

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.22.024

肝癌组织和细胞系 PML 蛋白表达及 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对其表达的调节作用\*金世龙,谭智明<sup>△</sup>,张鹏,匡远黎,杜波,唐华明,王郑,杜之明

(重庆市开县人民医院肝胆外科 405400)

**摘要:**目的 观察肝癌(HCC)组织及细胞系 PML 蛋白表达和三氧化二砷(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)对 HCC PML 蛋白表达的调节作用。方法 免疫组织化学法检测不同分化程度 HCC 组织 PML 蛋白表达水平,Western blot 分析 12 例 HCC 患者的癌组织,和 HuH7、HepG2、Hep3B、SMMC-7721、MHC97H 等 5 种 HCC 细胞系 PML 蛋白表达情况。观察低浓度 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理 72~96 h 后,HuH7、HepG2、Hep3B、SMMC-7721、MHC97H 细胞 PML 蛋白表达变化。结果 免疫组织化学染色显示,HCC 组织中细胞核、细胞质均有不同程度 PML 蛋白表达,细胞内分布不均匀。高分化、中分化和低分化 HCC 组织 PML 蛋白表达差异不明显。Western blot 分析发现 12 例 HCC 组织均有不同程度 PML 蛋白表达,而且各例 HCC 的 PML 蛋白表达量不同。HuH7、HepG2、Hep3B、SMMC-7721 和 MHC97H 等 5 种细胞系均表达 PML 蛋白,而且 PML 蛋白灰度相差很小。HuH7、HepG2、Hep3B、SMMC-7721、MHC97H 经过 0.25 μg/mL 的 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 培养 72~96 h 后 PML 蛋白表达明显减少,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 可以下调肝癌细胞 PML 蛋白表达。结论 HCC 组织和细胞系存在 PML 蛋白表达,而且 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 可以调控肝癌细胞 PML 蛋白表达,PML 蛋白可能是 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 治疗肝癌的靶分子。

关键词:肝细胞癌;PML 蛋白;As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

中图分类号:R735.7

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)22-2897-03

The PML protein expression of hepatocellular carcinoma and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> regulated its expression\*Jin Shilong, Tan Zhiming<sup>△</sup>, Zhang Peng, Kuang Yuanli, Du Bo, Tang Huaming, Wang Zheng, Du Zhiming

(Department of Hepaticbiliary Surgery, Kaixian People's Hospital, Chongqing 405400, China)

**Abstract:** Objective To observe the PML protein expression of hepatocellular carcinoma tissue and cells lines and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> regulate its expression. Methods Immunohistochemistry was used to examine the PML protein expression of hepatocellular carcinoma tissue. Western blot analysis were used to observe PML protein expression of hepatocellular carcinoma tissue of 12 cases, 5 hepatocellular carcinoma cell lines, such as HuH7, HepG2, Hep3B, SMMC-7721, MHC97H. Western blot analysis was used to detected the PML protein expression of these hepatocellular carcinoma cell lines after 72-96 h treated with 0.25 μg/mL of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Results Immunohistochemical staining showed that the PML protein was expressed in both cytoplasm and nucleus, did not well-distributed in hepatocellular carcinoma cells. There was no significant differences of PML protein expressed among differently differentiated stages of hepatocellular carcinoma cells. Western blot analysis found that hepatocellular carcinoma tissues of 12 cases with hepatocellular carcinoma expressed PML protein, and there was significant difference of PML protein expressed among 12 cases suffer with hepatocellular carcinoma, hepatocellular carcinoma cell lines, such as HuH7, HepG2, Hep3B, SMMC-7721 and MHC97H all expressed PML protein, and there was little difference of PML protein expressed among hepatocellular carcinoma cell lines. The PML protein expression of HuH7, HepG2, Hep3B, SMMC-7721 and MHC97H cell after 72-96 h treated with 0.25 μg/mL of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> significant decreased. Conclusion Hepatocellular carcinoma tissue and cells may express PML protein, and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> may regulate this protein expression as well. PML protein may be the target molecule of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> treating HCC.

Key words: hepatocellular carcinoma; PML protein; arsenic trioxide

肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全世界常见的恶性肿瘤之一,中国为 HCC 高发区,其发生率占世界的 50%。HCC 不仅手术切除率低于 50%,癌肿切除后易于复发和转移,5 年存活率只有 10%~20%<sup>[1-2]</sup>。三氧化二砷(arsenic trioxide, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)是剧毒中药砒霜的主要成分,20 世纪 70 年代以来,学者用 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 治疗急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukaemia, APL)取得了世人瞩目的突破性进展。近来应用 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 治疗实体肿瘤的实验和临床研究受到广泛重视,2004 年国家食品药品监督管理局(SFDA)批准 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 用于治疗晚

期 HCC,显示出其更为广范的应用前景<sup>[3-4]</sup>。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 是否与其治疗 APL 的机制一样,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 直接靶向降解 HCC 细胞 PML 蛋白,抑制 HCC 细胞生长和杀死 HCC 细胞,仍不清楚。鉴于目前几乎缺乏 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 治疗 HCC 可能通过干预 PML 蛋白表达的研究,在此重点研究 HCC 组织、5 种 HCC 细胞系 PML 蛋白表达及 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 HCC 细胞系 PML 蛋白表达的调控作用,确定 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 治疗 HCC 的分子基础。

## 1 材料与方法

1.1 材料 HuH7、HepG2、Hep3B、SMMC-7721、MHC97H

由第三军医大学西南医院肝胆科和病理科赠送, NB4 细胞由重庆医科大学生命科学研究院赠送。DMEM 培养基和胎牛血清为 Hyclone 产品, RPMI-1640 培养基为 IVD 产品, PML 多抗购自山达公司。HCC 组织取自 HCC 切除的组织标本。

**1.2 HCC 细胞培养及 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理** HuH7、HepG2、Hep3B、SMMC-7721、MHC97H 细胞在 10% FBS 的 DMEM 培养液, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱孵育, 细胞汇合度达到 70%~80% 时以 0.25% 胰酶消化, 收集细胞提取细胞总蛋白。对照 NB4 细胞在 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱孵育, 收集细胞提取细胞总蛋白。HCC 细胞长至 30%~50% 时, 将 DMEM 培养液配成终浓度为含 0.25 μg/mL As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 继续培养, 细胞汇合度达到 70%~80% 时以 0.25% 胰酶消化, 继续培养 72~96 h, 0.25% 胰酶消化, 收集细胞提取细胞总蛋白。

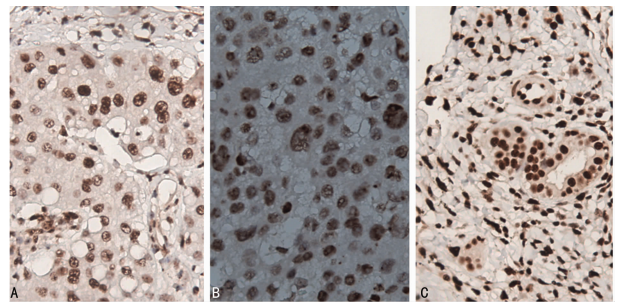
**1.3 HCC 细胞和组织 PML 蛋白表达检测** (1) 细胞总蛋白提取: HCC 细胞常规胰酶消化制成细胞悬液, 细胞数 1.0×10<sup>6</sup> 细胞, 1 500 r/min 离心 5 min, 移入 1.5 mL EP 管, PBS 洗 2 次。细胞悬液离心后吸上清液, 加入蛋白酶抑制剂的裂解液 200 μL, 冰上裂解 30 min, 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min, 上清液移入 EP 管, 蛋白定量后蛋白上样缓冲液稀释, 煮 3 min, 置 -70 °C 备用。(2) HCC 组织总蛋白提取: 切取 HCC 组织(癌肿边缘), 称取 100 mg HCC 加入预冷 500 μL 细胞裂解液, 冰上玻璃匀浆器碾磨消冰上裂解 30 min, 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min, 上清液移入 EP 管, 蛋白定量后蛋白上样缓冲液稀释, 煮 3 min, 置 -70 °C 备用。(3) Western blot 检测 PML 蛋白表达: 配置 10% 分离胶和 4% 积层胶。上样量为每泳道 50 μg, 体积 25~30 μL。电泳, 积层胶电压 80 V, 分离胶电压 100~120 V, 电泳 2~3 h。切胶后 PADV 膜向正极, 胶在负极, 将滤纸、PVDF 膜及凝胶整齐重叠后放在湿转槽、电流 150 mA 转移 90 min。取下 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉 PBS 封闭, 室温振摇 1~2 h。将封闭的膜滴加一抗按 1:100 (3% BSA), 4 °C 湿盒内过夜, 次日 PBS 漂洗 15 min×1 次, 5 min×4 次, 二抗按 1:2 500 (3% BSA), 25 °C 振摇 1 h, PBS 漂洗 15 min×1 次, 5 min×4 次。混合等体积 A 液和 B 液 (各 500 μL, 共 1 mL), 将显色剂滴加到 PVDF 膜正面, 开始显色记录图像。

**1.4 免疫组织化学检测 HCC 组织 PML 蛋白表达** 石蜡包埋的肝组织做超薄切片, 贴附于有粘胶的载玻片上, 进行下列步骤处理: (1) 切片脱蜡至水, PBS 洗 5 min×2 次; (2) 甲醇-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理切片室温 20 min, PBS 洗 5 min×3 次; (3) 枸橼酸缓冲液微波中火 5 min 修复, PBS 洗 5 min×3 次; (4) 滴加 PML 抗体, 4 °C 过夜; (5) PBS 洗 5 min×3 次, 滴加增敏剂, 37 °C, 35 min; (6) PBS 洗 5 min×3 次, 滴加二抗, 37 °C, 35 min; (7) PBS 洗 5 min×3 次, DAB 显色 10 min, 镜下观察显色情况; (8) 水洗终止显色后, 苏木素衬染 15~30 s; (9) 脱水、封片。镜下观察照像。HCC 按高、中及低分化 PML 免疫组织化学染色。结果判定: 阴性对照不着色, DAB 染色呈棕黄色颗粒为表达阳性。

## 2 结 果

**2.1 免疫组织化学染色显示 HCC 组织存在 PML 蛋白表达** 12 例肝癌组织 PML 免疫组织化学染色显示, HCC 细胞核、细胞质均有不同程度表达, 细胞质分布不均匀。高分化、中分

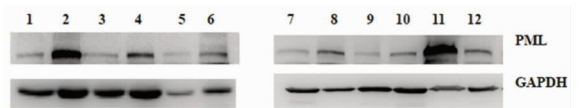
化和低分化 HCC 组织 PML 蛋白表达差异不明显 (图 1)。



A: 高分化 HCC; B: 中分化 HCC; C: 低分化 HCC。

图 1 3 种分化程度 HCC 组织 PML 蛋白表达 (×200)

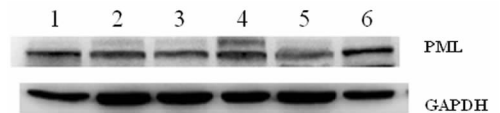
**2.2 Western blot 检测显示 HCC 组织 PML 蛋白表达** 既往的研究没有分析 HCC 组织是否表达 PML 蛋白, 误认为癌细胞不表达 PML 蛋白。为了弄清楚 HCC 组织是否有 PML 蛋白表达及 PML 表达与分化程度的关系, 试验中 Western blot 检测发现 12 例 HCC 组织均有不同程度 PML 蛋白表达, 而且各例 HCC 的 PML 蛋白表达量不同, 高分化 (图 2 11 泳道) 和低分化程度 (图 2 2 泳道) HCC 均可以高表达 PML 蛋白 (图 2)。



1~4: 低分化 HCC; 5~8: 高分化 HCC; 9~12: 中分化 HCC。

图 2 12 例 HCC 组织 PML 蛋白表达

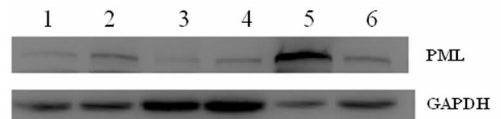
**2.3 5 种 HCC 细胞均表达 PML 蛋白** Western blot 检测发现 HCC 细胞 HuH7、HepG2、Hep3B、SMMC-7721、MHC97H 等 5 种细胞系均表达 PML 蛋白, 而且 PML 蛋白灰度相差不大 (图 3), 为了排除假阳性, 选 NB4 细胞做阳性对照。



1: NB4; 2: HuH7; 3: SMMC-7721; 4: HepG2; 5: Hep3B; 6: MHC97H。

图 3 5 种 HCC 细胞系和 NB4 细胞 PML 蛋白表达

**2.4 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 降低 HCC 细胞 PML 蛋白表达** HuH7、HepG2、Hep3B、SMMC-7721、MHC97H 经过终浓度 0.25 μg/mL 的 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 培养 72~96 h 后 PML 蛋白表达明显减少, 显示 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 可以下调 HCC 细胞 PML 蛋白表达 (图 4)。



1: Hep3B; 2: HepG2; 3: SMMC-7721; 4: MHC97H; 5: HuH7 (未经 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理); 6: HuH7。

图 4 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理 72 h 后 HCC 细胞 PML 蛋白表达

## 3 讨 论

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 是剧毒中药砒霜的主要成分, 自 20 世纪 70 年代以来, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 治疗 APL, 治愈率达到 95%。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 是致癌剂, 传

统中医长期积累经验证明也有治疗癌症的作用,中医称之为“以毒攻毒”。研究显示,PML 基因不仅维持造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)稳定,而且是维持慢性白血病(chronic myeloid leukaemia, CML) LICs 稳定所必需的。 $As_2O_3$  可逆性降低 HSCs 的 PML 表达,依赖  $As_2O_3$  的 PML 下调是治疗 APL 和根除 LICs 的有效途径<sup>[5]</sup>。PML 缺失使 HSCs 失去休眠状态,再次进入细胞周期,长期作用将使 HSCs 耗竭<sup>[6]</sup>。Ito 等<sup>[5]</sup>发现抑制 PML 基因可以激活 CML 患者体内 LICs,使其变得容易受化疗药物攻击。PML 蛋白表达活跃的患者,其体内 LICs 基本上都处于休眠状态( $G_0/G_1$  期),抗癌药物难以对它们发挥作用。白血病鼠去除 PML 基因后,LICs 变得活跃,提示 PML 基因可维持 LICs 稳定。白血病实验鼠先服  $As_2O_3$ ,再用抗癌药物治疗,实验鼠体内 LICs 及白血病细胞全部消失,白血病没有复发,显示  $As_2O_3$  对白血病 LICs 有清除作用。2010 年张小伟等研究结果显示,APL 细胞 PML-RAR 融合蛋白和 PML 蛋白的 RBCC 结构域锌指结构的半胱氨酸残基与 Arsenic 结合,诱导 PML 聚合,再与 SUMO 和 UBC9 结合增加相互作用,导致增强 SUMO 泛素化和 PML 及 PML-RAR 蛋白降解,LICs 及 APL 细胞被清除,首次阐明  $As_2O_3$  降解 PML-RAR 和 PML 蛋白,靶向治疗 APL 的分子机制<sup>[6]</sup>。研究显示, $As_2O_3$  与邻近半胱氨酸结合,增加活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生,ROS 引起 PML 分子间二硫化物形成,并与 Arsenic 直接结合,形成与核体(nuclear bodies, NBs)有关 PML 多聚体 Nuclear Matrix,进而多聚体泛素化降解,NBs 也随之解体,PML-NBs 上的多种核转录因子失去发挥功能平台,这些转录因子与细胞分化有关<sup>[7]</sup>。近期 Maroui 等<sup>[8]</sup>研究进一步证实  $As_2O_3$  主要诱导细胞核 PML 蛋白降解,细胞核 PML-NBs 参与细胞增殖和分化,细胞质 PML Ⅶ无明显变化。

近年来国内学者用  $As_2O_3$  对 HCC 患者、HCC 细胞株和其他癌进行抗肿瘤治疗,研究结果显示  $As_2O_3$  具有明显抑制 HCC 增殖、细胞周期阻滞和诱导癌细胞凋亡的作用。然而,对  $As_2O_3$  治疗 HCC 分子机制局限于抑制癌细胞增殖、诱导癌细胞凋亡,不清楚具体分子途径。 $As_2O_3$  治疗 APL 时,在于 Arsenic 直接与癌蛋白 PML-RAR 结合,使癌蛋白降解后 APL 细胞及 LICs 死亡,95% APL 患者治愈。 $As_2O_3$  治疗 HCC 是否也通过 PML 蛋白呢,无相关研究报告。目前缺乏 HCC 组织及细胞株表达 PML 蛋白实验证据,就认为白血病细胞才可能表达 PML 蛋白。甚至有研究者先在 HCC 细胞转染 PML 基因,表达 PML 蛋白后,再用  $As_2O_3$  处理 HCC<sup>[9]</sup>。

本组免疫组织化学检测显示,临床 12 例 HCC 组织(高分化 4 例、中分化 4 例和低分化 4 例),不同程度表达 PML 蛋白(图 1)。Western blot 检测结果显示 12 例 HCC 组织均有不同程度 PML 蛋白表达,而且各例 HCC 的 PML 蛋白表达量不同,高分化(例 11)和低分化程度(例 2)HCC 均可以高表达 PML 蛋白(图 2)。本研究的 Western blot 结果还显示 HCC 细胞系 HepG2、HuH7、Hep3B、SMMC-7721、MHC97H 均表达 PML 蛋白,并且用 NB4 做阳性对照(图 3),排除假阳性,这些结果首次证实 HCC 组织和细胞系可以表达 PML 蛋白。

为了解  $As_2O_3$  可否降低 HCC 细胞系 HuH7 细胞 PML 蛋白表达,早期实验发现 HuH7 细胞表达 PML 蛋白,0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $As_2O_3$  持续处理 HuH7 细胞 5 d,PML 蛋白表达显著降低,首次证实 HuH7 细胞表达 PML 蛋白和  $As_2O_3$  显著下调 HuH7 细胞 PML 蛋白表达<sup>[10]</sup>。本组 HuH7、HepG2、Hep3B、SMMC-7721、MHC97H 细胞经过终浓度 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的  $As_2O_3$  培养 72~96 h 后 PML 蛋白表达明显减少,显示  $As_2O_3$  可以下调 HCC 细胞 PML 蛋白表达(图 4),进一步证实这 5 种 HCC 细胞系不仅可以表达 PML 蛋白,而且低浓度  $As_2O_3$  处理 HCC 细胞可以调控 PML 蛋白表达。作者前期研究结果显示, $As_2O_3$  不仅显著下调 HuH7 细胞 PML 蛋白表达,而且还可以增加对化疗药物的敏感性和抑制 HuH7 细胞形成肿瘤球能力, $As_2O_3$  可能诱导  $CD13^+ CD133^+ LCSCs$  分化,可以清除 LCSCs,达到治愈 HCC 的目的<sup>[10]</sup>。本研究结果提示, $As_2O_3$  治疗肝癌可能与 PML 蛋白表达有关,为进一步研究治疗 HCC 的分子机制和临床应用提供了理论基础。

#### 参考文献:

- [1] Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2003, 362(9399): 1907-1917.
- [2] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.
- [3] 刘佳, 张大方, 李超英. 三氧化二砷的抗肝癌作用研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2008, 24(3): 252-253.
- [4] 刘小敏, 梁晓秋, 张杨, 等. 三氧化二砷对人肝癌 HepG2 细胞内活性氧水平的影响 [J]. 肿瘤学杂志, 2009, 15(3): 229-231.
- [5] Ito K, Bernardi R, Morotti A, et al. PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells [J]. Nature, 2008, 453(7198): 1072-1078.
- [6] Zhang XW, Yan XJ, Zhou ZR, et al. Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RAR oncoprotein by directly binding PML [J]. Science, 2010, 328(5975): 240-243.
- [7] Jeanne M, Breitenbach VL, Ferhi O, et al. The PML/RARA oxidation and arsenic binding initiate the antileukemia response of  $As_2O_3$  [J]. Cancer Cell, 2010, 18(1): 88-98.
- [8] Maroui MA, Kheddache-Atmane S, EI Asmi F, et al. Requirement of PML SUMO interacting motif for RNF4-or arsenic trioxide-induced degradation of nuclear PML isoforms [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44949.
- [9] Cui L, Zhang S, Zhang W, et al. Arsenic trioxide and promyelocytic leukemia protein-adenovirus synergistically inhibit in vitro and in vivo growth of a hepatoma cell line [J]. Oncol Res, 2010, 18(7): 305-314.
- [10] 金世龙, 余天雾, 黄中荣, 等.  $As_2O_3$  在 HuH7 及  $CD13^+ CD133^+ LCSCs$  增殖和分化中作用的初步观察 [J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(18): 1857-1861.