

# 肝细胞生长因子对肝细胞癌侵袭和转移的影响

王庆军, 孙 抒, 李宏丹, 魏 嘉, 苏荣健

## ■背景资料

原发性肝癌的恶性程度高, 并且早期就有转移. 肝细胞癌的生长受体内多种因素的影响, 其中肝细胞生长因子对于促进肝细胞癌的侵袭和转移能力以及上皮-间叶转化发挥了重要的作用.

王庆军, 孙抒, 延边大学基础医学院病理学与法医学教研部 吉林省延吉市 133000

李宏丹, 魏嘉, 苏荣健, 辽宁医学院科学实验中心 辽宁省教育厅分子细胞生物学和新药开发重点实验室 辽宁省锦州市 121001

王庆军, 延边大学基础医学院病理学与法医学教研部在读硕士.

辽宁省博士启动基金资助项目, No. 20061074

作者贡献分布: 王庆军与苏荣健对此文所作贡献均等; 此课题由王庆军、孙抒、李宏丹、魏嘉及苏荣健共同设计; 研究过程也由王庆军、孙抒、李宏丹、魏嘉及苏荣健共同操作完成; 研究用试剂及分析工具由王庆军与苏荣健提供; 数据分析由王庆军、孙抒、李宏丹、魏嘉与苏荣健完成; 本论文写作由王庆军、孙抒与李宏丹完成.

通讯作者: 苏荣健, 121001, 辽宁省锦州市, 辽宁省教育厅分子细胞生物学和新药开发重点实验室. rongjiansu@yahoo.com.cn  
电话: 0416-4673183

收稿日期: 2008-07-17 修回日期: 2008-09-06

接受日期: 2008-09-08 在线出版日期: 2008-10-08

## Effect of hepatocellular growth factor on the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma

Qing-Jun Wang, Shu Sun, Hong-Dan Li, Jia Wei, Rong-Jian Su

Qing-Jun Wang, Shu Sun, Department of Pathology and Forensic Medicine College of Basic Medical Sciences, Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China

Hong-Dan Li, Jia Wei, Rong-Jian Su, Science Laboratory Center of Liaoning Medical College, Key Laboratory of Molecular Cell Biology and New Drug Development of the Educational Department of Liaoning Province, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Supported by: the Liaoning Provincial Doctoral Foundation, No. 20061074

Correspondence to: Rong-Jian Su, Key Laboratory of Molecular Cell Biology and New Drug Development of the Educational Department of Liaoning Province, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. rongjiansu@yahoo.com.cn

Received: 2008-07-17 Revised: 2008-09-06

Accepted: 2008-09-08 Published online: 2008-10-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of hepatocellular growth factor (HGF) on the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma and the role of PI3 kinase in this process.

**METHODS:** Cell culture, Transwell assay, wound healing and WB technology were used to explore the effect of HGF on the invasion

and metastasis of SMMC7721 cells. SMMC-7721 cells were then pretreated with PI3 kinase inhibitor LY294002 (10  $\mu$ mol/L) and the effect of LY294002 on HGF was investigated.

**RESULTS:** Transwell assay and wound healing assay showed increased invasion and metastasis capacity of SMMC-7721 which was treated with HGF. WB showed raised expression of N-cad, MMP-2, MMP-9, Vimentin, and decreased expression of E-cad in HGF-treated SMMC-7721. When pretreated with LY294002 (10  $\mu$ mol/L), SMMC-7721 was not influenced by HGF and no morphological change was observed. Transwell assay and wound healing assay had the same results as the non-treated SMMC-7721. WB showed no significant difference in expressions of N-cad, MMP-2, MMP-9, Vimentin and E-cad.

**CONCLUSION:** HGF promotes EMT of SMMC-7721, and PI3 kinase plays an essential role in this process.

**Key Words:** Hepatocellular Growth Factor; Hepatocellular carcinoma; EMT; PI3K

Wang QJ, Sun S, Li HD, Wei J, Su RJ. Effect of hepatocellular growth factor on the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(28): 3152-3156

## 摘要

**目的:** 研究HGF对肝细胞癌SMMC-7721的上皮-间叶转化的作用, 并对其机制进行探讨.

**方法:** HGF处理SMMC-7721后, 应用细胞培养、Transwell、划痕实验、WB技术研究HGF对肝癌细胞SMMC-7721上皮-间叶转化的作用. 并应用PI3 kinase抑制物LY294002 10  $\mu$ mol/L预处理细胞, 观察SMMC-7721的变化, 研究PI3 kinase对于HGF作用机制的影响.

**结果:** Transwell和划痕实验显示HGF处理的细胞侵袭和转移能力增强, 蛋白印迹结果显示HGF处理的细胞的N-cad、MMP-2、MMP-9和Vimentin的表达增加, E-cad的表达减少. LY294002预处理后, 细胞不再受HGF的影响,

## ■同行评议者

高英堂, 研究员, 天津市第三中心医院, 天津市肝胆疾病研究所分子细胞室; 吴建国, 教授, 武汉大学生命科学学院病毒学国家重点实验室

细胞的形态没有明显变化, Transwell和划痕实验结果与未经处理的SMMC-7721相同. 蛋白印迹结果显示: 细胞的N-cad、MMP-2、MMP-9、Vimentin和E-cad的表达变化不明显.

**结论:** HGF能够促进SMMC-7721的上皮间叶转化, 这种作用通过PI3 Kinase实现.

**关键词:** 肝细胞生长因子; 肝细胞癌; EMT; PI3K

王庆军, 孙抒, 李宏丹, 魏嘉, 苏荣健. 肝细胞生长因子对肝细胞癌侵袭和转移的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3152-3156  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3152.asp>

## 0 引言

肝细胞癌是一种常见的恶性肿瘤, 发病率居全球第5位<sup>[1]</sup>, 随着近年来治疗方法的不断改进, 特别是肝移植在临床上的应用, 肝细胞癌患者的预后已经得到明显的改善. 但是, 由于肝细胞癌的高侵袭和高转移能力使得患者还是难以逃离复发的命运. 肝细胞生长因子(hepatocellular growth factor, HGF)是肝细胞分泌的一种具有较强刺激肝细胞增殖作用的多功能细胞因子, 其在肝细胞癌的表达明显增加. 他主要通过与细胞膜表面的c-Met受体结合而发挥生物作用. HGF与c-Met结合后, 促进受体自身的磷酸化, 进而导致含有Src同源结构域的多种底物磷酸化, 包括磷脂酶C、PI3K等<sup>[2]</sup>, 在肿瘤的侵袭和转移方面HGF具有重要作用<sup>[3-5]</sup>. 但是关于HGF调节肝细胞癌侵袭和转移机制的研究国内外报道较少. 本实验应用细胞培养、Transwell、蛋白印迹等技术, 对HGF体外处理肝癌细胞SMMC-7721进行研究, 观察HGF对SMMC-7721上皮-间叶转化的作用, 探讨其作用机制, 为治疗肝细胞癌以及肝细胞癌的发病机制的研究提供实验依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** SMMC-7721购自中国科学院细胞库, HGF与LY294002购自Sigma公司. DMEM培养基购至Gibco公司, 胎牛血清购自天津, CO<sub>2</sub>培养箱为德国Thermal产品.

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与镜下观察:** SMMC-7721细胞于含100 mL/L FBS, 100 g/L青霉素, 100 单位/mL链霉素的DMEM培养基中培养, 置于37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱培养, 细胞每3-4天换液, 细胞80%融合后1:3传代. 每天观察记录.

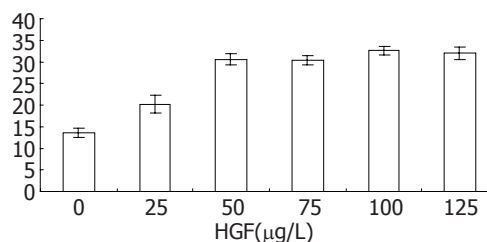


图1 HGF不同浓度处理SMMC-7721的Transwell结果.

**1.2.2 细胞处理:** 观察HGF对SMMC-7721的侵袭和转移能力的影响: 取30代以内的细胞进行实验. 将细胞以 $2 \times 10^5$ /L接种于六孔板中, 24 h后, 用PBS洗三次, 加入无血清DMEM+F12, 细胞饥饿12 h, 然后分别加入HGF 0、25、50、100 μg/L, 4 h后做Transwell计数细胞数, 筛选HGF最佳剂量. 观察LY294002对HGF的EMT作用的影响: 加入LY294002, 10 μmol/L预处理细胞1 h, 然后加入最佳浓度的HGF, 4 h.

**1.2.3 划痕实验:** 细胞长满单层后, 分别用最佳浓度的HGF和LY294002预处理的SMMC-7721做划痕试验, 用10 μL枪头在中间划一横线, 之后0、24 h分别观察照相.

**1.2.4 Transwell实验:** 将HGF、LY294002处理好的细胞含血清100 mL/L的DMEM培养基用悬液, 以 $2 \times 10^5$ 接种于Fibronectin包被的Corning Transwell孔板其中的12个Transwell上, 上室每孔加入100 μL, 下室加入600 μL含血清200 mL/L的DMEM培养基. 12 h后, 取出上室, 用棉签蘸去上层的细胞, 加入100 mL/L新鲜配置的甲醛溶液固定30 min, 然后用Hoechst 33285染色15 min. 甘油封片后用荧光显微镜检测细胞通过情况. 平均每个小室计数5个视野. 取平均值分析细胞的穿透能力.

**1.2.5 Western blot检测:** 将HGF、LY294002处理好的细胞, 用细胞刮刀刮下, 收集至EP管内. 用TBS漂洗后加入RIPA缓冲液(10 mL/L NP-40, 5 g/L脱氧胆酸钠, 10 g/L SDS, 1 g/L PMSF)裂解细胞, 考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度. 加热变性, SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 5%脱脂奶粉封闭过夜, 加入1:1000倍稀释的一抗(E-cad、N-cad、MMP-2、MMP-9、Vimentin), 杂交2 h, β-actin作为内参. TBST洗膜后加入二抗温育1 h, TBST洗膜后进行BCIP/NBT显色, 采用Chemigenius凝胶成像系统分析目的蛋白的表达量.

## 2 结果

**2.1 HGF处理SMMC-7721的最佳浓度** 由Transwell实验结果显示50 μg/L的HGF是最佳的浓度(图1).

### ■ 相关报道

HGF、HGF受体对于肝细胞癌的侵袭和转移能力具有重要的作用. 他们对于肿瘤的治疗有着重要的影响. PI3K和MAPK信号通路在肿瘤的侵袭和转移过程中发挥着重要的作用, 现在的研究认为, HGF对于肝细胞癌的侵袭和转移能力的影响是通过多种信号通路实现的.

### ■ 创新盘点

本文以肝细胞癌SMMC-7721为研究对象, 用HGF处理, 观察其上皮-间叶转化作用, 并且探讨其发挥作用的机制. 研究发现HGF是通过PI3K信号通路发挥促进肝细胞癌的侵袭和转移作用.



# 应用要点

本研究对于临床上治疗肝细胞癌,寻找抑制其侵袭和转移的新途径,以及开发抗肿瘤新药提供一个新的研究方向.为肝细胞癌的研究提供一个新热点.

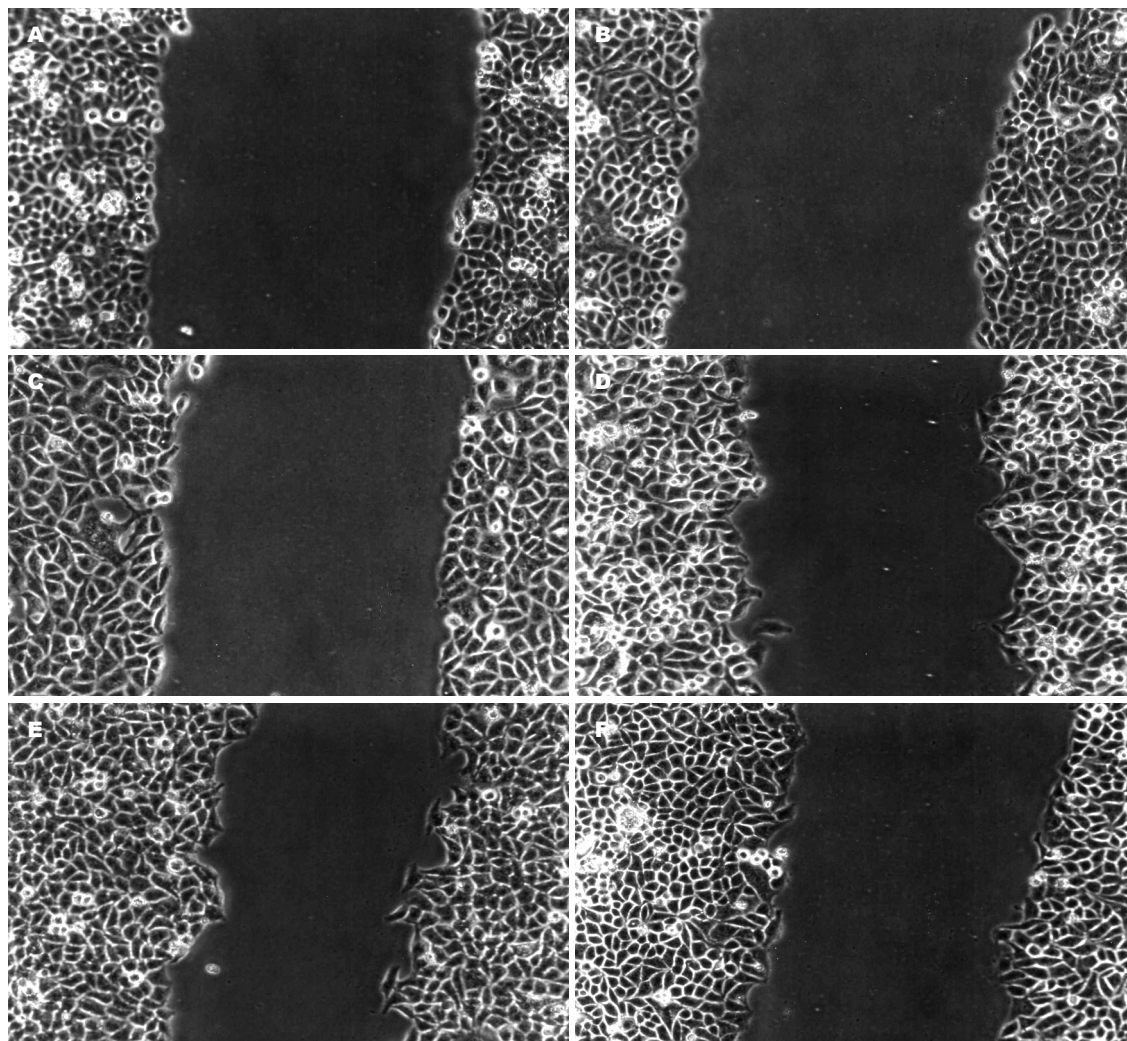


图2 HGF处理后的细胞生长结果( $\times 100$ ). A-C: 划痕实验0 h细胞; D-F: 划痕实验24 h细胞; A, D: 未处理的SMMC-7721; B, E: HGF处理的SMMC-7721; C, F: LY294002预处理后加入HGF.

**2.2 划痕实验结果** 划痕实验可见HGF处理后的细胞,细胞的划痕愈合比未经处理的SMMC-7721快.而经LY294002预处理后的细胞,细胞的划痕愈合情况也与不加HGF处理细胞的愈合情况相似,不再加快(图2).

**2.3 Transwell实验** 从实验结果可见, HGF处理组的细胞比要比未经HGF处理的SMMC-7721细胞多二倍以上,而当加入LY294002(PI3K抑制剂)预处理后的SMMC-7721细胞侵袭能力明显下降(图3).

**2.4 Western blot结果** 细胞经HGF处理后的SMMC-7721,随着HGF浓度的增加E-cad的表达而明显降低, MMP-2、MMP-9的表达明显增高, N-cad的表达明显增加、Vimentin的表达明显增加.  $\beta$ -Actin作为内参.而经LY294002预处理1 h后, HGF对于SMMC-7721的作用明显减弱, E-cad的表达与未经处理的SMMC-7721无差别, MMP-2、MMP-9的表达与HGF处理的

SMMC-7721相比也有不同程度的减少, N-cad的表达也不再增加. Vimentin的表达不变(图4).

## 3 讨论

HGF与细胞膜上的特异性受体c-Met结合而激活其自身磷酸化而导致多种底物磷酸化,如磷脂酶C $\gamma$ , PI3K等.从而引起细胞内一系列传导.继而,发挥生物学功能,如促进细胞增殖、运动等<sup>[2]</sup>.

由实验结果可见, HGF能够促进SMMC-7721的侵袭和转移能力,并且有一定的剂量依赖性,  $<50 \mu\text{g/L}$ 时随着浓度的增加,侵袭和转移能力增强,  $>50 \mu\text{g/L}$ 以后,侵袭和转移能力不再增强. Transwell实验显示SMMC-7721在HGF $<50 \mu\text{g/L}$ 时,随着HGF浓度的增加,细胞的侵袭能力明显增强,细胞的划痕愈合加快、穿透能力增强.蛋白印迹结果显示: HGF处理后的SMMC-7721的E-cad的表达明显减少, E-cad是钙黏素家族的成员之一,他主要介导细胞与细

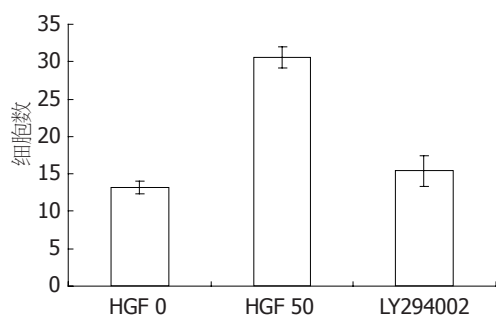


图 3 HGF与LY294002预处理后再加入HGF的SMMC-7721 Transwell结果.

胞之间的连接, 他的表达减少, 细胞之间的连接就会减弱, 促进了细胞的侵袭和转移. MMP-2, MMP-9是金属蛋白酶家族的成员, 他们能够水解基底膜和基质成分. 其表达的增加有利于肿瘤细胞的生长、浸润和转移. WB结果显示, HGF处理后的SMMC-7721的MMP-2、MMP-9的表达均明显升高, 也促进了SMMC-7721的侵袭和转移. 研究证实N-cad与Vimentin表达的增加有助于肿瘤的侵袭和转移能力. Vimentin, 即波形蛋白, 是细胞中间丝的一种蛋白, 多表达于间叶肿瘤中, 目前研究认为, N-cad与Vimentin表达的增加与肿瘤细胞的EMT呈正比<sup>[6-7]</sup>. HGF处理后的细胞, N-cad与Vimentin的表达均增加.

LY294002能够抑制HGF的EMT作用. LY294002是PI3K的抑制剂, 他能够抑制PI3K的活性. 当应用LY294002预处理SMMC-7721, 1 h后, 细胞的PI3K的活性被抑制, 当再加入HGF后, 细胞的形态学变化以及划痕实验、Transwell结果显示, 其对于SMMC-7721的EMT作用明显减弱. 在形态学上, 细胞的形态变化不如单纯HGF处理细胞变化明显, 划痕实验和Transwell结果也显示经LY294002预处理后, 再加入HGF也不会增加细胞划痕愈合速度、穿透能力也不再增强, 并且浓度组之间也无差别. 蛋白印迹结果显示, 经LY294002预处理后, E-cad的表达不再受HGF的影响, 与未处理的SMMC-7721的表达量相同. 因而, LY294002能够抑制了细胞的EMT, 减弱了细胞的侵袭和转移能力. MMP-2, MMP-9的表达也受到LY294002的抑制作用, 表达量明显减少. 减弱了HGF处理SMMC-7721的侵袭能力. 经LY294002处理后的细胞, N-cad与Vimentin的表达也不再增加, 而是与SMMC-7721的表达程度接近. 细胞的侵袭和转移能力减弱.

总之, HGF能够增强SMMC-7721的上皮-间叶转化能力<sup>[8-9]</sup>, 侵袭和转移能力, 降低细胞的黏

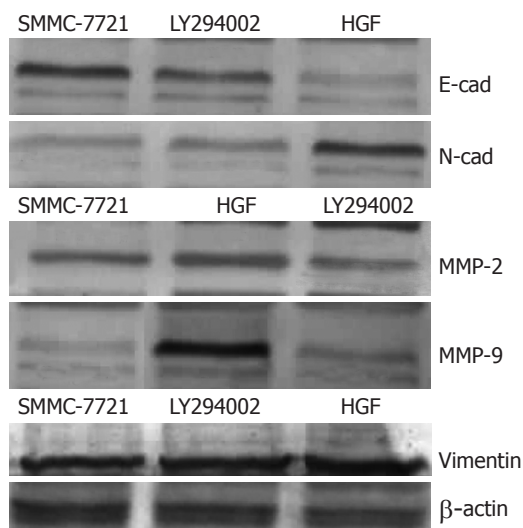


图 4 Western blot检测结果.

附能力. 其机制与PI3K有关<sup>[10]</sup>, HGF通过与c-Met结合<sup>[11-12]</sup>后激活了PI3K, 继而引起一系列的细胞内信号传导, 促进了肝细胞癌SMMC-7721的上皮-间叶转化.

#### 4 参考文献

- 1 Bräu N, Fox RK, Xiao P, Marks K, Naqvi Z, Taylor LE, Trikha A, Sherman M, Sulkowski MS, Dieterich DT, Rigsby MO, Wright TL, Hernandez MD, Jain MK, Khatri GK, Sterling RK, Bonacini M, Martyn CA, Aytaman A, Llovet JM, Brown ST, Bini EJ. Presentation and outcome of hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients: a U.S.-Canadian multicenter study. *J Hepatol* 2007; 47: 527-537
- 2 Maulik G, Shrikhande A, Kijima T, Ma PC, Morrison PT, Salgia R. Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 41-59
- 3 Trusolino L, Cavassa S, Angelini P, Andó M, Bertotti A, Comoglio PM, Boccaccio C. HGF/scatter factor selectively promotes cell invasion by increasing integrin avidity. *FASEB J* 2000; 14: 1629-1640
- 4 Kermorgant S, Aparicio T, Dessirier V, Lewin MJ, Lehy T. Hepatocyte growth factor induces colonic cancer cell invasiveness via enhanced motility and protease overproduction. Evidence for PI3 kinase and PKC involvement. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1035-1042
- 5 Yano H, Hara A, Murase S, Hayashi K, Ando H, Shinoda J, Shimokawa K, Sakai N. Expression of hepatocyte growth factor and matrix metalloproteinase-2 in human glioma. *Brain Tumor Pathol* 2001; 18: 7-12
- 6 Yoon WH, Song IS, Lee BH, Jung YJ, Kim TD, Li G, Lee TG, Park HD, Lim K, Hwang BD. Differential regulation of vimentin mRNA by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate and all-trans-retinoic acid correlates with motility of Hep 3B human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 2004;

#### ■名词解释

EMT(上皮-间叶转化): 具有极性的上皮细胞转化成为具有活动能力的间质细胞并获得侵袭和迁移能力的过程. 他存在于人体多个生理和病理过程中. EMT的发生涉及到多个信号转导通路和复杂的分子机制, 与钙连接素、生长因子、转录因子、微环境等有关. EMT与肿瘤细胞的侵袭和转移关系密切.



## ■同行评价

本文的研究内容尚可,实验数据较充足,具有反映实验结果的图片资料,科学结论较明确,具有一定的新颖性。

- 203: 99-105
- 7 Nakajima S, Doi R, Toyoda E, Tsuji S, Wada M, Koizumi M, Tulachan SS, Ito D, Kami K, Mori T, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Hosotani R, Imamura M. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4125-4133
- 8 Jiang WG, Martin TA, Parr C, Davies G, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 53: 35-69
- 9 Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Julien S, Prévost G, Zimmer A, Ouelaa R, Bracke M, De Wever O, Gespach C. Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. *Drug Resist Updat* 2008 Aug 19. [Epub ahead of print]
- 10 Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 2153-2160
- 11 Numata M, Ido A, Moriuchi A, Kim I, Tahara Y, Yamamoto S, Hasuike S, Nagata K, Miyata Y, Uto H, Tsubouchi H. Hepatocyte growth factor facilitates the repair of large colonic ulcers in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 551-558
- 12 Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, Zhang H, Yoshimura T, Kawazoe S, Eguchi Y, Yasutake T, Hisatomi A, Sakai T, Yamamoto K. Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1. *Hepatol Res* 2003; 27: 289-301

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志正文要求

**本刊讯** 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文。以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注)。如同一表中另有一套  $P$  值, 则 <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 第 3 套为 <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$ 。  $P$  值后注明何种检验及其具体数字, 如  $P < 0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用  $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$  表达。黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小  $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$ , 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴。(5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。(常务副总编辑: 张海宁 2008-10-08)