

本研究结果显示大剂量组麦芽可明显降低模型大鼠血脂 (TC、TG、LDL - C、HDL - C) 及游离脂肪酸水平, 与前人的研究相吻合。同时本研究显示麦芽对瘦素的合成也有影响, 且对瘦素合成的影响与对糖脂代谢的调节呈正相关。因此, 笔者认为麦芽对糖脂代谢的调节是多方面的, 其中对瘦素表达的调节作用是其机制之一。

参考文献

- 1 赵春艳, 普晓英, 曾亚文, 等. 大麦麦芽总黄酮类化合物含量的测定分析[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(4): 498 - 502
- 2 王晓飞, 周金影, 金向群, 等. 麦芽的药理研究及临床应用[J]. 中成药, 2007, 2(11): 1677 - 1679
- 3 陶弘景. 名医别录 (尚志钧辑校) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 205 - 207
- 4 李时珍. 本草纲目下册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 1156 - 1158

- 5 于鹰, 平静, 麦芽临床应用之历史沿革探析[J]. 江苏中医药, 2010, 42(9): 60 - 61
- 6 陈建澍, 潘伟槐, 童微量, 等. 大麦 β - 葡聚糖对小鼠血脂水平的影响[J]. 大麦科学, 2002(3): 23 - 25
- 7 Yokoyama WH, Hudson CA, Knuckles BC, *et al.* Effect of barley β - glucan in durum wheat pasta on human glycemia response[J]. Cereal Chemistry, 1997, 74(3): 293 - 296
- 8 Wang I, Behr SR, Newman RK, *et al.* Comparative cholesterol lowering effects of barley β - glucan and barley oil in golden Syrian hamsters [J]. Nutrition Research, 1997(17): 77 - 81
- 9 张海蓉, 夏雷. 肥胖对女性生殖系统功能影响的研究进展[J]. 山东医药, 2008, 48(39): 112 - 113
- 10 顾洪涛. 儿童单纯性肥胖的病因、危害及其防治[J]. 中国医刊, 2012, 47(7): 34 - 35
- 11 张海蓉, 夏雷. 脂肪源性泌乳素的分泌及对代谢调节的影响[J]. 中国实用医药, 2009, 4(27): 113 - 114

(收稿日期: 2013 - 07 - 23)

(修回日期: 2013 - 08 - 28)

ER α 通过 MTA3 调控 EMT 影响 HCC 细胞凋亡的研究

张宇华 胡智明 张成武 吴伟顶 刘 杰 尚敏杰 赵大建

摘 要 **目的** 在肝细胞性肝癌(HCC)细胞中, 探讨雌激素受体 α (ER α) 通过肿瘤转移相关基因 3 (MTA3) 调控 HCC 细胞上皮 - 间质转换 (EMT) 对 HCC 细胞凋亡的影响。**方法** 使用雌二醇、氟维司琼干预 HCC 细胞中 ER α 的表达, 采用 real - time PCR 测定信号通路中关键因子 MTA3、EMT 关键调节因子 Snail、E - cadherin, 及凋亡相关因子 BAX 在处理前后 mRNA 水平的改变, 探讨 ER α 、MTA3 改变与 HCC 细胞 EMT 和凋亡改变的关系。**结果** ER α →MTA3→Snail→E - cadherin 信号通路各相关因子在部分 HCC 细胞 (HepG2) 中表达。雌二醇处理 ER α 高表达的 HepG2 细胞后, Snail 表达下降, E - cadherin 表达上升, EMT 被抑制; BAX 表达上升, HCC 细胞凋亡增加。氟维司琼处理后, Snail 表达上升, E - cadherin 表达下降, EMT 被激活; BAX 表达下降, HCC 细胞凋亡被抑制, 而在 ER α 低表达的 SMMC - 7721 细胞中, 则没有明显差异。**结论** ER α 高表达的 HCC 细胞中, ER α →MTA3→Snail→E - cadherin 信号通路存在并调节 EMT。雌二醇可以激活 ER α 表达, 抑制 EMT 进而抑制细胞凋亡, 而氟维司琼则可以通过抑制 ER α , 激活 EMT。

关键词 雌激素受体 α 肿瘤转移相关基因 3 上皮 - 间质转换 肝细胞性肝癌

[中图分类号] R735 [文献标识码] A

Role of ER α in Governing EMT via MTA3 and Its Correlation with Apoptosis in HCC Cells. Zhang Yuhua, Hu Zhiming, Zhang Chengwu, *et al.* Hepatobiliary Surgery Department, Zhejiang Provincial People's Hospital, Zhejiang 310014, China

Abstract Objective To investigate the role of ER α and MTA3 in EMT via ER α →MTA3→Snail→E - cadherin signaling pathway and the correlation with cell apoptosis in HCC cells. **Methods** The HCC cells were treated with different concentrations of estradiol and fulvestrant for 48 hours. Expression of MTA3, Snail and E - cadherin mRNA, apoptosis protein BAX mRNA were detected by real time PCR. **Results** The molecular involved in ER α →MTA3→Snail→E - cadherin signaling pathway were existed in some of the HCC cells such as HepG2. In ER α positive HCC cell HepG2, more expression of MTA3, less expression of Snail and more expression of E - cadherin.

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划基金资助项目 (2012KYB015)

作者单位: 310014 杭州, 浙江省人民医院肝胆外科

通讯作者: 赵大建, 电子信箱: zyhemail@ hotmail. com

in was detected in HepG2 cells after the treatment of estradiol, and these changes were correlated with a higher expression of BAX. The opposite changes were observed in HepG2 cells after treated with fulvestrant. However, in ER α negative HCC cell SMMC - 7721, no change of these factors could be detected. **Conclusion** ER α →MTA3→Snail→E - cadherin signaling pathway was existed in some of the HCC cells and governed EMT. Estradiol could suppress EMT via this signaling pathway in ER α positive HCC cell HepG2, while fulvestrant had the opposite function.

Key words ER α ; MTA3; EMT; HCC

肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)病死率高,每年全球 50 万以上患者诊断为原发性肝癌, HCC 约占原发性肝癌的 85%^[1]。我国是 HCC 高发区,发病人数约占全球 55%,在肿瘤相关死亡中仅次于肺癌,手术治疗是目前治疗效果最佳、唯一有可能治愈的方案,但是 5 年内再次发现肿瘤的概率为 75%^[2]。进展期肝癌目前无有效治疗方案,放化疗对 HCC 无效。分子靶向治疗是目前发展十分迅速的一个领域,但索拉菲尼是一种小分子多激酶抑制剂,仅能使 37% 患者延长生存期 2~3 个月^[3]。雌激素在 HCC 发生发展中起作用,但目前对此方面的研究不多。上皮间质转换(epithelial - mesenchymal transition, EMT)为目前肿瘤研究的热点,影响多种肿瘤的转移及进展,而雌激素受体 α (Estrogen receptor α , ER α)通过调控 Snail、E - cadherin (EMT 重要调控因子)调控 EMT 已经在乳腺癌、卵巢癌及前列腺癌等中被证实,但在 HCC 中,目前尚未发现有关 ER α 调控 EMT 的报道。笔者通过检测雌二醇、氟维司琼作用于 HCC 细胞后 MTA3、Snail、E - cadherin 和 BAX 表达变化,明确 ER α 通过 ER α →MTA3→Snail→E - cadherin 信号通路影响 HCC 细胞 EMT,进而影响 HCC 细胞凋亡的机制,为针对 ER α 的治疗应用于 HCC 提供理论基础。

材料与方法

1. HCC 细胞:HCC 细胞株:HepG2、SMMC - 7721 (中国科学院肿瘤细胞库)。

2. 细胞培养:HepG2、SMMC - 7721 细胞于 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清、100U/ml 青霉素、100mg/ml 链霉素)(杭州四季青)37℃、5% CO₂ 常规培养。

3. Western blot:按照常规方法提取细胞总蛋白、定量。蛋白变性后 10% SDS - 聚丙烯酰胺收集 + 5% SDS - 聚丙烯酰胺分离,蛋白湿转至 PVDF 膜,脱脂奶封闭后,ER α 、MTA3、Snail、E - cadherin、BAX (Santa Cruz Biotechnology 公司) 4℃ 振荡孵育过夜,二抗(抗兔或抗鼠 IgG, Santa Cruz Biotechnology 公司)室温孵育 1h, ECL 显色。 β - actin (Santa Cruz Biotechnology 公司)作为内参照。

4. 分组及干预药物浓度:HepG2、SMMC - 7721 细胞在无酚红培养液中调节细胞浓度为 2.0×10^6 个/毫升。空白对照

组无酚红培养液培养;药物干预组浓度:雌二醇 (Sigma, 德国) 浓度: 10^{-9} mol/L、 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L; 氟维司琼 (Sigma 公司, 德国) 浓度: 10^{-9} mol/L、 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L。药物干预 48h 后测定各目标基因的相对浓度。

5. 引物设计:采用 Primer 5.0 引物设计软件和引物设计原则进行引物的设计,然后由上海生物工程有限公司负责合成:引物序列:ER α : SE: 5' - AATgATTCTATAATgCCATCATg - CAgC - 3', AS: 5' - gCTTggTTAAACATATCTgCAAggTTAC - 3'; MTA3: SE: 5' - TgAggCTgAggAggAggC - 3', AS: 5' - CTTC - TATCCTTCTTATTAaggTATgggTTgC - 3'; Snail: SE: 5' - gAggCg - gTggCAGACTAg - 3', AS: 5' - gACACATCggTCAGACCAg - 3'; E - cadherin: SE: 5' - gAATCCAAAACCTCAgTCA - 3', AS: 5' - TgTAGTCACCCACCTCTAAg - 3'; BAX: SE: 5' - AACTggA - CAgTAACATgg - 3', AS: 5' - CTTATAgACCACATCTgA - 3'; β - actin: SE: 5' - gATgCTgCTTACATgTCTCg - 3', AS: 5' - CCAgCAGAgAATggAAAgTC - 3'。

6. PCR 反应条件:Trizol 法提取细胞总 RNA,紫外分光光度计测 RNA 纯度和浓度。cDNA 合成:用反转录酶合成 cDNA,按试剂盒操作。实时定量 PCR 反应参数:95℃, 5min; 95℃, 20s; 55℃, 20s; 72℃, 30s; 共 35 个循环。所有实验重复 3 次。PCR 产物以曲线起翘值(Ct 值)作为分析依据。在 ABI7500 软件体系中调整基线和阈值,读出各反应孔 Ct 值。以 β - actin 作为内对照。根据靶基因及 β - actin 基因 Ct 值计算 Δ Ct 进行分析, Δ Ct = 2^(β - actin 基因的 Ct 值 - 靶基因的 Ct 值), Δ Ct 值越高,表达越低。

7. 统计学方法:SPSS 13.0 软件进行统计分析,数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,统计学分析用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. HCC 细胞中 ER α 、MTA3、Snail、E - cadherin、BAX 在基因和蛋白层面的表达:从图 1 可以发现 HepG2 细胞有 ER α 表达,而 SMMC - 7721 细胞基本无 ER α 表达;MTA3、Snail、E - cadherin、BAX 在两个细胞株中均有表达,MTA3 在两个细胞株中表达无明显差异;HepG2 细胞中 Snail 表达低,E - cadherin 表达高;而 SMMC - 7721 细胞中 Snail 表达高,E - cadherin 表达低;BAX 在两株细胞中无明显差异。

2. Real - time PCR 法:检测 HCC 细胞经过雌二

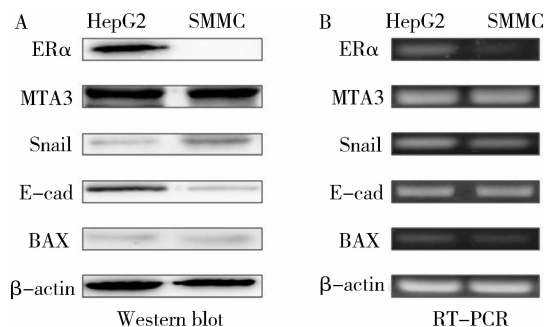


图 1 ERα、MTA3、Snail、E-cadherin、BAX 在 HCC 细胞株 HepG2、SMMC-7721 中的表达

A. 上述因子蛋白通过 Western blot 检测后的结果; B. 上述因子基因通过 RT-PCR 检测后的结果

醇、氟维司琼作用后, MTA3、Snail、E-cadherin 和 BAX mRNA 的表达水平的变化。HCC 细胞株 HepG2 和 SMMC-7721 经不同浓度雌二醇、氟维司琼作用 48h 后, MTA3 基因表达的变化。HepG2 细胞经过不同浓度雌二醇处理后, 随着雌二醇浓度升高, MTA3 基因 ΔCt 下降, 表达升高, 各组间表达有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2A), 而 SMMC-7721 细胞 MTA3 则无明显统计学意义。HCC 细胞经过不同浓度氟维司琼作用 48h 后, 随着浓度升高, HepG2 细胞 MTA3 表达下降 ($P < 0.05$, 图 2B), 而 SMMC-7721 细胞 MTA3 表达改变无统计学差异 (图 2)。HCC 细胞株 HepG2 和 SMMC-7721 经不同浓度雌二醇、氟维司琼作用 48h 后, Snail 基因表达的变化。HepG2 细胞经过不同

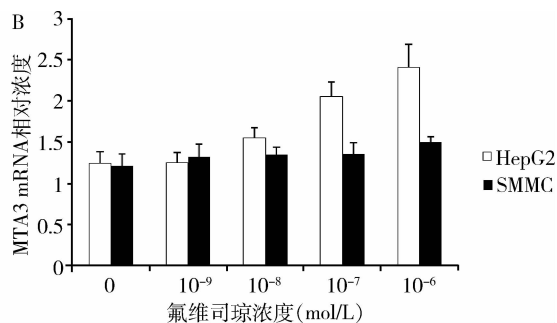
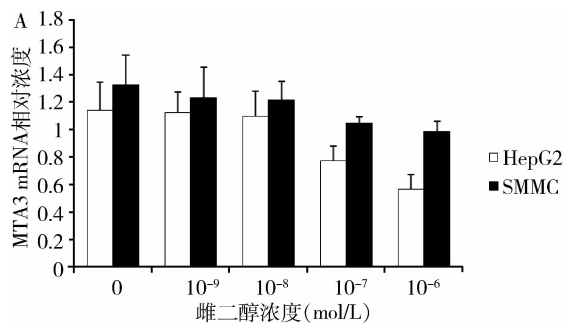


图 2 雌二醇和氟维司琼处理 HepG2 和 SMMC-7721 细胞后经 real-time PCR 检测后 MTA3 基因表达 (ΔCt) 的变化

A. 不同浓度的雌二醇处理后, HCC 细胞 MTA3 基因表达的变化; B. 不同浓度的氟维司琼处理后 MTA3 基因表达的变化

讨 论

HCC 总体治疗效果仍不满意。手术治疗是目前治疗效果最佳、唯一有可能治愈的方案, 但是 5 年内肿瘤复发率为 75%^[2]。进展期肝癌目前无有效治疗方案, 全身化疗对 HCC 无效。分子靶向治疗是目前发展十分迅速的一个领域, 索拉菲尼是一种低分子多

浓度雌二醇处理后, 随着雌二醇浓度升高, Snail 基因 ΔCt 上升, 表达下降, 各组间表达有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3A), 而 SMMC-7721 细胞 MTA3 则无明显统计学意义。HCC 细胞经过不同浓度氟维司琼作用 48h 后, 随着浓度升高, HepG2 细胞 Snail 表达上升 ($P < 0.05$, 图 3B), 而 SMMC-7721 细胞 Snail 表达改变无统计学差异 (图 3)。HCC 细胞株 HepG2 和 SMMC-7721 经不同浓度雌二醇、氟维司琼作用 48h 后, E-cadherin 基因表达的变化。HepG2 细胞经过不同浓度雌二醇处理后, 随着雌二醇浓度升高, E-cadherin 基因 ΔCt 下降, 表达升高, 各组间表达有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4A), 而 SMMC-7721 细胞 E-cadherin 则无明显统计学意义。HCC 细胞经过不同浓度氟维司琼作用 48h 后, 随着浓度升高, HepG2 细胞 E-cadherin 表达下降 ($P < 0.05$, 图 4B), 而 SMMC-7721 细胞 E-cadherin 表达改变无明显统计学差别 (图 4)。HCC 细胞株 HepG2 和 SMMC-7721 经不同浓度雌二醇、氟维司琼作用 48h 后, BAX 基因表达的变化。HepG2 细胞经过不同浓度雌二醇处理后, 随着雌二醇浓度升高, BAX 基因 ΔCt 下降, 表达升高, 各组间表达有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 5A), 而 SMMC-7721 细胞 BAX 则无明显统计学意义。HCC 细胞经过不同浓度氟维司琼作用 48h 后, 随着浓度升高, HepG2 细胞 BAX 表达下降 ($P < 0.05$, 图 5B), 而 SMMC-7721 细胞 BAX 表达改变无明显统计学差别 (图 5)。

激酶抑制剂, 2007 年 FDA 批准可适用于不能切除的晚期肝癌, 与安慰剂相比, 能使 37% 患者延长生存期 2~3 个月^[3]。其他尚有 brivanib、erlotinib、bevacizumab 等分子靶向药物正进行临床研究, 尽管目前 HCC 分子靶向治疗发展十分迅速, 但进展期肝癌总体疗效不佳。

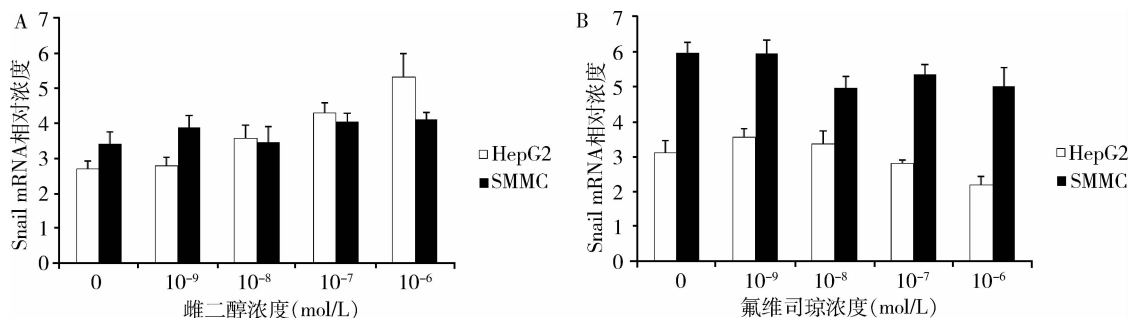


图3 雌二醇和氟维司琼处理 HepG2 和 SMMC - 7721 细胞后经 real - time PCR 检测后 Snail 基因表达 (Δ Ct) 的变化

A. 不同浓度的雌二醇处理后, HCC 细胞 Snail 基因表达的变化; B. 不同浓度的氟维司琼处理后 Snail 基因表达的变化

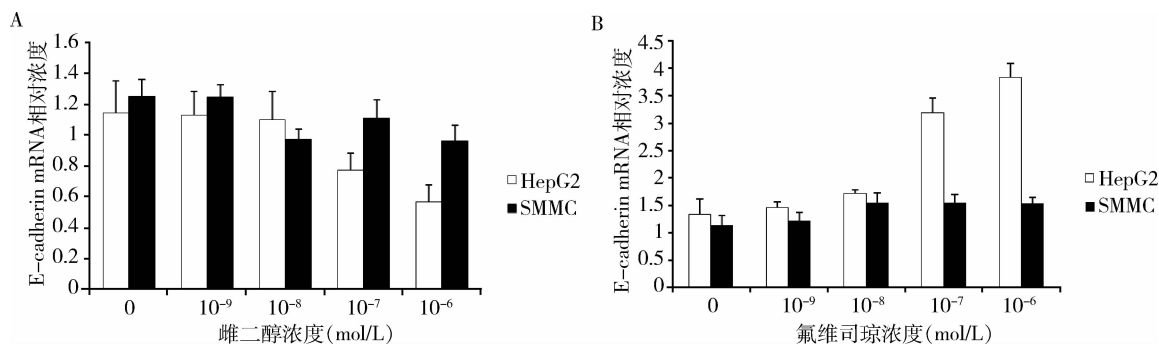


图4 雌二醇和氟维司琼处理 HepG2 和 SMMC - 7721 细胞后经 real - time PCR 检测后 E - cadherin 基因表达 (Δ Ct) 的变化

A. 不同浓度的雌二醇处理后, HCC 细胞 E - cadherin 基因表达的变化; B. 不同浓度的氟维司琼处理后 E - cadherin 基因表达的变化

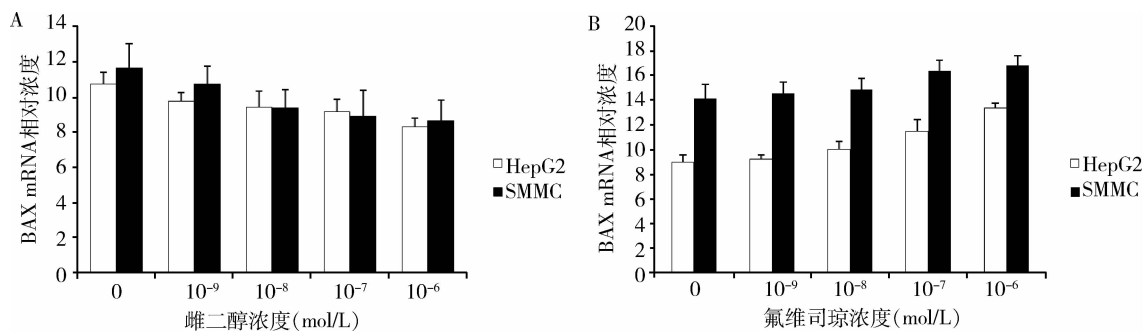


图5 雌二醇和氟维司琼处理 HepG2 和 SMMC - 7721 细胞后经 real - time PCR 检测后 BAX 基因表达 (Δ Ct) 的变化

A. 不同浓度的雌二醇处理后, HCC 细胞 BAX 基因表达的变化; B. 不同浓度的氟维司琼处理后 BAX 基因表达的变化

EMT 是目前肿瘤研究的热点之一, EMT 能使肿瘤细胞侵袭力更强, 恶性程度更高, 耐药性更强, 预后更差, 抑制 EMT 也是下一步肿瘤治疗的关键之一^[4]。肝细胞虽不是上皮细胞, 但其表现出极性并相互粘连, 呈现上皮细胞特性。已有大量文献证实 EMT 在肝脏疾病发生发展过程中起重要作用, EMT 被认为是从肝硬化向肝癌转移的桥梁, EMT 指标能在肝硬化中发现, 并在肝癌患者中表达增强, 而在 HCC 伴转移的患者中表达最强^[5, 6]。目前已证实

Snail 为 EMT 中最重要的调控因子, Snail 表达升高预示 EMT 被激活^[4, 7]。而 E - cadherin 是 Snail 下游受体, 受 Snail 抑制, E - cadherin 被认为是 EMT 的直接调控因子, E - cadherin 表达下降提示 EMT 被激活^[4, 8]。

雌激素在肝癌发生发展过程中起作用, 男性 HCC 发病率明显比女性高, 约为 3 ~ 5 倍, 在动物实验中也发现类似的情况, 使用二乙基亚硝胺诱导小鼠 HCC, 在雄性小鼠中 100% 诱导而雌性小鼠中仅

10% ~ 30% 诱导成功^[9]。以上结果提示雌激素在 HCC 发生发展中起作用,能抑制 HCC 的发生进展,但目前对此机制的研究不多。Nakatani 等^[10]和 Naugler 等^[11]发现雌激素能通过抑制白介素 6 抑制二乙基亚硝胺诱导的肝损害,并抑制 HCC 在雄性小鼠中的发展。ER α 通过 Snail、E-cadherin 调节 EMT 在乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌等激素密切相关的肿瘤中均被发现,ER α 高表达抑制 EMT,改善肿瘤预后^[12]。但笔者未发现 ER α 在 HCC 中调节 EMT 相关的报道。

笔者首先在 HCC 细胞中通过 RT-PCR 及 Western blot 显示 MTA3、ER α 、Snail、E-cadherin、BAX 在 HCC 细胞中存在并表达,结果提示 ER α →MTA3→Snail→E-cadherin 信号通路中各个因子在 HCC 细胞中存在。在 HepG2 细胞中,ER α 表达明显高于 SMMC-7721 (图 1)。然后笔者通过雌二醇激活 ER α 后,real-time PCR 发现在 ER α 高表达的 HepG2 细胞中,MTA3 表达上升,Snail 表达则受抑制、E-cadherin 表达上调 ($P < 0.05$),EMT 被抑制。而在 ER α 低表达的 SMMC-7721 细胞中,则没有明显改变。通过氟维司琼处理后,HepG2 细胞 MTA3 表达下降,Snail 表达上升、E-cadherin 表达下调 ($P < 0.05$),EMT 被激活(图 2)。笔者得到的结果与 Fujita 等^[12]在乳腺癌细胞中获得的结果类似,雌二醇可以通过激活 ER α ,抑制 Snail,激活 E-cadherin 而抑制 EMT,而氟维司琼则可以起到相反的作用。然后笔者又检测了凋亡相关因子 BAX 的表达,ER α 激活后,EMT 被抑制,BAX 表达增加,肿瘤细胞凋亡激活,而通过氟维司琼抑制 ER α 后,EMT 被激活,BAX 表达降低,细胞凋亡被抑制。本研究实验结果提示在 ER α 高表达的肝癌细胞株中,雌激素可以通过激活 ER α ,激活 MTA3,抑制 Snail,激活 E-cadherin,从而抑制这些 HCC 细胞株的 EMT,同时激活了肿瘤细胞的凋亡。这个结果解释了雌激素在部分 HCC 的发生发展过程中起到一定的抑制 HCC 生长发展的作用,与其他学者所报道的 ER α 在 HCC 发展中的角色相符^[9~11]。但 HCC 发展,特别是进展期 HCC 的发展过程往往是一个多基因调控的过程,本结果仅提示了在部分 ER α 表达阳性的 HCC 中,ER α 可以作为一个潜在的治疗靶点。

通过以上结果,笔者认为 ER α →MTA3→Snail→E-cadherin 信号通路在部分 HCC 细胞中存在并调控 EMT,与肿瘤凋亡相关。在 ER α 高表达的 HCC 细胞中,ER α 可以作为一个靶点对此通路进行干预。雌二醇通过激活 ER α 进而抑制 EMT,激活肿瘤凋亡,抑制 HCC 的发展,而氟维司琼则可以起到相反的作用。本结果拓展了 HCC 治疗的思路,在 HCC 细胞中证明了雌二醇抑制 EMT 的机制,下一步需要在体内实验中进一步验证。

参考文献

- 1 Siegel R,Naishadham D,Jemal A. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2012,62(1):10-29
- 2 Llovet JM,Schwartz M,Mazzaferro V. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma[J]. Semin Liver Dis, 2005. 25(2):181-200
- 3 Llovet JM,Ricci S,Mazzaferro V,et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2008,359(4):378-390
- 4 Kalluri R,Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. J Clin Invest, 2009,119(6):1420-1428
- 5 Min AL,Choi JY,Woo HY,et al. High expression of Snail mRNA in blood from hepatocellular carcinoma patients with extra-hepatic metastasis[J]. Clin Exp Metastasis, 2009,26(7):759-767
- 6 Woo HY,Min AL,Choi JY,et al. Clinicopathologic significance of the expression of Snail in hepatocellular carcinoma[J]. Korean J Hepatol, 2011,17(1):12-18
- 7 de Herreros AG,Peiro S,Nassour M,et al. Snail family regulation and epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer progression[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010,15(2):135-147
- 8 Giangreco A,Lu L,Vickers C,et al. Beta-Catenin determines upper airway progenitor cell fate and preinvasive squamous lung cancer progression by modulating epithelial-mesenchymal transition[J]. J Pathol, 2012,226(4):575-587
- 9 Maeda S,Kamata H,Luo JL,et al. IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis[J]. Cell, 2005,121(7):977-990
- 10 Nakatani T,Roy G,Fujimoto N,et al. Sex hormone dependency of diethylnitrosamine-induced liver tumors in mice and chemoprevention by leuporelin[J]. Jpn J Cancer Res, 2001. 92(3):249-256
- 11 Naugler WE,Sakurai T,Kim S,et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production[J]. Science, 2007,317(5834):121-124
- 12 Fujita N,Jaye DL,Kajita M,et al. MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer[J]. Cell, 2003,113(2):207-219

(收稿日期:2013-02-11)

(修回日期:2013-03-14)