

肝癌细胞中抑制 *Galectin-3* 基因表达对细胞增殖及侵袭能力的影响及机制研究

徐玉玲, 罗宏伟, 丁沛, 孟祥林, 李海雷

郑州市中医院消化内科, 河南 郑州 450000

摘要: **目的** 探讨 *Galectin-3* 基因在肝癌细胞中的表达及抑制其表达对肝癌细胞增殖和侵袭能力的影响及机制。 **方法** RT-PCR 检测人肝癌细胞 MHCC-97H、HepG2、SMCC-7721 及人正常肝细胞 HL-7702 中 *Galectin-3* 基因的 mRNA 表达; Control、NC-siRNA、*Galectin-3*-siRNA 转染 HepG2 细胞, 48 h 后 Western blot 检测各组细胞中 *Galectin-3*、MMP-2、MMP-9、Notch1、Hes1 的蛋白表达; CCK8 实验和流式细胞仪分别检测细胞的增殖和侵袭能力。 **结果** MHCC-97H、HepG2、SMCC-7721 细胞中 *Galectin-3* 的 mRNA 表达均显著高于正常肝细胞 HL-7702 中的 *Galectin-3* 的 mRNA 表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), *Galectin-3* 在 HepG2 细胞中的表达最高, 选择作为后续的研究对象; 转染 siRNA 后能显著抑制 *Galectin-3* 基因的表达; *Galectin-3*-siRNA 组细胞存活率、细胞侵袭数及 MMP-2、MMP-9、Notch1、Hes1 蛋白表达均低于对照组和 NC-siRNA 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。 **结论** 抑制肝癌细胞中 *Galectin-3* 基因表达能显著降低癌细胞的增殖及侵袭能力, 其机制与 Notch1 信号通路的调控有关。

关键词: 肝癌; *Galectin-3* 基因; 增殖; 侵袭; Notch1 信号通路

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2018)04-0421-05 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.04.010

Effect and mechanism of inhibition of *Galectin-3* gene expression on proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells

XU Yu-ling, LUO Hong-wei, DING Pei, MENG Xiang-lin, LI Hai-lei

Department of Gastroenterology, Zhengzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450000, China

Abstract: **Objective** To explore the expression of *Galectin-3* gene in hepatocellular carcinoma cells and the effect and mechanism of inhibiting its expression on the proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells. **Methods** Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay was used to detect the mRNA expression of *Galectin-3* gene in human hepatocellular carcinoma cell lines MHCC-97H, HepG2 and SMCC-7721 and human normal liver cell line HL-7702. Control, NC-siRNA and *Galectin-3*-siRNA were transfected into HepG2 cells, and Western blot was employed to detect *Galectin-3*, MMP-2, MMP-9, Notch1 and Hes1 protein expression after 48 hours. Cell counting kit-8 (CCK8) assay and flow cytometry were used to respectively detect the cell proliferation and invasiveness. **Results** The mRNA expression of *Galectin-3* in MHCC-97H, HepG2 and SMCC-7721 cells was significantly higher than that in normal liver cell line HL-7702, showing statistically significant differences (all $P < 0.01$). The expression of *Galectin-3* in HepG2 cells was the highest, which was selected as the follow-up research object. After siRNA being transfected, the expression of *Galectin-3* was significantly inhibited. The cell survival rate, invasive cell-counting and MMP-2, MMP-9, Notch1 and Hes1 protein expression in *Galectin-3*-siRNA group were all lower than those of the control group and NC-siRNA group, with statistically significant differences (all $P < 0.01$). **Conclusions** Inhibition of *Galectin-3* gene expression in hepatocellular carcinoma cells can significantly decline the proliferation and invasion of cancer cells, and its mechanism is related to the regulation of Notch1 signaling pathway.

Key words: hepatocellular carcinoma; *Galectin-3* gene; proliferation; invasion; Notch1 signaling pathway

肝癌是常见的且恶性程度最高的肿瘤之一, 具有高死亡率、高转移性及高侵袭性等特点, 大部分肝癌患者确诊时已处于晚期, 目前尚无有效的治疗方法^[1]。

基金项目: 郑州市科技计划发展项目 (0910SGYS33384)

作者简介: 徐玉玲 (1968-), 女, 本科学历, 副主任医师, 研究方向: 胃肠病、肝胆。

肝癌的发生不仅与遗传有关, 其发生发展也受到表观遗传学影响。半乳糖凝集素 (*Galectin-3*) 是凝集素家族中的一员, 广泛表达于细胞质中, 可与相应的配体结合影响细胞的生长、凋亡、新生血管形成、损伤、肿瘤浸润转移等^[2]。目前在多种肿瘤中均可检测到 *Galectin-3* 基因的高表达^[3-4], *Galectin-3* 基因的高表达影响

了肿瘤的恶性程度及浸润和转移。关于 *Galectin-3* 基因对肝癌的影响及机制研究的尚未清楚。因此,本研究通过 RNA 干扰技术靶向抑制 *Galectin-3* 的表达,研究其对肝癌细胞增殖及侵袭的影响,并进一步探讨其机制。为肝癌的诊断及分子靶向治疗提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人肝癌细胞 MHCC-97H、HepG2、SMCC-7721 及人正常肝细胞 HL-7702 购自河南省干细胞库;胰蛋白酶、RPMI1640 培养基均购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司;RNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒购自日本 Takara;BCA 试剂盒、CCK8 试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司;Transwell 小室购自美国 Millipore 公司;siRNA 购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗人 *Galectin-3* 多克隆抗体及鼠抗人 MMP-2、MMP-9、Notch1、Hes1、GAPDH 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 均购自美国 Santa Cruz;Lipofectamine™2000 购自美国 Invitrogen;增强化学发光法(ECL)试剂盒购自上海史瑞克生物公司;PCR 扩增仪购自德国 Eppendorf 公司;CO₂ 细胞培养箱购自美国 SIM 公司;酶标仪购自 Bio-Rad 公司;倒置显微镜购自日本 OLYMPUS。

1.2 siRNA 的设计合成 根据 GenBank 中提供的 *Galectin-3* 的编码区序列(NM-002306),有广州瑞博生物技术有限公司设计并合成 siRNA 序列:5'-AUAUGAAGCACUGGUGAGGUCUAUGTT-3'和 5'-CAUAGACCUCACCAGUGCUUCAUAUTT-3'。阴性对照组 siRNA 序列为:5'-UUCUCCGAACGUGU-CACGUTT-3'和 5'-ACGUGACACGUUCGAGAATT-3'。

1.3 细胞培养 人肝癌细胞 MHCC-97H、HepG2、SMCC-7721 及人正常肝细胞 HL-7702 在含有 RPMI1640 细胞培养液中(含有 10% 胎牛血清、100 mg/L 青霉素及 100 mg/L 链霉素),于 37℃、5% CO₂、95% 饱和湿度的恒温培养箱中培养。细胞生长密度达到 80% 以上时消化,传代。取对数生长期的细胞用于实验研究。

1.4 *Galectin-3* 在肝癌细胞中的表达 取生长至对数期的人肝癌细胞 MHCC-97H、HepG2、SMCC-7721 及人正常肝细胞 HL-7702, RNA 提取试剂盒提取各个肝细胞中的总 RNA,根据逆转录试剂盒说明将总 RNA 反转录为 cDNA。Oligo7 引物设计软件设计 *Galectin-3* 及内参 GAPDH 的 RT-PCR 引物。引物序列如下:*Galectin-3* 引物序列:上游引物:5'-CAGGAAAATG-

GCAGACAGCTT-3',下游引物:5'-CCCATGCACCCG-GATATC-3',扩增产物为 86 bp。GAPDH 引物序列:上游引物:5'-ATGACCCCTTCATTGACC-3',下游引物:5'-GAAGATGCTGATGGGATTTC-3',扩增产物为 131 bp。所有引物送由上海生工合成。PCR 反应条件:95℃ 10 min;95℃ 10 s;59℃ 15 s,72℃ 20 s,共 40 个循环。最后 72℃ 延伸 15 min,4℃ 保存。每个样品设置 6 个重复,利用 2^{-ΔΔCt} 法计算肝癌细胞中 *Galectin-3* 的 mRNA 相对表达量。

1.5 细胞转染 取生长至对数期的 HepG2 细胞,以每孔 1×10⁶ 个细胞接种于 6 孔细胞培养板中,细胞生长融合度达到 90% 以上时将阴性对照组(转染 siRNA Control)和 *Galectin-3* 沉默组(转染 siRNA *Galectin-3*)转染至细胞内,同剂量的转染试剂作为空白对照组,每组设置 3 个复孔,转染严格按照美国 Invitrogen 公司 Lipofectamine™2000 转染说明进行操作。

1.6 转染后细胞中 *Galectin-3* 的表达检测 取转染后培养 48 h 的细胞,加入细胞裂解液置于冰上反应 30 min,4℃,12 000 rpm/min 离心 15 min,收集蛋白。取少量蛋白样品用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒对蛋白进行定量。按照 1:5 的比例将蛋白样品与上样缓冲液充分混匀,置于 100℃ 沸水中变性 5 min,40 μg/孔蛋白样品于 12% 的 SDS-PAGE 分离,电泳结束后转膜、封闭,加入一抗(1:1 000 稀释的 *Galectin-3* 和 GAPDH),4℃ 孵育过夜,加入 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG,37℃ 孵育 1 h。TBST 清洗后化学发光增强剂(ECL)显色,洗片后进行显影和定影。以 GAPDH 作为内参,分析 *Galectin-3* 的蛋白表达水平。

1.7 细胞增殖检测 取转染后的各组细胞,以每孔 2 000 个细胞接种于 96 孔细胞培养板中,每组设置 6 个复孔,37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,培养 48 h 后收集细胞,加入 CCK8 试剂(10 μl/孔),37℃ 孵育细胞 4 h,酶标仪测定 490 nm 波长吸光度 A。计算细胞增殖率。细胞增殖率=(转染组细胞 A/对照组细胞 A)×100%。

1.8 细胞侵袭能力检测 取出保存在-80℃ 中的基质胶(Matrigel 胶),置于 4℃ 中处理 24 h,使基质胶变为液态,用去血清的 RPMI1640 培养基将 Matrigel 胶稀释成 1:8 比例,每孔中 100 μl 加入至 Transwell 小室中,37℃ 放置 1 h,使 Matrigel 胶充分的凝固,取消化转染 48 h 后的细胞,无血清培养基洗涤细胞 3 次,细胞浓度调整为每毫升含有 1×10⁵ 个细胞。已铺好 Matrigel 胶的上室中加入 200 μl 的细胞悬液,下室中加

入 600 μ l 含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 细胞培养基,于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,取出小室,在冰上用 PBS 洗涤小室 2 次,戊二醛 (50 g/L) 固定 20 min,结晶紫染色 10 min, PBS 洗涤 2 次,用棉签轻轻擦掉上层的细胞,置于室温直至风干。显微镜下观察细胞,随机取 6 个不同的视野 ($\times 200$) 观察并记录穿膜的细胞数,试验重复 3 次,计算侵袭细胞的平均数。

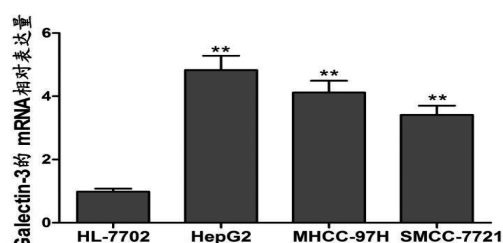
1.9 MMP-2、MMP-9、Notch1、Hes1 蛋白表达检测 收集转染 48 h 的各组细胞,根据 1.4 方法检测 MMP-2、MMP-9、Notch1、Hes1 蛋白表达。

1.10 统计学方法 所有实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行分析,计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组比较采用

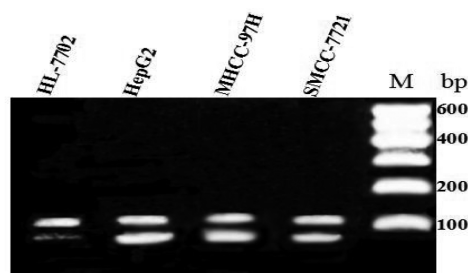
t 检验,多组间差异比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌细胞中 Galectin-3 基因表达 提取人肝癌细胞 MHCC-97H、HepG2、SMCC-7721 及人正常肝细胞 HL-7702 中的总 RNA, RT-PCR 检测 Galectin-3 的 mRNA 表达,结果见图 1。MHCC-97H、HepG2、SMCC-7721 细胞中 Galectin-3 的 mRNA 表达均显著高于正常肝细胞 HL-7702 中的 Galectin-3 的 mRNA 表达,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。Galectin-3 在 HepG2 细胞中的表达最高,选择作为后续的研究对象。



A



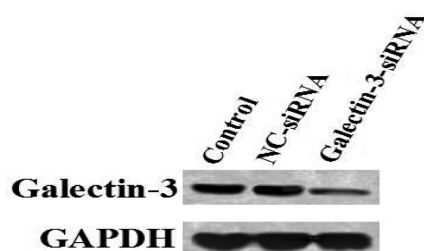
B

注:A: RT-PCR 检测结果图; B: 琼脂糖凝胶电泳结果图; 与 HL-7702 细胞比较, * * $P < 0.01$ 。

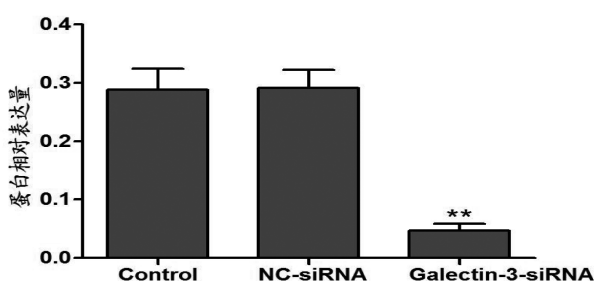
图 1 肝癌细胞中 Galectin-3 基因的表达

2.2 转染效果检测 各组 siRNA 转染 48 h 后,提取细胞中的蛋白, Western blot 检测各组细胞中 Galectin-3 的蛋白表达,结果见图 2。NC-siRNA 组 Galectin-3

的蛋白表达与对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), Galectin-3-siRNA 组 Galectin-3 的蛋白表达低于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。



A



B

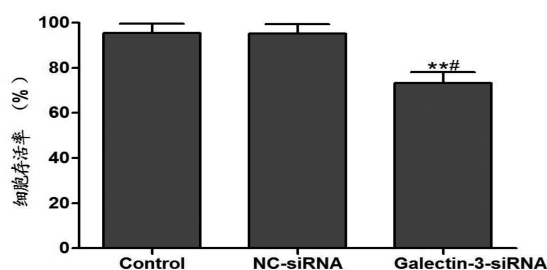
注:A: Western blot 检测转染后细胞中 Galectin-3 的蛋白表达; B: Galectin-3 的蛋白相对表达量; 与 Control 组比较, * * $P < 0.01$ 。

图 2 转染效果检测

2.3 转染 Galectin-3-siRNA 降低 HepG2 细胞的增殖活性 各组 siRNA 转染后培养 48 h, CCK8 实验检测细胞的增殖活性,结果见图 3。Galectin-3-siRNA 组细胞存活率低于对照组和 NC-siRNA 组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

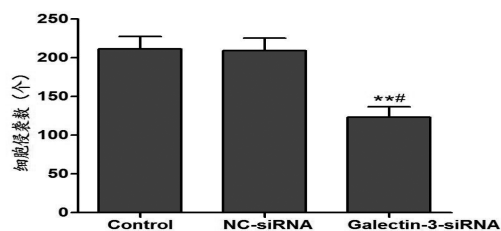
2.4 转染 Galectin-3-siRNA 降低 HepG2 细胞的侵袭能力 Transwell 小室检测各组 siRNA 转染后培养 48 h 的细胞侵袭能力,结果见图 4。Galectin-3-siRNA 组细胞侵袭数低于对照组和 NC-siRNA 组,差异有统计学

意义 ($P < 0.01$)。



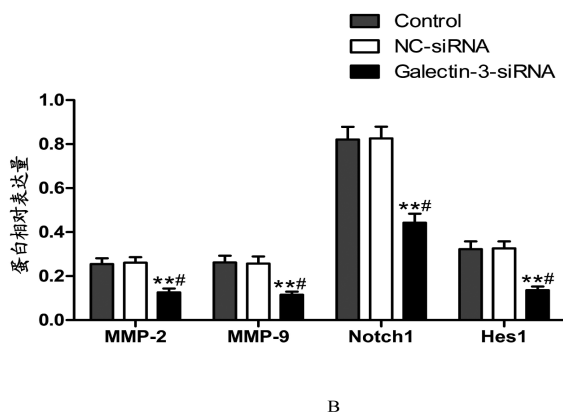
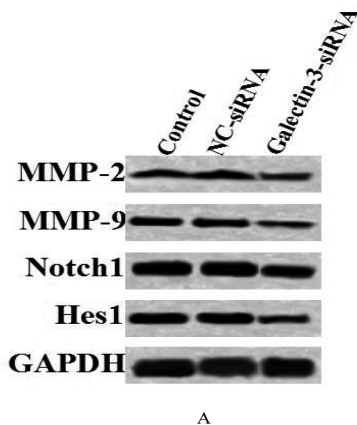
注:与 Control 组比较, * * $P < 0.01$; 与 NC-siRNA 组比较, # $P < 0.01$ 。

图 3 转染 Galectin-3-siRNA 对 HepG2 细胞增殖的影响



注:与 Control 组比较, * $P < 0.01$; 与 NC-siRNA 组比较, # $P < 0.01$ 。

图 4 转染 Galectin-3-siRNA 对 HepG2 细胞侵袭能力的影响



注:A:Western blot 检测结果图;B:蛋白的相对表达量;与 Control 组比较, * $P < 0.01$; 与 NC-siRNA 组比较, # $P < 0.01$ 。

图 5 转染 Galectin-3-siRNA 对 MMP-2、MMP-9、Notch1、Hes1 蛋白表达的影响

3 讨论

恶性肿瘤具有快速、无限的增殖能力,严重威胁着人类的健康,其发生是一个多步骤、多因素复杂的生理病理过程,随着分子生物学的不断发展,多种肿瘤的生物学标记物在肿瘤的发生和作用受到了广泛的关注。Galectin-3 基因定位于 14q21-22 染色体,属于半乳糖凝集素家族中的一员,广泛存在于正常细胞及肿瘤细胞的细胞膜及细胞质中,参与细胞的生长、凋亡、新生血管形成、细胞粘附及肿瘤细胞的分化、侵袭和转移等生理病理过程^[5-6]。研究显示,在胃癌、乳腺癌等多种肿瘤中 Galectin-3 的表达均显著高于相应的癌旁组织^[7]。RNA 干扰乳腺癌细胞中 Galectin-3 的表达可显著降低肿瘤细胞的侵袭及迁移能力,诱导细胞的凋亡^[8];抑制胃癌细胞中 Galectin-3 的表达可降低癌细胞增殖及促进细胞的凋亡,并增加细胞对化疗药物的敏感性^[9]。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是由双链 RNA 介导的能使基因在转录后发生沉默的现象,具有高度的特异性、有效性,目前已在基因功能研究、信号转导、基因治疗等领域中得到应用^[10]。本研究的检测结果发现抑制 Galectin-3 的表达可显著降低肝癌细胞的增殖及侵袭能力。肿瘤的侵袭是一个多环节、多步骤的复杂过程,受到多种因素的影响,基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 是重要的蛋白水解酶

2.5 转染 Galectin-3-siRNA 对 MMP-2、MMP-9、Notch1、Hes1 蛋白表达的影响 Western blot 检测各组细胞中侵袭相关蛋白 MMP-2、MMP-9 及 Notch1 信号通路相关蛋白 Notch1、Hes1 的蛋白表达,结果见图 5。Galectin-3-siRNA 组 MMP-2、MMP-9、Notch1、Hes1 的蛋白表达均低于对照组和 NC-siRNA 组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

家族,其家族成员表达的改变对细胞的侵袭能力具有重要影响^[11]。MMP-2 和 MMP-9 是 MMPs 家族最重要的两种蛋白水解酶,可降解基底膜中的 IV 型胶原蛋白酶,增强癌细胞的转移和侵袭能力^[12]。研究显示, MMP-2 和 MMP-9 在肿瘤中的表达升高,如肝癌、宫颈癌等,可增强肿瘤对 ECM 降解的能力,最终使细胞的转移和侵袭增强,目前已被广泛的用于恶性肿瘤细胞转移及侵袭的潜在标志^[13-14]。本研究检测抑制 Galectin-3 的表达对 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响,结果显示,抑制 Galectin-3 的表达后, MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达均显著降低。

Notch1 信号通路是一条在进化上高度保守的信号转导途径,广泛存在于从果蝇到哺乳动物等多种生命体中,其家族成员对细胞的发育、凋亡、分化等过程有重要作用^[15]。由 Notch 受体、Notch 配体及细胞内的效应器分子组成,Notch1 是 Notch 信号通路中的一个受体,研究显示,Notch1 信号通路在肝癌、肺癌等多种肿瘤中有异常表达,其异常表达影响肿瘤细胞的生长、凋亡、细胞周期、代谢等过程^[16-17],也有研究显示抑制 Notch1 信号通路可降低肿瘤的发生及发展^[18]。Hes1 是 Notch1 信号通路最重要的靶基因,其表达是 Notch1 信号通路是否激活的重要标志。本研究检测 Notch1、Hes1 蛋白表达,结果显示,抑制 Galectin-3 的表达后可