

AFP 通过激活 STAT3 的磷酸化促进肝癌细胞的增殖

张泽亮^{1,2}, 王黎明^{1,2}, 任龙飞^{1,2}, 朱 丹^{1,2}, 李 汛^{1,3,4}

(1. 兰州大学第一医院, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省生物治疗与再生医学重点实验室, 甘肃 兰州 730000; 3. 甘肃省肝胆胰研究所, 甘肃 兰州 730000; 4. 兰州大学医学院肿瘤防治中心, 甘肃 兰州 730000)

摘要: [目的] 研究 AFP 基因过表达对肝癌细胞系 HepG2 细胞增殖的影响及其机制。[方法] 利用慢病毒转染技术对 HepG2 细胞进行 AFP 基因过表达, 通过 Western Blot 检测转染后 HepG2 细胞中 AFP 表达情况, 采用流式细胞技术和 CCK8 细胞增殖实验检测细胞的增殖情况, Western Blot 检测 AFP 过表达后 STAT3、p-STAT3 蛋白水平的变化。[结果] CCK8 细胞增殖实验显示, AFP 过表达组 HepG2 细胞较对照组细胞增殖速度快 ($P < 0.05$)。流式细胞实验显示, AFP 基因过表达组处于 G₁ 期和 S 期的细胞占比分别为 49% 和 21%, 而对照组相应的 G₁ 期、S 期细胞占比分别为 61% 和 12%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。AFP 基因过表达后, HepG2 细胞中 p-STAT3 表达水平升高, 表明存在 STAT3 蛋白的激活。[结论] AFP 可促进 HepG2 肝癌细胞的增殖, 其机制涉及 STAT3 蛋白的激活。

关键词: 肝肿瘤; 甲胎蛋白; p-STAT3; 增殖

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2018)10-0796-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2018.10.A010

AFP Promotes Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cells by Activating Phosphorylation of STAT3

ZHANG Ze-liang^{1,2}, WANG Li-ming^{1,2}, REN Long-fei^{1,2}, ZHU Dan^{1,2}, LI Xun^{1,3,4}

(1. The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Provincial Key Laboratory of Biotherapy and Regenerative Medicine, Lanzhou 730000, China; 3. Gansu Provincial Hepatobiliary and Pancreatic Research Institute, Lanzhou 730000, China; 4. Cancer Prevention and Treatment Center of Lanzhou University Medical College, Lanzhou 730000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of AFP on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells (HCC). [Methods] Lentivirus-mediated recombination AFP was transfected into HCC HepG2 cells. Western Blot was used to detect the efficiency of AFP transfection. The cell proliferation and cell cycle were detected by CCK8 assay and flow cytometry, respectively. The protein level of AFP, STAT3 and p-STAT3 were detected by Western blot. [Results] The CCK8 assay indicated that overexpression of AFP significantly enhanced the proliferation of HepG2 cells comparing to the negative control ($P < 0.05$). G₁ and S phase of HepG2 cells in AFP over-expressed HepG2 cells accounted for 49% and 21%, while those in the negative control group accounted for 61% and 12%, respectively ($P < 0.05$). The expression of p-STAT3 was increased in AFP over-expressed HepG2 cells. [Conclusion] AFP can promote proliferation of HepG2 cells by activating phosphorylation of STAT3.

Key words: hepatocellular neoplasms; alpha-fetoprotein; p-STAT3; proliferation

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是目前发病率高、预后极差的恶性肿瘤之一。在世界范围内, 肝癌是男性第三大和女性第七大常见的恶性肿

瘤, 其病死率按死亡例数排序居肿瘤相关性死亡的第 2 位^[1]。

甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP) 主要来源于胚胎期肝细胞分泌, 成年后在正常人体内几乎检测不到 AFP 的表达, 但是在 70% 的肝癌患者体内 AFP 的含量显著升高, 因而 AFP 作为肝癌特异性肿瘤标志物被广泛应用于高危患者的筛查和肝癌患者术后

收稿日期: 2018-02-05; 修回日期: 2018-03-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31270543、31570509); 甘肃省卫生行业科研计划管理项目 (GWGL2010-22); 甘肃省科技重大专项 (1602FKDA001)

通讯作者: 李汛, E-mail: lxd21@126.com

随访^[2,3]。AFP 作为生物学活性非常复杂的蛋白质,其生物学功能尚未完全清楚,大量学者研究证明 AFP 可促进肝癌细胞的生长,这一过程中参与的信号通路复杂且存在较多争议,当前仍需进一步探索。

信号传导与转录激活因子(signal transducer and activator of transcription,STAT)是一类能与靶基因调控区 DNA 结合的胞质蛋白,STAT3 属于 STAT 家族中 7 个成员之一^[4]。STAT3 的持续激活与多种肿瘤的发生发展具有密切关系,其中包括肝癌。研究发现,STAT3 的持续激活可调控其下游靶基因如 *Bcl-2*、*Mcl-1*、*p53*、*c-Myc*、*cyclin D1* 等的表达,促进肿瘤的增殖、侵袭和血管生成^[5-8]。那么,STAT3 在肝癌中的激活效应是否受到 AFP 的调控目前尚未见报道,需要进一步揭示,这将对阐明 AFP 调节肝癌细胞增殖的机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

HepG2 细胞购自中科院上海生物研究所细胞库,DMEM 高糖培养基购自以色列 BI 公司,胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)、胰酶购于美国 Gibco 公司,25cm² 细胞培养瓶和培养板自美国 Corning 公司,转染用慢病毒载体 LV-AFP(22138-1)和其阴性对照病毒 CON220 均购于上海吉凯基因公司,总蛋白提取液、蛋白酶抑制剂均购自美国 Thermo 公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×)和 SDS-PAGE 凝胶试剂盒均购于碧云天(上海)生物公司,AFP 兔单克隆抗体购自美国 Abcam 公司,KLF6(Kruppel-like Factor 6)鼠单克隆抗体、肌动蛋白 β -Actin 鼠单克隆抗体、辣根过氧化物酶偶联山羊抗鼠、抗兔 IgG 均购自美国 Abcam 公司,Chemiluminescent HRP Substrate 化学发光液购自美国 MILLIPORE 公司,Cell counting Kit-8 (CCK8)试剂盒购于日本同仁公司,细胞周期检测试剂盒购于万类生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和 LV-AFP 慢病毒转染

人肝癌细胞 HepG2 为 AFP 表达细胞,采用含 10% FBS DMEM 培养的 HepG2 细胞,将 25cm² 培养瓶放入 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养。待培养瓶

内细胞融合度达 80%以上时,胰酶消化,铺板。以 5×10⁴ 个/ml 细胞密度接种 2ml 到相应 6 孔板中,每组平行感染 2~3 个复孔。当 6 孔板中 HepG2 细胞生长融合度为 30%时,分别向每孔加入 10μl 慢病毒 LV-AFP 及其阴性对照病毒 CON220(图例中 NC 代表阴性对照组,OE 代表过表达 AFP 组)。转染 6~8h 后换液 1 次,转染 72h 后于荧光倒置显微镜下观察荧光表达情况,确定感染效率达到 80%为宜。

1.2.2 Western Blot 实验

向 25cm² 细胞培养瓶中加入 100μl 蛋白裂解液、1μl PMSF 和 10μl 磷酸酶抑制剂,按照蛋白提取试剂说明提取细胞总蛋白。根据实验样本量按照 A 液:B 液=50:1 的比例配制合适量 BCA 工作液测定样本蛋白浓度。十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,将蛋白转到 PVDF 膜上。用 2% BSA 封闭液封闭 1h 后,一抗孵育,4℃过夜。孵育一抗后,用 TBST 洗膜 3 次,再加入二抗室温孵育 1h, TBST 洗 3 次后,进行曝光。配制化学发光显色液,采用 Alpha Imager HP 凝胶成像系统显影拍照。所有实验均重复 3 次。

1.2.3 CCK8 细胞增殖实验

用完全培养基 DMEM 重悬细胞并进行计数,将细胞浓度调成 2×10⁴ 个/ml,每孔 100μl 接种在 96 孔板中,每组设 3 个复孔。将 96 孔板于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养,待细胞贴壁后,每孔加入 10μl CCK8 试剂 37℃、2h 孵育后,用酶标仪测定其在 450nm 处的吸光度并以此为零点。以后 4 天每隔 24h 测定一次。根据酶标仪测定出的吸光度值,绘制细胞生长曲线。所有实验重复 3 次。

1.2.4 流式细胞实验

以每孔 1×10⁶ 个细胞接种到 6 孔板中,待细胞贴壁生长 48h 后胰酶消化,加入完全培养基后反复将细胞吹打制备成单细胞,1000g、5min 离心后 PBS 清洗 2 次,将细胞密度调成 1×10⁶ 个/ml 离心后,70%乙醇固定、4℃过夜。将固定好的细胞 1000g、5min 离心后,加入 100μl RNAase,37℃水浴 30min,然后加入 500μl PI 染料,避光染色 30min 后上机检测,所有实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

采用 Graphpad Prism 5.01 软件对所得数据进行统计学处理和分析。定量资料采用 *t* 检验或单因素

方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。定量资料的描述采用均数 $\pm$ 标准差表示。

2 结果

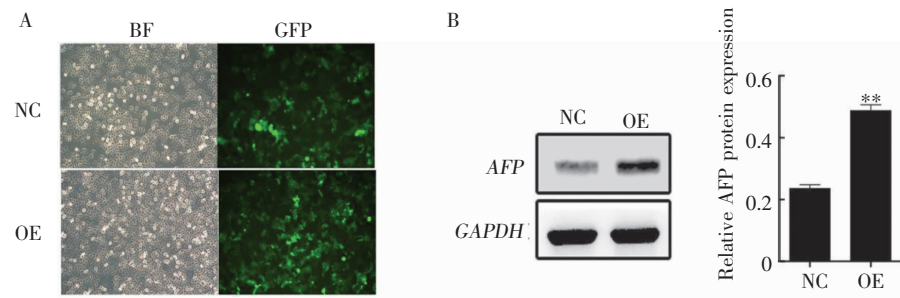
2.1 慢病毒转染效率及转染后 AFP 基因表达水平

分别将构建好的 LV-AFP 及其阴性对照慢病毒转入 HepG2 细胞。转染成功后于荧光显微镜下观察,被慢病毒转染的 HepG2 细胞呈现绿色荧光信号(Figure 1A)。Western Blot 结果显示,AFP 过表达组较其阴性对照组 AFP 表达量增高,差异具有统计学意义($t=8.564, P=0.001$)(Figure 1B),这表明慢病毒转染 HepG2 细胞取得了良好的效果。

2.2 AFP 过表达促进 HepG2 细胞的增殖

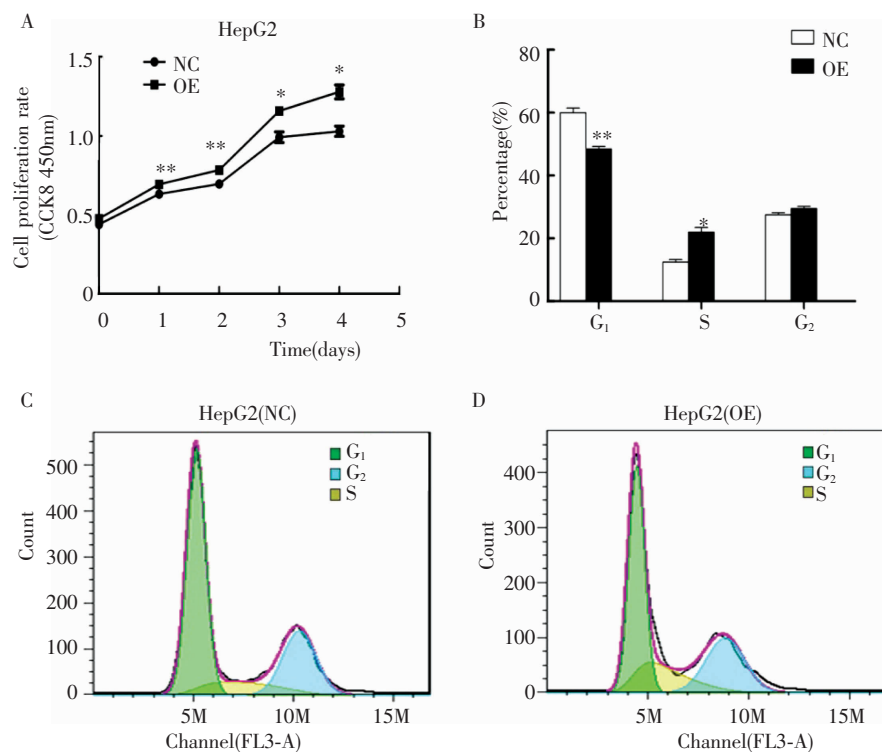
通过 CCK8 细胞增殖实验分析发现,当过表达 AFP 后 HepG2 细胞增殖能力较阴性对照组增强。其中在细胞贴壁 24h 后两组细胞生长出现明显差异($t=7.172, P=0.002$),AFP 过表达组 HepG2 细胞生长较阴性对照组快,同时在以后的 48h($t=5.617, P=0.005$)、72h($t=4.133, P=0.015$)、96h($t=4.604, P=0.010$)均具有明显差异。进一步在细胞生长 48h 后分析细胞周期发现,AFP 过表达组 HepG2 细胞 G₁ 期、S 期和 G₂ 期细胞所

占的比例分别是 49%、21%和 30%,其阴性对照组 HepG2 细胞 G₁ 期、S 期和 G₂ 期细胞所占的比例分别是 61%、12%和 27%,即 AFP 基因过表达后 HepG2 细胞 S 期细胞明显增多($P=0.014$)(Figure 2),这一结果表明,AFP 基因过表达可以通过调控细胞周期进程促进 HepG2 细胞的增殖。



Note: A: fluorescence of HepG2 negative control cells (NC) and AFP overexpression HepG2 cell line (OE); Bright Field (BF): green fluorescent protein; B: the overexpression efficiency of AFP in HepG2 cell line was assayed by Western Blot. ** $P<0.01$.

Figure 1 The efficiency of LV-AFP and negative control transfection on HepG2 cell lines



Note: A: cell growth viability was assayed in HepG2 negative control cells (NC) and AFP overexpression HepG2 cell line (OE) by CCK8-assay at days 1, 2, 3, 4 and 5 time-points; B: quantification of the cell cycle in (C); C: cell cycle was assayed in HepG2 negative control cells (Left) and AFP overexpression HepG2 cell line. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 2 The efficiency of LV-AFP and negative control transfection on the proliferation of HepG2 cells

2.3 AFP基因过表达后 HepG2 细胞中 STAT3、p-STAT3 蛋白表达水平的变化

过表达 AFP 基因后通过对 Western Blot 结果分析显示,当 AFP 蛋白表达量增加时 STAT3 蛋白的表达变化不大,而 p-STAT3 蛋白的表达量伴随 AFP 的增加而上调 (Figure

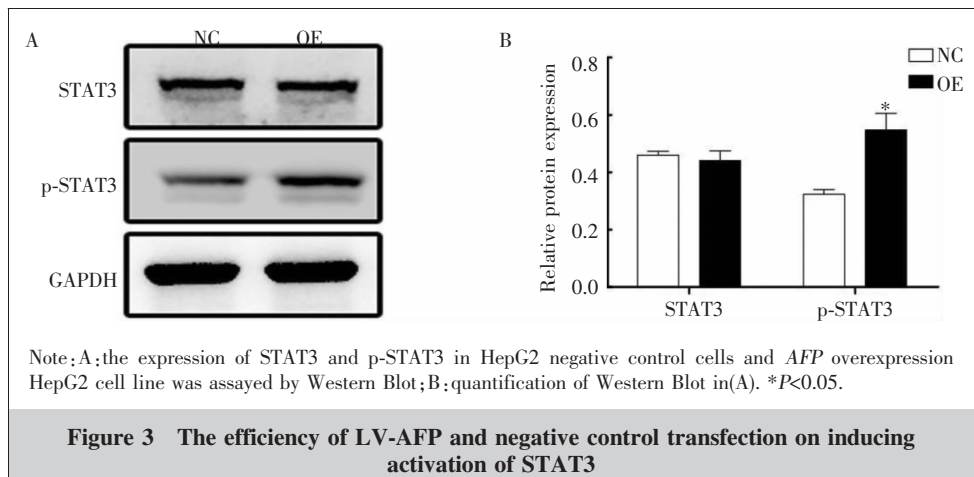
3)。这表明过表达 AFP 基因后存在 STAT3 蛋白被磷酸化激活,结果差异具有统计学意义 ($t=5.239, P=0.034$)。

3 讨论

肝癌恶性程度高,病死率居恶性肿瘤的第 2 位,然而其分子靶向治疗至今未取得突破性进展^[1,9]。循环肿瘤 DNA 甲基化(circulating tumour DNA,ctDNA)可作为诊断肝癌和评价其预后的分子标志物,但由于其属目前最新研究成果未在临床推广,故 AFP 仍是当前肝癌辅助诊断的特异性标志物^[10,11]。

在临床应用中,当 AFP 值大于 400 $\mu\text{g/L}$,并结合影像学指标,可考虑诊断肝癌^[12],然而升高的 AFP 不仅可以作为肝癌的诊断指标,而且还能作为一种细胞信号分子促进肝癌的生长^[13-15]。据相关研究报道,AFP 可通过激活 PI3K/Akt 信号通路促进肝癌细胞 HepG2 的增殖^[16]。在本研究中,我们将构建好的慢病毒转染进入肝癌 HepG2 细胞中,使 AFP 基因过表达。过表达 AFP 组的 HepG2 细胞增殖速率明显快于阴性对照组,且 AFP 过表达组 S 期占比明显高于阴性对照组,表明 AFP 可以促进 HepG2 细胞由 G₁ 期向 S 期转化,进而促进细胞增殖。

AFP 调节肝癌细胞增殖的分子机制非常复杂,有文献报道 AFP 可与肿瘤细胞表面的 AFP 受体结合促进人肝癌 Bel7402 细胞的增殖,而 AFP 受体还可通过 cAMP-PKA、TPK-Ras-MAPK、PI3K/PTEN/Akt 和 Ca²⁺等多种信号转导途径调节肝癌细胞的生长^[10,17,18]。STAT3 是转录激活因子家族成员之一,可



在多种信号分子(非受体酪氨酸激酶、生长因子、细胞因子和 G 蛋白等)刺激下并依靠其上游的一类具有激酶结构的连接蛋白 JAKs 使 STAT3 的一个羟基酪氨酸磷酸化而激活。激活的 STAT3 可进一步诱导细胞中癌基因的异常表达进而促进肿瘤的发生发展^[6]。有研究表明,STAT3 被大量磷酸化后可促进乳腺癌细胞的生长,相反当通过基因敲除 STAT3 或者通过药物抑制 STAT3 表达后可抑制细胞的增殖和迁移,促进乳腺癌细胞的凋亡^[19]。在本研究中我们发现 AFP 过表达后 p-STAT3 蛋白表达显著上调,肝癌细胞的生长较对照组显著增加,这与上述的研究结果是一致的,这表明 AFP 促进 HepG2 细胞增殖机制还可能涉及 STAT3 蛋白的激活。

综上,AFP 可能通过激活 STAT3 促进 HepG2 细胞增殖。该研究为 STAT3 基因作为 AFP 高表达肝癌的治疗靶点提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Chen WQ,Zheng RS,Zhang SW,et al. Report of cancer incidence and mortality in China,2013[J]. China Cancer, 2017,26(1):1-7. [陈万青,郑荣寿,张思维,等.2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J].中国肿瘤,2017,26(1):1-7.]
- [2] Chen JG,Lu JH,Zhang YH,et al. Progress and application of alpha-fetoprotein for screening[J]. China Cancer, 2009,18(8):609-612. [陈建国,陆建华,张永辉,等.甲胎蛋白的现场应用与筛查进展[J].中国肿瘤,2009,18(8):609-612.]
- [3] Mao L,Wang Y,Wang D,et al. TEMs but not DKK1 could serve as complementary biomarkers for AFP in dia-

- gnosing AFP-negative hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2017, 12(9):e0183880.
- [4] Chai EZ, Shanmugam MK, Arfuso F, et al. Targeting transcription factor STAT3 for cancer prevention and therapy [J]. Pharmacol Ther, 2016, 162: 86–97.
 - [5] Zhu G, Shi W, Fan H, et al. HES5 promotes cell proliferation and invasion through activation of STAT3 and predicts poor survival in hepatocellular carcinoma [J]. Experiment Mol Pathol, 2015, 99(3): 474–484.
 - [6] Kamran MZ, Patil P, Gude RP. Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances[J]. Bio Med Res Int, 2013, 2013(42): 1821.
 - [7] Feng Y, Ke C, Tang Q, et al. Metformin promotes autophagy and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma by downregulating Stat3 signaling[J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1088.
 - [8] Zhang XM, Zhou C, Gu H, et al. Correlation of RKIP, STAT3 and cyclin D1 expression in pathogenesis of gastric cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(9): 5902–5908.
 - [9] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7–30.
 - [10] Xu RH, Wei W, Krawczyk M, et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. Nat Mater, 2017, 16(11): 1155–1161.
 - [11] Cree IA, Uttley L, Buckley WH, et al. The evidence base for circulating tumour DNA blood-based biomarkers for the early detection of cancer: a systematic mapping review [J]. BMC Cancer, 2017, 17(1): 697.
 - [12] Zhou L, Rui JA, Wang SB, et al. The significance of serum AFP cut-off values, 20 and 400ng/ml in curatively resected patients with hepatocellular carcinoma and cirrhosis might be of difference[J]. Hepato-gastroenterology, 2012, 59(115): 840–843.
 - [13] Li M, Li H, Li C, et al. Cytoplasmic alpha-fetoprotein functions as a co-repressor in RA-RAR signaling to promote the growth of human hepatoma Bel 7402 cells [J]. Cancer Lett, 2009, 285(2): 190–199.
 - [14] Tang H, Tang XY, Liu M, et al. Targeting alpha-fetoprotein represses the proliferation of hepatoma cells via regulation of the cell cycle[J]. Int J Clin Chem, 2008, 394(1–2): 81–88.
 - [15] Meng W, Li X, Bai Z, et al. Silencing alpha-fetoprotein inhibits VEGF and MMP-2/9 production in human hepatocellular carcinoma cell [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e90660.
 - [16] Zheng L, Gong W, Liang P, et al. Effects of AFP-activated PI3K/Akt signaling pathway on cell proliferation of liver cancer [J]. J Int Soc Oncodev Biol Med, 2014, 35(5): 4095–4099.
 - [17] Li MS, Li PF, Yang FY, et al. The intracellular mechanism of alpha-fetoprotein promoting the proliferation of NIH 3T3 cells[J]. Cell Res, 2002, 12(2): 151–156.
 - [18] Zhang H, Bai Z, Chen J, et al. Alpha-fetoprotein-specific transfer factors downregulate alpha-fetoprotein expression and specifically induce apoptosis in Bel7402 alpha-fetoprotein positive hepatocarcinoma cells[J]. Hepatol Res, 2007, 37(7): 557–567.
 - [19] Yao X, Liu H, Zhang X, et al. Cell surface GRP78 accelerated breast cancer cell proliferation and migration by activating STAT3 [J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0125634.

《临床与实验病理学杂志》征稿启事

《临床与实验病理学杂志》(ISSN 1001-7399, CN 34-1073/R), 月刊, 连续入选《中国科学引文数据库》(CSCD) 来源期刊(核心库)、北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》“临床医学类核心期刊”及科技部中国科学技术信息研究所中国科技核心期刊(统计源期刊)。

精准医疗被认为是继经验医学、循证医学之后的第三次医学革命, 作为当今肿瘤临床研究最活跃的领域之一, 精准医疗在肿瘤治疗中正发挥越来越重要的作用; 而肿瘤诊断的“金标准”, 病理诊断不仅能判定肿瘤的良恶性、分类和分级, 也是临床医师进行预后评估和药物选择的重要依据。为加强病理学与临床的联系, 《临床与实验病理学杂志》现面向广大医务工作者征集有关精准医学与肿瘤专业领域在基础研究、临床诊断、治疗等方面的最新研究论文或进展评述。对有国家和省部级基金资助的文章, 将优先予以发表。网址: <http://www.cjcep.com>, 邮箱投稿: lcsybl@163.com, 编辑部电话: 0551-65161102。