

IGFBP2 增强 IGF-1 诱导的 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭

张雨 崔东倩 刘倩 韩陈陈 罗婷婷 马旻 魏伟

摘要 目的 探讨胰岛素样生长因子结合蛋白 2(IGFBP2)对胰岛素样生长因子-1(IGF-1)诱导人源肝癌(HCC)细胞株 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响及其机制。方法 选用 15.6、31.2、62.5、125、250 ng/ml 的 IGFBP2 与 50 ng/ml 的 IGF-1 联合刺激 HepG2 细胞。用 CCK-8 法检测细胞增殖,transwell 法检测细胞迁移和侵袭;Western blot 检测细胞内信号通路相关蛋白的活化和表达。结果 与 IGF-1 单独刺激相比,IGFBP2 与 IGF-1 联合作用可增强 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭能力;IGFBP2 与 IGF-1 联合刺激增加 HepG2 细胞株中 IGF1R、Akt 和 ERK 磷酸化水平,而对总表达无明显改变,同时上调早期生长反应蛋白 1(EGR1)的表达。结论 IGFBP2 通过活化 Akt 及 ERK 信号通路增强 IGF-1 诱导 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭的能力。

关键词 胰岛素样生长因子结合蛋白 2;胰岛素样生长因子-1;HepG2;细胞增殖;细胞迁移和侵袭

中图分类号 R 329;R 735.7;R 341.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)03-0348-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.003

胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)是 IGF 家族成员,可与胰岛素样生长因子 1 受体(insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R)结合并参与肿瘤的发生发展^[1-2]。研究^[3]表明 IGF-1 可以促进黑色素瘤细胞转移;还可通过上调早期生长反应蛋白 1(early growth response 1, EGR1)的表达增强肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)细胞的迁移和侵袭能力^[4]。胰岛素样生长因子结合蛋白 2(insulin-like growth factor binding protein 2, IGFBP2)是循环系统中含量第二大的 IGF-1^[5]。IGFBP2 结构中含有 IGF 结合区域,可在循环

中与 IGF 形成复合物并调节 IGF 功能^[6]。IGFBP2 可通过调控 IGF/IGFR 信号通路促进肿瘤进展,但 IGFBP2 在 IGF-1 诱导肝癌细胞增殖、迁移和侵袭中的作用尚未有报道。

该研究选用不同浓度 IGFBP2 与 IGF-1 联合刺激 HepG2 细胞,用 CCK-8 法检测细胞增殖,transwell 法检测细胞迁移和侵袭,Western blot 检测细胞内信号通路相关蛋白的活化和表达,旨在揭示 IGFBP2 在 IGF-1 诱导 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 高糖 DMEM、胎牛血清购自美国 Biological Industries 公司;胰酶购自美国 Wisent Inc 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海 Bestbio 生物公司;CCK-8 试剂盒购自日本 DOJINDO 公司;Elk1、磷酸化 Elk1、Akt、磷酸化 Akt、p44/42 MAPK (ERK1/2)、磷酸化 p44/42 MAPK (ERK1/2)、EGR1、磷酸化 IGF-1R 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; β -actin、HRP 偶联抗兔和小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;24 孔板购自美国 NEST 公司;0.5% 结晶紫染色液、PBS 缓冲液购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.2 细胞株的培养 人源 HCC 细胞株 HepG2 购自美国 American Type Culture Collection 公司,以 2×10^6 个/ml 密度接种于细胞培养瓶中,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 置于 5% CO_2 、37 °C 培养箱中培养。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 法检测 HepG2 细胞增殖能力 将对数生长期的 HepG2 细胞,用胰蛋白酶消化,配制成细胞悬液并调整细胞密度为 5×10^4 个/ml。取 100 μl 细胞悬液接种于 96 孔板各孔中,5% CO_2 、37 °C 培养至细胞贴壁且融合度为 50% ~ 60% 后,将不同浓度的 IGFBP2(15.6、31.2、62.5、125、250 ng/ml)与 IGF-1(50 ng/ml)加入各孔中,每组设 3 个复孔。

2020-09-30 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81502123、81673444);安徽省自然科学基金(编号:1308085QH130);安徽省高等学校省级自然科学基金项目(编号:KJ2014A119、KJ2019A0234)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,合肥 230032

作者简介:张雨,女,硕士研究生;

魏伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

马旻,女,副教授,责任作者,E-mail: mayang_ahmu@126.com

培养 48、72 h 后,每个孔中分别加入 10 μ l CCK-8 溶液,轻轻敲击培养板混匀,培养箱中孵育 1~4 h,酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。

1.2.2 Transwell 法检测细胞迁移和侵袭 采用文献^[4]中相关方法,将处于对数生长期、融合度为 70%~80% 且饥饿处理 12~24 h 的 HepG2 细胞,消化并计数后,用无血清培养基 DMEM 重悬细胞并调整细胞密度为 2×10^5 个/ml,将含有不同浓度 IGFBP2 (15.6、31.2、62.5、125、250 ng/ml) 与 IGF-1 (50 ng/ml) 的 200 μ l 细胞悬液接种于小室的上室。下室加入 600 μ l 含有 10% 胎牛血清的培养基,每组设 3 个复孔进行细胞迁移和侵袭实验。侵袭实验中,预先在上室的底部均匀的铺一层 Matrigel,铺胶过程中避免产生气泡。培养 12 h 后取出 24 孔板,用棉签小心擦拭小室内室, PBS 洗 2 次,4% 多聚甲醛固定 30 min。0.5% 结晶紫染色液染色 15 min, PBS 清洗 3 次,自然晾干,正置显微镜拍照计数,一个小室计数 5 个区域的细胞数,取平均值,一次实验至少计数 3 个小室。

1.2.3 Western blot 250 ng/ml IGFBP2 与 50 ng/ml IGF-1 联合刺激 HepG2 细胞 0、0.5、1、4、12、24、48 h 后收集细胞蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量,加入一定量的 loading buffer 后煮样,10% 分离胶 5% 浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳,分离后转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶 37 $^{\circ}$ C 摇床封闭 2 h 后,一抗(1:1 000 稀释)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日,TBST 洗膜 8 min \times 3 次后,使用辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(兔二抗按 1:10 000 稀释,鼠二抗按 1:20 000 稀释)室温孵育 2 h,TBST 洗膜 8 min \times 3 次,化学发光液暗室显影。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异的比较采用单因素方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IGFBP2 对 IGF-1 诱导 HepG2 细胞增殖能力的影响 如图 1 结果显示,刺激细胞 48 h 后,与对照组(IGF-1 单独刺激)相比,15.6、31.2 ng/ml 的 IGFBP2 与 IGF-1 联合刺激组细胞增殖差异无统计学意义($P > 0.05$);62.5、125、250 ng/ml 的 IGFBP2 与 IGF-1 联合刺激组增强 HepG2 细胞的增殖能力($F = 8.32$, $P < 0.05$),且具有浓度依赖的特性。刺激细胞 72 h 后,与对照组(IGF-1 单独刺激)相比,

不同浓度 IGFBP2 与 IGF-1 联合刺激各组可浓度依赖地增强 IGF-1 诱导 HepG2 细胞的增殖能力,差异有统计学意义($F = 13.20$, $P < 0.05$)。

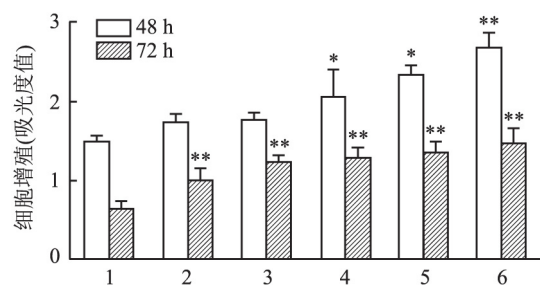


图1 不同浓度 IGFBP2 与 IGF-1 联合刺激对 HepG2 细胞增殖能力的影响

1: 对照组 (IGF-1 50 ng/ml 单独刺激); 2: IGFBP2 15.6 ng/ml + IGF-1 50 ng/ml 联合刺激组; 3: IGFBP2 31.2 ng/ml + IGF-1 50 ng/ml 联合刺激组; 4: IGFBP2 62.5 ng/ml + IGF-1 50 ng/ml 联合刺激组; 5: IGFBP2 125 ng/ml + IGF-1 50 ng/ml 联合刺激组; 6: IGFBP2 250 ng/ml + IGF-1 50 ng/ml 联合刺激组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 IGFBP2 对 IGF-1 诱导 HepG2 细胞迁移和侵袭能力的影响 与对照组相比,用不同浓度(15.6、31.2、62.5、125、250 ng/ml) IGFBP2 与 IGF-1 联合刺激 HepG2 细胞 12 h 后可浓度依赖地增加迁移的细胞数目(图 2A),差异有统计学意义($F = 113.3$, $P < 0.05$)(图 2B);细胞侵袭数目统计结果表明,与对照组相比,不同浓度 IGFBP2 (15.6、31.2、62.5、125、250 ng/ml) 与 IGF-1 联合刺激 HepG2 细胞 12 h 后可浓度依赖地增加侵袭的细胞数目(图 2C),差异有统计学意义($F = 81.1$, $P < 0.05$)(图 2D)。

2.3 IGFBP2 与 IGF-1 联合刺激活化胞内 Akt、ERK 信号通路 选用 250 ng/ml IGFBP2 与 50 ng/ml IGF-1 联合刺激 HepG2 细胞 0、0.5、1、4、12、24、48 h, Western blot 检测胞内信号通路相关蛋白的活化和表达。结果显示,与 0 h (50 ng/ml IGF-1 单独刺激)相比,IGF1R 的磷酸化水平逐渐增高,并在刺激 4 h 时达到峰值($P < 0.05$)随后逐步降低;与对照组(IGF-1 单独刺激)相比,Akt 和 ERK 的磷酸化水平在联合刺激 0.5 h 时增高($P < 0.05$)随着时间的延长逐渐降低,而总表达无明显改变;联合刺激不同时间 EGR1 的蛋白表达水平也逐渐增高(图 3)。以上结果表明,IGFBP2 与 IGF-1 联合刺激活化 HepG2 细胞内 Akt、ERK 信号通路,上调 EGR1 的蛋白表达。

3 讨论

肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭是恶性肿瘤重要的

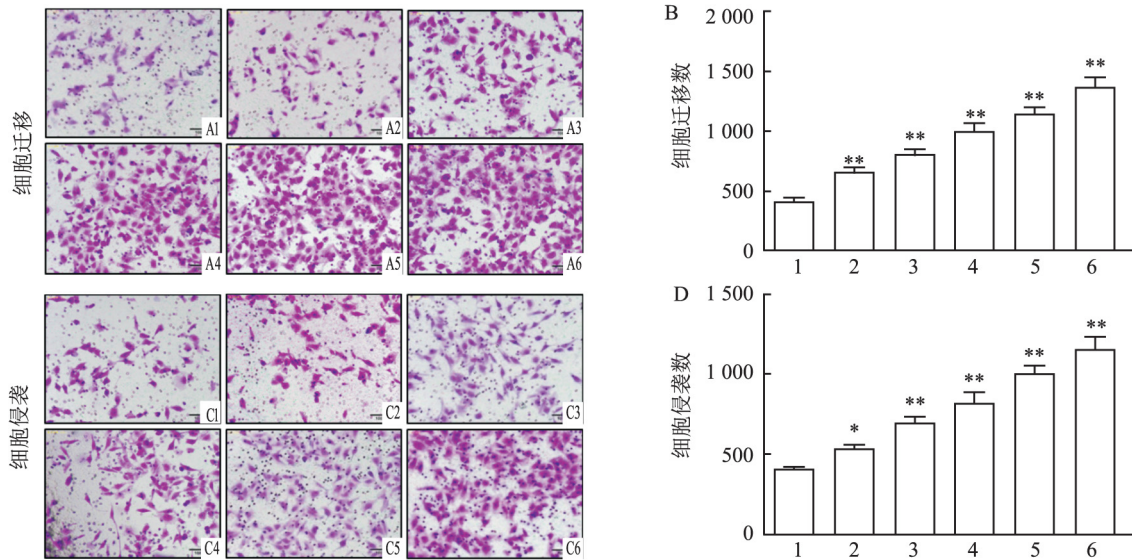


图2 不同浓度 IGFBP2 与 IGF-1 联合刺激对 HepG2 细胞迁移和侵袭能力的影响

A: Transwell 法检测不同浓度 IGFBP2 与 IGF-1 联合刺激对 HepG2 细胞迁移能力的影响 $\times 400$; B: HepG2 细胞迁移数目统计; C: Transwell 法检测不同浓度 IGFBP2 与 IGF-1 联合刺激对 HepG2 细胞侵袭能力的影响 $\times 400$; D: HepG2 细胞侵袭数目统计; 1: 对照组 (IGF-1 50 ng/ml 单独刺激); 2: IGFBP2 15.6 ng/ml + IGF-1 50 ng/ml 联合刺激组; 3: IGFBP2 31.2 ng/ml + IGF-1 50 ng/ml 联合刺激组; 4: IGFBP2 62.5 ng/ml + IGF-1 50 ng/ml 联合刺激组; 5: IGFBP2 125 ng/ml + IGF-1 50 ng/ml 联合刺激组; 6: IGFBP2 250 ng/ml + IGF-1 50 ng/ml 联合刺激组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

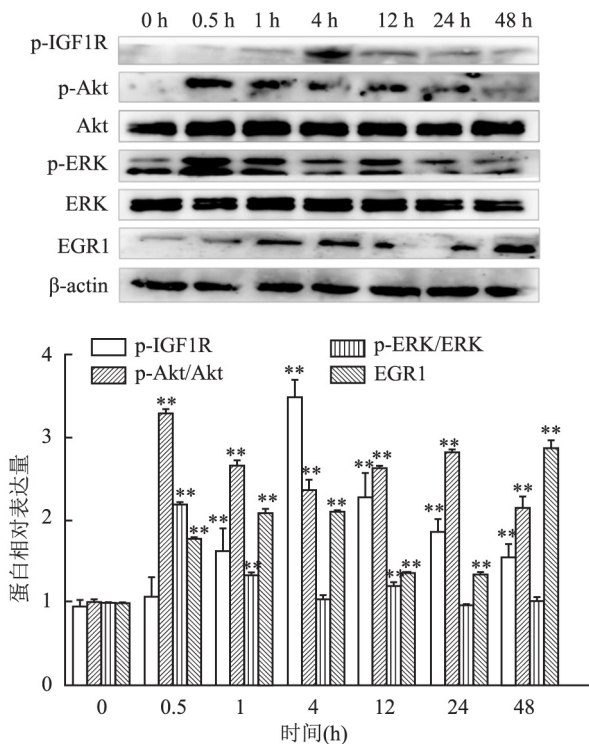


图3 250 ng/ml IGFBP2 与 50 ng/ml IGF-1 联合刺激不同时间对胞内 Akt 及 ERK 信号通路活化的影响
与 0 h 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

囊性癌中,上调 IGFBP2 的表达可以增强肿瘤细胞的侵袭迁移能力^[7]; IGFBP2 通过激活 NF- κ B 信号通路促进胰腺癌细胞侵袭^[8];上调 IGFBP2 的表达增强 HCC 细胞株 Huh7 的迁移侵袭能力^[9]。然而, IGFBP2 对 IGF-1 诱导 HepG2 增殖、迁移和侵袭能力的影响尚不清楚。该研究选用不同浓度 IGFBP2 与 IGF-1 联合刺激 HepG2 细胞,用 CCK-8 法和 transwell 法检测细胞功能,结果表明 IGFBP2 可以增强 IGF-1 诱导 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭的能力。

Akt 及 ERK 信号通路的活化与肿瘤的发生发展密切相关。研究^[4]已证实 IGF-1 可以通过与 IGF1R 结合活化 Akt 及 ERK 信号通路增强 HCC 的迁移和侵袭能力。本研究中,用 Western blot 法检测胞内 IGF1R、Akt 及 ERK 蛋白表达,结果显示 IGF1R 在刺激 4 h 时磷酸化水平增高,而在刺激 0.5 h 时 Akt 及 ERK 信号通路已被活化,提示 IGFBP2 增强 IGF-1 诱导的 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭可能是通过 IGF-1 非依赖途径活化 Akt 及 ERK 信号通路进行的。研究^[10]报道 IGFBP-2 可通过自身 RGD 结构与 integrin β 1 受体结合活化 ERK 信号通路促进胶质瘤细胞增殖和侵袭;在卵巢癌中,IGFBP2 可以通过激活 ERK1/2 和 JNK 信号通路促进癌细胞增殖^[11]。因此,IGFBP2 活化 Akt 及 ERK 信号通路的

生物学行为。研究^[7-8]表明 IGFBP2 的异常表达与肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭关系密切。在涎腺性

具体机制还需要进一步研究。

EGR1 是即刻早期基因家族的重要成员,可被其上游如 Akt 或 ERK 等信号通路激活,被活化后可以通过调控其下游靶标基因在肿瘤恶性生物学行为中发挥重要作用。如在前列腺癌中,EGR1 通过与 IGF1R 基因结合上调 IGF1R 的表达,从而激活 Akt 及 ERK 信号通路,最终增强癌细胞的增殖能力^[12];在肝癌中,肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)可以诱导 EGR1 表达及转录,EGR1 通过转录激活下游 MMP-2 和 MMP-9 基因表达从而促进 HCC 细胞迁移和侵袭^[13]。本研究证明 IGFBP2 与 IGF-1 联合刺激 HepG2 细胞可以上调 EGR1 的表达,增强细胞的增殖、迁移和侵袭能力,为探究 HCC 分子机制提供新的方向。

参考文献

- [1] Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(18): 1472–89.
- [2] Ma J, Sawai H, Matsuo Y, et al. IGF-1 mediates PTEN suppression and enhances cell invasion and proliferation via activation of the IGF-1/PI3K/Akt signaling pathway in pancreatic cancer cells [J]. *J Surg Res*, 2010, 160(1): 90–101.
- [3] Le Coz V, Zhu C, Devocelle A, et al. IGF-1 contributes to the expansion of melanoma-initiating cells through an epithelial-mesenchymal transition process [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50): 82511–27.
- [4] 马 畅, 崔东倩, 韩陈陈, 等. IGF-1 通过激活 EGR1 诱导肝细胞癌的迁移和侵袭 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(11): 1750–5.
- [5] Rajaram S, Baylink D J. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions [J]. *Endocr Rev*, 1997, 18(6): 801–31.
- [6] Mitutsova V, Yeo Y, Davaze R, et al. Adult muscle-derived stem cells engraft and differentiate into insulin-expressing cells in pancreatic islets of diabetic mice [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 86.
- [7] Yao X, Wang Y, Duan Y, et al. IGFBP2 promotes salivary adenoid cystic carcinoma metastasis by activating the NF- κ B/ZEB1 signaling pathway [J]. *Cancer Lett*, 2018, 432: 38–46.
- [8] Gao S, Sun Y, Zhang X, et al. IGFBP2 Activates the NF- κ B pathway to drive epithelial-mesenchymal transition and invasive character in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(22): 6543–54.
- [9] 林玩福. 基于 IGFBP2 信号通路探讨解毒方对肝癌的增殖及迁移侵袭的抑制效应及作用机制 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2019.
- [10] Han S, Li Z, Master L M, et al. Exogenous IGFBP-2 promotes proliferation, invasion, and chemoresistance to temozolomide in glioma cells via the integrin β 1-ERK pathway [J]. *Br J Cancer*, 2014, 111(7): 1400–9.
- [11] Lim V, Zhu H, Diao S, et al. PKP3 interactions with MAPK-JNK-ERK1/2-mTOR pathway regulates autophagy and invasion in ovarian cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(2): 646–53.
- [12] Ma Y, Cheng Q Q, Ren Z J, et al. Induction of IGF-1R expression by Egr-1 facilitates the growth of prostate cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2012, 317(2): 150–6.
- [13] Ozen E, Gozukizil A, Erdal E, et al. Heparin inhibits hepatocyte growth factor induced motility and invasion of hepatocellular carcinoma cells through early growth response protein 1 [J]. *PLoS one*, 2012, 7(8): e42717.

IGFBP2 enhances IGF-1 induced proliferation, migration and invasion of HepG2 cells

Zhang Yu, Cui Dongqian, Liu Qian, et al

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032*)

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2) on insulin-like growth factor-1 (IGF-1) induced proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma (HCC) cell line of HepG2 cells. **Methods** 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 ng/ml IGFBP2 and 50 ng/ml IGF-1 were used to stimulate HepG2 cells. Cell proliferation was detected by CCK-8 method, and cell migration and invasion were detected by transwell method. Western blot was used to detect the activation and expression of intracellular signaling pathway-related proteins. **Results** The combination of IGFBP2 and IGF-1 could promote the proliferation, migration and invasion of HepG2 cells compared with the effect of IGF-1. The combination of IGFBP2 and IGF-1 increased phosphorylation levels of IGF1R, Akt and ERK in HepG2 cells without significant changes in total expression, and the protein expression of early growth response gene 1 (EGR1) also increased. **Conclusion** IGFBP2 enhances IGF-1 induced proliferation, migration and invasion of HepG2 cells by activating Akt and ERK signaling pathways.

Key words insulin-like growth factor binding protein 2; insulin-like growth factor-1; HepG2; cell proliferation; cell migration and invasion