

· 论 著 ·

蜂毒素对人肝癌细胞中 HMGB1 及 VEGF-C 表达的影响

曹清心^{1,2}, 汪 晨¹, 刘 宇³, 赵 丹⁴, 凌昌全¹

[摘要] **目的** 观察蜂毒素对人肝癌细胞株 HepG2 中高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1) 及血管内皮生长因子 C (vascular endothelial growth factors C, VEGF-C) 表达的影响, 探讨其抑制肝癌细胞的作用机制。**方法** 肝癌细胞 HepG2 体外培养, 经蜂毒素处理后, 采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法了解蜂毒素对肝癌细胞增殖的影响, 用 Western-blotting、qRT-PCR 方法检测 HMGB1、VEGF-C 的表达。**结果** 蜂毒素在体外能够抑制肝癌细胞的增殖活性; Western-blotting 结果显示, 蜂毒素可抑制 HMGB1 的表达, 且呈浓度依赖性, 但对 VEGF-C 的蛋白表达无明显影响; qRT-PCR 结果显示, 蜂毒素在 mRNA 水平均具有抑制 HMGB1、VEGF-C 表达的作用。**结论** 蜂毒素可降低肝癌细胞的增殖活性, 并可能通过 HMGB1、VEGF-C 的表达发挥抗肝癌作用。

[关键词] 蜂毒素; 肝细胞癌; 高迁移率族蛋白 B1; 血管内皮生长因子 C

[中图分类号] R735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2012)02-0101-04

Effect of melittin on high mobility group box 1 and vascular endothelial growth factors C expressions in hepatocarcinoma cells

CAO Qing-xin^{1,2}, WANG Chen¹, LIU Yu³, ZHAO Dan⁴, LING Chang-quan¹. 1. Department of Traditional Chinese Medicine, 3. Department of Cardiovascular Disease, 4. Department of Respiratory Disease, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. 455 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of melittin on the expressions of high mobility group box 1 (HMGB1) and vascular endothelial growth factors C (VEGF-C) in hepatocarcinoma cells in vitro and to study the mechanisms of melittin in hepatocarcinoma cells. **Methods** HepG2 cell line was treated with melittin in vitro. The inhibition of proliferation was detected by MTT assay. The expressions of HMGB1 and VEGF-C were detected by western-blotting and real-time quantitative PCR (qRT-PCR) assay. **Results** Melittin inhibited cell proliferation in vitro. Western-blotting outcome showed that melittin could down-regulate the protein of HMGB1, while VEGF-C expression did not change. qRT-PCR results showed that HMGB1 and VEGF-C mRNA expressions were down-regulate by melittin. **Conclusion** It is suggested that melittin can inhibit hepatocarcinoma cells proliferation. The effect of melittin in inducing anti-hepatocarcinoma may be related with down-regulation of HMGB1 and VEGF-C.

[Key words] melittin; hepatocarcinoma; HMGB1; VEGF-C

蜂毒素 (melittin) 又称蜂毒溶血肽, 是一种小分子多肽类生物毒素, 约占蜂毒干重的 50% 左右, 是蜜蜂毒中主要的功能物质。有研究^[1-2] 显示, 蜂毒素

对肺癌、卵巢癌等多种肿瘤细胞均有杀伤作用。既往研究表明, 蜂毒素可通过多种途径, 抑制肝癌的增殖、浸润及转移。在此基础上, 本实验进一步观察蜂毒素抗肝癌的生物活性及对细胞内重要的信号分子高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1) 及血管内皮生长因子 C (vascular endothelial growth factors C, VEGF-C) 的影响, 为蜂毒素的抗肿瘤的临床应用, 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30901986); 上海市晨光计划资助项目 (10CG41); 南京军区医学科技创新课题项目 (10MA028)

作者简介: 曹清心 (1985-), 女, 江苏南京人, 硕士研究生, 医师, 研究方向: 中西医结合 (肝癌防治)

作者单位: 1. 200433 上海, 第二军医大学长海医院中医科; 2. 200052 上海, 解放军 455 医院; 3. 200433 上海, 第二军医大学长海医院心血管内科; 4. 200433 上海, 第二军医大学长海医院呼吸内科

通讯作者: 凌昌全, E-mail: lingchangquan@gmail.com

1.1.1 细胞株 人肝癌细胞株 HepG₂ 由长海医院中医科实验室保存,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基,在 37℃、5% CO₂、完全饱和湿度条件下常规培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.1.2 试剂 蜂毒素为美国 Sigma 公司产品,批号:120M4068V。四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO) 购自美国 Sigma 公司。胎牛血清、DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司。小鼠抗人 HMGB1 单克隆抗体、羊抗人 VEGF-C 多克隆抗体购自美国 R&D 公司。Trizol 试剂、qRT-PCR 试剂盒、qPCR SuperMix-UDG 试剂盒及相关试剂等购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测蜂毒素对人肝癌细胞的生长抑制作用 将 HepG₂ 细胞接种于 6 孔板,每孔 10⁴ 个细胞,常规培养 24 h 后,加入终浓度为 0、1、2、4、8、16 μg/ml 的蜂毒素 (以 0 剂量组作为对照组),分别作用 24、48、72 h,每孔加入 MTT 10 μl 继续培养 4 h,倾去培养基,每孔加 DMSO 100 μl,室温震荡溶解结晶 10 min,于 570 nm (吸收波长) 和 630 nm (参比波长) 处测吸光度 (OD)。按公式计算细胞存活率:细胞存活率 = 实验组 (OD_{570 nm} - OD_{630 nm}) / 对照组 (OD_{570 nm} - OD_{630 nm}) × 100%

1.2.2 Western-blotting 检测蜂毒素对 HepG₂ 细胞 HMGB1 和 VEGF-C 蛋白表达的影响 将 HepG₂ 细胞接种于 6 孔板,每孔 10⁶ 个细胞,常规培养 24 h 后,分别加入终浓度为 0、1、2、4、6 μg/ml 的蜂毒素 (以 0 剂量组作为对照组)。作用 24 h 后,收集 6 孔板内的细胞,每孔细胞加入 100 μl 细胞裂解液,置于冰上裂解 1 min; 4℃,离心取上清,加上样缓冲液沸煮 5 min 变性,紫外分光光度计测定蛋白浓度。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳 2 h,转膜 1 h,牛奶封闭 2 h,加入一抗,4℃摇床孵育过夜,加入二抗,室温摇床孵育 1 h,暗室中辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗 ECL 显色,常规方法显影定影,显示特异的蛋白信号。

1.2.3 qRT-PCR 检测蜂毒素对 HepG₂ 细胞 HMGB1 mRNA 和 VEGF-C mRNA 表达的影响 取蜂毒素作用 24 h 的 HepG₂ 细胞,Trizol 方法提取总 RNA,定量后,按照 qRT-PCR 试剂盒说明书合成 cDNA,其中总 RNA 2 μg,反应体系为 20 μl。按照 qPCR SuperMix-UDG 试剂盒说明书进行 PCR 扩增: 50℃ 2 min,1 个循环;95℃ 2 min,1 个循环;95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环。反应在 ABI Prism 7500 实时荧光 PCR 仪上进行,所有样本检测值均用甘油

醛-3 磷酸脱氢酶 (GAPDH) 进行校准。引物序列由江苏省中西医结合医院设计,上海英骏生物技术有限公司合成,具体引物序列见表 1。

表 1 目的基因上下游引物序列表

目的基因	引物序列 (5' to 3')
GAPDH Forward	ACA TCA AGA AGG TGG TGA AGCA
GAPDH Reverse	GTC AAA GGT GGA GGA GTG GGT
HMGB1 Forward	GCC TCC TTC GGC CTT CTT CCT CTC
HMGB1 Reverse	CTC CCA GTT TCT TCG CAA CAT CACC
VEGF-C Forward	GGG GAA GGA GTT TGG AGT CGC
VEGF-C Reverse	CTG AGG TAG CTC GTG CTG GTG
VEGF-D Forward	CAG CAC CTC GTA CAT TTC
VEGF-D Reverse	TTG GCA AGC ACT TAC AAC CT

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件系统进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蜂毒素对人肝癌细胞的生长抑制作用 经不同浓度蜂毒素处理 24、48、72 h 后,显著降低 HepG₂ 细胞存活率,抑制细胞增殖,并且在 2 ~ 8 μg/ml 浓度范围内对 HepG₂ 细胞增殖抑制作用具有明显的剂量和时间依赖性,见表 2。

2.2 蜂毒素对 HepG₂ 细胞 HMGB1 和 VEGF-C 蛋白表达的影响 经不同浓度蜂毒素处理 24 h 后, HepG₂ 细胞中 HMGB1 的蛋白表达水平呈下降趋势,而 VEGF-C 无明显改变,见图 1。

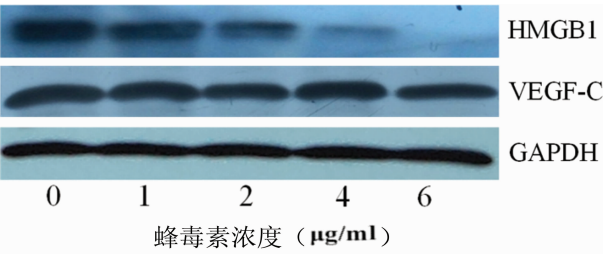


图 1 Western-blotting 检测蜂毒素对 HepG₂ 细胞 HMGB1 和 VEGF-C 蛋白表达的影响

2.3 蜂毒素对 HepG₂ 细胞 HMGB1 mRNA 和 VEGF-C mRNA 表达的影响 经不同浓度蜂毒素处理 24 h 后, HepG₂ 细胞中 HMGB1 和 VEGF-C 的 mRNA 表达水平均呈下降趋势,与对照组相比,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 2。

表 2 不同浓度蜂毒素对人肝癌细胞株 HepG₂ 时间生长抑制效应

蜂毒素 (μg/ml)	细胞存活率 (%)		
	24 h	48 h	72 h
0	100.00 ± 3.63	100.00 ± 3.74	100.00 ± 9.55
1	91.64 ± 6.31 *	56.71 ± 11.61 **	64.70 ± 2.38 **
2	83.22 ± 4.75 **	4.46 ± 2.20 **	5.64 ± 0.48 **
4	42.99 ± 2.56 **	3.53 ± 1.34 **	6.40 ± 0.96 **
8	2.01 ± 1.08 **	3.91 ± 1.45 **	7.36 ± 2.84 **
16	0.06 ± 0.02 **	4.40 ± 1.54 **	6.24 ± 1.30 **

注:与对照组(0 μg/ml)比较,* P < 0.05,** P < 0.01

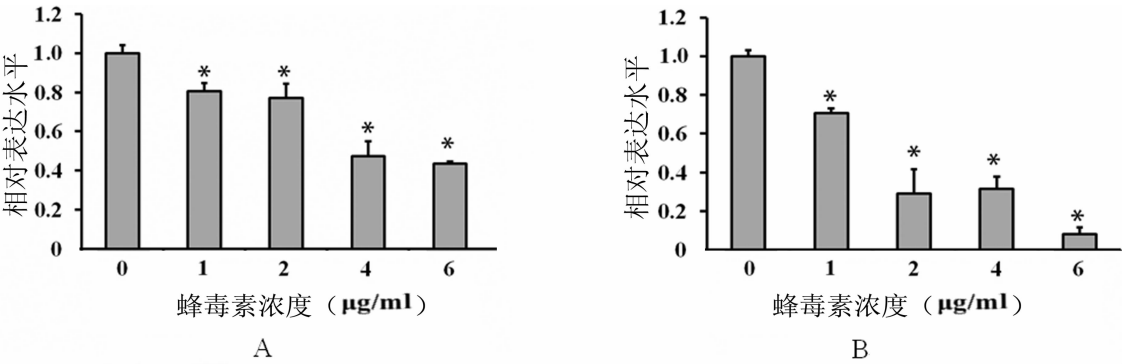


图 2 qRT-PCR 检测度蜂毒素对 HepG₂ 细胞 HMGB1 mRNA 和 VEGF-C mRNA 表达的影响

A:HMGB1 mRNA 相对表达水平;B: VEGF-C mRNA 相对表达水平
与对照组比较,* P < 0.05

3 讨 论

原发性肝癌是临床常见的恶性肿瘤之一,其发病率在全球实体肿瘤中居第五位,在肿瘤相关性死因居第四位^[3]。肿瘤的增殖、浸润和淋巴转移在原发性肝癌的发生、发展过程中非常重要,如何对其进行定量的测定,有助于肝癌的辅助诊断、预测术后复发及降低转移的危险。

HMGB1 是存在于真核生物细胞内的一类非组蛋白染色体结合蛋白,它在细胞外可通过与其受体,即晚期糖基化终末产物受体 (receptor of advanced glycation end products, RAGE) 和 Toll 样受体 (Toll like receptors, TLRs) 结合,促进肿瘤的增殖、浸润、转移^[4,5]。VEGF-C 是 VEGF 家族成员,在体内具有很强的血管生成作用,且较 VEGF 作用持久,它与其受体 VEGFR-3 结合后,可介导淋巴管内皮细胞增殖,具有促进肿瘤增殖、抑制细胞凋亡的作用^[6]。有研究^[7-9]显示, HMGB1 在结肠癌、肺癌及肝癌等多种肿瘤组织中均为高表达;而 VEGF-C 也在多种肿瘤中可检测到,其表达均亦明显高于正常组织,且与淋巴转移相关^[10-12]。

近期有研究显示, HMGB1 与 VEGF-C 之间可能存在相关性。Jiang 等^[13]发现,在人肝细胞癌细胞 HCCLM3 中, siRNA 靶向作用 HMGB1 mRNA 后, VEGF-C 表达下调,且能明显抑制细胞增殖、侵袭、浸润的能力。有研究^[14]认为, HMGB1 可有效诱导人单核巨噬细胞 U937 中 VEGF-C 的表达,并且 VEGF-C mRNA 的表达与 HMGB1 剂量呈正相关。在高转移率人口腔鳞癌细胞 HSC3 中, HMGB1 为高表达, VEGF-C 并与人口腔鳞癌的浸润和转移密切相关^[15]。还有研究^[16]认为, HMGB1 可能通过诱导结肠癌组织中 VEGF-C 的表达,从而促进结肠癌的淋巴结转移。由此可见, HMGB1 和 VEGF-C 与肿瘤的增殖、浸润和转移等过程都密切相关。

在既往蜂毒素实验基础上,本研究初步观察其对 HMGB1 及 VEGF-C 表达的影响。结果显示,蜂毒素可明显抑制人肝癌细胞 HepG₂ 的增殖,降低 HMGB1 蛋白和 HMGB1 mRNA 的表达,并对 VEGF-C mRNA 的表达具有抑制作用,但不影响 VEGF-C 的蛋白表达,由此提示,蜂毒素对肝癌细胞中 VEGF-C 的调节作用可能处于转录水平而非翻译水平。蜂毒素具有抑制细胞增殖、浸润及淋巴转移的作用,

这也许是其抑制肿瘤生长的作用机理之一,但其是否通过 HMGB1 作用于 VEGF-C 的具体机制尚有待于进一步研究。

【参考文献】

- [1] Oršolić N. Bee venom in cancer therapy [J]. Cancer Metastasis Rev, 2011; 1-22.
- [2] Jo M, Park MH, Kollipara PS, et al. Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 258 (1): 72-81.
- [3] Chen KF, Tai WT, Liu TH, et al. Sorafenib overcomes TRAIL resistance of hepatocellular carcinoma cells through the inhibition of STAT3 [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16 (21): 5189-5199.
- [4] Ohmori H, Luo Y, Kuniyasu H. Non-histone nuclear factor HMGB1 as a therapeutic target in colorectal cancer [J]. Expert Opin Ther Targets, 2011, 15 (2): 183-193.
- [5] Kokkola B, Andersson A, Mullins G, et al. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages [J]. Scand J Immunol, 2005, 61 (1): 1-9.
- [6] Staeker SA, Caesar C, Baldwin ME, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics [J]. Nat Med, 2001, 7 (4): 186-191.
- [7] Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, et al. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation [J]. J Transl Med, 2009, 7: 17.
- [8] Kostova N, Zlateva S, Ugrinova I, et al. The expression of HMGB1 protein and its receptor RAGE in human malignant tumors [J]. Mol Cell Biochem, 2010, 337 (1-2): 251-258.
- [9] Cheng BQ, Jia CQ, Liu CT, et al. Serum high mobility group box chromosomal protein1 is associated with clinicopathologic features in patients with hepatocellular carcinoma [J]. Dig Liver Dis, 2008, 40 (6): 446-452.
- [10] Su JL, Shih JY, Yen ML, et al. Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2/Neu-dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation; a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma [J]. Cancer Res, 2004, 64 (2): 554-564.
- [11] 姜汉国, 高 崑, 唐慰萍, 等. 甲状腺乳头状癌 VEGF-C 和 VEGF-D 表达与其转移关系的研究 [J]. 中国医师杂志, 2005, 7 (9): 1180-1182.
- [12] 吴碧川, 曾 虎, 张杰军, 等. VEGF-C 和 VEGF-D 在肝内胆管癌组织中的表达与淋巴结转移的关系及临床意义 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11 (15): 2910-2913.
- [13] Jiang W, Wang Z, Li X, et al. Reduced high-mobility group box 1 expression induced by RNA interference inhibits the bioactivity of hepatocellular carcinoma cell line HCCLM3 [J]. Dig Dis Sci, 2012, 57 (1): 92-98.
- [14] 李 焱, 蒋 凯, 卓文磊, 等. HMGB1 对 U937 细胞 VEGF-C/D 表达影响的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15 (2): 123-126.
- [15] Sasahira T, Kirita T, Oue N, et al. High mobility group box-1-inducible melanoma inhibitory activity is associated with nodal metastasis and lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma [J]. Cancer Sci, 2008, 99 (9): 1806-1812.
- [16] 李 焱, 蒋 凯, 卓文磊, 等. HMGB1 在结肠癌中的表达及其对 VEGF-C 的影响 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2007, 12 (6): 417-420.

(收稿日期: 2012-01-31)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)