

网络出版时间: 2019-1-11 14:05 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190109.1117.001.html>

◇基础医学研究◇

## PMA 对 4-HPR 抑制 HepG2 细胞体外迁移的影响

张玲<sup>1,2</sup>, 魏翔<sup>2</sup>, 张素梅<sup>2</sup>, 周青<sup>2</sup>, 汪渊<sup>2</sup>

**摘要** 目的 观察乙酸肉豆蔻佛波醇(PMA)对N-(4-羟基苯基)维生素甲酰胺(4-HPR)抑制肝癌细胞HepG2体外迁移的影响,并探讨相关机制。方法 PMA单独或联合4-HPR处理HepG2细胞,倒置显微镜下观察HepG2细胞形态学变化和药物对生长的影响;细胞划痕实验检测HepG2细胞体外迁移能力的变化;Western blot法检测迁移相关蛋白神经钙黏蛋白(N-cadherin)、肌球蛋白轻链激酶(MLCK)的表达和肌球蛋白轻链(MLC)磷酸化程度。结果 PMA联合4-HPR处理细胞密度小,形态更为细长;二者联合处理细胞迁移距离明显减少,而PMA单独处理细胞迁移距离增加( $P < 0.05$ );抑制细胞迁移过程中,N-cadherin、MLCK表达减少,MLC磷酸化亦降低( $P < 0.05$ )。结论 PMA联合4-HPR可抑制HepG2细胞的迁移,相比4-HPR组能更显著减少MLCK的表达和MLC的磷酸化,为进一步探讨4-HPR联合PMA治疗肝癌提供实验基础。

**关键词** 乙酸肉豆蔻佛波醇;N-(4-羟基苯基)维生素甲酰胺;肌球蛋白轻链激酶;神经钙黏蛋白;肌球蛋白轻链磷酸化;肝癌HepG2;迁移

中图分类号 R 735.7;R 329.24;R 73-37;R 979.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)02-0169-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.02.001

肝癌是常见肿瘤,在我国发病率较高,早期难发现,诊断时多已中晚期。侵袭转移往往是导致治疗欠佳的主因。乙酸肉豆蔻佛波醇(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)是一种从巴豆油中提取的化合物,初期研究具有较高的促癌活性<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2]</sup>显示PMA可诱导白血病细胞分化。N-(4-羟基苯基)维生素甲酰胺[N-(4-hydroxyphenyl)retinoide, 4-HPR]是全反

式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)的一种人工合成衍生物,前期研究<sup>[3-4]</sup>显示可显著抑制肝癌细胞HepG2、肺癌细胞A549的迁移。该研究观察PMA对4-HPR抑制人肝癌细胞株HepG2体外迁移的影响,并对其作用机制进行初步探讨。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 药物和试剂** PMA购自美国Cayman公司;4-HPR购自美国MCE公司;ATRA购自上海东苍生物科技有限公司。均用二甲基亚砜(DMSO)配制成10 mmol/L母液,-20℃避光保存。DMEM培养基购自美国Hyclone公司;0.25%胰酶、BCA蛋白定量试剂盒购自北京碧云天公司;肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)购自美国Abcam公司;肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)购自美国Proteintech公司;磷酸化的肌球蛋白轻链(phosphorylated myosin light chain, p-MLC)购自美国Cell Signaling Technology公司;ECL试剂盒购自美国Thermo Fisher公司。

**1.1.2 主要实验仪器** 倒置显微镜(DMI3000B,德国Leica公司);电泳仪(DYY-11型,北京六一仪器厂);化学发光成像仪(上海勤翔仪器公司);低温离心机(Legend micro21R,美国Thermo Fisher公司)。

#### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 将肝癌细胞HepG2培养在含10%小牛血清(杭州四季青生物公司)的DMEM培养基中,放置在37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱中。当细胞长至80%~90%密度,用0.25%胰酶消化传代。HepG2细胞株由安徽医科大学分子生物学实验室馈赠。

**1.2.2 实验分组、倒置显微镜下观察** 实验分溶剂对照组(0.1% DMSO)、100 nmol/L PMA组、10 μmol/L ATRA组、10 μmol/L 4-HPR组、PMA + ATRA组、PMA + 4-HPR组,共6组。待细胞长至40%~50%密度加药处理,48 h后倒置显微镜下观察,并拍照记录。

2018-08-10 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81272399);安徽省自然科学基金青年项目(编号:1508085QH185);皖南医学院中青年科研基金自然科学基金类项目(编号:WK201403)

作者单位:<sup>1</sup>皖南医学院生物化学教研室,芜湖 241002

<sup>2</sup>安徽医科大学分子生物学实验室、生物化学教研室,合肥 230032

作者简介:张玲,女,讲师;

汪渊,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wan-gyuan@ahmu.edu.cn

**1.2.3 细胞划痕实验** 取处于对数生长期的 HepG2 细胞,胰酶消化吹打重悬为单细胞悬液,均匀种入 24 孔细胞培养板中。待细胞长成单层即弃去培养液,用 200  $\mu$ l 枪头在 24 孔板每孔中央划出一痕,洗去死细胞后显微镜下拍照作为 0 h。药物处理 24 h 和 48 h,在同一观察点处拍照记录这两个时间点细胞划痕愈合情况,实验重复 3 次。利用 Image Pro Plus 软件测量各孔多点划痕距离,取均值,并用处理前的距离减去处理后的距离即为 24 h、48 h 的细胞迁移距离,数据用统计软件分析。

**1.2.4 Western blot 检测细胞 N-cadherin、MLCK 的表达和 MLC 的磷酸化** 收集药物处理 48 h 的细胞,分组同前,加入 RIPA 缓冲液(pH 7.4 的 Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% Triton, 0.1% SDS 磷酸酶抑制剂)提取蛋白,BCA 法蛋白定量。取 40  $\mu$ g 每孔蛋白上样,进行 SDS-PAGE 电泳。电转至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入兔源单克隆抗体 MLCK、兔源多克隆抗体 MLC、鼠源单克隆抗体 p-MLC、N-cadherin 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,经 TBST 洗涤后再加入相应浓度的二抗室温孵育 2 h,洗涤后用 ECL 试剂盒反应,在化学发光成像仪上显影拍照记录。以 Image Pro Plus 软件进行灰度扫描,分析各条带的灰度值,分别以 p-MLC/MLC、MLCK/ $\beta$ -actin、N-cadherin/ $\beta$ -actin 进行比值计算作半定量分析。实验重复 3 次,取其均值。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 10.0 软件进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间计量资料比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同处理组 HepG2 细胞生长和形态变化

药物处理 48 h,显微镜下可见溶剂对照组和 PMA 组、PMA + ATRA 组细胞密度大,光泽度好(图 1A、1B、1D)。ATRA 组细胞密度略有减少(图 1C)。4-HPR 组细胞数明显减少,失去正常生长,PMA + 4-HPR 组表现更为明显,形态更为细长,多核细胞减少(图 1E、1F)。

**2.2 不同处理组对 HepG2 细胞迁移的影响** 药物处理 24 h 的细胞,与溶剂对照组(迁移距离  $178 \pm 26.5 \mu\text{m}$ )相比,PMA 组(迁移距离  $237 \pm 32.6 \mu\text{m}$ )细胞的迁移距离增加( $F = 4.469, P < 0.05$ )。4-HPR 组(迁移距离  $93 \pm 22.0 \mu\text{m}$ )和 PMA + 4-HPR 组(迁移距离  $99 \pm 6.4 \mu\text{m}$ )细胞的迁移距离减少( $F = 8.653, P < 0.05$ )。药物处理 48 h 的细胞,与溶剂对照组(迁移距离  $346 \pm 19.3 \mu\text{m}$ )比较,PMA 组(迁移距离  $429 \pm 20.1 \mu\text{m}$ )细胞的迁移距离仍增加( $F = 6.386, P < 0.05$ )。4-HPR 组(迁移距离  $140 \pm 26.6 \mu\text{m}$ )和 PMA + 4-HPR 组(迁移距离  $128 \pm 14.2 \mu\text{m}$ )细胞的迁移距离仍减少( $F = 47.34, P < 0.05$ )。以上数据说明 PMA 单独处理可以增加肿瘤细胞的迁移距离,而和 4-HPR 联用后,促迁移能力消失,转为抑制效应(图 2~3)。图 2 中同时观察到 PMA + 4-HPR 组划痕边界的细胞形态更为细长,排列较稀疏。提示二者联用作用时间若延长,对细胞迁移的抑制可能更显著。

**2.3 不同处理组对 HepG2 细胞迁移相关蛋白表达的影响** Western blot 结果分析表明 PMA + 4-HPR 组、4-HPR 组可明显降低 MLCK、N-cadherin 的表达和 MLC 的磷酸化( $F_{\text{MLCK}/\beta\text{-actin}} = 128.385, F_{\text{N-cadherin}/\beta\text{-actin}} = 39.871, F_{\text{p-MLC}/\text{MLC}} = 35.378, P < 0.05$ )。PMA + 4-HPR 处理组相比 4-HPR 组,MLCK、MLC 的磷酸化降低更显著( $P < 0.05$ )。见图 4。

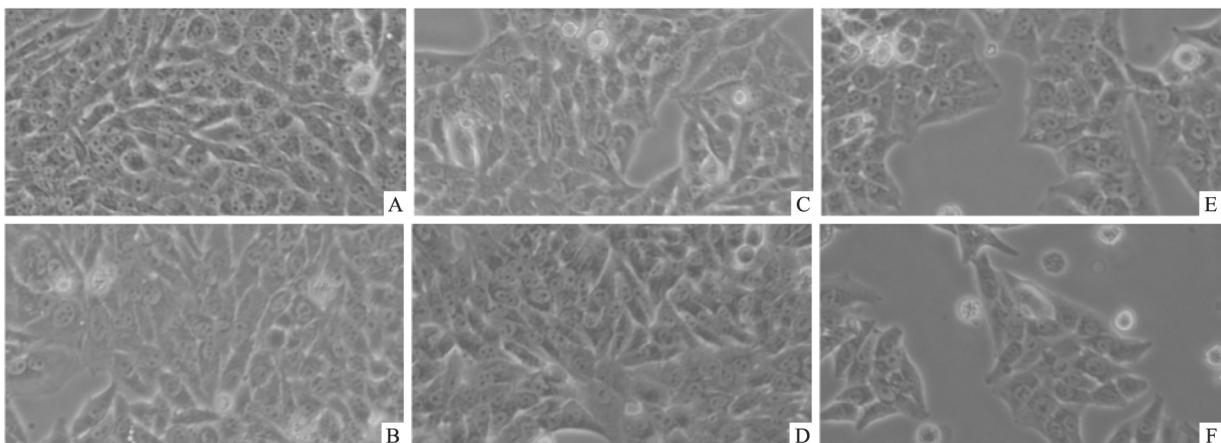


图 1 倒置显微镜观察 PMA、4-HPR 处理后 HepG2 细胞的生长  $\times 100$   
A: 溶剂对照组; B: PMA 组; C: ATRA 组; D: ATRA + PMA 组; E: 4-HPR 组; F: 4-HPR + PMA 组

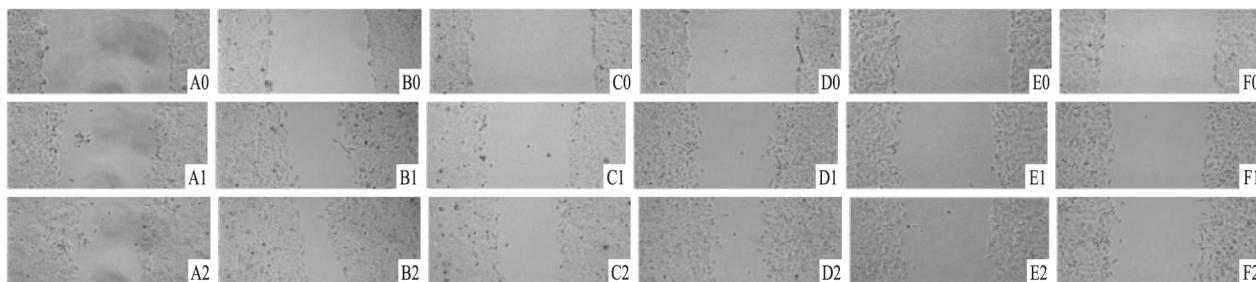


图2 细胞划痕实验检测 PMA、4-HPR 处理后 HepG2 细胞的迁移 ×100

A: 溶剂对照组; B: PMA 组; C: ATRA 组; D: ATRA + PMA 组; E: 4-HPR 组; F: 4-HPR + PMA 组; 0: 0 h; 1: 24 h; 2: 48 h

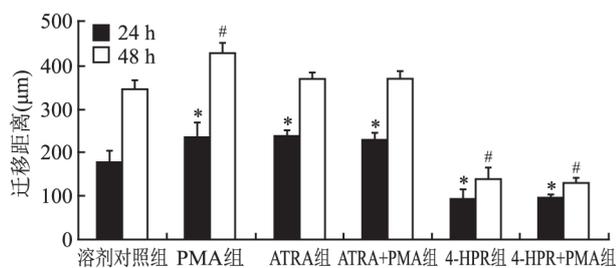


图3 细胞划痕实验迁移距离统计

与 24 h 溶剂对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 48 h 溶剂对照组比较: #  $P < 0.05$

### 3 讨论

肝癌是一种恶性度很高的肿瘤,临床上目前除了手术治疗和介入治疗外,没有十分有效的方法。应用于肝癌的化疗药物有限,需要探寻新的药物。ATRA 在八十年代已用于诱导急性早幼粒细胞白血病的分化治疗<sup>[5]</sup>。4-HPR 是 ATRA 的类似物,国外用于乳腺癌、前列腺癌、神经母细胞瘤的研究均已进入临床实验阶段<sup>[6-8]</sup>。本课题组前期研究<sup>[3-4,9]</sup>显示,与同浓度 ATRA 相比 4-HPR 能更有效抑制肺癌 A549 细胞、肝癌 HepG2 细胞的增殖和迁移。考虑到维甲酸类化合物长期使用的毒副作用,本研究中引入白血病细胞研究常用的诱导分化剂 PMA,观察到 PMA 单独处理促进肝癌 HepG2 细胞迁移,但和 4-HPR 联用能显著抑制细胞迁移和增殖,并改变细胞的形态。联用药时 PMA 是否表现出诱导分化作用需要进一步实验验证。而 4-HPR 前体 ATRA 与 PMA 的联用没有相类似的效应。一方面说明 4-HPR 药效强于 ATRA,另一方面提示 PMA 的作用通路和 4-HPR 相关,二者的联用不仅取消了 PMA 的促迁移效应,反而表现出强烈的抑制迁移作用。

N-cadherin 又称神经钙黏蛋白,主要在神经细胞、内皮细胞等间充质细胞中表达。研究<sup>[10]</sup>显示其可在多种肿瘤中上调表达,且与肿瘤侵袭性增强相

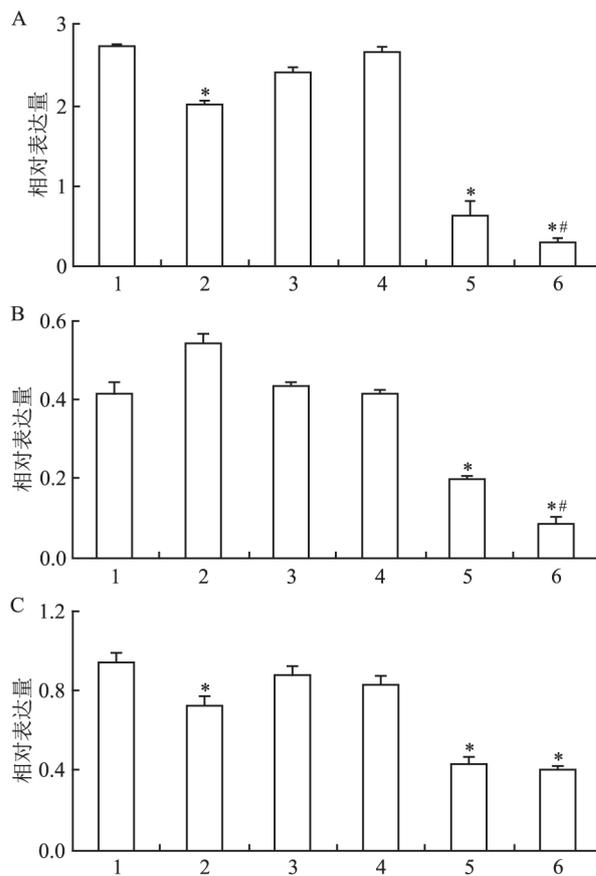
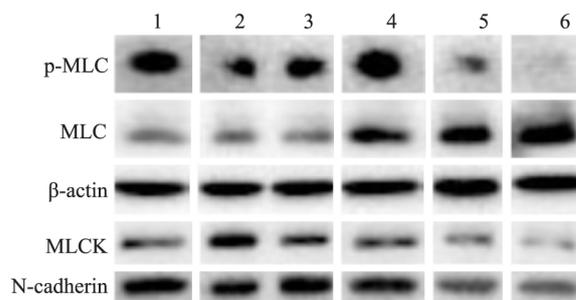


图4 Western blot 检测 PMA、4-HPR 对 HepG2 细胞迁移相关蛋白表达的影响

A: p-MLC/MLC; B: MLCK/β-actin; C: N-cadherin/β-actin; 1: ATRA + PMA 组; 2: ATRA 组; 3: 溶剂对照组; 4: PMA 组; 5: 4-HPR 组; 6: 4-HPR + PMA 组; 与溶剂对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 4-HPR 组比较: #  $P < 0.05$

关。本研究中 N-cadherin 在对照组中表达量大,在细胞迁移减慢的 PMA + 4-HPR 组和 4-HPR 组表达明显减少 ( $P < 0.05$ )。表明药物的使用可能抑制了肝癌细胞的迁移。MLCK 是一种蛋白激酶,其激活可使 MLC 磷酸化,进一步有利于肌球蛋白和肌动蛋白微丝之间的作用,促进细胞移行。国外报道<sup>[11]</sup>显示在一些类型细胞迁移过程中,MLCK 和激活的肌球蛋白在细胞的突出结构中含量丰富。近年亦有研究<sup>[12]</sup>指出 MLCK 给予鼠神经腺瘤细胞缓慢并有方向性的移动。本课题前期研究<sup>[3-4]</sup>显示在迁移受到抑制的肿瘤细胞中,MLCK 和磷酸化 MLC (p-MLC) 蛋白表达水平均有减少 ( $P < 0.05$ )。本次研究中 MLCK 和 p-MLC 的表达在 PMA + 4-HPR 组表现出比 4-HPR 组更显著的减少 ( $P < 0.05$ )。这提示 PMA 和 4-HPR 的联用可能存在协同作用。有研究<sup>[13]</sup>显示 PMA 上调白血病细胞的黏附能力并且抑制其迁移。尽管划痕实验没有显示出 PMA + 4-HPR 组和 4-HPR 组肝癌细胞迁移能力的显著差异,若延长药物作用时间或改用细胞迁移能力的其他检测方法,可能会有更多的发现。

本研究是对 PMA 和 4-HPR 联用以抑制肝癌细胞体外迁移的初步探查,为进一步深入研究打下基础,同时为改善 4-HPR 单独使用的不良反应,以期应用于肝癌的临床治疗提供实验依据。

### 参考文献

- [1] Fujiki H, Suganuma M, Okabe S, et al. A new concept of tumor promotion by tumor necrosis factor alpha, and cancer preventive agents (-) epigallocatechin gallate and green tea [J]. *Cancer Detect Prev*, 2000, 24(1): 91-9.
- [2] 袁晓莉, 林全德, 魏旭东. 佛波酯对白血病细胞诱导分化的研究进展 [J]. *白血病·淋巴瘤*, 2008, 17(2): 155-8.

- [3] 张玲, 黄道斌, 吕俊, 等. N-(4-羟基苯基) 维生素甲酰胺抑制人肺腺癌 A549 细胞体外迁移机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(2): 137-40.
- [4] Zhang L, Huang D B, Shao D C, et al. Fenretinide inhibits the proliferation and migration of human liver cancer HepG2 cells by downregulating the myosin light chain kinase activation through the p38-MAPK signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 40(1): 518-26.
- [5] Wu X, Wang X, Qien X, Liu H, et al. Four years' experience with the treatment of all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia [J]. *Am J Hematol*, 1993, 43(3): 183-9.
- [6] Veronesi U, Mariani L, Decensi A, et al. Fifteen-year results of a randomized phase III trial of fenretinide to prevent second breast cancer [J]. *Ann Oncol*, 2006, 17(7): 1065-71.
- [7] Moore M M, Stockler M, Lim R, et al. A phase II study of fenretinide in patients with hormone refractory prostate cancer: a trial of the Cancer Therapeutics Research Group [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010, 66(5): 845-50.
- [8] Garaventa A, Luksch R, Lo Piccolo M S, et al. Phase I trial and pharmacokinetics of fenretinide in children with neuroblastoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(6): 2032-9.
- [9] 张玲, 桂淑玉, 李庆, 等. 4-HPR 体外诱导 A549 细胞凋亡与 Bcl-2 家族蛋白相关性研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2007, 42(6): 616-9.
- [10] Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(6): 442-54.
- [11] Chew T L, Wolf W A, Gallagher P J, et al. A fluorescent resonant energy transfer-based biosensor reveals transient and regional myosin light chain kinase activation in lamella and cleavage furrows [J]. *J Cell Biol*, 2002, 156(3): 543-53.
- [12] Ávila-Rodríguez D, Solano Agama C, González-Pozos S, et al. The shift in GH3 cell shape and cell motility is dependent on MLCK and ROCK [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 354(1): 1-17.
- [13] Zhou Z L, Ma J, Tong M H, et al. Nanomechanical measurement of adhesion and migration of leukemia cells with phorbol 12-myristate 13-acetate treatment [J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 6533-45.

## Effects of PMA on 4-HPR inhibiting HepG2 cell migration *in vitro*

Zhang Ling<sup>1,2</sup>, Wei Xiang<sup>2</sup>, Zhang Sumei<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Biochemistry, Wannan Medical College, Wuhu 241002;

<sup>2</sup>Dept of Biochemistry and Laboratory of Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To observe the effects of PMA on N-(4-hydroxyphenyl) retinoide (4-HPR) inhibiting the migration of liver cancer cell HepG2 and its mechanism. **Methods** HepG2 cells were treated with PMA or combined with 4-HPR. An inverted microscope was used to observe the cellular morphology and inhibitory effects. A wound healing assay was performed to measure the cell migration. Western blot was used to detect the expression of N-cadherin, myosin light chain kinase (MLCK) and phosphorylation of myosin light chain (p-MLC). **Results** Treatment with PMA and 4-HPR in combination, the cells density was low and the cell morphology changed into a slender

# 重组人甲状旁腺激素对 SLA 纯钛表面 MC3T3-E1 细胞黏附的影响

傅琪琳<sup>1,2</sup>, 朱中焰<sup>3</sup>, 刘敏<sup>2</sup>

**摘要** 目的 体外研究重组人甲状旁腺激素 [rhPTH(1-34)] 对 MC3T3-E1 细胞在大颗粒喷砂酸蚀 (SLA) 处理纯钛表面黏附的影响。方法 通过 CCK8 法确定 rhPTH(1-34) 的最佳作用浓度, 将 MC3T3-E1 细胞分为用含最适浓度 rhPTH(1-34) 培养基处理的实验组和用空白培养基处理的对照组, 并分别接种于 SLA 处理的钛片上。用 DAPI 免疫荧光染色法、扫描电镜、RT-PCR 对钛片表面黏附的 MC3T3-E1 细胞进行细胞计数, 观察其形态学变化并测定 MC3T3-E1 细胞整合素  $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$  mRNA 的表达情况。结果 实验组成骨细胞的黏附数量较对照组多, 肌动蛋白微丝的重构、细胞形态变化以及在钛片上黏附与伸展的速度较对照组更快, 骨细胞整合素亚基  $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$  表达高于对照组。结论 rhPTH(1-34) 能促进 MC3T3-E1 细胞在纯钛表面的黏附。

**关键词** 重组人甲状旁腺激素; MC3T3-E1 细胞; 黏附; 整合素

中图分类号 R 78

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)02-0173-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.02.002

作为与生物材料间相互作用的第一阶段, 成骨细胞在种植体表面的黏附情况是影响成骨的重要因素之一。因此, 为获得高种植成功率, 加快钛种植体与骨组织形成骨整合的速度是目前许多学者研究的

热点。重组人甲状旁腺素 (1-34) [human recombinant parathyroid hormone, rhPTH(1-34)], 商品名特利帕肽 (Teriparatide), 作为目前唯一通过食品药品监督管理局批准的促合成代谢类药物, 研究<sup>[1-2]</sup> 表明其具有应用于口腔种植及牙周领域, 促进新骨形成及种植体与周围骨组织形成骨整合的潜力。目前体外研究<sup>[3-5]</sup> 结果显示, rhPTH(1-34) 可能是通过活化种植体周围成骨细胞增殖与分化促进骨整合形成。由于种植体植入初期成骨细胞的黏附情况对骨整合的形成至关重要, 但尚未有文献显示 rhPTH(1-34) 对成骨细胞黏附的影响。该课题从细胞及分子水平初步研究 rhPTH(1-34) 对成骨细胞在 SLA 钛表面初期黏附功能的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料和设备** 小鼠成骨前体细胞株 MC3T3-E1 购自西南医科大学口腔颌面修复重建和再生实验室; rhPTH(1-34) 购自上海吉尔生化有限公司; CCK-8 试剂盒购自上海贝博公司; TA2 型商业纯钛购自陕西宝鸡特殊钢厂; 总 RNA 抽提试剂盒购自北京 tiangen 有限公司; ReverTra Ace qPCR RT Master Mix、SYBR Green Realtime PCR Master Mix 购自日本 TOYOBO 公司; 喷砂机购自北京荣辉机械设备有限公司; 扫描电子显微镜 SEM 购自荷兰 FEI 公司; X 射线能谱仪购自英国 Oxford 公司; Image-Pro Plus 图像分析系统购自美国 Media Cybernetics 公司。

**1.2 纯钛的表面 SLA 处理及材料学表征** 将直径 10 mm 厚度 1 mm 的圆形钛片, 用 400、600、800、

2018-10-19 接收

基金项目: 四川省科技厅-泸州市科技局-泸州医学院联合项目 (编号: LY-51)

作者单位: <sup>1</sup> 西南医科大学口腔医学院, 泸州 646000

<sup>2</sup> 西南医科大学附属口腔医院修复科, 泸州 646000

<sup>3</sup> 自贡市第一人民医院口腔科, 自贡 643000

作者简介: 傅琪琳, 女, 硕士研究生;

刘敏, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

584494011@qq.com

shape. The migration distance of HepG2 cells was obviously decreased when treated with PMA and 4-HPR, whereas the distance was increased when treated with PMA alone ( $P < 0.05$ ). A combination of PMA and 4-HPR also significantly decrease the protein expression of N-cadherin, MLCK and p-MLC. **Conclusion** Combining PMA with 4-HPR inhibit HepG2 cell migration. Compared with 4-HPR alone, the two drug combination lower the protein expression of MLCK and p-MLC more significantly. The study of two drug combination may provide the experimental basis for further discussing the liver cancer therapy.

**Key words** PMA; 4-HPR; MLCK; N-cadherin; phosphorylation of MLC; liver cancer HepG2; migration