

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.01.008

自分泌运动因子在肝细胞癌侵袭及转移中的作用*

徐金锴 李宗禹 苏清华 赵 军 马建仓[△]

(西安交通大学第二附属医院 陕西 西安 710004)

摘要 目的:探讨自分泌运动因子 (AMF) 在人肝细胞癌侵袭和转移中的作用。**方法:**人肝细胞系 LO2 和人肝细胞癌细胞株 MHCC97-H 作为实验材料,检测二者 AMF 的表达水平;设计并合成针对 AMF 基因序列的双链小干扰 RNA 转染高转移性人肝癌细胞株 MHCC97-H, Western blot 检测 AMF 基因的蛋白的表达水平;通过 MTT 实验检测转染后细胞的增殖力;通过体外 Transwell 小室对比沉默 AMF 基因前后的肝癌细胞的迁移力和侵袭力;最后用细胞悬液皮下接种小鼠,观察沉默 AMF 基因前后肝细胞的成瘤能力。**结果:**AMF 在 MHCC97-H 的表达量较高;将双链小干扰 RNA 转入 MHCC97-H 后,AMF 的表达显著降低 ($P < 0.05$);沉默 AMF 基因序列后,MHCC97-H 的增殖力、迁移力和侵袭力均有明显下降 ($P < 0.05$);用细胞悬液皮下接种小鼠沉默 AMF 基因的 MHCC97-H 形成的肿瘤体积小于对照组 ($P < 0.05$)。**结论:**AMF 基因可调节肝癌细胞的迁移和侵袭。

关键词:肝细胞癌;AMF;转移;侵袭

中图分类号:R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)01-32-04

The Effect of Autocrine Motility Factor on the Invasion and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma*

XU Jin-kai, LI Zong-yu, SU Qing-hua, ZHAO Jun, MA Jian-cang[△]

(The Second Affiliated Hospital Of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710004, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of autocrine motility factor invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma.

Methods: Human liver LO2 cells and human liver cancer MHCC97-H cells were used as the research object, and the protein expression levels of AMF was tested. Chemically synthesized siRNA duplex targeting the AMF gene (AMF-siRNA) was transiently transfected into MHCC97-H cells protein expression levels of AMF was detected by Western blot; Cell proliferation was determined by MTT experiment tests after transfection. The effect of AMF knockdown on cell invasion and migration was analyzed by Transwell chamber assays; With cell suspension finally subcutaneously vaccinated mice and observe silence before and after the AMF genetic liver cell into a tumor ability.

Results: The protein expression of AMF in MHCC97-H quantity was higher; Putting the small double-stranded SiRNA transfection into MHCC97-H, the protein expression of AMF significantly reduced ($P < 0.05$); After silence, AMF genetic sequences, MHCC97-H proliferation, migration and invasion forces were significantly decreased ($P < 0.05$); Using cell suspension subcutaneous inoculation of AMF gene in mice MHCC97-H formation of tumor size was smaller than the control group ($P < 0.05$). **Conclusions:** SiRNA-mediated silencing of AMF gene could significantly inhibit the cell invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Autocrine Motility Factor(AMF); Invasion; Metastasis

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)01-32-04

前言

在我国,肝细胞癌是一种常见的恶性程度高的肿瘤,外科手术切除法是治疗该病的有效方法之一,但多数患者在手术治疗前癌细胞已经开始转移或是扩散,故该病在手术后的复发率也较高^[1,2]。1986年,Liotta等从人黑色素瘤细胞株的血清培养基中分离、纯化出了一种由肿瘤细胞分泌出的细胞因子,该因子可以刺激肿瘤细胞的迁移和运动,被命名为自分泌运动因子 (autocrine motility factor, AMF)^[3,4]。研究表明恶性肿瘤细胞的转

移与 AMF 和 AMF-R 有关^[5,6]。本试验先对不同细胞中的 AMF 的表达进行了检测,其次沉默了高表达 AMF 的细胞,检测其在增殖力、迁移力和侵袭力是否有影响,最后通过建立鼠原位人肝细胞癌模型,评估 AMF 在肝细胞癌的进展和转移的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂

人肝细胞癌细胞株 MHCC97-H 和人肝细胞株 LO2 为西安交通大学基础医学院癌症研究所保存提供,小白鼠购于第四

* 基金项目:陕西省科学技术厅基金项目(2014K11-03-03-16)

作者简介:徐金锴(1973-),硕士研究生,主治医师,主要研究方向:甲状腺疾病, E-mail: 13572880966@163.com, 电话: 13572880966

[△] 通讯作者:马建仓(1972-),副教授,副主任医师,主要研究方向:腺体疾病及血管疾病, E-mail: majiancangery@163.com

(收稿日期:2016-08-08 接受日期:2016-08-29)

军医大学, DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司, 胰酶购自 Sigma 公司, 胎牛血清购自 Gibco, TRIzol 和 Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司, Negative control 购自上海吉玛生物有限公司, 小鼠抗人 AMF 抗体购自 Abcam 公司, Transwell 小室购自 Millipore 公司, Matrigel 胶购自美国 BD 公司。

1.2 LO2 和 MHCC97-H 细胞株的复苏和培养

取出保存于液氮罐中细胞, 迅速在 37 °C 水浴融化, 随后低速离心 (1000 rpm, 5 min), 悬浮培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中 (MHCC97-H 需要高糖 DMEM), 置于恒温培养箱 (37 °C, 5% CO₂) 中培养。待细胞融合度达到 70-80% 时, 用 0.25% 的胰酶消化, 并加入完全培养基中和, 此后按 1:3 进行传代培养。

1.3 蛋白质免疫印迹 (Western Blot) 检测肿瘤细胞中 AMF 的表达水平

收集两种细胞提取膜蛋白, 蛋白样品采用 Bradford 法测定总蛋白含量。根据蛋白样品的浓度, 计算出每孔中蛋白质样品的体积。SDS-PAGE 电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h, 加入小鼠抗人 AMF 抗体 (1:1000 稀释), 4 °C 过夜孵育, TBST 漂洗 10 min, 共三次, 用 HRP 标记的羊抗鼠二抗 (1:10000 稀释), 室温孵育 2 h, 用 ECL 发光试剂盒曝光, 观察结果。

1.4 siRNA 的合成

上海吉玛生物有限公司化学合成 3 条针对 AMF 序列的 siRNA, 我们从中筛选出一条有效的 siRNA 序列, 正义链: 5'-UAAAGAUGGGGAAACUGAGGU-3', 反义链: 5'-CUCAGU-UCCCCAUCUUUAGA-3', 用 Free-Rnase 水稀释干粉 siRNA, 最终浓度为 20 μmol/L。

1.5 细胞培养及 siRNA 瞬时转染

取对数生长期的细胞胰酶消化、计数, 接种于 6 孔板, 每孔细胞数为 1.5×10^5 个, 24 h 后细胞密度达到 60%, 参照 Lipofectamine™2000 说明书进行瞬时转染。实验分 3 组: 只加 Lipofectamine™2000 的空白对照组; 加入非特异性 siRNA/Lipofectamine™2000 复合物的阴性对照组; 加入 AMF 特异性 siRNA/Lipofectamine™2000 复合物实验组, 筛选出成功转染的细胞株, 然后用 Western blot (方法同 1.3) 检测 AMF 的表达情况。

1.6 MTT 细胞增殖试验

将三组细胞用胰蛋白酶消化成单细胞后, 接种于 96 孔板, 并将每孔的细胞数调整为 1×10^4 个; 刚贴壁记为 0 h, 在随后的 24 h、48 h、72 h、96 h 后加入 20 μL MTT 溶液 (5 mg/mL), 各组细胞再培养 4 h, 加入 DMSO 后震荡 10 min, 用酶标仪测定 OD 值, 绘制细胞生长曲线。

1.7 细胞迁移和侵袭试验

细胞迁移实验将三组细胞培养 24 h 后, 胰蛋白酶进行消化, 并用无血清 DMEM 将细胞密度调整为 1×10^5 /mL, 取 200 μL 加入 Transwell 上室 (无 Matrigel 包被上室聚碳酸酯滤膜, 滤膜孔径为 8 μm), 再取 600 μL 含 20% 胎牛血清 DMEM 培养液, 每个样品做三组重复, 37 °C 细胞培养箱内培养 24 h 后取出小室, 小心擦掉上室未迁移的细胞, 用 PBS 轻轻洗 3 次, 乙醇固定, 结晶紫染色显微镜下计数 5 个视野穿过微孔的细胞数, 求取平均值。

细胞侵袭实验: Transwell 上室用 Matrigel 包被上室聚碳酸酯滤膜, 滤膜孔径为 8 μm, 其余步骤同细胞迁移实验。

1.8 原位肿瘤模型的建立

将 MHCC97-H 和转染 AMF-siRNA 的 MHCC97-H 细胞在体外培养至对数期以后, 调整细胞密度至 1×10^7 个/mL, 将小鼠随机分为 2 组, 每组 10 只小鼠, 一组皮下注射 MHCC97-H 细胞悬液 0.5 mL, 一组皮下注射 AMF-siRNA 的 MHCC97-H 细胞悬液 0.5 mL, 随后将两组小鼠置于相同的生长环境下培养 35 d, 解剖小鼠, 比较其肿瘤大小。

1.9 统计学处理

数据统计处理采用统计学软件 SPSS17.0 软件完成, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LO2, MHCC97-H 细胞中 AMF 的蛋白表达水平

采用 Western-blot 法分析 LO2、MHCC97-H 细胞中 AMF 蛋白的表达。根据实验可以得出 MHCC97-H 细胞中 AMF 的蛋白水平明显高于 LO2 细胞中 ($P < 0.05$, 图 1)。

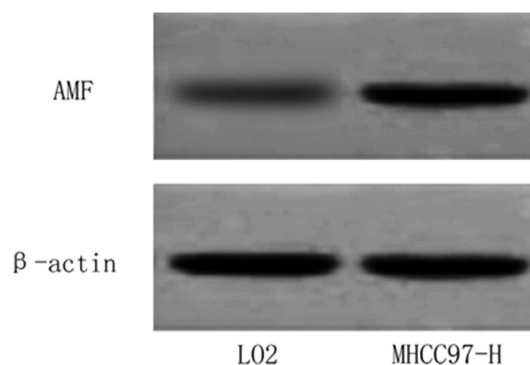


图 1 LO2, MHCC97-H 细胞中 AMF 的蛋白表达

Fig.1 Protein expressions of AMF in LO2 and MHCC97-H

2.2 转染后的 MHCC97-H 蛋白水平的变化

实验组 AMF 基因的蛋白水平明显下调, 而空白对照和阴性对照组无明显差异, 说明 AMF 基因被沉默 ($P < 0.05$, 图 2)。

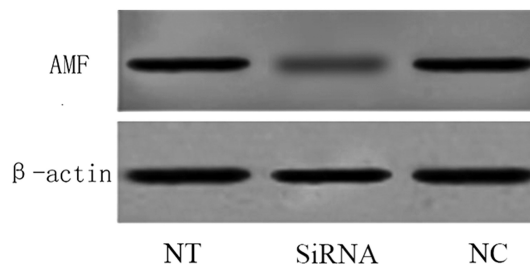


图 2 转染后的 MHCC97-H 蛋白水平的变化

Fig.2 Protein expressions of AMF transfection into MHCC97-H

2.3 AMF 对 MHCC97-H 细胞的增殖能力的影响

在 0-24 h 时, 三组细胞的增殖速度无明显差异 ($P > 0.05$); 在 48 h 后, 转染后的细胞增殖速度与空白对照组和阴性对照组存在明显差异 ($P < 0.05$), 而空白对照组和阴性对照组无明显差异 ($P > 0.05$, 图 3)。

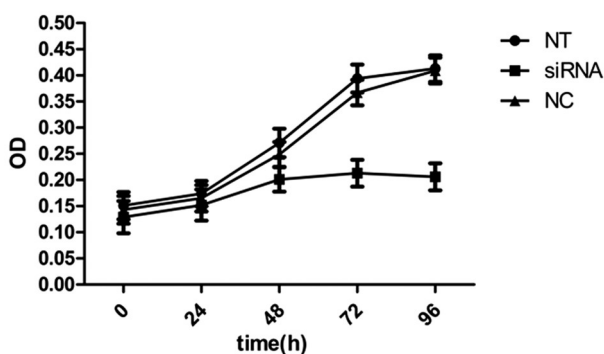


图3 转染 AMF-siRNA 对 MHCC97-H 细胞的增殖能力的影响

Fig.3 Effects of AMF Silencing On Proliferation in MHCC97-H

2.4 沉默 AMF 基因对 MHCC97-H 细胞迁移能力的影响

对实验组、空白对照组和阴性对照组穿过 Transwell 小室的细胞数进行方差分析,结果显示:实验组穿过 Transwell 小室的细胞数明显减少($P < 0.05$),而空白对照组和阴性对照组无明显差异($P > 0.05$),说明沉默 AMF 基因后,细胞运动迁移能力下降(图 4)。

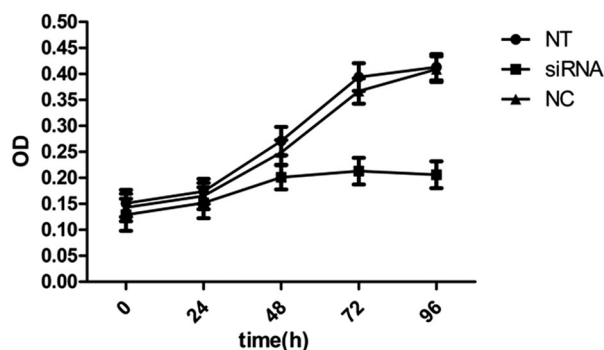


图4 沉默 AMF 对 MHCC97-H 细胞迁移能力影响

Fig.4 Migration of MHCC97-H cells affected by silencing of AMF

2.5 沉默 AMF 基因后 MHCC97-H 细胞侵袭能力的变化

对实验组、空白对照组和阴性对照组穿过的细胞数进行方差分析,结果显示:实验组穿过的细胞数明显减少($P < 0.05$),而空白对照组和阴性对照组无明显差异 ($P > 0.05$),说明沉默 AMF 基因后,细胞运动侵袭能力下降(图 5)。

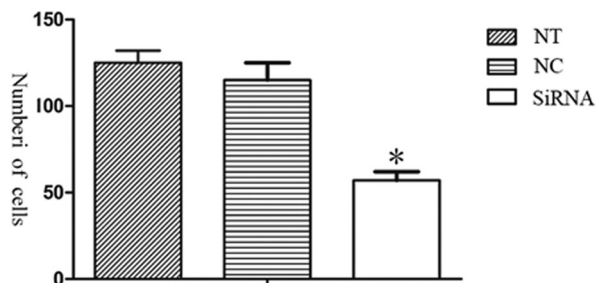


图5 沉默 AMF 对 MHCC97-H 细胞侵袭能力影响

Fig.5 Invasion of MHCC97-H cells affected by silencing of AMF

2.6 沉默 AMF 基因后肿瘤模型建立情况

对比 35 d 后三组小鼠皮下肿瘤形成的大小情况,结果显示:沉默 AMF 基因后的 MHCC97-H 组肿瘤形成的大小显著低于 MHCC97-H 组($P < 0.05$,图 6)。

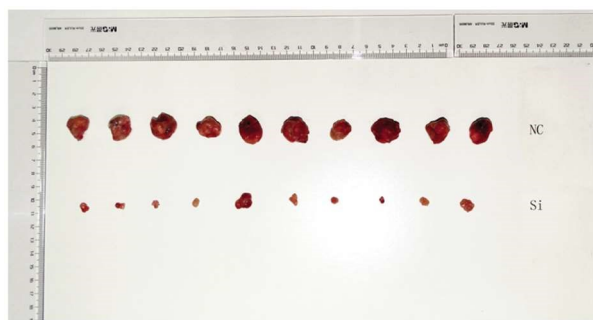


图6 35 d 后肿瘤大小对比

Fig.6 Comparison of tumor size after 35 d

3 讨论

目前,治疗肝癌的方式主要有手术切除法、肝脏移植法、免疫治疗法、化学治疗法等,但这些方法基本上都无法根治肝癌,接受治疗的患者复发率也是比较高,严重影响肝癌患者的生存^[7-9]。由于我们对肝癌的复发和转移的机制分子机制不完全了解,因此对其预防和治疗的效果十分有限^[10,11]。

1986 年,有人从人黑色素瘤细胞的血清培养基中分离纯化出一种细胞因子,命名为自分泌运动因子(autoocrine motility factor, AMF),该因子与肿瘤细胞的转移和侵袭有着较为密切的关系^[12-15]。AMF 是一个家族,从不同的细胞分离纯化出来 AMF 的分子量是不相同的,而且 AMF 存在还原状态和非还原状态两种状态。肿瘤细胞和正常细胞都可以表达 AMF,但肿瘤细胞中的 AMF 呈过表达的状态。AMF 分布在整个细胞的细胞质中,并不是只存在于细胞的某一特殊的细胞骨架网中^[16-18]。有研究表明 AMF 首先与其受体结合,使受体磷酸化,之后激活一种叫做百日咳毒素敏感的 G 蛋白,来刺激肌醇蛋白,从而促使癌细胞发生运动^[19,20]。肝癌是一种比较容易复发和转移的癌症,AMF 在肝癌细胞的迁移和侵袭的过程中是否扮演重要的角色尚不明确^[21]。为此,本试验先对比正常细胞和肝癌细胞中 AMF 的表达量,随后沉默了高转移性的肝癌细胞株中 AMF,观察沉默 AMF 基因后,其迁移力和侵袭力的变化,来说明 AMF 在肝癌细胞的转移和侵袭中是否有这重要作用,最后在小鼠皮下进行肿瘤实验,来验证 AMF 对肿瘤的生长影响。

本研究结果显示肝癌细胞中的 AMF 表达量明显高于正常的肝细胞,提示其可能与肝细胞癌的发生相关。本试验合成了针对 AMF 的 siRNA 并将其转染到 MHCC97-H 细胞中,结果显示:沉默 AMF 基因后, MHCC97-H 的增殖力、迁移力和侵袭力都有明显下降,说明 AMF 基因与肝癌细胞的转移和侵袭有密切的关系;最后用其建立的小鼠肿瘤模型,结果显示转染后的 MHCC97-H 形成的肿瘤明显小于未转染时形成的肿瘤。由此可见,沉默 AMF 基因可以抑制高转移性的肝癌细胞系 MHCC97-H 的增殖力、迁移力和侵袭力,并且可以减缓肿瘤形成的速度。

综上所述,AMF 在肝癌的发生和发展中扮演重要角色。但是 AMF 在肝癌的形成和发展中的分子学机制和调控机制,以及整个发生和发展过程中是否还有其他细胞因子参与都需要进行下一步的深入研究。

参 考 文 献(References)

- [1] Giuseppe Lucarelli, Monica Rutigliano, Francesca Sanguedolce, et al. Increased Expression of the Autocrine Motility Factor is Associated With Poor Prognosis in Patients With Clear Cell-Renal Cell Carcinoma[J]. *Medicine*, 2015, 94(46): 420-423
- [2] Peer CJ, Sissung TM, Figg WD. CHIP and gp78-mediated ubiquitination of CYP3A4: Implications for the pharmacology of anticancer agents[J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11(6): 549-551
- [3] Yingchao Wang, A Lina Ma, Chunmei Wang, et al. Autocrine motility factor receptor promotes the proliferation of human acute monocytic leukemia THP-1 cells [J]. *International Journal of Molecular Medicine*. 2015, 36(3): 627-632
- [4] Yiran Li, Qi Che, Yiding Bian, et al. Autocrine motility factor promotes epithelial-mesenchymal transition in endometrial cancer via MAPK signaling pathway [J]. *International Journal of Oncology*, 2015, 47(3): 3091
- [5] Han T, Kang D, Ji D, et al. How does cancer cell metabolism affect tumor migration and invasion?[J]. *Cell Adh Migr*, 2013, 7(5): 395-403
- [6] Li Yang, Tang Ning, Liu Zhe-yu, et al. Effects of Autocrine Motility Factor (AMF) on the Migration and Invasion of Glioblastoma U251 Cells and Their Mechanism [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2016, 38(4): 369-374
- [7] Han T, Kang D, Ji D, et al. How does cancer cell metabolism affect tumor migration and invasion?[J]. *Cell Adh Migr*, 2013, 7(5): 395-403
- [8] Niinaka Y, Harada K, Fujimuro M, et al. Silencing of autocrine motility factor induces mesenchymal-to-epithelial transition and suppression of osteosarcoma pulmonary metastasis [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(22): 9483-9493
- [9] Effendi K, Mori T, Komuta M, et al. Bmi-1 gene is upregulated in early stage hepatocellular carcinoma and correlates with ATP-binding cassette transporter B1 expression[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101: 666-667
- [10] Nakajima K, Yanagawa T, Watanabe H, et al. Hyperthermia reduces migration of osteosarcoma by suppression of autocrine motility factor [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(6): 1953-1958
- [11] Jiang WG, Raz A, Douglas JA, et al. Expression of autocrine motility factor(AMF) and its receptor AMFR in human breast cancer[J]. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54: 231-241
- [12] Xue W, Chen S, Yin H, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver[J]. *Nature*, 2014, 514: 380-384
- [13] Li L, Wang H. Heterogeneity of liver cancer and personalized therapy [J]. *Cancer Lett*, 2015, 7: 3834-3835
- [14] Chen JG, Zhang SW. Liver cancer epidemic in China: Past, present and future[J]. *Semin Cancer Biol*, 2011, 21: 59-69
- [15] Yamamoto K, Imamura H, Matsuyama Y, et al. AFP, AFP-L3, DC-Pand GP73 as markers for monitoring treatment response and recurrence and as surrogate markers of clinicopathological variables of HCC[J]. *Journal of Gastroenterology*, 2010, 45(12): 1272-1282
- [16] Dobashi Y, Watanabe H, Sato Y, et al. Differential expression and pathological significance of autocrine motility factor/glucose-6-isomerase expression in human lung carcinomas [J]. *J Pathol*, 2006, 210(4): 431-440
- [17] Chiu CG, St Pierre P, Nabi IR, et al. Autocrine motility factor or receptor: a clinical review [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2008, 8(2): 207-217
- [18] Jiang WG, Raz A, Douglas-Jones A, et al. Expression of autocrine motility factor (AMF) and its receptor AMFR, in human breast cancer[J]. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54(2): 231-241
- [19] Kojic LD, Wiseman SM, Ghaidi F, et al. Raft-dependent endocytosis of autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase: a potential drug delivery route for tumor cells [J]. *PLOS One*, 2008, 3(10): e3597-e3604
- [20] Haga A, Komazaki S, Funasaka T, et al. AMF/G6PI induces differentiation of leukemia cells via an unknown receptor that differs from gp78[J]. *Leuk Lymphoma*, 2006, 47(10): 2234-2243
- [21] Yamamoto K, Imamura H, Matsuyama Y, et al. AFP, AFP-L3, DCP, and GP73 as markers for monitoring treatment response and recurrence and as surrogate markers of clinicopathological variables of HCC[J]. *Journal of Gastroenterology*, 2010, 45(12): 1272-1282
- [16] Littlepage LE, Sternlicht MD, Rouquier N, et al. Matrix metalloproteinases contribute distinct roles in neuroendocrine prostate carcinogenesis, metastasis, and angiogenesis progression [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(6): 2224-2234
- [17] Guzinska U, Stymowicz K. MMP and cathepsin B expression in tumor budding as an indicator of a more aggressive phenotype of colorectal cancer(CRC)[J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(2B): 1589-1594
- [18] Katayama A, Bando N, Kishibe K, et al. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(2): 634-640
- [19] Ueda M, Terai Y, Kumagai K, et al. Vascular endothelial growth factor C gene expression is closely related to invasion phenotype in gynecological tumor cells[J]. *Gynecol Oncol*, 2001, 82(1): 162-166
- [20] Levy AT, Cioce V, Sobel ME, et al. Increased expression of the Mr 72,000 type IV collagenase in human colonic adenocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 1991, 51(1): 439-444
- [21] Maurel J, Nadal C, Garcia-Albeniz X, et al. Serum matrix metalloproteinase 7 levels identifies poor prognosis advanced colorectal cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(5): 1066-1071

(上接第 50 页)

Deng Wei-kang. Significance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in colorectal cancer [J]. *Chinese Journal of Laboratory Diagnosis*, 2013, 17(11): 2038-2039

- [12] Shiomi T, Inoki I, Kataoka F, et al. Pericellular activation of proMMP-7 (promatrilysin-1) through interaction with CD151 [J]. *Lab Invest*, 2005, 85(12): 1489-1506
- [13] Salem N, Kamal I, Al-Maghrabi J, et al. High expression of matrix metalloproteinases: MMP-2 and MMP-9 predicts poor survival outcome in colorectal carcinoma[J]. *Future Oncol*, 2016, 12(3): 323-331
- [14] Amalinei C, Carontu ID, Giusca SE, et al. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2010, 51(2): 215-228
- [15] Hahne JC, Okuducu AF, Kaminski A, et al. Ets-1 expression promotes epithelial cell transformation by inducing migration, invasion and anchorage-independent growth [J]. *Oncogene*, 2005, 24(34): 5384-5388
- [16] Littlepage LE, Sternlicht MD, Rouquier N, et al. Matrix metalloproteinases contribute distinct roles in neuroendocrine prostate carcinogenesis, metastasis, and angiogenesis progression [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(6): 2224-2234