

ATRA 对肝癌细胞 HepG2 生物学行为的影响

周青¹, 魏翔², 张素梅¹, 汪渊¹

摘要 目的 初步探讨全反式维甲酸(ATRA)作用于人肝癌细胞 HepG2 后其生长形态、增殖、分化等生物学行为的变化。方法 首先 ATRA(1 μmol/L 和 10 μmol/L)处理 HepG2 细胞,观察细胞形态变化并检测 γ-谷氨酰转氨酶(γ-GT)比活性和甲胎蛋白(AFP)分泌量,MTT 法检测细胞增殖状况,Hoechst 染色检测细胞凋亡情况,细胞划痕实验观察细胞的迁移能力,软琼脂克隆观察细胞形成的克隆数目。结果 与对照组相比,ATRA 处理 HepG2 细胞后,细胞生长数目减少、生长形态改变,γ-GT 比活性与 AFP 的分泌量下降,细胞增殖降低、迁移能力减弱、凋亡小体增多和细胞克隆减少。结论

ATRA 作为诱导分化剂,可抑制 HepG2 细胞增殖、迁移及克隆形成能力,诱导 HepG2 细胞分化和凋亡。

关键词 全反式维甲酸;肝癌;分化;凋亡;迁移

中图分类号 R 453.3;R 977.3;R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)12-1928-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.12.018

目前世界每年新增加的癌症患者约 1 808 万,死亡约 956 万^[1],在未来相当长的时间癌症仍将是人类面临的一项严峻挑战。随着现代医学的进步人们对癌症的本质有了深入的了解,肿瘤的治疗也由传统的手术、放疗和化疗发展到多学科联合治疗,并出现了诱导分化治疗。诱导分化治疗是指诱导分化剂作用于肿瘤细胞后肿瘤细胞重新向正常细胞分化,生物学特性逐渐向正常细胞靠拢,甚至转变成正常细胞的现象。维甲酸类化合物是典型的诱导分化剂且在临床广泛使用,它包括全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)、3,4-双脱氢维甲酸(ddRA)、9-顺维甲酸(9-cis-RA)和 13-顺维甲酸(13-cis-RA)等^[2]。研究^[3]表明 ATRA 对多种肿瘤细胞具有诱导分化、抑制增殖并促进凋亡的作用,本文主要研究 ATRA 作为体外诱导分化剂对人肝癌细胞株

HepG2 在分化、凋亡、迁移和克隆形成等细胞生物学行为方面的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 人肝癌细胞株 HepG2(安徽医科大学分子生物学实验室保存);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(美国 Clark 公司);ATRA 和 MTT 试剂(美国 Sigma 公司);细胞凋亡 Hoechst 33258 试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天公司);γ-GT、AFP 检测试剂盒(上海复兴长征医学科学有限公司)等。

1.2 主要实验仪器 二氧化碳培养箱、高速冷冻离心机和酶标仪(美国 Thermo 公司);超净工作台(苏州净化设备公司);荧光显微镜 DM400B 和倒置显微镜 DMI3000B(德国 Leica 公司);超声破碎仪(宁波新芝公司)等。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞的复苏和培养 将保存的 HepG2 细胞从液氮中取出,37℃水浴融化,加入含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,混匀。置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中,培养 3 d 传代后使用。

1.3.2 细胞形态的观察和 AFP、γ-GT 比活性的检测 将 HepG2 细胞分为对照组(含 0.1% 的 DMSO)和 ATRA 加药组(ATRA 溶解于 DMSO 中,ATRA 终浓度分别为 1 μmol/L 和 10 μmol/L),预实验表明 0.1% DMSO 对细胞生长没有影响。待细胞密度达到 80%~90% 时,弃去培养液,用 PBS 洗涤 3 遍,胰酶消化,DMEM 完全培养基终止消化,计数,用 DMEM 完全培养基调整细胞密度为 6 × 10³ 个/ml,细胞按 2、5、14、42、72 d 时间培养,2、5 d 加药组直接在 24 孔板中培养,14、42、72 d 加药组先在培养瓶中加药培养 3 d 传代 1 次,最后 5 d 移至 24 孔板中培养(调整细胞密度为 6 × 10³ 个/ml)。到达预定培养时间后在倒置显微镜下观察细胞形态学的变化并拍照;收集对照组和加药组细胞,离心取上清液检测 AFP 含量;将细胞沉淀用 PBS 洗涤 3 次,加入含 0.5% Triton X-100 的 Tris-HCl 缓冲液,超声破碎,4℃高速离心 15 min(15 000 r/min),取上清液用

2019-07-12 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81272399);安徽省自然科学基金(编号:1708085MH212)

作者单位:¹安徽医科大学分子生物学实验室,合肥 230032

²安徽医科大学附属合肥医院 230011

作者简介:周青,男,高级实验师;

汪渊,男,教授,责任作者,E-mail:aydesm-1@163.com

BCA 法蛋白定量后检测 γ -GT 比活性。

1.3.3 细胞增殖实验 细胞分组、培养方法和培养时间同上;取 200 μ l 细胞密度为 5×10^3 个/ml 的 DMEM 完全培养基加入 96 孔板中,每组 6 个复孔,在到达培养时间时,每孔加入 10 μ l MTT(5 g/L),置 37 $^{\circ}$ C 培养箱中继续培养 4 h,吸尽孔中培养基,每孔加入 100 μ l DMSO,酶标仪检测对照组和加药组吸光度 A 细胞抑制率% = (细胞对照组 OD₅₇₀ - 加药处理组 OD₅₇₀) / 细胞对照组 OD₅₇₀ \times 100%,重复 3 次,计算各组细胞抑制率。

1.3.4 细胞凋亡实验 将硅化盖玻片放入清洁液中浸泡,流水冲洗,再用去离子水冲洗,高压灭菌后置于 70% 乙醇中浸泡,使用时超净台中吹干放入 24 孔板中,种入细胞;细胞分组、培养方法和培养时间同上,各组细胞在密度达到 50% ~ 60% 时取出盖玻片放在载玻片上固定并 Hoechst 染色。荧光显微镜下观察细胞形态(激发波长 350 nm,发射波长 460 nm) 细胞核致密浓染为凋亡细胞。每一组细胞随机拍摄 3 个视野,细胞计数。重复 3 次,计算细胞凋亡率,凋亡率 = 凋亡细胞数 / 细胞总数 \times 100%。

1.3.5 细胞迁移实验 取处于对数生长期的 HepG2 细胞,胰酶消化,DMEM 培养基终止消化,吹打均匀后接种至 24 孔板中。待细胞全部长满 24 孔板底部,用 200 μ l 塑料吸头在 24 孔板每孔中央划出一条直线划痕,洗去脱落细胞,在显微镜下拍照作为 0 h,对照组和加药组培养至 24、48、72 h 时,分别在同一观察点拍照记录细胞划痕处的细胞迁移情况,重复 3 次。利用 Quantity One 软件测量各孔多点划痕距离取均值,细胞迁移距离为 0 h 的距离减去 24、48、72 h 处理后的距离。

1.3.6 细胞软琼脂克隆实验 首先在 6 孔细胞培养板中铺设 0.6% 琼脂(每孔 3 ml),冷却凝固作为底层琼脂;取处于对数生长期的 HepG2 细胞,制备成单细胞悬液并稀释到终浓度为 1×10^3 个/ml;铺设 0.3% 上层软琼脂,按 1 : 1 比例吸取 2 \times DMEM 培养基,加入 0.6% 软琼脂(70 $^{\circ}$ C),迅速混匀再加入细胞悬液(细胞终浓度 5×10^2 个/ml) 轻轻混匀,按每孔 1.0 ml 加入 6 孔板中,6 孔板置于湿盒中室温放置 30 min,再连同湿盒一起置于二氧化碳培养箱,在到达各培养时间时每孔加入 MTT 染液 1 ml,30 min 后观察对照组和加药组细胞克隆的形成状态并拍照。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行

分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析(ANOVA),两组之间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATRA 对 HepG2 细胞分化的影响

2.1.1 HepG2 细胞形态学的变化 倒置显微镜下观察到 HepG2 对照组细胞成簇状生长,细胞密度大,具有良好的光泽度,细胞形态不因培养时间不同而发生变化(图 1)。1 μ mol/L ATRA 组和 10 μ mol/L ATRA 组细胞在第 5 天时可见细胞数目减少且细胞形态不规则并呈离散状生长,72 d 时细胞形态更为细长,多核细胞更少;同一处理时间段 10 μ mol/L ATRA 组细胞形态变化比 1 μ mol/L ATRA 组更加明显。

2.1.2 ATRA 对 HepG2 细胞 γ -GT 比活性和 AFP 分泌量的影响 与对照组相比,同一处理天数,1 μ mol/L ATRA 组和 10 μ mol/L ATRA 组细胞 γ -GT 比活性均呈下降趋势,差异有统计学意义。与对照组相比,1 μ mol/L ATRA 组和 10 μ mol/L ATRA 组 AFP 分泌量也呈下降趋势,但处理时间较短时差异无统计学意义;与对照组相比,1 μ mol/L ATRA 组从第 42 天起 AFP 值的差异有统计学意义,10 μ mol/L ATRA 组从第 14 天起差异有统计学意义。见表 1。

2.2 ATRA 对 HepG2 细胞凋亡的影响 在荧光显微镜下可以观察到对照组的 HepG2 细胞核发出均匀的蓝色荧光(图 2),而 1 μ mol/L ATRA 组和 10 μ mol/L ATRA 组可见核致密浓染的凋亡细胞(箭头处为凋亡小体),在第 72 天 10 μ mol/L ATRA 组凋亡小体最多。统计显示自第 5 天起 1 μ mol/L ATRA 组和 10 μ mol/L ATRA 组凋亡率高于对照组,差异有统计学意义(表 2)。

2.3 ATRA 对 HepG2 细胞增殖的影响 MTT 实验结果显示,与对照组相比,1 μ mol/L ATRA 组和 10 μ mol/L ATRA 组从第 2 天开始生长受到抑制,差异有统计学意义;10 μ mol/L ATRA 组较 1 μ mol/L ATRA 组对 HepG2 细胞的抑制程度更高(表 3)。

2.4 ATRA 对 HepG2 细胞迁移的影响 对照组 24 h 迁移距离为 $(7.31 \pm 3.20) \mu\text{m}$,1 μ mol/L ATRA 和 10 μ mol/L ATRA 加药组 24 h 迁移距离分别为 $(12.28 \pm 1.97) \mu\text{m}$ 和 $(10.50 \pm 3.12) \mu\text{m}$;48 h 对照组迁移距离为 $(40.03 \pm 4.68) \mu\text{m}$,1 μ mol/L ATRA 和 10 μ mol/L ATRA 加药组迁移距离分别为 $(36.15$

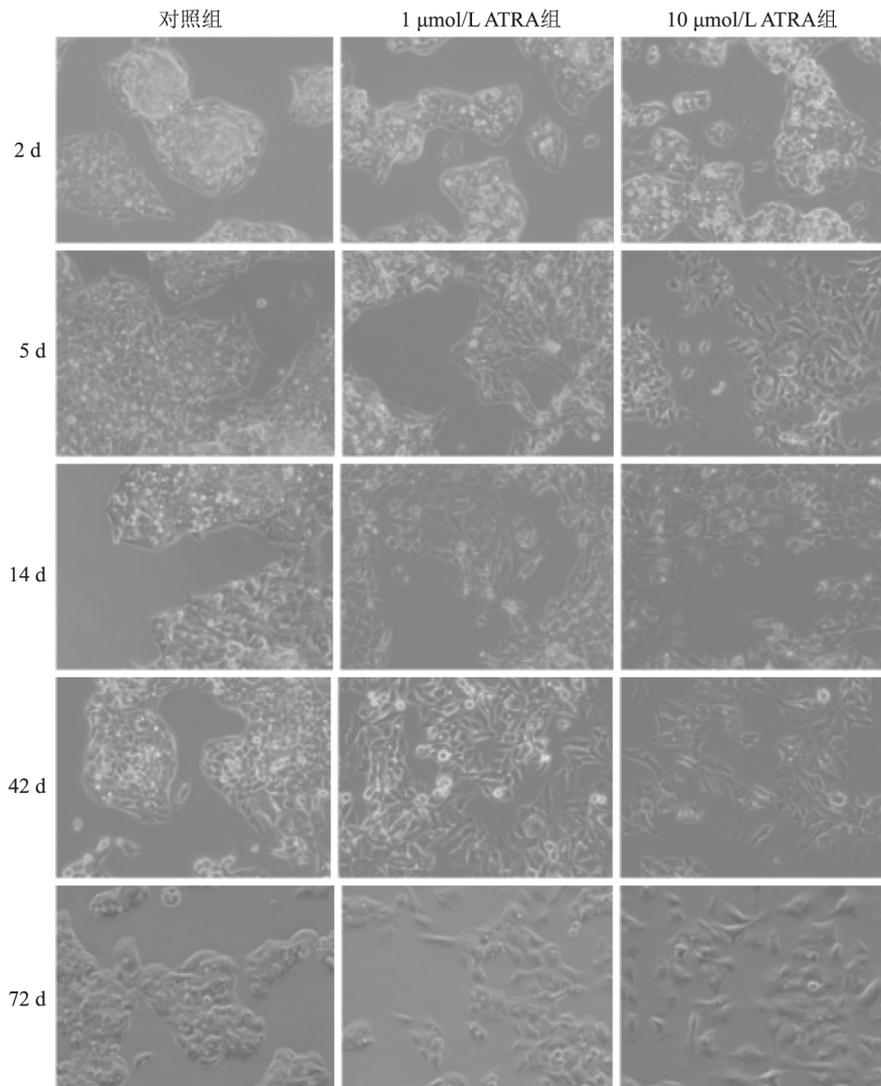


图 1 ATRA 诱导 HepG2 分化在细胞形态学上的影响 ×100

表 1 ATRA 处理肝癌细胞 HepG2 细胞后 γ -GT 的比活性和 AFP 的分泌量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	处理时间 (d)	γ -GT 比活性	F 值	AFP 分泌量	F 值
对照	2	9.422 ± 1.822		14.756 ± 0.246	
	5	8.868 ± 1.342		14.425 ± 0.832	
	14	8.532 ± 1.609		14.952 ± 0.882	
	42	8.532 ± 1.026		14.324 ± 0.462	
	72	8.525 ± 0.821		14.580 ± 0.246	
1 μ mol/L ATRA	2	5.333 ± 0.582*	13.720	13.972 ± 2.166	0.388
	5	5.480 ± 0.602*	15.911	13.421 ± 0.945	1.908
	14	4.666 ± 0.552*	33.063	13.623 ± 0.948	3.160
	42	5.436 ± 0.562*	21.041	12.247 ± 1.222*	7.583
	72	4.364 ± 0.588*	67.790	12.240 ± 0.482*	56.095
10 μ mol/L ATRA	2	6.667 ± 0.665*	6.053	14.532 ± 0.984	0.060
	5	5.362 ± 0.673*	16.361	13.764 ± 0.812	0.970
	14	4.060 ± 1.120*	26.021	11.808 ± 0.921*	18.236
	42	5.423 ± 0.822*	16.105	11.212 ± 1.012*	23.476
	72	3.384 ± 0.872*	67.671	11.322 ± 0.458*	117.817

与对照组比较: * $P < 0.05$

± 4.72) μ m 和 (27.41 ± 2.49) μ m; 72 h 对照组迁移距离为 (50.36 ± 3.14) μ m, 1 μ mol/L ATRA 和 10 μ mol/L ATRA 加药组迁移距离分别为 (45.76 ± 4.35) μ m 和 (29.63 ± 2.40) μ m。统计学分析结果显示 加药组 24、48、72 h 细胞划痕间伤口愈合距离均低于同期对照组 (图 3), 差异有统计学意义, 10 μ mol/L ATRA 比 1 μ mol/L ATRA 作用更强。

2.5 ATRA 对 HepG2 细胞克隆形成能力的影响

软琼脂克隆形成实验表明 HepG2 细胞可以在软琼脂上形成克隆, 与对照组相比, 1 μ mol/L ATRA 组和 10 μ mol/L ATRA 组克隆数目减少, 到 72 d 时 1 μ mol/L ATRA 组仍可见少量克隆, 但 10 μ mol/L ATRA 组基本无克隆生长。提示 HepG2 细胞受到 ATRA 刺激后能明显抑制 HepG2 肿瘤细胞在软琼脂中的克隆形成 (图 4)。

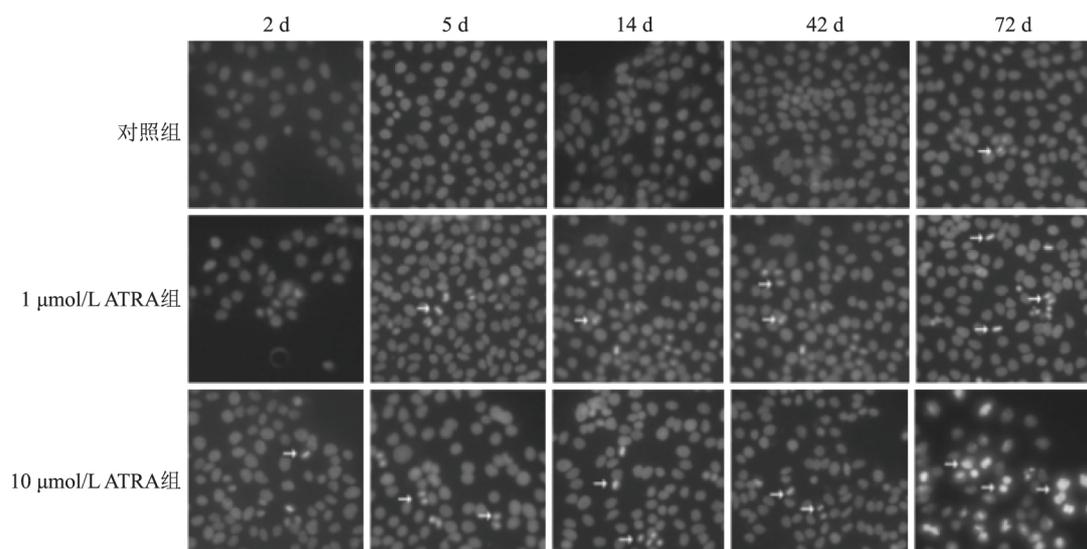


图2 ATRA对肝癌细胞HepG2凋亡的影响 ×200

表2 ATRA对肝癌细胞HepG2凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	处理时间(d)	凋亡率	F值
对照	2	1.685 ± 0.493	
	5	1.862 ± 1.022	
	14	1.626 ± 0.429	
	42	1.568 ± 0.536	
	72	1.749 ± 1.342	
1 μmol/L ATRA	2	4.206 ± 0.652*	28.536
	5	5.614 ± 0.649*	28.814
	14	5.849 ± 1.026*	43.261
	42	6.262 ± 1.632*	22.402
	72	6.244 ± 1.462*	15.391
10 μmol/L ATRA	2	3.548 ± 0.726*	13.520
	5	6.742 ± 1.222*	28.152
	14	6.914 ± 1.225*	49.796
	42	6.448 ± 1.262*	22.402
	72	9.458 ± 2.246*	15.391

与对照组比较: * $P < 0.05$ 表3 ATRA对肝癌细胞HepG2增殖的影响($n=6$)

组别	处理时间(d)	OD值($\bar{x} \pm s$)	抑制率(%)	F值
对照	2	1.192 ± 0.210	-	
	5	1.095 ± 0.186	-	
	14	0.994 ± 0.246	-	
	42	0.979 ± 0.128	-	
	72	0.926 ± 0.228	-	
1 μmol/L ATRA	2	0.998 ± 0.028*	16.3	8.636
	5	0.824 ± 0.115*	24.8	31.226
	14	0.682 ± 0.082*	31.4	127.484
	42	0.534 ± 0.108*	45.5	21.181
	72	0.428 ± 0.124*	53.8	11.045
10 μmol/L ATRA	2	0.747 ± 0.102*	37.3	10.900
	5	0.562 ± 0.183*	50.8	12.518
	14	0.539 ± 0.026*	45.8	10.150
	42	0.485 ± 0.121*	53.2	23.597
	72	0.285 ± 0.048*	69.2	22.706

与对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

诱导分化剂治疗恶性肿瘤的理论基础是诱导分化剂可以使肿瘤细胞的分化潜能部分或全部恢复进而转化为正常细胞,或诱导肿瘤细胞凋亡从而达到治疗肿瘤的目的^[4]。ATRA目前在临床上常被用于急性早幼粒白血病的诱导分化治疗^[5]。本研究初步探讨ATRA作用于人肝癌细胞株HepG2后,HepG2细胞分化、凋亡、迁移和克隆形成等生物学行为的变化。

本研究选择 γ -GT和AFP作为ATRA诱导HepG2细胞分化的观察指标。正常血清中 γ -GT主要来自肝脏,当肝细胞发生癌变时活性逐渐上升且与恶变程度正相关,因此可以把 γ -GT作为肝癌诊

断的标志物^[6]。AFP主要由胎儿肝细胞及卵黄囊合成,正常成人无分泌,且分泌量与肝癌的恶性程度密切相关,AFP是肝癌特异性标志物^[7],本研究选择这两个指标作为观察HepG2细胞分化的指标。

首先观察了1 μmol/L ATRA和10 μmol/L ATRA药物处理组对HepG2细胞分化的影响,结果显示对照组HepG2成簇状生长,细胞密度大,具有良好的光泽度,细胞形态不随培养时间长短发生改变,经过ATRA处理后HepG2细胞生长离散,细胞数目减少,细胞核变小且发生凹陷和分叶,胞质增多,并随着作用时间的延长形态学改变越明显,与Arisi et al^[8]的研究中细胞形态学改变一致。结果分析显示:同一处理时间段1 μmol/L ATRA组和10 μmol/L

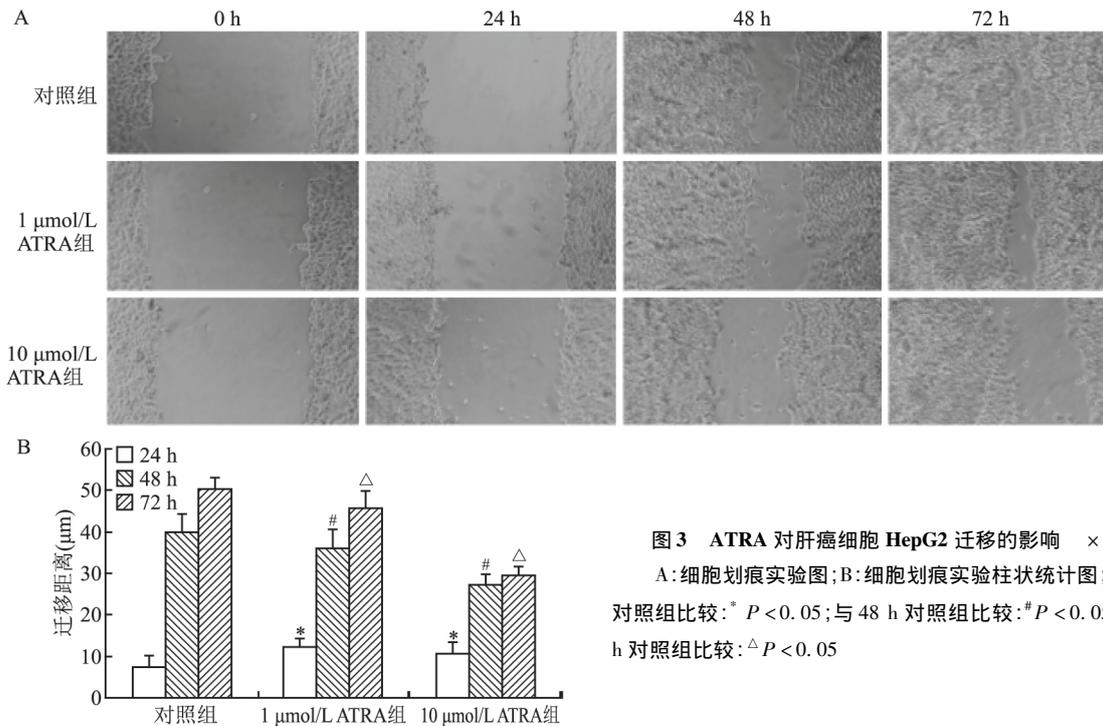


图3 ATRA对肝癌细胞HepG2迁移的影响 ×100
 A:细胞划痕实验图;B:细胞划痕实验柱状统计图;与24 h对照组比较:* P<0.05;与48 h对照组比较:# P<0.05;与72 h对照组比较:△ P<0.05

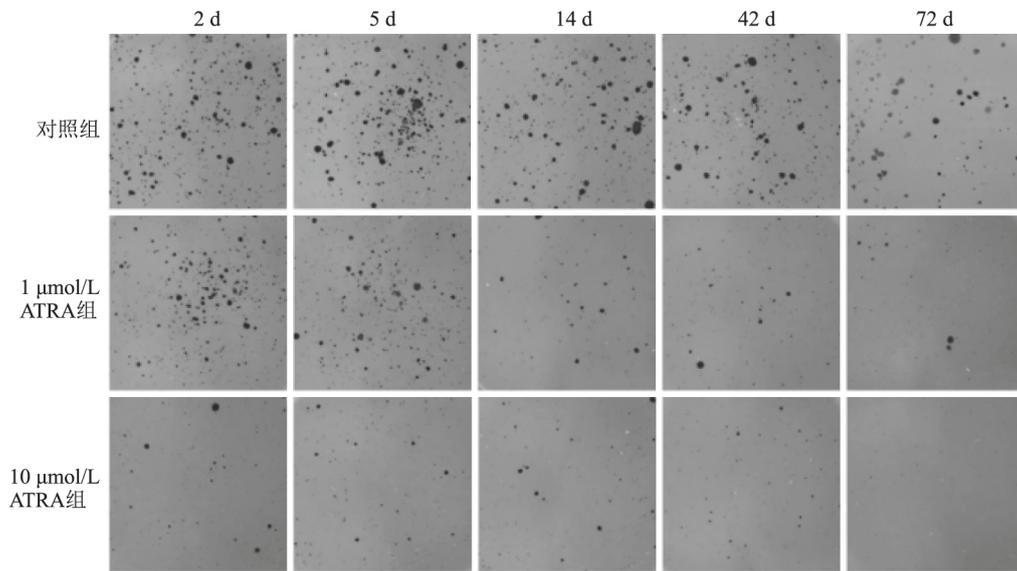


图4 ATRA对肝癌细胞HepG2克隆形成能力的影响

ATRA组的γ-GT比活性和AFP分泌量均低于对照组;组内不同处理时间段之间γ-GT比活性和AFP分泌量也有差异。ATRA加药组在诱导HepG2细胞分化过程中随处理时间的增加γ-GT比活性和AFP分泌量呈下低趋势,表明ATRA处理的HepG2细胞恶性程度降低^[9]。提示1 μmol/L ATRA和10 μmol/L ATRA具有诱导HepG2分化的作用。

MTT试验结果表明,ATRA能够抑制HepG2细胞的增殖,与对照组比较,ATRA加药组细胞均自2 d时开始受到抑制,细胞抑制率随处理时间的增加

而增加,72 d时细胞抑制率最高达到59.043%。Hoechst染色结果显示细胞对照组在荧光显微镜下细胞核发出均匀的蓝色荧光,偶见凋亡细胞,而加药组可见致密浓染的凋亡细胞、碎裂和凋亡小体。1 μmol/L ATRA处理72 d后,HepG2细胞凋亡率(6.244 ± 1.462)%,10 μmol/L ATRA处理72 d后凋亡率为(9.458 ± 2.246)%。说明ATRA不仅可以促进HepG2细胞向正常细胞再分化,抑制HepG2细胞增殖还可以诱导HepG2细胞凋亡^[10]。

根据划痕实验结果可以初步研究肿瘤细胞的迁

移能力,通过判断细胞对照组与加药组划痕的愈合距离来判断细胞的迁移能力强弱^[11]。实验中观察到在低浓度血清培养基中,1 μmol/L ATRA 组和 10 μmol/L ATRA 组细胞划痕间伤口愈合距离在 24、48、72 h 均低于对照组;提示 ATRA 具有抑制 HepG2 细胞的迁移能力,且随着药物浓度的增加其抑制迁移的作用也随之增强。

HepG2 细胞对照组在软琼脂上形成较多的克隆,ATRA 刺激后 HepG2 细胞在软琼脂中的克隆形成减少,72 d 后 10 μmol/L ATRA 组几乎无克隆形成,但 1 μmol/L ATRA 组仍可见少量克隆。提示 ATRA 能够抑制 HepG2 细胞在体外克隆形成能力且 ATRA 对 HepG2 克隆能力的抑制程度呈时间与剂量依赖。

参考文献

- [1] 曹毛毛,陈万青.中国恶性肿瘤流行情况及防控现状[J].中国肿瘤临床,2019,46(3):145-9.
- [2] Rexfer B N, Zheng W L, Ong D E. Retinoic acid biosynthesis by normal human breast epithelium is *via* aldehyde dehydrogenase 6, absent in MCF-7 cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(19):7065-70.
- [3] Garattini E, Parrella E, Diomedea L, et al. ST1926, a novel and orally active retinoid-related molecule inducing apoptosis in myeloid leukemia cells: modulation of intracellular calcium homeostasis[J]. Blood, 2004, 103(1):194-207.
- [4] Caliaro M J, Vitaux P, Lafon C, et al. Multifactorial mechanism for the potentiation of cisplatin (CDDP) cytotoxicity by all-*trans* retinoic acid (ATRA) in human ovarian carcinoma cell lines[J]. Br J Cancer, 1997, 75(3):333-40.
- [5] Wu X, Wang X, Qien X, 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] Wang X W, Xu B. Several new targets of antitumor agents[J]. Acta Pharmacol Sin, 1997, 18(4):289-92.
- [7] Liu F, Qi H L, Chen H L. Effects of all-*trans* retinoic acid and epidermal growth factor on the expression of nm23-H1 in human hepatocarcinoma cells[J]. J Cancer Res Clin, 2000, 126(2):85-90.
- [8] Arisi M F, Starker R A, Addya S, et al. All *trans*-retinoic acid (ATRA) induces re-differentiation of early transformed breast epithelial cells[J]. Int J Oncol, 2014, 44(6):1831-42.
- [9] Cui J, Gong M, He Y, et al. All *trans*-retinoic acid inhibits proliferation, migration, invasion and induces differentiation of hep1-6 cells through reversing EMT *in vitro* [J]. Int J Oncol, 2016, 48(1):349-57.
- [10] Wang S, Jiang W, Chen X, et al. Alpha-fetoprotein acts as a novel signal molecule and mediates transcription of Fn14 in human hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2012, 57(2):322-9.
- [11] Yarrow J C, Perlman Z E, Westwood N J, et al. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods[J]. BMC Biotechnol, 2004, 4:21.

Effect of all-*trans* retinoic acid on the biological characteristics of human hepatoma HepG2 cells

Zhou Qing¹, Wei Xiang², Zhang Sumei¹, et al

¹Laboratory of Molecular Biology of Anhui Medical University, Hefei 230032;

²The Affiliated Hefei Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230011)

Abstract Objective To investigate the effect of all-*trans* retinoic acid (ATRA) on cells morphology, proliferation and differentiation of HepG2 cells. **Methods** HepG2 hepatoma cells were treated with ATRA (1 μmol/L and 10 μmol/L). Cell morphology was observed under microscope. Secreted γ-glutamyl transferase (γ-GT) and alpha-fetoprotein (AFP) were determined quantitatively. MTT, Hoechst staining, cell wound healing assay and soft agar assay were used to detect the effect of ATRA on the proliferation, apoptosis, differentiation, *in vitro* clony-formation viability of HepG2 cells, respectively. **Results** Compared with the control group, the number of cell growth decreased, growth morphology changed after treated with ATRA. Secreted γ-GT and AFP were both reduced significantly. Meanwhile, the potential of cells proliferation, migration and clony-formation were decreased, but apoptotic cells were increased when compared with control cells. **Conclusion** ATRA, as a well-known differentiation inducer, can induce the cells differentiation and apoptosis, but also inhibit the proliferation, migration and clony-formation of HepG2 cells.

Key words all-*trans* retinoic acid; hepatoma; differentiation; apoptosis; migration