

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.33.007

盐酸川芎嗪对人肝癌细胞及外泌体蛋白 GPC3 的影响*

刘振华¹,王 宁²,李克跃¹,汤可立¹,石承先¹,丁 杰³,王飞清⁴
(1. 贵州省人民医院肝胆外科,贵阳 550002;2. 贵州省骨科医院药剂科,贵阳 550004;
3. 贵州省人民医院胃肠外科,贵阳 550002;4. 贵阳中医学院附属
第一医院检验科,贵阳 550001)

[摘要] 目的 探讨盐酸川芎嗪(TMPH)对肝癌细胞外泌体蛋白磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)的影响,以了解其抑制肝癌的机制。**方法** 采用 Western blot 分别检测 2 种肝癌细胞(MHCC97-H、HepG2)及 TMPH 处理 24 h 后上清液外泌体 GPC3 的表达水平。利用共培养法培养 HepG2 细胞,TMPH 处理 24 h 后采用划痕实验和 Transwell 实验分析与 MHCC97-H 共培养的 HepG2 细胞侵袭迁移能力。**结果** 与 HepG2 相比,MHCC97-H 上清液外泌体蛋白 GPC3 水平升高,表达差异有统计学意义($P<0.01$),加入 TMPH 处理 MHCC97-H 24 h 后,上清液中外泌体蛋白 GPC3 水平明显降低($P<0.01$);与 MHCC97-H 共培养的 HepG2 侵袭迁移能力明显增强,GPC3 水平较高,差异均有统计学意义($P<0.01$);TMPH 处理 24 h 后 HepG2 侵袭迁移能力减弱,且 GPC3 水平明显下降($P<0.01$)。**结论** TMPH 调节外泌体中 GPC3 能对 HepG2 的侵袭迁移产生作用,这可能是其抗肝癌的机制之一。

[关键词] 川芎嗪;肝癌细胞;磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3
[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)33-4226-03

Effect of tetramethylpyrazine hydrochloride on hepatocellular carcinoma cells and exosome protein GPC3*
LIU Zhenhua¹,WANG Ning²,LI Keyue¹,TANG Keli¹,SHI Chengxian¹,DING Jie³,WANG Feiqing⁴
(1. Department of Hepatobiliary Surgery,Guizhou Provincial People's Hospital,Guiyang,Guizhou 550002,China;2. Department of Pharmacy,Guizhou Provincial Orthopedic Hospital,Guiyang,Guizhou 550004,China;3. Department of Gastrointestinal Surgery,Guizhou Provincial People's Hospital,Guiyang,Guizhou 550002,China;4. Department of Clinical Laboratory,First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine,Guiyang,Guizhou 550001,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of tetramethylpyrazine hydrochloride (TMPH) on exosome protein glypican-3 (GPC3) of hepatocellular carcinoma (HCC) cells for understanding its mechanism for inhibiting HCC. **Methods** Western blot was used to detect the expression level of GPC3 in supernatant of two kinds of hepatoma cells (MHCC97-H, HepG2) and TMPH treatment for 24 h respectively. HeG2 cells were cultured by using the co-culture method. After TMPH treatment for 24 h, the scratch test and Transwell assay were used to analyze the invasion and migration of HepG2 cells co-cultured with MHCC97-H. **Results** Compared with HepG2, the level of exosome protein GPC3 in supernatant of MHCC97-H was significantly higher, the expression difference was statistically significant ($P<0.01$), and the expression of GPC3 in supernatant was significantly decreased after adding TMPH to treat MHCC97-H for 24 h ($P<0.01$); the invasion and migration ability of HepG2 cells co-cultured with MHCC97-H was increased significantly, and the level of GPC3 was higher ($P<0.01$). The invasion and migration ability of HepG2 cells decreased after TMPH treatment for 24 h, moreover the GPC3 level was decreased significantly ($P<0.01$). **Conclusion** TMPH regulating GPC3 in exosomes produce the effect on the invasion and migration of HepG2, which may be one of the mechanisms of its anti-liver cancer.

[Key words] tetramethylpyrazine; hepatocellular carcinoma cell; glypican-3

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是肝癌最常见的类型,占 80%~90%,是导致全球癌症相

关死亡的主要原因之一^[1]。尽管在预防、筛查、诊断和治疗手段等方面已经取得了一定进步,但是肝癌的

* 基金项目:贵州省中医药、民族医药科学技术研究课题资助(GZYY-2015-002)。 作者简介:刘振华(1984—),主治医师,在读博士,主要从事中医药、肝胆胰疾病基础与临床研究。

发病率和病死率仍持续上升,且患者的5年生存率仍低于20%^[2-3]。外泌体作为生物信息交换的物质载体并通过递送一系列生物分子(包括蛋白质,脂质和核酸)在调节细胞微环境中起重要作用。肿瘤细胞来源的外泌体参与了细胞间的信息沟通、肿瘤血管生成、肿瘤转移及放化疗抵抗的形成^[4-6]。研究发现,外泌体蛋白磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)是磷脂酰肌醇蛋白聚糖家族中的一员,通过磷脂酰肌醇锚定连接于细胞表面,与细胞的增殖、分化、黏附和迁移关系密切,与肝癌的侵袭、转移相关,在肝癌组织及肝癌患者血清中异常表达^[7-8]。川芎嗪(TMPH)是从中药川芎中分离得到的有效单体成分,因其不良反应小等特点,临床应用较为广泛,具有一定的抗肝癌作用^[9-11],然而其作用机制不完全清楚。本文探索川芎嗪对肝癌细胞外泌体中GPC3及肝癌细胞侵袭、迁移能力的影响,为临床使用川芎嗪治疗HCC提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人肝癌细胞系MHCC97-H、HepG2购于中国科学院上海生命科学院细胞库,注射用盐酸川芎嗪(TMPH,北京四环科宝制药有限公司,批号14032015)用DMEM培养液溶解为1.0 mg/mL质量浓度,0.22 μm 滤器除菌,临用时配制。兔抗GPC3(379-393aa)抗体为美国Bioworld Technology公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

1.2.1.1 MHCC97-H、HepG2细胞的常规培养 肝癌细胞用高糖DMEM培养基+10%胎牛血清(FBS);置于37℃,5% CO₂培养箱中培养,2 d换培养液一次,待细胞密度达到80%左右,即可进行后续实验的处理。

1.2.1.2 细胞间接共培养 MHCC97-H、HepG2 高糖DMEM无血清培养基,上室接种5×10⁴个/mL MHCC97-H,下室接种2.5×10⁵个/mL HepG2,共培养72 h后,下室HepG2细胞用于后续的迁移、侵袭实验。

1.2.2 细胞划痕实验 待MHCC97-H、共培养细胞和HepG2细胞生长至最佳,1×10⁵个/孔细胞接种于

24孔板,次日长满后,用20 μL的加样枪头轻轻划一痕,新鲜不含血清培养基饥饿4 h后加入TMPH(1.0 mg/mL)处理各细胞系24 h。0、24 h测量划痕宽度算出细胞迁移距离,并计算迁移率。

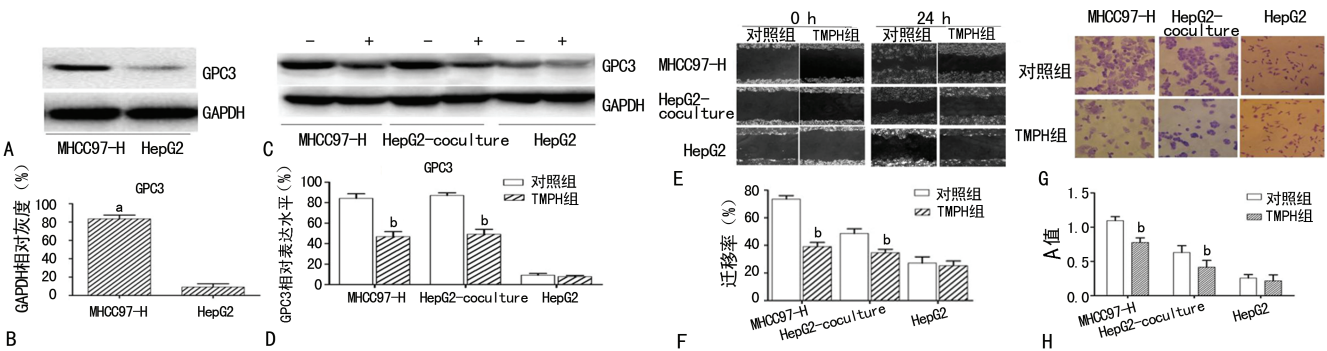
1.2.3 细胞侵袭实验 分组同划痕实验,小室上层Matrigel胶铺成单层,37℃温箱孵育40 min。制备各组细胞悬液,每孔1×10⁵个细胞接种于Transwell小室,24孔板中,下室加含10%胎牛血清(FBS)的培养基,用TMPH处理各细胞系24 h。用棉签在小室内层轻轻擦试胶,结晶紫染色,测穿越的细胞吸光度值(A值),取 $\bar{x} \pm s$ 作统计分析。

1.2.4 Western blot 检测外泌体GPC3表达 制备各组细胞悬液,以2×10⁷个/mL细胞数接种于T75培养瓶中,于37℃、5% CO₂培养箱中培养过夜;弃旧培养基,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗2遍。加新鲜不含血清培养基,细胞饥饿4 h后加入TMPH处理各细胞系,放入37℃、5% CO₂培养箱孵育24 h后收集细胞上清液,利用超速离心法提取上清液中的外泌体蛋白。二喹啉甲酸(BCA)蛋白样品定量各组后,用上样缓冲液进行样品制备,上样行12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,湿转法转印到PVDF膜上,甲醇浸泡后,室温干燥固化膜上蛋白,再水化后用5%脱脂奶粉封闭,一抗4℃孵育过夜,TBST洗后用二抗室温孵育2 h,进行化学发光显色,化学发光及凝胶成像仪成像观察GPC3水平。

1.3 统计学处理 实验数据采用SPSS 16.0统计软件进行处理,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用t检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GPC3蛋白在MHCC97-H、HepG2上清液中的表达 在两种肝癌细胞培养上清液中均可检测到GPC3,且与HepG2相比,MHCC97-H上清液中GPC3水平明显较高(图1A),差异有统计学意义(P<0.01,图1B)。



A: Western blot 检测 GPC3 蛋白;B:GPC3 半定量统计图;C:Western blot 检测 3 组细胞 GPC3 蛋白量;D:3 组细胞 GPC3 蛋白半定量统计图;E:3 组细胞划痕比较;F:3 组细胞迁移率统计图;G:3 组细胞侵袭能力比较;H:3 组细胞侵袭 A 值统计图;a: P<0.01,与 HepG2 比较;b: P<0.01,与对照组比较;“-”为对照组,“+”为 TMPH 组

图1 TMPH 对肝癌细胞及上清液外泌体 GPC3 蛋白的影响

2.2 TMPH 处理各组细胞后上清液外泌体中 GPC3 的变化 共培养细胞 HepG2 上清液中外泌体蛋白 GPC3 较常规培养的 HepG2 明显增高;3 组细胞经 TMPH 处理 24 h 后(TMPH 组),除 HepG2 组外,上清液中的外泌体蛋白 GPC3 均较未处理组(对照组)有明显下降,差异均有统计意义($P<0.01$,图 1C、D)。

2.3 TMPH 对常规培养肝癌细胞、共培养肝癌细胞迁移侵袭能力的影响 经 TMPH 处理 24 h 的 MH-CC97-H、HepG2-coculture 迁移、侵袭能力明显下降,其迁移率(图 1E、F)、穿膜细胞数 A 值(图 1G、H)与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨 论

HCC 是一种高度恶性的肿瘤,其转移与所处微环境关系密切。外泌体携带来源于肿瘤细胞的特异性生物标志物,其水平与肿瘤细胞侵袭能力和肿瘤微环境相关。由于外泌体的保护性脂质膜,其 DNA、RNA 和蛋白质不易降解,且外泌体可以从许多体液中获得,使外泌体的检测可能是“液体活检”的理想方法^[12]。研究发现,GPC3 通过糖基-磷脂酰肌醇锚定与细胞膜结合,在培养肝癌细胞的培养基中可以检测到 GPC3 蛋白^[13]。本研究发现,与 HepG2 相比,MH-CC97-H 上清液外泌体中 GPC3 蛋白水平明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$),经 TMPH 处理 24 h 后,GPC3 水平明显下降。

外泌体通过囊泡内容物传递信息,被认为是细胞间的第 3 种信号传导机制^[14]。在生理条件下,外泌体的内容物被供体细胞精确地调节并反映供体细胞的功能。为了在细胞之间交换和传递生物信息,供体细胞通过外泌体的“运输”功能将遗传物质转移到靶细胞^[15]。在病理条件下,病变细胞也可以将病毒、miRNA 等内容转移到正常细胞,使正常细胞感染导致细胞病变^[16],或将癌基因转移至正常细胞,导致肿瘤侵袭转移^[17]。本实验发现,与高转移能力肝癌细胞系 MHCC97-H 共培养的 HepG2 细胞,其侵袭、迁移能力明显增强,经 TMPH 处理后明显下降,差异有统计学意义。CAPURRO 等^[18]使用免疫组织化学和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测了 HCC 患者的 GPC3 蛋白表达和血清中 GPC3 水平,以及健康肝脏、肝炎和肝硬化患者血清中 GPC3 的水平,结果显示 HCC 患者肝脏组织中 GPC3 表达水平增加,但在正常肝细胞中不表达。HCC 患者血清中 GPC3 水平显著升高,而在健康体检者和肝炎患者血清中检测不到^[18]。表明肝癌细胞能够自分泌相关信号物质进入血液循环,这可能是肝癌细胞发生血液转移的前提。研究发现,GPC3 通过增加自分泌/旁分泌激活经典 Wnt 信号刺激 HCC 细胞的体外和体内生长。免疫共沉淀实验显示,GPC3 能够与 Wnt 形成复合物,表明 GPC3 通过促进该多肽与其信号受体的相互作用来刺激 Wnt 活性^[18]。这可能也是 MHCC97-H 细胞通过分泌 GPC3

促进 HepG2 侵袭、迁移能力增强的原因。

川芎中提取的纯化学物质 TMPH 具有抗氧化、抗纤维化作用,能改变血液流变学、免疫抗肿瘤等功效。研究发现其通过诱导肝癌细胞的凋亡及自噬等发挥抑癌作用^[9];也有研究表明 TMPH 直接杀伤肿瘤细胞、抑制血管生成^[19],与调控 TGF- β 1/Smads 通路^[11]、调控 Bax、Bcl-2 基因的表达从而调控细胞的凋亡及增殖周期有关^[20]。本研究结果表明,TMPH 可通过下调外泌体中 GPC3 蛋白的表达水平,抑制肝癌细胞的侵袭迁移能力,表明其抑制肝癌的机制可能与改变肿瘤的微环境、降低外泌体中 GPC3 表达有关。

综上所述,下调外泌体中 GPC3 蛋白改变肿瘤的微环境可能是 TMPH 抗肝癌机制之一。

参考文献

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30.

[2] EL-SERAG H B, Rudolph K L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis[J]. Gastroenterology, 2007, 132(7): 2557-2576.

[3] EL-SERAG H B. Hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2011, 365(12): 1118-1127.

[4] YU D D, WU Y, SHEN H Y, et al. Exosomes in development, metastasis and drug resistance of breast cancer[J]. Cancer Sci, 2015, 106(8): 959-964.

[5] TANG Y, CUI Y, LI Z, et al. Radiation-induced miR-208a increases the proliferation and radioresistance by targeting p21 in human lung cancer cells[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35: 7.

[6] MILANE L, SINGH A, MATTHEOLABAKIS G, et al. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment[J]. J Control Release, 2015, 219: 278-294.

[7] MONTALBANO M, RASTELLINI C, MCGUIRE J T, et al. Role of glypican-3 in the growth, migration and invasion of primary hepatocytes isolated from patients with hepatocellular carcinoma[J]. Cell Oncol (Dordr), 2018, 41(2): 169-184.

[8] 刘敏, 曾霞, 侯恩存, 等. Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 在原发性肝癌中的表达与临床意义[J]. 重庆医学, 2014(2): 173-176.

[9] CAO J, MIAO Q, MIAO S, et al. Tetramethylpyrazine (TMP) exerts antitumor effects by inducing apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma[J]. Int Immunopharmacol, 2015, 26(1): 212-220.

[10] WANG X B, WANG S S, ZHANG Q F, et al. Inhibition of tetramethylpyrazine on P-gp, MRP2, MRP3 and MRP5 in multidrug resistant human hepatocellular carcinoma cells[J]. Oncol Rep, 2010, 23(1): 211-215.

[11] 李克跃, 石承先, 汤可立, 等. 川芎嗪对人肝癌细胞 TGF- β 1/Smads 通路的影响[J]. 东南大学学报(医学版), 2017, 36(4): 554-558.

- [5] 陈海林,徐文生,徐红,等. Th1 和 Th2 细胞因子在子宫内膜癌患者中的表达及临床意义[J]. 广西医科大学学报, 2017,34(5):736-739.
- [6] ZOU Y,LIU F Y,WU J,et al. Mutational analysis of the RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathway in 260 Han Chinese patients with cervical carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2017,14(2):2427-2431.
- [7] VEGUNTA S,FILES J A,WASSON M N. Screening women at high risk for cervical cancer:special groups of women who require more frequent screening[J]. *Mayo Clin Proc*,2017,92(8):1272-1277.
- [8] 苏兰,秦爱兰,冯婷婷,等. 自身免疫性肝病患者外周血 Th1/Th2 细胞的表达及其与肝功能的相关性研究 [J]. 现代生物医学进展,2017,17(3):476-480.
- [9] WAKAYAMA A,KUDAKA W,NAKASONE T,et al. Secondary uterine carcinosarcoma after concurrent chemoradiotherapy for cervical cancer:case reports[J]. *Gynecol Oncol Rep*,2017,21:81-83.
- [10] PENG Y,WANG X,FENG H,et al. Is oral contraceptive use associated with an increased risk of cervical cancer? An evidence-based meta-analysis[J]. *J Obstet Gynaecol Res*,2017,43(5):913-922.
- [11] HANPRASERTPONG J,GEATER A,JIAMSET I,et al. Fear of cancer recurrence and its predictors among cervical cancer survivors[J]. *J Gynecol Oncol*,2017,28(6):e72.
- [12] 孟建华. 参芪扶正注射液联合三参芪口服液对宫颈癌术后放疗患者细胞免疫功能的影响[J]. 现代中西医结合杂
- 志,2017,26(5):477-480.
- [13] PHUTHONG S,SETTHEETHAM-ISHIDA W,NATPHOPSUK S,et al. Haplotype analysis of MDR1 and risk for cervical cancer in northeastern thailand[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*,2017,18(7):1815-1819.
- [14] GELE A A,QURESHI S A,KOUR P,et al. Barriers and facilitators to cervical cancer screening among Pakistani and Somali immigrant women in Oslo:a qualitative study [J]. *Int J Womens Health*,2017,9:487-496.
- [15] BREBI P,ILI C G, ANDANA A,et al. Frequency of Human papillomavirus in women attending cervical cancer screening program in Chile [J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1):518.
- [16] 张晓娜,邓卫平. 腹腔镜下子宫肌瘤剔除术对患者体内免疫功能及氧化应激水平的影响[J]. 中国妇幼保健,2017,32(19):4854-4857.
- [17] 梁毓,李颖,兰永连. 不孕原因对窗口期子宫内膜 Th1/Th2 细胞因子的影响[J]. 中国优生与遗传杂志,2016,24(6):60-62.
- [18] 吴献青,方小玲,聂妹芳,等. IL-1 β 或 TNF- α 干预的子宫蜕膜细胞对母胎界面 Th1/Th2 及 Th17/Treg 平衡的影响[J]. 中南大学学报(医学版),2017,42(1):66-71.
- [19] LIANG Y,LIU J,LIU T,et al. Anti-c-Met antibody bioconjugated with hollow gold nanospheres as a novel nanomaterial for targeted radiation ablation of human cervical cancer cell[J]. *Oncol Lett*,2017,14(2):2254-2260.
- (收稿日期:2018-03-22 修回日期:2018-07-12)
- (上接第 4228 页)
- [12] LI Y,XIANG G M,LIU L L,et al. Assessment of endogenous reference gene suitability for serum exosomal microRNA expression analysis in liver carcinoma resection studies[J]. *Mol Med Rep*,2015,12(3):4683-4691.
- [13] SUNG Y K,HWANG S Y,PARK M K,et al. Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Sci*,2003,94(3):259-262.
- [14] LUDWIG A K,GIEBEL B. Exosomes:small vesicles participating in intercellular communication[J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2012,44(1):11-15.
- [15] TKACH M,THÉRY C. Communication by extracellular vesicles:where we are and where we need to go[J]. *Cell*, 2016,164(6):1226-1232.
- [16] SHRIVASTAVA S,DEVHARE P,SUJIJANTARAT N A,et al. Knockdown of autophagy inhibits infectious hepatitis C virus release by the exosomal pathway[J]. *J Virol*,2016,90(3):1387-1396.
- [17] CONIGLIARO A,COSTA V,LO DICO A,et al. CD90⁺ liver cancer cells modulate endothelial cell phenotype through the release of exosomes containing H19 lncRNA [J]. *Mol Cancer*,2015,14:155.
- [18] CAPURRO M I,XIANG Y Y,LOBE C,et al. Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling[J]. *Cancer Res*,2005,65(14):6245-6254.
- [19] 韩娇艳,朱方强,徐祥,等. 川芎嗪通过 Akt 信号通路影响前列腺癌 PC3 细胞的增殖和凋亡[J]. 第三军医大学学报,2013,35(2):105-108.
- [20] CAO J,MIAO Q,ZHANG J,et al. Inhibitory effect of tetramethylpyrazine on hepatocellular carcinoma:possible role of apoptosis and cell cycle arrest[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*,2015,29(2):297-306.
- (收稿日期:2018-03-22 修回日期:2018-05-14)