

## MTA1 基因在肝癌细胞系 HepG<sub>2</sub> 及其 异质性亚系中表达的差异性

蒋璐岑<sup>1</sup>, 杜彬<sup>1</sup>, 徐华<sup>2</sup>, 周序琰<sup>1</sup>

(1. 暨南大学医学院病理教研室, 广东广州 510632; 2. 深圳市中医院, 广东深圳 518020)

**[摘要]** 目的: 探讨 *MTA1* 基因在肝癌细胞系 HepG<sub>2</sub> 及其异质性亚系中的表达水平。方法: 采用半定量 RT-PCR、荧光定量 RT-PCR 的方法检测 3 种细胞中 *MTA1* 基因的表达差异; Western blotting 检测蛋白水平的表达差异; 用细胞免疫组织化学方法观察 *MTA1* 蛋白的细胞定位。结果: HepG<sub>2</sub>-H 和 HepG<sub>2</sub> 细胞株的 mRNA 和蛋白表达水平均高于 HepG<sub>2</sub>-L 细胞株; 细胞免疫组化显示 3 株细胞的 *MTA1* 蛋白均定位于细胞核和细胞浆, 以细胞核为主。结论: *MTA1* 基因在具有不同转移潜能的肝癌细胞亚系 HepG<sub>2</sub>-H、HepG<sub>2</sub>-L 中的表达具有明显差异。

**[关键词]** 转移相关基因(*MTA1*); 肝癌; 差异性; 异质性

**[中图分类号]** R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)02-0148-04

## Variability of *MTA1* expression in hepatocellular carcinoma cell line HepG<sub>2</sub> and its heterogeneous sublines

JIANG Lu-cen<sup>1</sup>, DU Bin<sup>1</sup>, XU Hua<sup>2</sup>, ZHOU Xu-long<sup>1</sup>

(1. Department of Pathology, Medical College Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Chineses Medicine Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518020, China)

**[Abstract]** **Aim:** To investigate the expression level of metastasis associated gene-1 (*MTA1*) in hepatocellular carcinoma cell line HepG<sub>2</sub> and its heterogeneous sublines. **Methods:** The expression level of *MTA1* in vitro was examined by using semi-quantitative RT-PCR, real-time RT-PCR. The variability of *MTA1* protein expression was measured by Western blotting. The location of *MTA1* in cells was studied by immunohistochemistry. **Results:** The *MTA1* levels of mRNA and protein expressing in HepG<sub>2</sub>-H, HepG<sub>2</sub> were higher than those in HepG<sub>2</sub>-L. *MTA1* can be found in the nucleus and cytoplasm of the cells, predominantly in the nucleus. **Conclusion:** Expression of *MTA1* gene in two heterogeneous sublines that derived from HepG<sub>2</sub> with different metastatic potency shows significant differences.

**[Key words]** metastasis-associated gene 1 (*MTA1*); hepatocellular carcinoma; variability; heterogeneity

肿瘤转移相关基因 (metastasis-associated gene, *MTA*) 是近年来发现的与多种肿瘤转移密切相关的

基因家族, 包括 *MTA1*、*MTA2*、*MTA3* 等多个基因, 其中 *MTA1* 发现最早, 研究最多。大量研究表明 *MTA1*

**[收稿日期]** 2008-10-17

**[基金项目]** 广东省医学科研基金项目 (B2006084)

**[作者简介]** 蒋璐岑 (1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤病理

通讯作者: 周序琰, 男, 副教授, 硕士生导师, Tel: 020-85220252; E-mail: tzhouxl@jnu.edu.cn

是促进多种肿瘤侵袭转移的关键因素,但在肝癌转移中的作用却存在争议。HepG<sub>2</sub>-H(HepG<sub>2</sub>-high metastasis, HepG<sub>2</sub>-H)为高侵袭转移亚系, HepG<sub>2</sub>-L(HepG<sub>2</sub>-low metastasis, HepG<sub>2</sub>-L)为低侵袭转移亚系<sup>[1]</sup>。HepG<sub>2</sub>-H、HepG<sub>2</sub>-L具有相同遗传背景、不同转移能力的特点。本研究拟通过比较不同的肝癌细胞亚系 HepG<sub>2</sub>-H、HepG<sub>2</sub>-L 及其母系 HepG<sub>2</sub> 中 *MTAI* 基因 mRNA 和蛋白水平表达的差异,进一步阐明 *MTAI* 与肝癌细胞侵袭转移的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人肝癌细胞株 HepG<sub>2</sub> 购自中山大学实验动物中心, HepG<sub>2</sub>-H、HepG<sub>2</sub>-L 本室保存。Trizol 购自 invitrogen 公司; DL2000DNA marker、半定量 RT-PCR 试剂盒、实时荧光定量 RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物(Takara)公司;羊抗人 *MTAI* 抗体购自 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记的马抗羊 IgG、鼠抗人 *GAPDH* 抗体购自北京鼎国生物技术公司;BCA 法蛋白定量试剂盒购自上海申能博彩生物技术有限公司,显影定影粉购自广州威佳公司。

### 1.2 实验方法

(1)细胞培养 细胞培养在含体积分数为 10% 新生小牛血清的 RPMI-1640 培养液,于 37 ℃、体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养,质量分数为 0.25% 胰蛋白酶、质量分数为 0.02% 二乙烯四乙酸二钠(EDTA)消化传代。

(2)半定量 RT-PCR 反应 采用 Trizol 法提取 3 株细胞总 RNA,逆转录成 cDNA,以 *GAPDH* 为内参,进行半定量 RT-PCR 反应。*GAPDH* 上游引物为:5'-ACAGTCCATGCCATCACTGCC-3', *GAPDH* 下游引物为:5'-GCCTGCTTACCACCTTCTTG-3',全长 268 bp; *MTAI* 上游引物为:5'-AGCTACGAGCAGCA-CAACGGGGT-3',下游引物为:5'-CACGCTTG-GTTTCCGAGGAT-3',全长 289 bp。反应条件:94 ℃ 5 min, 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 35 个循环, 72 ℃ 5 min 延伸。PCR 产物在含溴化乙锭的体积分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

(3)实时荧光定量 RT-PCR 提取 3 株细胞总 RNA,逆转录成 cDNA,以 *GAPDH* 为内参,进行半定量 RT-PCR 反应。*GAPDH* 上游引物为:5'-ACAGTC-CATGCCATCACTGCC-3', *GAPDH* 下游引物为:5'-

GCCTGCTTACCACCTTCTTG-3',全长 268 bp; *MTAI* 上游引物为:5'-AGCTACGAGCAGCACAACGGGGT-3',下游引物为:5'-CACGCTTGTTTCCGAGGAT-3',全长 289 bp。反应体系为:SYBR Premix EX Taq 12.5 μL,上游引物 0.5 μL,下游引物 0.5 μL, 2 μL cDNA,灭菌蒸馏水 0.5 μL。反应条件为:50 ℃ 孵育 2 min, 95 ℃ 10 s, 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 20 s, 45 个循环, 95 ℃ 15 s, 59 ℃ 1 min。结果计算:ΔCT = (CT<sub>目的基因</sub> - CT<sub>内标基因</sub>) 样品 - (CT<sub>目的基因</sub> - CT<sub>内标基因</sub>) 对照,本实验选取 HepG<sub>2</sub>-L 中 *MTAI* 经 *GAPDH* 标化的相对表达量为参照。

(4)Western blotting 方法 消化后收集细胞,预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,加入 100 μL 细胞裂解液冰浴 30 min,收集上清液,采用 BCA 法进行蛋白定量。取 50 μg 蛋白按比例加入 2 × SDS 加样缓冲液,沸水浴 5 min 变性蛋白质,上样量 40 μL/孔,SDS-PAGE 电泳分离蛋白,转移至 NC 膜,质量分数为 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。加入 *MTAI* 及 *GAPDH* 抗体 4 ℃ 过夜,二抗室温孵育 1 h,化学发光显影,底片灰阶扫描后用图像分析系统测定蛋白条带的相对灰度积分值。

(5)细胞免疫组织化学 接种 3 株细胞于盖玻片上,6 孔板内培养,细胞融合度达到 80% ~ 90% 后,丙酮固定 20 min,体积分数为 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 10 min,体积分数为 10% 正常非免疫动物血清室温封闭 10 min,滴加 *MTAI* 抗体,以 PBS 代替一抗做阴性对照,4 ℃ 冰箱孵育过夜,PBS 水洗后滴加生物素标记的二抗,37 ℃ 孵育 10 min,DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片,镜下观察。

### 1.3 统计学处理

数据用统计软件 SPSS 13.0 分析,以(均数 ± 标准差)( $\bar{x} \pm s$ )表示,进行完全随机设计的单因素方差分析和 *t* 检验,  $P < 0.05$  具有统计学差异。

## 2 实验结果

### 2.1 MTAI mRNA 在 HepG<sub>2</sub>-H、HepG<sub>2</sub>-L 及 HepG<sub>2</sub> 中的表达

(1)RT-PCR RT-PCR 检测靶基因 *MTAI* 在 3 株细胞中的 mRNA 表达结果显示, *MTAI* 在 HepG<sub>2</sub>-H、HepG<sub>2</sub> 细胞株中的表达高于 HepG<sub>2</sub>-L 细胞株(图 1)。经凝胶图像分析, *MTAI* 基因在 HepG<sub>2</sub>-H、HepG<sub>2</sub>-L、HepG<sub>2</sub> 细胞株中的相对表达量为 665/458 : 524/435 : 576/425 = 1.21 : 1.00 : 1.13。

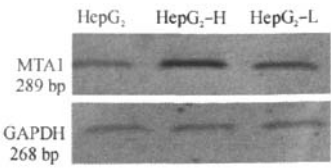


图 1 MTA1 mRNA 在 HepG<sub>2</sub>-H、HepG<sub>2</sub>、HepG<sub>2</sub>-L 细胞株中的表达

(2) 荧光定量 PCR 实时定量 RT-PCR 反应曲线, 可见 *MTA1* 的 CT 值 23~26, *GAPDH* 的 CT 值 15~18。内标 *GAPDH* 和目的基因 *MTA1* 标准曲线良好, 斜率分别为 0.290 0 和 0.290 7, 可认为二者扩增效率一致, 融解曲线可见 90℃ 处单峰, 空白无污染, 经体积分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳验证实时荧光定量 PCR 反应无非特异性产物。根据 CT 值(表 1)应用  $2^{-\Delta CT}$  法进行相对表达量的数据分析, 经两组间均数比较的 *t* 检验, HepG<sub>2</sub>-H 与 HepG<sub>2</sub>-L 比较,  $P = 0.000, < 0.05$ ; HepG<sub>2</sub>-H 与 HepG<sub>2</sub> 比较,  $P = 0.000, < 0.05$ ; 可认为 HepG<sub>2</sub>-H 与 HepG<sub>2</sub> 细胞株中 *MTA1* 基因 mRNA 表达量高于 HepG<sub>2</sub>-L 细胞株(图 2)。

表 1 HepG<sub>2</sub>-H、HepG<sub>2</sub>-L、HepG<sub>2</sub> 细胞中 GAPDH 和 MTA1 的 CT 值( $\bar{x} \pm s$ )

组别	MTA1	GAPDH
HepG <sub>2</sub> -H	25.32 ± 0.169	16.25 ± 0.092
HepG <sub>2</sub> -L	23.94 ± 0.110	14.15 ± 0.161
HepG <sub>2</sub>	26.22 ± 0.095	16.81 ± 0.040

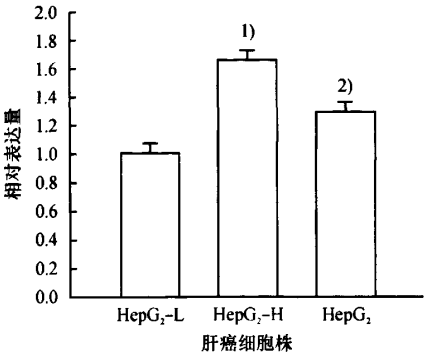
2.2 MTA1 蛋白在 HepG<sub>2</sub>-H、HepG<sub>2</sub>-L 及 HepG<sub>2</sub> 中的表达

Western blotting 检测 *MTA1* 在 3 株细胞中的表达(图 3), *MTA1* 蛋白经 GAPDH 标化后的浓度显示, 其在 HepG<sub>2</sub>-H、HepG<sub>2</sub> 中的表达高于 HepG<sub>2</sub>-L, 表达差异有显著性( $P = 0.033, P = 0.038$ )(图 4)。

2.3 HepG<sub>2</sub>-H、HepG<sub>2</sub>-L 及 HepG<sub>2</sub> 中 MTA1 蛋白的定位

细胞免疫组化结果显示, 在 HepG<sub>2</sub>-H、HepG<sub>2</sub>-L

及 HepG<sub>2</sub> 细胞株中, *MTA1* 蛋白均定位于细胞核和细胞浆, 以细胞核为主(图 5)。



- 1): HepG<sub>2</sub>-H 与 HepG<sub>2</sub>-L 比较,  $P < 0.05$ ;
- 2): HepG<sub>2</sub> 与 HepG<sub>2</sub>-L 比较,  $P < 0.05$

图 2 HepG<sub>2</sub>-H、HepG<sub>2</sub>-L、HepG<sub>2</sub> 细胞中 MTA1 基因相对表达量

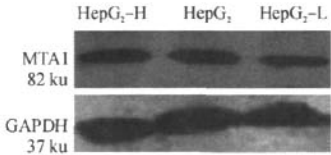
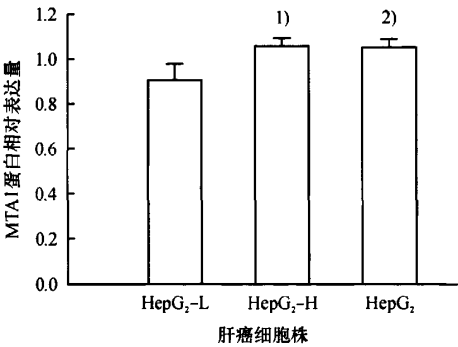


图 3 MTA1 蛋白在 HepG<sub>2</sub>-H、HepG<sub>2</sub>、HepG<sub>2</sub>-L 细胞株中的表达



- 1): HepG<sub>2</sub>-H 与 HepG<sub>2</sub>-L 比较,  $P < 0.05$ ;
- 2): HepG<sub>2</sub> 与 HepG<sub>2</sub>-L 比较,  $P < 0.05$

图 4 HepG<sub>2</sub>-L、HepG<sub>2</sub>-H、HepG<sub>2</sub> 细胞中 MTA1 蛋白相对表达量

A: HepG<sub>2</sub>-H 细胞; B: HepG<sub>2</sub> 细胞; C: HepG<sub>2</sub>-L 细胞; D: 阴性对照

图 5 MTA1 蛋白在 HepG<sub>2</sub>-H、HepG<sub>2</sub>-L、HepG<sub>2</sub> 细胞中的定位(×400 倍)

### 3 讨论

异质性 (heterogeneity) 是单克隆起源的肿瘤细胞在生长过程中形成不同表型亚克隆的特性。肿瘤异质性中基因表达的异质性最为关键,决定着细胞表型差异。本研究采用的 HepG<sub>2</sub>-H、HepG<sub>2</sub>-L 为本实验室自建,来源于同一细胞母系,但在脾脏种植成瘤性及转移表型方面均存在明显差异<sup>[1]</sup>。两株遗传背景相同的细胞,侵袭转移的表型差异必然是某些转移调控相关基因表达水平不同造成的。本研究中转移潜能较高的 HepG<sub>2</sub>-H 和 HepG<sub>2</sub> 中 *MTA1* mRNA 和蛋白表达都高于转移潜能较低的 HepG<sub>2</sub>-L,提示 *MTA1* 基因表达不一致很可能是引起这两株肝癌细胞亚系转移能力异质性的关键因素。

*MTA1* 基因是 Toh 等<sup>[2]</sup> 采用差异 cDNA 显示技术研究具有不同转移潜能的鼠乳腺癌细胞株时克隆出来的。目前已有实验证实,*MTA1* 基因表达与许多恶性肿瘤的浸润转移密切相关。但 *MTA1* 基因在肝癌中的表达与肝癌转移的关系存在不一致的报道:林川等<sup>[3]</sup> 报道 *MTA1* mRNA 表达水平在具有很强的侵袭及转移能力的子灶中显著增强,提示该基因在原发性肝癌的侵袭及转移过程中起一定作用。Moon W S 等<sup>[4]</sup> 研究得到肝癌中 *MTA1* 基因的表达可促进微血管的形成,并且与雌激素受体的  $\alpha$  的核定位负相关。然而 Hamatsu T 等<sup>[5]</sup> 提出该基因在肝癌组织中的表达与肝内、门脉、远处转移并没有相关性,而与患者存活时间呈负相关。本研究结果显示,*MTA1* 基因在 mRNA 水平和蛋白表达水平上,HepG<sub>2</sub>-H 细胞株均高于 HepG<sub>2</sub>-L 细胞株,提示 *MTA1* 基因表达水平与肿瘤细胞转移能力呈正相关,*MTA1* 可能是促进肝癌细胞转移的重要因素之一,和林川等<sup>[3]</sup>、Moon WS 等<sup>[4]</sup> 的结论一致,同时也明确了 *MTA1* 在肝癌中发挥着与在其他肿瘤中相同的促进转移的作用。

*MTA1* 是组蛋白去乙酰化复合物 NuRD 的构成部分,作为共调节因子在转录水平调控基因表

达<sup>[6]</sup>,这些调控在细胞核内完成,因此 *MTA1* 蛋白必须定位在核内发挥其功能。但也有研究表明,乳腺癌细胞浆中存在 *MTA1* 剪切变异体 *MTA1s*,并可促进 ER $\alpha$  功能<sup>[7]</sup>。本研究观察到 *MTA1* 蛋白在肝癌细胞中表达于胞核、胞浆,但以胞核为主,且在 HepG<sub>2</sub>-H 细胞株中表达较其他两株较强,其中原因尚有待进一步研究;而免疫组化结果提示 *MTA1* 通过转录调节功能的发挥来促进肝癌的转移。

综上,肝癌细胞系 HepG<sub>2</sub> 及其异质性亚系 HepG<sub>2</sub>-H、HepG<sub>2</sub>-L 细胞株在 mRNA 和蛋白水平存在明显的差异,关于 *MTA1* 调控肝癌转移的具体机制有待一步深入研究。

#### [参考文献]

- [1] 杜彬,周序琰,张海伟,等. 人肝癌 HepG<sub>2</sub> 细胞异质性亚系的建立及其行为初探[J]. 暨南大学学报:医学版,2003,24(2):19-24.
- [2] TOH Y, PENCIL S D, NICOLSON G L. A novel candidate metastasis-associated gene, *mta1*, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. cDNA cloning, expression, and protein analyses[J]. J Biol Chem, 1994, 269(37):22958-22963.
- [3] 林川,陈汉,吴孟超,等. 肿瘤转移基因 *MTA1* 的分子克隆及其在肝癌组织中表达的初步研究[J]. 中华普通外科杂志,2000,15(10):634-635.
- [4] MOON W S, CHANG K, TARNAWSKI A S. Overexpression of metastatic tumor antigen 1 in hepatocellular carcinoma: Relationship to vascular invasion and estrogen receptor- $\alpha$ [J]. Hum Pathol, 2004, 35(4):424-429.
- [5] HAMATSU T, RIKIMARU T, YAMASHITA Y, et al. The role of *MTA1* gene expression in human hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Rep, 2003,10(3):599-604.
- [6] NICOLSON G L, NAWA A, TOH Y. Tumor metastasis-associated human *MTA1* gene and its *MTA1* protein product: role in epithelial cancer cell invasion proliferation and nuclear regulation[J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20(1):19-24.
- [7] KUMAR R, WANG R A. A naturally occurring *MTA1* variant sequesters oestrogen receptor- $\alpha$  in the cytoplasm[J]. Nature, 2002, 418(6898):654-657.

[责任编辑:朱颖娜]