

Apelin-13 对肝细胞癌 HepG2 细胞增殖的影响

何宝凤, 雷俊悦, 曾奎, 陈雄英, 黄秋林

(南华大学附属第一医院胃肠外科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] Apelin-13; 肝细胞癌; 增殖; 凋亡

[摘要] **目的** 探讨 Apelin-13 对肝细胞癌 HepG2 细胞增殖的影响。**方法** 将 HepG2 细胞按 Apelin-13 不同浓度分组:10%胎牛血清组(对照组)、0.000 1、0.001、0.01、0.1 $\mu\text{mol/L}$ Apelin-13 组,处理时间为 24 h;按 Apelin-13 时效关系分组:0、6、12、18、24 h 组,处理浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 。细胞增殖实验检测各组处理后细胞水平。蛋白质印迹法检测细胞增殖相关蛋白细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)和细胞凋亡相关蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的表达水平。**结果** HepG2 细胞增殖程度随 Apelin-13 浓度增加及作用时间延长而增强($P < 0.05$)。CyclinD1 蛋白表达水平随 Apelin-13 处理浓度的升高及处理时间延长而升高($P < 0.05$);Caspase-3 蛋白表达水平随 Apelin-13 处理浓度的升高及处理时间延长而降低($P < 0.05$)。**结论** Apelin-13 在一定范围内促进肝细胞癌 HepG2 细胞增殖,抑制 Caspase-3 蛋白的表达,抑制效果随着处理时间延长和浓度的升高而增强。

[中图分类号] R73.34

[文献标识码] A

The effect of Apelin-13 on the proliferation of HepG2 cells

HE Baofeng, LEI Junyue, ZENG Kui, CHEN Xiongying, HUANG Qiulin

(Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Apelin-13; hepatocellular carcinoma; proliferation; apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Apelin-13 on proliferation of HepG2 cells. **Methods** HepG2 cells were divided into different concentrations of Apelin-13: 10% FBS (control), 0.000 1, 0.001, 0.01, 0.1 $\mu\text{mol/L}$. And the different durations were 0 h (control), 6 h, 12 h, 18 h, 24 h. The number of cells in each group was calculated by MTT method. Western blot was used to detect the expressions of cell cycle protein D1 (CyclinD1) and cysteine aspartate protease 3 (Caspase-3). **Results** The proliferation of HepG2 cells was increased with the increase of Apelin-13 concentration, and the prolongation of the Apelin-13 treatment time ($P < 0.05$). The expression of CyclinD1 was increased with the increase of Apelin-13 concentration and treatment time, while the expression of Caspase-3 decreased with the increase of Apelin-13 concentration and treatment time. **Conclusion** Apelin-13 promoted the proliferation of hepatocellular carcinoma HepG2 cells and inhibited the expression of Caspase-3 protein within a certain range, and the inhibitory effect was enhanced with prolongation of treatment time and the increase of treatment concentration.

原发性肝癌是全球发病率第六位及癌症相关死亡率第四位的癌症^[1]。Apelin 在体内分布广泛,在右心房、左心室、脑、肺、肝和肾上腺中均可检测到 Apelin 的表达,尤其在血管内皮细胞中高表达^[2]。Apelin 可通过旁分泌的形式介导肿瘤新生血管的生成,Picault 等^[3]报道了 Apelin 信号通过激活自身分泌参与结肠腺癌的生长。Apelin 家族包括多种

亚型,焦谷氨酸修饰形式的 Apelin-13 是其中生物活性最强的一种。Apelin-13 与部分肿瘤的生长侵袭转移密切相关^[4-5]。Apelin 在肝癌中表达上调,以自身分泌的形式通过 PI3K/Akt 通路促进肝癌的进展^[6]。本研究以不同浓度 Apelin-13 处理肝细胞癌 HepG2 细胞不同时间,观察其对 HepG2 细胞增殖的影响,以研究其在肝癌发展中的影响及作用机制。

[收稿日期] 2020-09-16

[修回日期] 2021-03-15

[基金项目] 湖南省自然科学基金省市联合基金(2020JJ6055)

[作者简介] 何宝凤,硕士研究生,住院医师,研究方向为胃肠肿瘤,E-mail 为 1115450309@qq.com。通信作者黄秋林,博士,主任医师,教授,硕士研究生导师,研究方向为胃肠肿瘤,E-mail 为 1907722730@qq.com。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌细胞 HepG2 购自中科院上海细胞研究所; Aeplin-13 购自 Santa 公司; 抗-CyclinD1 抗体、抗-Caspase-3 抗体购自 ABZOOM 公司; MTT 试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶试剂盒购自博士德生物科技有限公司。

1.2 细胞培养

人肝癌 HepG2 细胞 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 显微镜下观察到约 90% 细胞覆盖培养板后, 用胰酶消化并吹打成悬液。接种于 96 孔板中, 约 5 × 10³/孔。待细胞覆盖率约 50% 时, 予细胞换液, 加入不含 10% FBS 的培养基, 放入培养箱继续培养 12 h 备用。

1.3 细胞分组

根据本课题组前期的研究^[7], 按不同浓度的 Aeplin-13 分为 5 组: 10% FBS (对照组)、0.000 1、0.001、0.01、0.1 μmol/L 组, 处理时间为 24 h; 每组设 3 个复孔。再根据初步的实验结果, 选用差异最大的 Aeplin-13 浓度(0.1 μmol/L)处理不同时间: 0 h (对照组)、6、12、18、24 h 组。具体方法: 将上述处理后的各组细胞加入 0.1 mL 含 10% FBS 的培养基, 24 h 组加入 0.1 μmol/L Aeplin-13, 开始计时, 6 h 后 18 h 组加入 0.1 μmol/L Aeplin-13, 以此类推, 对照组不加入 Aeplin-13, 37 °C 培养箱中培养 24 h。

1.4 MTT 检测 HepG2 细胞增殖

细胞分组后, 每个孔各加入 20 μL 0.5% MTT (5 g/L), 培养箱内放置 4 h, 然后吸取丢弃原培养液加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min 后在酶联免疫检测仪上测量各孔在 490 nm 处的吸光值。每组设 5 个复孔。

1.5 Western blot 法检测蛋白表达

各组细胞裂解 30 min, 4 °C 离心 8 min (12 000 r/min), 收集上清液。采用 BCA 试剂盒进行 HepG2 细胞蛋白定量, 将蛋白量调制等量后, 加入上样缓冲液, 加热至 99 °C 10 min, 冷却至 4 °C 4 min, 然后置于 -20 °C 冰箱内保存备用。将制备好的 1.0 mm 厚度的 10% SDS-PAGE 凝胶置于电泳缓冲液中上样(每孔 20 μL 蛋白样品), 电转移至硝酸纤维素膜后使用 5% 封闭液封闭 2 h。封闭结束后, 加入稀释号的一抗孵育过夜(抗体效价为 1:250), TBST 洗膜 3 次,

10 min/次, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗(抗体效价为 1:1 000), 摇床上孵育 60 min, TBST 洗膜 3 次, 10 min/次。将增强剂、稳定剂、背景抑制剂按照 20:20:1 的比例混合, 加至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上, 孵育 5 min 后显影。Mias 图像分析系统测定各条带灰度值, 与 β 微管蛋白(β-Tubulin)条带光密度值之比反映蛋白的表达。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 23.0 软件进行分析, 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 Aeplin-13 在不同时间对 HepG2 细胞增殖的影响

与对照组比较, 0.000 1、0.001、0.01、0.1 μmol/L 组的 OD 值增加(P < 0.05; 图 1), 且 OD 值随着 Aeplin-13 浓度增加而增加, Aeplin-13 呈浓度依赖性促进细胞增殖。用 0.1 μmol/L Aeplin-13 处理 HepG2 细胞不同时间后, OD 值随着 Aeplin-13 处理时间的增加而增加(P < 0.05; 图 2), Aeplin-13 呈时间依赖性促进细胞增殖。

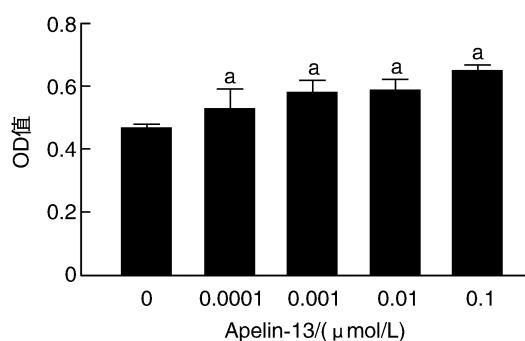


图 1 不同浓度 Aeplin-13 对 HepG2 细胞增殖的影响
a 为 P < 0.05, 与对照组(0 μmol/L)比较。

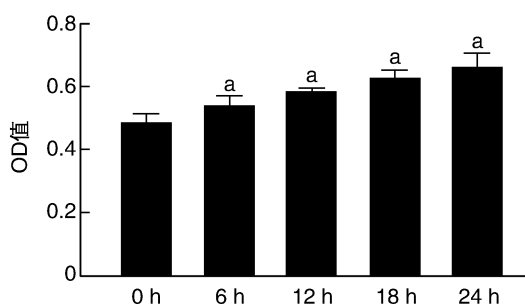


图 2 0.1 μmol/L 的 Aeplin-13 处理不同时间对 HepG2 细胞增殖的影响
a 为 P < 0.05, 与 0 h 组比较。

2.2 不同浓度 Apelin-13 及不同时间对 HepG2 细胞中 CyclinD1 表达的影响

与对照组比较,0.000 1、0.001、0.01、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组的 CyclinD1 表达升高,且随浓度升高呈递增趋势 ($P<0.05$;图 3)。用 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 Apelin-13 处理 HepG2 细胞不同时间后,CyclinD1 表达随 Apelin-13 处理时间延长呈递增趋势($P<0.05$;图 4)。

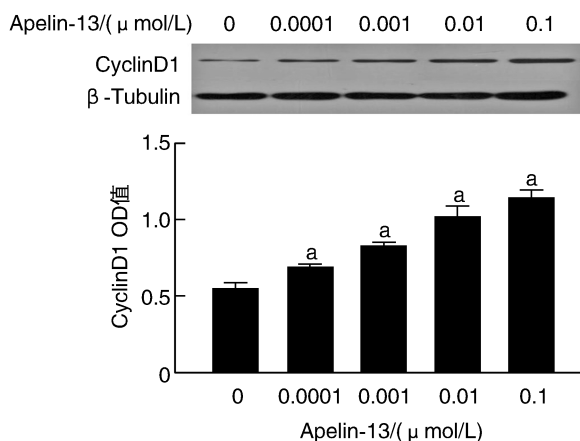


图 3 不同浓度 Apelin-13 对 HepG2 细胞中 CyclinD1 表达的影响
a 为 $P<0.05$,与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)比较。

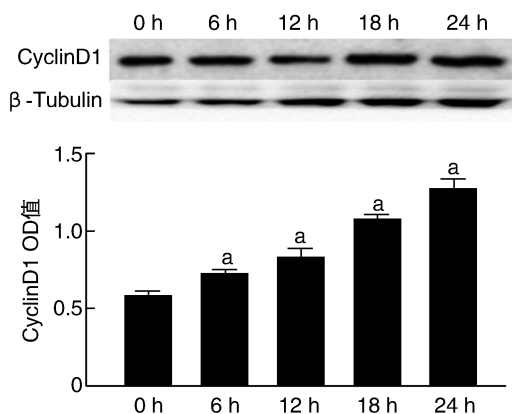


图 4 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Apelin-13 处理不同时间对 HepG2 细胞中 CyclinD1 表达的影响
a 为 $P<0.05$,与 0 h 组比较。

2.3 不同浓度 Apelin-13 及不同时间对 HepG2 细胞中 Caspase-3 表达的影响

与对照组比较,0.000 1、0.001、0.01、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组的 Caspase-3 表达降低,且 Caspase-3 表达随浓度的增高而降低($P<0.05$;图 5)。用 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Apelin-13 处理 HepG2 细胞不同时间后,Caspase-3 的表达随处理时间延长而降低($P<0.05$;图 6)。

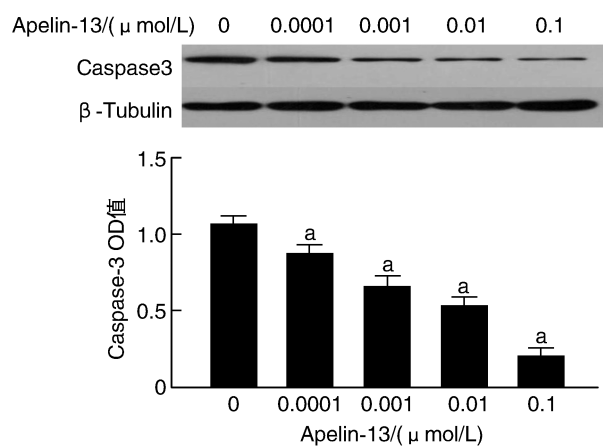


图 5 不同浓度 Apelin-13 对 HepG2 细胞中 Caspase-3 表达的影响
a 为 $P<0.05$,与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)比较。

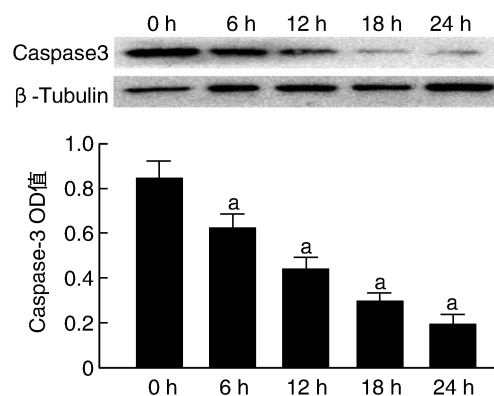


图 6 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Apelin-13 处理不同时间对 HepG2 细胞中 Caspase-3 表达的影响
a 为 $P<0.05$,与 0 h 组比较。

3 讨论

Apelin 是从牛胃分泌物中提取的孤儿 G 蛋白偶联受体的天然配体。Apelin/APJ 在体内分布广泛,作为血管活性肽的 Apelin 以内分泌、旁/自分泌等方式在调节心血管系统稳态方面的生物学效应成为了研究热点^[8]。Apelin-13 作为具有最高的生物学活性的 Apelin 亚型,参与了多种重要的生物学过程。Peng 等^[5]发现 Apelin-13 可通过 ERK1/2/AIB1 信号通路促进乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和侵袭。Apelin-13 能促进肺腺癌细胞增殖,同时通过 PAK1-cofilin 磷酸化机制介导了 Apelin-13 促进肺腺癌细胞迁移^[4]。

笔者通过体外培养肝癌 HepG2 细胞,研究不同浓度及不同作用时间的 Apelin-13 对 HepG2 细胞增殖的影响。结果表明,在一定范围内随着 Apelin-13

浓度增加和处理时间的延长, HepG2 细胞增殖能力增加, 证实外源性 Apelin-13 可促进 HepG2 细胞增殖, 这与 Chen 等^[9] 在结肠癌中 Apelin-13 对结肠癌细胞作用结果一致。同时本文利用 Western blot 检测 Apelin-13 作用下 HepG2 细胞增殖相关蛋白 CyclinD1 的表达水平。细胞在正常生理状态下由 G1 期进入 S 期后, 细胞内的 CyclinD1 会迅速分解, 一旦 CyclinD1 持续高表达, 就会使细胞的 G1 期缩短, 使细胞周期变化, 提前进入 S 期, 导致细胞增殖失控, 这也是肿瘤的发生机制之一。本研究结果显示, 随着 Apelin-13 浓度升高和作用时间延长, CyclinD1 表达也随之增高。Caspase-3 是包括凋亡在内的多种生物学过程中的关键酶。本研究结果显示, 随着 Apelin-13 浓度的增高和处理时间的延长, Caspase-3 的表达也随之降低, 提示 Apelin-13 可呈浓度和时间依赖性抑制 HepG2 细胞 Caspase-3 的表达, 从蛋白水平进一步证实其能抑制 HepG2 细胞凋亡。有研究表明, Caspase-3 在肝癌组织中表达增高, 并与肝癌细胞凋亡有关^[10]。结合本研究结果, Apelin-13 可能通过抑制肝癌细胞的凋亡而促进肿瘤进展。Lu 等^[11] 发现 Apelin-13 可通过相应的机制来促进视网膜胶质细胞的增殖, 并能抑制其凋亡。前期研究发现 Apelin-13 可通过激活 ERK1/2 信号通路, 上调 HepG2 细胞 Beclin1 的表达促进细胞自噬^[7], 该机制是否与增殖和凋亡有关有待进一步证实。

本实验研究表明, Apelin-13 是参与肝癌细胞增殖的新分子, 且可抑制 Caspase-3 蛋白的表达, 对探寻肝癌发生发展机制具有重要意义, 有望成为肝癌一个新的分子治疗靶点。

[参考文献]

- [1] VILLANUEVA A. Hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(15): 1450-1462.
- [2] SORLI S C, LE GONIDEC S, KNIBIEHLER B, et al. Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis[J]. *Oncogene*, 2007, 26(55): 7692-7699.
- [3] PICAULT F X, CHAVES-ALMAGRO C, PROJETTI F, et al. Tumour co-expression of apelin and its receptor is the basis of an autocrine loop involved in the growth of colon adenocarcinomas[J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(3): 663-674.
- [4] LYU D, LI L, LU Q, et al. PAK1-cofilin phosphorylation mediates human lung adenocarcinoma cells migration induced by apelin-13[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2016, 43(5): 569-579.
- [5] PENG X, LI F, WANG P, et al. Apelin-13 induces MCF-7 cell proliferation and invasion via phosphorylation of ERK1/2[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(3): 733-738.
- [6] CHEN H, WONG C C, LIU D, et al. APLN promotes hepatocellular carcinoma through activating PI3K/Akt pathway and is a druggable target[J]. *Theranostics*, 2019, 9(18): 5246-5260.
- [7] HUANG Q, LIU X, CAO C, et al. Apelin-13 induces autophagy in hepatoma HepG2 cells through ERK1/2 signaling pathway-dependent upregulation of Beclin1[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(2): 1051-1056.
- [8] ISHIMARU Y, SHIBAGAKI F, YAMAMURO A, et al. An apelin receptor antagonist prevents pathological retinal angiogenesis with ischemic retinopathy in mice[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15062-15070.
- [9] CHEN T, LIU N, XU G M, et al. Apelin13/APJ promotes proliferation of colon carcinoma by activating Notch3 signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(60): 101697-101706.
- [10] SUN B H, ZHANG J, WANG B J, et al. Analysis of in vivo patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to p21 (WAF1) expression and hepatic apoptosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2000, 6(3): 356-360.
- [11] LU Q, JIANG Y R, QIAN J, et al. Apelin-13 regulates proliferation, migration and survival of retinal Müller cells under hypoxia[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2013, 99(2): 158-167.

(此文编辑 蒋湘莲)