

Axl 去糖基化对小鼠肝癌细胞增殖和侵袭能力的影响

李吉¹, 张大伟¹, 姜文清¹, 赵永福^{2*}

(1. 辽宁医学院附属第三医院普通外科, 辽宁 锦州 121000; 2. 大连医科大学附属第二医院普通外科, 辽宁 大连 116027)

摘要:【目的】探讨 Axl 去糖基化对小鼠肝癌细胞(Hca-F)增殖和侵袭能力的影响。【方法】以糖链抑制剂衣霉素(Tunicamycin)处理 Hca-F 细胞,通过 Western Blot 法观察 Axl 糖基化的改变;应用 MTT 实验和体外侵袭实验观察 Axl 去糖基化对 Hca-F 细胞的增殖和侵袭能力的影响。【结果】用衣霉素处理 Hca-F 细胞后,Axl 糖蛋白的表达明显改变,且都出现了新的脱糖蛋白质条带;同时,该细胞在体外的增殖和侵袭能力下降($P < 0.05$)。【结论】Axl 去糖基化能够抑制小鼠肝癌细胞 Hca-F 的增殖和侵袭能力。

关键词: Axl;糖基化;衣霉素;肝癌

中图分类号: R735.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2014)06-0849-05

Effect of Axl Deglycosylation on Proliferation and Invasion in Murine Hepatocellular Carcinoma

LI Ji¹, ZHANG Da-wei¹, JIANG Wen-qing¹, ZHAO Yong-fu^{2*}

(1. Department of General Surgery, The Third Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121000, China;

2. Department of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

Abstract: 【Objective】To research the possible effects of Axl deglycosylation on the proliferation and invasion of murine hepatocellular carcinoma cell line Hca-F.【Methods】Western blotting was used to analyze the expression profile of Axl glycoprotein in mouse hepatocellular carcinoma cell line Hca-F treated with tunicamycin. MTT assay and ECM invasion assay were utilized to evaluate the effect of Axl deglycosylation on the Hca-F cell proliferation and invasion. 【Results】By treatment with tunicamycin, the expression level of Axl glycoprotein was markedly changed. The new bands that appeared were consistent with the size of the core protein, which were the result of tunicamycin inhibiting Axl glycosylation. The Hca-F cells proliferation and invasion capability decreased, comparing with control ($P < 0.05$). 【Conclusion】Axl deglycosylation inhibits tumor cells proliferation and invasion in murine hepatocellular carcinoma cell line Hca-F.

Key words: Axl; glycosylation; tunicamycin; hepatocellular carcinoma

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(6): 849-853]

肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一,早期症状并不明显,且易转移复发,病死率高。有报道,出现症状的肝癌患者 5 年生存率不到 5%^[1]。Axl 作为一种广泛存在于细胞表面的跨膜糖蛋白,参与多种癌细胞的侵袭和转移,已引起人们的广泛关注^[2-7]。本研究目的旨在观察 Axl 去糖基化对小鼠肝癌细胞的增殖和侵袭能力的影响,为研究抗

肿瘤转移的药物开发提供有价值的实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物及肝癌细胞 SPF 级 615 小鼠,雄性,8 周龄,体质量 20 ~ 23 g,由辽宁医学院实

收稿日期:2014-06-19

基金项目:辽宁省自然科学基金(20092164)

作者简介:李吉,外科硕士,医师,研究方向:肝癌的淋巴道转移,E-mail: jzlj0601@163.com; * 通信作者:赵永福,教授,E-mail: zyf0386@sina.com

验动物中心提供。小鼠肝癌细胞 Hca-F, 由大连医科大学大学生化教研室提供。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清及 RPMI 1640 (Gibco 公司); 衣霉素及 MTT (Sigma 美国); Elivision™ plus 试剂盒 (Maixin Bio); 凯基全蛋白提取试剂盒及 BCA 蛋白含量检测试剂盒 (大连宝生物公司); 兔抗小鼠 Axl 多克隆抗体及辣根酶标记羊抗兔抗体 (Santa 公司); ECL 试剂盒 (Amersham Biosciences 公司); Transwell (Corning 公司); 基质胶 (Chemicon 公司); DMSO (Gibco 公司)。

1.2 细胞培养及衣霉素处理

复苏 Hca-F 细胞, 接种 615 小鼠腹腔 (4 只正常 615 小鼠随机分成 2 组), 7 d 后在无菌条件下抽取非血性腹水, 然后用 PBS 洗涤一次, 再将细胞加入含 100 mL/L 的胎牛血清, RPMI 1640 培养基, 青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 μg/mL, 37 °C 的体积分数为 5% CO₂ 孵箱中培养 24 h, 使小鼠腹腔巨噬细胞贴壁, 然后收集悬浮液, 离心收集细胞, 用石蜡包埋并制作切片, 参照 Elivision™ plus 试剂盒说明鉴定 Hca-F 细胞。制备好 Hca-F 细胞悬液, 然后加入衣霉素, 使其终浓度为 0、5、10 和 20 μg/mL。在 37 °C 的体积分数为 5% CO₂ 孵箱中培养 12 h, 然后用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 再分别行 Western blot、MTT 实验和体外侵袭实验。

1.3 Western blot 分析

参照蛋白提取试剂盒说明提取细胞全蛋白, 并参照 BCA 蛋白含量检测试剂盒说明进行蛋白定量, 以每孔加热煮沸的目的蛋白 40 μg 点样, 经 10% 分离胶、6% 浓缩胶的 SDS-PAGE 电泳分离。通过半干法转膜, 将转移好的 PVDF 膜放在 50 g/L 脱脂奶粉中封闭, 37 °C 封闭 2 h。然后分别置于按 1:200 稀释的兔抗小鼠 Axl、GAPDH 多克隆抗体中孵育, 4 °C 过夜。用 TTBS 于摇床上洗膜 10 min × 3 次。然后置于按 1:3 000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔二抗中孵育, 37 °C 1 h, 随后用 TTBS 于摇床上洗膜 10 min × 3 次。以 ECL 发光试剂盒发光, 检测结果, LabWorks 分析作图 (TM ver4.6, UVP)。

1.4 MTT 实验

收集处理后的 Hca-F 细胞, 显微镜下计数, 调细胞浓度为 1×10^6 mL⁻¹, 按每孔 200 μL 细胞悬液接种于 96 孔板, 每组设 4 个复孔, 每孔分别在 24、48、72、96 和 120 h, 加入 100 μL 5 mg/mL MTT, 在 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 及饱和湿度条件下继续

培养 4 h, 吸净培养液后, 每孔加入 100 μL 的 DMSO, 振荡 10 min 后以空培养液调零, 应用 BIO-RAD550 酶标仪测定 $A_{490\text{ nm}}$ 值, 记录数据, 分析作图。

1.5 体外侵袭实验

将基质胶于 4 °C 过夜解冻, 滤膜小杯 (transwell 小室) 预冷过夜, 每小杯加入 50 μg 的基质胶, 于超净台的紫外灯照射约 2 h, 干燥过夜, 同时加入少许无血清培养基水化, 将细胞于无血清培养基中培养 24 h, 再用含 0.1% BSA 的无血清培养基重新悬浮, 细胞浓度调整为 3×10^5 mL⁻¹, 细胞 100 μL 分别加入上室, 500 μL RPMI 1640 培养基入下室, 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 孵箱培养 24 h, 取出带滤膜小杯, 用棉签小心把上膜细胞擦掉, 小杯入 PBS 缓冲液洗 2 次, 然后瑞氏-吉姆萨染色, 显微镜下随机选择 5 个 400 倍视野, 统计视野中的细胞数目, 以侵袭细胞的相对数目来表示肿瘤细胞的侵袭能力。每组平行设 3 个滤膜, 取均值计数, 照相分析。

1.6 统计学处理

所有数据均用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。每一项分析至少有 3 次结果。数值用均数 ± 标准差表示, 采用相关与回归分析。P < 0.05 认为差异有统计学意义

2 结 果

2.1 衣霉素 (Tunicamycin) 对 Axl 糖基化的影响

糖链抑制剂衣霉素能够使细胞表面糖蛋白的糖链加工受阻, 从而阻断糖基化过程, 本实验观察其对 Axl 糖基化的影响。我们分别以终浓度 0、5、10 和 20 μg/mL 的衣霉素处理 Hca-F 细胞 12 h 后, 结果显示 Axl 糖基化明显被抑制。Western blot 实验结果显示 (图 1), Axl 糖蛋白 130 ku 条带的表达量减少, 而 60 ku 条带的表达量增多, 而且还出现一条 100 ku 的条带, 其为脱糖的蛋白质条带, 这是由于衣霉素抑制细胞表面糖蛋白的糖基化所产生的。然而, 随着衣霉素浓度的升高, 130 ku 条带的几乎消失。这些结果显示了衣霉素对 Hca-F 细胞糖基化过程的影响。

2.2 Axl 去糖基化对 Hca-F 细胞体外增殖能力的影响

在不同浓度的衣霉素处理下使 Hca-F 细胞中

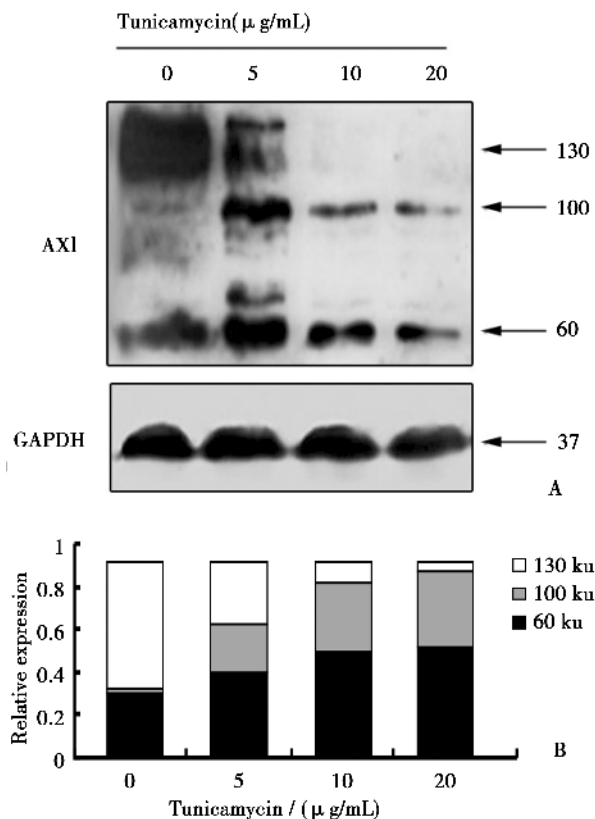


图1 衣霉素对 Axl 糖基化的影响

Fig.1 Tunicamycin effects on Axl glycosylation

Hca-F cells were treated with 0 μg/mL, 5 μg/mL, 10 μg/mL, and 20 μg/mL tunicamycin for 12 h. Total protein extracts were loaded for each sample. A: Protein was separated on a gel for Western blotting Analysis. GAPDH was used as a control. B: Relative signal intensities of Axl protein levels were compared with GAPDH by LabWorks™ (ver 4.6, UVP; Biolmaging systems) analysis, respectively. Data was obtained in triplicate.

的 Axl 糖蛋白不同程度的去糖基化, 然后用 MTT 法检测细胞增殖能力变化。结果显示, 随着衣霉素浓度的增大 Hca-F 细胞的增殖能力逐渐下降 (图 2), 表明 Axl 的去糖基化能够抑制 Hca-F 细胞在体外的增殖能力。

2.3 Axl 去糖基化对 Hca-F 细胞体外侵袭能力的影响

肿瘤细胞发生侵袭时需穿过细胞外的基底膜和组织间隙基质。本实验为了观察 Axl 去糖基化后对 Hca-F 细胞体外侵袭能力的影响, 体外侵袭实验结果显示随衣霉素浓度的增大 Hca-F 细胞穿过基质胶的数量逐渐减少 (图 3)。0 μg/mL 衣霉素处理组 Hca-F 细胞穿过基质胶的平均数量是 80

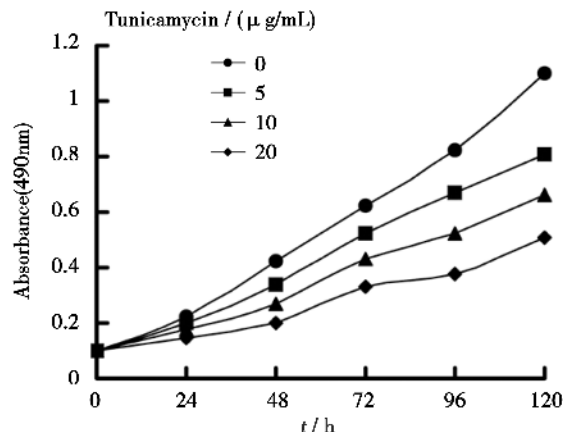


图2 Axl 去糖基化对 Hca-F 细胞体外增殖能力的影响

Fig.2 Axl deglycosylation effects on cell proliferation in vitro

Hca-F cells were exposed to tunicamycin and harvested at 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, and 120 h. Cell proliferation was measured by 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. Decreased proliferative ability was detected in cells treated with tunicamycin, compared with untreated Hca-F cells. Data was obtained in triplicate.

± 9, 并作为对照组, 而 5、10 和 20 μg/mL 衣霉素处理组 Hca-F 细胞穿过基质胶的平均数量分别是: 68 ± 8、50 ± 6 和 41 ± 4, 与对照组比较差异有统计学意义 (5 μg/mL: 68 ± 8 vs 80 ± 9, $P = 0.0222$; 10 μg/mL: 50 ± 6 vs 80 ± 9, $P = 0.0003$; 20 μg/mL: 41 ± 4 vs 80 ± 9, $P = 0.0001$)。以上结果表明, Axl 的去糖基化能够抑制 Hca-F 细胞体外侵袭能力。

3 讨论

肿瘤的发生、发展是由多基因改变参与的一个积累过程, 它的重要原因有细胞增殖和分化失控, 血管生成异常以及细胞凋亡障碍。而 Axl 分子是否参与了这些因素的调控? Axl 是新近成为研究热点的与肿瘤转移相关的分子。Tai 等^[2]研究发现 Axl 高表达能够触发 MMP-9 的表达, 从而增强癌细胞的侵袭能力。He 等^[6]研究发现 Axl 表达下调能够抑制小鼠肝癌细胞的侵袭能力。Xu 等^[7]研究发现 Axl 表达下调能够抑制人肝癌细胞的侵袭能力。然而 Axl 分子作为一种广泛存在于细胞表面的跨膜糖蛋白, 却很少有科学家从糖基化的角度来阐述其作用机制。本研究以糖生物学为基础靶

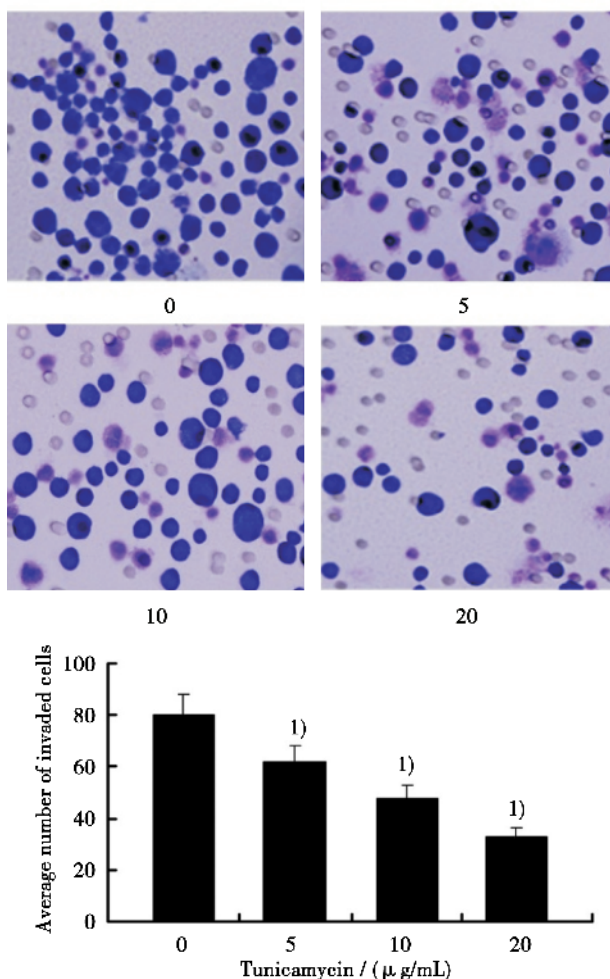
Tunicamycin / ($\mu\text{g/mL}$)

图 3 Axl 去糖基化对 Hca-F 细胞体外侵袭能力的影响

Fig.3 Axl deglycosylation alters the invasive ability of Hca-F cells in vitro

In vitro ECMatrix gel analysis. Wright-Giemsa staining results of the lower surface filter showed that the cells passed through the filter and attached to the lower side (400 \times). The average number of cells invading the filter was counted. 1) Cells treated with tunicamycin were significantly less invasive ($P < 0.05$ vs the control group) than untreated Hca-F cells. Data was obtained in triplicate.

点,提出了糖蛋白 Axl 的糖基化与肝癌细胞转移潜能关系。

我们使用糖链抑制剂衣霉素使 Axl 去糖基化。衣霉素是一种天然的核苷抗生素,其可以抑制糖基化反应中十四糖二磷酸长萜醇的生成,从而阻碍糖链的加工,产生脱糖蛋白。通过 Western blot 实验我们观察到这种方法对 Hca-F 细胞的糖基化过程的影响,也说明了衣霉素能够使 Axl 去糖基化。

糖基化是细胞表面受体蛋白翻译后修饰的主要反应之一,糖链结构改变被观察到出现在多种肿瘤细胞中^[8]。本研究观察到 Axl 去糖基化影响肿瘤细胞的增殖和侵袭能力。我们通过 MTT 实验中活细胞数量间接反映细胞增殖数量。结果发现经衣霉素处理后的 Hca-F 细胞的增殖数量显著减少,也说明了 Axl 去糖基化能够抑制 Hca-F 细胞在体外的增殖能力。同样有研究表明,细胞增殖需要细胞表面的糖蛋白受体传递生长因子信号,然而它可能在其去糖基化后受抑制^[9]。肿瘤侵袭转移离不开肿瘤细胞的自身运动,基底膜是防止肿瘤细胞侵袭的天然屏障,也是评价其侵袭穿透能力的重要依据。本研究中我们采用 Transwell 小室定量检测 Hca-F 细胞体外侵袭能力的变化,Transwell 人工基底膜模拟了真实的基底膜。结果发现被衣霉素处理后的 Hca-F 细胞穿过基质胶的平均数量显著减少,这也说明了 Axl 去糖基化能够抑制 Hca-F 细胞在体外的侵袭能力。

在这项研究中,我们没有做更深入的工作去进一步阐明 Axl 去糖基化抑制小鼠肝癌细胞 Hca-F 增殖和侵袭能力的具体机制。不过越来越多的证据表明,糖蛋白的糖链参与调节细胞功能,包括细胞间的通讯和信号转导^[10-11]。 $\beta 1, 6\text{-GlcNAc}$ 结构中的 N-糖链和催化 $\beta 1, 6\text{-}$ 分支的 GnT-V 的表达被发现能够促进转移^[12-13]。至少,在这些报道中,我们可以看出糖链和肿瘤转移之间的关系是极其复杂的,要阐明其更加详细的机制,需要我们更多的科学工作者付出更大的努力。

总之,本研究显示 Axl 的去糖基化能够抑制肝癌细胞 Hca-F 的增殖和侵袭能力。本研究也进一步提示了 Axl 糖基化可能为诊断和治疗肿瘤转移提供新的靶点,为研究抗肿瘤转移的药物开发提供有价值的实验依据。

参考文献:

- [1] Schutte K, Bornschein J, Malfertheiner P. Hepatocellular carcinoma—epidemiological trends and risk factors [J]. Dig Dis, 2009, 27(2):80-92.
- [2] Tai KY, Shieh YS, Lee CS, et al. Axl promotes cell invasion by inducing MMP-9 activity through activation of NF-kappaB and Brg-1 [J]. Oncogene, 2008, 27(29): 4044-4055.
- [3] Christofori G. New signals from the invasive front [J]. Nature, 2006, 441(7092): 444-450.

- [4] Zhang YX, Knyazev PG, Cheburkin YV, et al. AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(68): 1905–1915.
- [5] Zhao Y, Sun X, Jiang L, et al. Differential Expression of Axl and Correlation with Invasion and Multidrug Resistance in Cancer Cells [J]. *Cancer Investigation*, 2012, 30(4): 287–294.
- [6] He L, Zhang JN, Jiang LL, et al. Differential expression of Axl in hepatocellular carcinoma and correlation with tumor lymphatic metastasis [J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2010, 49(10): 882–891.
- [7] Xu J, Jia L, Ma H, et al. Axl gene knockdown inhibits the metastasis properties of hepatocellular carcinoma via PI3K/Akt-PAK1 signal pathway [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(4): 3809–3817.
- [8] Kudo T, Nakagawa H, Takahashi M, et al. N-glycan alterations are associated with drug resistance in human hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2007, 6: 32–43.
- [9] Monfardini C, Canziani G, Plugariu C, et al. Structure-based design of mimetics for granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) [J]. *Curr Pharm Des*, 2002, 8(24): 2185–2199.
- [10] Saxon E, Bertozzi CR. Chemical and biological strategies for engineering cell surface glycosylation [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, 17(8): 1–23.
- [11] Taniguchi N, Miyoshi E, Gu J, et al. Decoding sugar functions by identifying target glycoproteins [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2006, 16(5): 561–566.
- [12] Granovsky M, Fata J, Pawling J, et al. Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice [J]. *Nat Med*, 2000, 6(3): 306–312.
- [13] Murata K, Miyoshi E, Kameyama M, et al. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in colorectal cancer correlates with metastasis and poor prognosis [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(5): 1772–1777.

(编辑 徐杰)

(上接第 848 页 from page 848)

- on therapy for type 2 diabetes [J]. *Chin New Drug*, 2010, 19(15): 1347–1350.
- [5] Kar S. Anthropometric, clinical, and metabolic comparisons of the four Rotterdam PCOS phenotypes: A prospective study of PCOS women [J]. *J Hum Reprod Sci*, 2013, 6(3): 194–200.
- [6] Sonntag B, Gotte M, Walfing P, et al. Metformin alters insulin signaling and viability of human granulosa cells [J]. *Fertil Steril*, 2005, 84(9): 1173–1179.
- [7] Jaime A, Davidson MD. Advances in therapy for type 2 diabetes: GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors [J]. *Cleveland Clin J Med*, 2009, 76(5): S28–S38.
- [8] Todd JF, Bloom SR. Incretins and other peptides in the treatment of diabetes [J]. *Diabet Med*, 2007, 24(3): 223–232.
- [9] Leeman L, Acharya U. The use of metformin in the management of polycystic ovary syndrome and associated anovulatory infertility: the current evidence [J]. *J Obstet Gynaecol*, 2009, 29(6): 467–472.
- [10] Moll E, vanderVeen F, vanWely M. The role of metformin in polycystic ovary syndrome: a systematic review [J]. *Hum Reprod Update*, 2007, 13(6): 527–537.
- [11] Xu W, Bi Y, Sun Z. Comparison of the effects on glycaemic control and β -cell function in newly diagnosed type 2 diabetes patients of treatment with exenatide, insulin or pioglitazone: a multicentre randomized parallel-group trial: the CONFIDENCE study [J]. *J Intern Med*, 2014 Jul 16. doi: 10.1111/joim.12293
- [12] Rice S, Christoforidis N, Gadd C, et al. Impaired insulin-dependent glucose metabolism in granulosa-lutein cells from anovulatory women with polycystic ovaries [J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(9): 373–381.

(编辑 徐杰)