

文章编号:1005-6947(2007)12-1162-04

· 基础研究 ·

RhoC 基因对肝癌细胞促血管生长因子表达的影响

郑岩松¹, 吕新生²

(1. 福建医科大学附属第一医院 普通外科, 福建 福州 350005; 2. 中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008)

摘要:目的 观察 RhoC 基因对肝癌 HepG2 细胞表达促血管生长因子 (VEGF, bFGF) 的影响。方法 将 pcDNA3.1-RhoC 重组质粒和空载体 pcDNA3.1 转染 HepG2 细胞, 用 RT-PCR 及免疫组化检测 HepG2 细胞的 RhoC mRNA 及 RhoC 蛋白表达情况; RT-PCR 及免疫组化检测 HepG2 细胞 VEGF 和 bFGF-mRNA 及蛋白的表达。将转染 pcDNA3.1-RhoC 重组质粒和空载体 pcDNA3.1 的 HepG2 细胞接种裸鼠, 观察肿瘤的成瘤率。结果 与转染空载体 pcDNA3.1 的 HepG2 细胞相比, 转染 pcDNA3.1-RhoC 重组质粒的细胞表达 RhoC mRNA 及 RhoC 蛋白增强, 其表达 VEGF 和 bFGF-mRNA 及蛋白明显增强 ($P < 0.01$); 重组质粒转染组成瘤率高于空载体组。结论 RhoC 表达可促进 HepG2 细胞表达血管内皮生成因子。RhoC 可促进肝癌细胞分泌促血管生长因子, 可能是促进肝癌侵袭、转移的机制之一。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(12): 1162-1165]

关键词: 癌, 肝细胞; 基因, RhoC; 基因表达; 血管内皮细胞生长因子; 碱性成纤维细胞因子

中图分类号: R 73-37

文献标识码: A

The influence of RhoC on the expression of angiogenic factors in HCC cells

ZHENG Yan-song¹, LU Xin-sheng²

(1. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China; 2. Department of General Surgery, Xiangya Hospital Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To study the influence of pcDNA3.1-RhoC on the expression of endogenous angiogenic factors in HCC cells. **Methods** The reconstructed plasmid pcDNA3.1-RhoC was transfected into HepG2 cells, and expression of VEGF and bFGF was detected with the RT-PCR and immunohistochemical stain. HepG2 cells transfected with pcDNA3.1-RhoC or pcDNA3.1 were implanted into nude mice to observe the tumor occurrence rate. **Results** HepG2 cells transfected with pcDNA3.1/RhoC showed higher expression of RhoC. The expression of RhoC enhanced the expression of VEGF and bFGF ($P < 0.01$). The tumor occurrence rate in nude mice implanted with HepG2 cells transfected with pcDNA3.1-RhoC (20%) was higher than those implanted with HepG2 cells transfected with pcDNA3.1 (0%). **Conclusions** The expression of RhoC efficiently enhances the expression of VEGF and bFGF; RhoC can promote the expression of angiogenic factors in HCC cell, and it may be one of the mechanisms of RhoC for enhancement of invasion and metastasis of HCC.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(12): 1162-1165]

Key words: Carcinoma, Hepatocellular; Genes, RhoC; Gene Expression; VEGF; bFGF

CLC number: R 73-37

Document code: A

基金项目: 福建省自然科学基金 (C03-10013); 福建省卫生厅青年科研基金 (2002-01-04) 资助。

收稿日期: 2007-08-10; **修订日期:** 2007-11-08。

作者简介: 郑岩松, 男, 福建福清人, 福建医科大学附属第一医院副主任医师, 主要从事肝胆胰外科方面的研究。

通讯作者: 郑岩松 E-mail: zhyans@sina.com

血管生成牵涉到肿瘤的形成、浸润和转移的每个环节。肿瘤新生血管的形成不仅提供肿瘤的营养和氧气的通路,还提供肿瘤细胞进入血液循环的途径,许多与肿瘤血管形成有关的癌基因、生长因子与肿瘤的侵袭转移呈正相关,如血管内皮细胞生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞因子(bFGF)等^[1-2]。笔者既往对RhoC基因与肝细胞癌(HCC)关系的研究^[3-4]表明,RhoC mRNA及蛋白的表达与HCC和胃癌肝转移有关。为探讨RhoC基因与肝癌促血管生长因子的关系,本实验利用已经构建的RhoC基因真核表达载体,将其转染入肝癌HepG2细胞,观察HepG2细胞表达VEGF及bFGF的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 pcDNA3.1-RhoC重组质粒由本实验组自行构建;LIPFECTAMINETM Reagent(18324-020)购于GIBCOBRL公司;潮霉素购于Bio-Lab公司;抗RhoC多克隆抗体(sc12116)购于Santa Cruz公司;DNAMarker购于Takara公司;即用型VEGF及bFGF单克隆抗体、SP试剂盒购于福州迈新公司产品。其余生化试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.1.2 主要仪器 Gene Amp PCR system2400 PCR仪,Gel Doc 1000UV BIO-RAD分子定量成像系统(美国BioLabs公司),紫外分光光度计(瑞典Pharmacia Biotech公司),微量移液器(GILSON公司),超净工作台(苏州净化设备有限公司),稳压稳流电泳仪(DYY-III-5)(北京六一仪器厂)。

1.1.3 实验用裸鼠 6周龄,购自上海实验动物中心,无菌层流间无菌食物喂养。

1.2 实验方法

1.2.1 体外实验

1.2.1.1 实验分组 采用脂质体转染法,将pcDNA3.1-RhoC重组质粒转染肝癌HepG2细胞,获得稳定转染RhoC基因的细胞(即HepG2-RhoC细胞)。以HepG2-RhoC细胞为实验组;空载体pcDNA3.1转染的HepG2细胞(即HepG2(-)细胞)为空载体对照组;未转染的HepG2细胞为阴性对照组。RT-PCR及免疫组化证实质粒转入细胞中并表达RhoC基因。

1.2.1.2 RT-PCR检测VEGFmRNA及bFGFmRNA的表达 用TRIzol抽提各组细胞的RNA。测定RNA溶液A260nm/A280nm比值,判断RNA的纯度。取RNA溶液4.5μL,5×甲醛凝胶电泳缓冲

液2.0μL,甲醛3.5μL,甲酰胺10.0μL混合,65℃温浴15min,加入2.0μL甲醛凝胶缓冲液,上样,5v/cm电压电泳45min。证实有3条明显的5S,18S,28S条带,提示RNA未被降解。

利用NTIVector软件设计VEGF(基因号:AY047581)引物序列如下,扩增片段长为505bp:上游引物5'CCTGCGCTTGCTGCTCTACC3'(49-69);下游引物5'TTA ACTCAAGCTGCCTCGCC3'(554-534)。bFGF(基因号:E02544)引物序列如下,扩增片段长为300bp:上游引物5'CCAAGCGGCTGTACTGCAA3'(68-82);下游引物5'TCGTTTCAGTGCCACATACCA3'(363-343)。β-actin引物序列:上游引物5'GGGCATGGGT-CAGAAGGAT3'(176-196);下游引物5'CAGTTG-GTGACGATGCCGT3'(277-257)将RT-PCR产物经1%的琼脂糖电泳,利用分子定量成像系统分析,以β-actin条带为内参照计算VEGFmRNA及bFGFmRNA表达的相对丰度。

1.2.1.3 免疫组织化学染色检测VEGF及bFGF的表达 各组细胞浓度调节为 2×10^5 /mL,置6孔培养板,每孔内放入1片已作预处理的盖玻片,37℃,5%CO₂,含10%胎牛血清的RPMI1640培养液中培养48h,取出盖玻片,标本半干燥,以4℃丙酮固定10min,免疫组织化学染色过程按说明书进行。结果以细胞内出现玫瑰红色颗粒为阳性细胞,每张片随机取5个高倍视野(10×20),根据染色强弱判断表达深浅。

1.2.2 体内实验 建立人肝癌裸鼠皮下移植瘤病模型:实验动物随机分为实验组和对照组,每组各5只。实验组细胞按 1×10^8 /mL接种于裸鼠皮下,每只0.1mL;相同数量的空载体对照组细胞接种于裸鼠皮下。两组动物自由摄水及饮食,每周测量1次体重。4周后处死动物,完整取下肿瘤,用游标卡尺测量肿瘤直径,并以中性甲醛固定,石蜡切片包埋,HE染色做病理学检查。

1.3 统计分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用Student's *t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 实验组细胞内外源RhoC基因的表达

实验组细胞的RNA其RT-PCR扩增产物经1%的琼脂糖电泳,于约600bp左右处见到明亮的条带,而空载体对照组于该处仅能见到较暗的条带。提示HepG2-RhoC细胞中RhoC基因表达增强。

2.2 RhoC 基因对 VEGF mRNA 表达的影响

用 TRIzol 抽提实验组细胞 RNA 经电泳证实有 3 条明显的 5S, 18S, 28S 条带, 紫外可见分光光度仪检测 RNA 的纯度: A260nm/A280nm 比值 = 1.812。经分子定量成像系统分析, 实验组及空载体组两组细胞 β -actin 条带光密度近似。以 β -actin 条带为内参照, 其光密度值设定为 1.000, 实验组细胞 VEGF mRNA 光密度相对值为 3.016 ± 0.108 ; 空载体对照组细胞及阴性对照组 VEGF mRNA 光密度相对值分别为 0.287 ± 0.098 和 0.301 ± 0.130 ; 经统计学分析, 实验组与空载体对照组及阴性对照组在 VEGF mRNA 的表达上有显著性差异 ($P < 0.01$); 而空载体对照组细胞及阴性对照组之间则无显著性差异 ($P > 0.05$)。提示外源 RhoC 基因转染的 HepG2 细胞表达 VEGF mRNA 增强 (图 1)。

2.3 RhoC 基因对 bFGF mRNA 表达的影响

实验组与空载体对照组及阴性对照组的 RNA 其 RT-PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖电泳, 于约 300bp 左右处得到特异条带。经分子定量成像系统分析, 各组 β -actin 条带光密度近似。以 β -actin 条带为内参照, 其光密度值设定为 1.000, 实验组 bFGF mRNA 光密度相对值为 2.310 ± 0.284 ; 空载体对照组细胞及阴性对照组 bFGF mRNA 光密度相对值分别为 0.367 ± 0.094 和 0.411 ± 0.259 ; 经统

计学分析, 实验组与空载体对照组及阴性对照组在 bFGF mRNA 的表达上有显著性差异 ($P < 0.01$); 而空载体对照组及阴性对照组之间则无显著性差异。 ($P > 0.05$)。提示外源 RhoC 基因转染的 HepG2 细胞表达 bFGF mRNA 增强 (图 2)。

2.4 RhoC 基因对 VEGF、bFGF 蛋白表达的影响

细胞免疫组织化学染色显示, 阴性对照组表达 VEGF 及 bFGF 蛋白较弱; 而实验组表达 VEGF 及 bFGF 蛋白明显增强 (图 3-6)。

2.5 成瘤率

实验组及空载体对照组细胞接种动物后, 两组实验动物均存活 4 周。空载体组 5 只动物均没有成瘤, 成瘤率 0%, 表现为持续体重增加。而实验组 5 只动物中有 2 只在注射部位成瘤, 成瘤率 40.0%, 成瘤动物在第 3 周以前表现为体重略增加, 在第 4 周以后表现为体重减轻, 肿瘤大小分别为 $1.14 \text{ cm} \times 1.06 \text{ cm} \times 1.04 \text{ cm}$ 和 $1.65 \text{ cm} \times 1.53 \text{ cm} \times 1.39 \text{ cm}$ 。

肿瘤病理学检查, 镜下见: 肿瘤细胞高度恶性, 呈巢状、结节状, 细胞大部分为立方形, 部分为梭形, 有些排列成索状。胞浆淡红色, 核呈圆形, 大部分胞浆/核形态尚一致, 也有散在的瘤巨细胞, 核分裂相明显, 可见赤道板征和芽棒状核。肿瘤组织内可见灶性坏死, 部分为片状坏死。肌索内可见巢状癌细胞浸润, 部分肌纤维被破坏, 肿瘤中甚至可见残留的肌细胞。

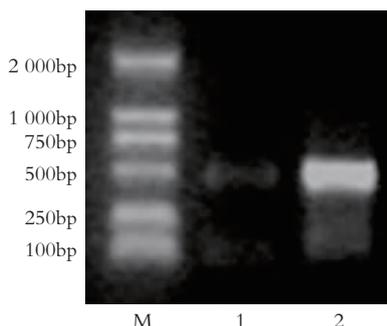


图1 HepG2 细胞表达 VEGF mRNA 1: 空载体对照组; 2: 实验组; M: DI-2000 marker

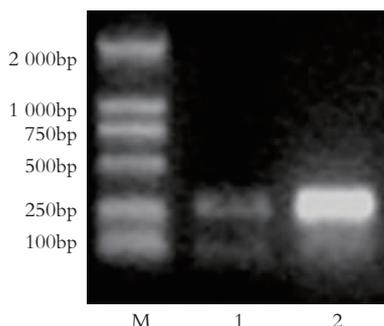


图2 HepG2 细胞表达 bFGF mRNA 1: 空载体对照组; 2: 实验组; M: DI-2000 marker

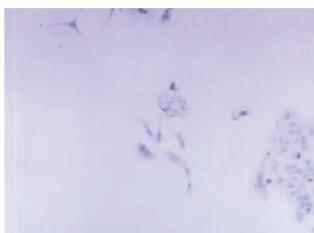
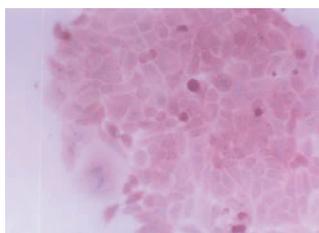


图3 HepG2-RhoC 细胞表达 VEGF(AEC 染色, $\times 400$)

图4 HepG2 (-) 细胞表达 VEGF(AEC 染色, $\times 400$)

图5 HepG2 (-) 细胞表达 bFGF(AEC 染色, $\times 400$)

图6 HepG2-RhoC 细胞表达 bFGF(AEC 染色, $\times 400$)

3 讨论

VEGF 可诱导内皮细胞分裂、增殖、迁移;此外,VEGF 还可增加微血管的通透性,促进内皮细胞产生间质胶原蛋白酶、基质降解蛋白等,促进基膜降解从而使内皮细胞出芽、迁移。活化的 H-ras 对 VEGF 的诱导作用是细胞特异性的^[5]。研究表明 VEGF 表达与 HCC 的发展和血管侵犯有关,VEGF 在 HCC 的侵袭、转移中起重要的作用^[1]。

bFGF 是另一种重要的血管生成刺激因子。许多肿瘤都表达 bFGF,而抑制 bFGF 受体可抑制肿瘤的生长^[6]。Mise^[7]研究 20 例 HCC 组织标本,发现 9 例合并包膜浸润者 bFGFmRNA 表达。bFGF 与 VEGF 在肿瘤血管形成中有协同作用^[8]。已经证实 Ras 与 rac 可以激活 bFGF 基因的启动子,但 bFGF 的转录是否也有增强尚不清楚。

本实验将 RhoC 基因重组质粒转染 HepG2 细胞,获得稳定表达 RhoC 蛋白的 HepG2-RhoC 细胞。经 RT-PCR 检测表明当 RhoC 基因转染后,VEGFmRNA 和 bFGFmRNA 的表达是空载体对照组和阴性对照组的 16 及 10 倍;免疫组化染色表明 RhoC 基因过表达时,VEGF 和 bFGF 蛋白表达明显增强。本实验结果显示,与空载体对照组和阴性对照组相比,转染 RhoC 基因的 HepG2 细胞过表达 RhoC 时,实验组细胞成瘤率增高,并且恶性表型增强。虽然实验组与空载体组两组成瘤率(40%:0)没有形成统计学上的意义,可能与实验动物数量有关。本实验结果提示 RhoC 基

因作为一种可能的癌基因,其促进 HCC 的发展、转移作用可能与 VEGF 和 bFGF 表达增强有关。

参考文献:

- [1] Kong SY, Park JW, Lee JA, Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and survival in hepatocellular carcinoma patients [J]. *Hepatology*, 2007, 46 (8): 446 - 455.
- [2] Pang R, Poon RT. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2006, 242 (2): 151 - 167.
- [3] 郑岩松,吕新生. RhoC 基因在原发性肝癌中的表达及其意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11 (9): 528 - 530.
- [4] 郑岩松,吕新生,曾永毅,等. 乙肝病毒 X 基因对肝癌细胞表达 RhoC 的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15 (12): 923 - 926.
- [5] Ronnie Tung-Ping Poon. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma [J]. *Asian J Surgery*, 2000, 23 (3): 259 - 267.
- [6] Hori A, Sasada R, Matsutani E, *et al.* Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor [J]. *Cancer Res*, 1991, 51 (12): 6180 - 6184.
- [7] Mise M, Arai S, Higashitani H, *et al.* Clinical significance of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor gene expression in liver tumor [J]. *Hepatology*, 1996, 23 (6): 455 - 464.
- [8] Imura S, Miyake H, Izumi K, *et al.* Correlation of vascular endothelial cell proliferation with microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in hepatocellular carcinoma [J]. *J Med Invest*, 2004, 51 (3 - 4): 202 - 209.

本刊启事

由国家科技部中国科学技术信息研究所主办的中国科技论文统计结果发布会于 2007 年 11 月 15 日在北京国际会议中心举行。与其同时,中国科学技术信息研究所出版的 2006 年版《中国科技期刊引证报告》(核心版),对 1 723 种中国科技论文统计源期刊的引文数据进行了统计分析。我刊 2006 年总被引用频次为 1 100,影响因子为 0.625,分别居 1 723 种统计源期刊的第 269 位和第 341 位;5 年影响因子为 0.804。