论著·基础研究

DcR3 表达在肝癌细胞凋亡和增殖中的作用研究*

彭　亮,赵静静,娄晓丽,侯彦强△

(南京医科大学上海松江临床医学院,上海 201600)

摘　要:目的　通过体外试验探讨诱骗受体 3(DcR3) 对肝癌细胞凋亡和增殖的影响。**方法**　构建 DcR3 慢病毒载体和慢病毒非特异性载体,转染 HepG2 细胞株后,用荧光显微镜观察绿色荧光蛋白(GFP) 判断转染效率。采用蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 DcR3 蛋白表达水平;并绘制生长曲线检测细胞增殖情况;采用荧光定量 PCR (qPCR) 方法检测细胞凋亡指标半胱天冬酶-3 (caspase 3)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax) 转录水平变化。**结果**　检测 3 株肝癌细胞 HepG2、MHCC-LM3 和 MHCC-97H 的 DcR3 蛋白表达水平,发现细胞株 HepG2 较 MHCC-LM3、MHCC-97H 中的 DcR3 蛋白表达水平明显低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。上调 HepG2 细胞株的 DcR3 的 mRNA 水平后,细胞凋亡指标 caspase 3 和 Bax 转录水平明显下降,抗凋亡基因 Bcl-2 转录水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。当培养到第 4 天时,LV-DcR3 组增殖速度[(39.45±3.61)]与 LV-NC 组[(25.98±5.34)]比较,差异具有统计学意义($P=0.022$);当培养到第 6 天时,LV-DcR3 组增殖速度[(65.84±6.16)]较 LV-NC 组[(33.34±4.55)],差异有统计学意义($P=0.002$)。**结论**　DcR3 具有促进肝癌细胞增殖和抗凋亡作用,其机制可能与上调抗癌基因 Bcl-2 的表达有关。

关键词:肝癌;　诱骗受体 3;　凋亡;　增殖

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.19.001　　**中图法分类号:**R735.7

文章编号:1673-4130(2019)19-2305-04　　**文献标识码:**A

Study of the value of DcR3 expression in the proliferation and anti-apoptosis of hepatoma cells*

PENG Liang, ZHAO Jingjing, LOU Xiaoli, HOU Yanqiang△

(*Shanghai Songjiang Clinical Medicine of Nanjing Medical University, Shanghai* 201600, *China*)

Abstract: Objective　To analyze the value of decoy receptor 3(DcR3) expression in the proliferation and anti-apoptosis of hepatoma cells by vitro testing. **Methods**　The DcR3 recombinant lentivirus vectors and DcR3 lentiviral non-specific vector were synthesized and transfected to HepG2 cells. The GFP green fluorescent protein were observed by fluorescence microscopy to determine the transfection efficiency. The DcR3 protein levels were analyzed by Western blot. The growth inhibition was examined by the draw growth curve, and qPCR assay was used to detect the changes of transcription levels of caspase 3, Bax and bcl-2. **Results**　The expression levels of DcR3 in HepG2, MHCC-LM3 and MHCC-97H were detected. The expression of DcR3 in HepG2 cells was significantly lower than that in liver cancer cell line MHCC-LM3 and MHCC-97H, and which had significant difference ($P<0.05$). After up-regulating the DcR3 of HepG2 cell line. Compared with LV-DcR3 group, the transcriptional levels of caspase 3 and Bax in LV-DcR3 group were down-regulated significantly, whereas the expression level of Bcl-2 was up-regulated significantly, the difference was statistically significant ($P<0.05$). When cultured to the 4th day, the proliferation rate of LV-DcR3 group [(39.45±3.61)] was significantly different from that of LV-NC group [(25.98±5.34)], the difference was statistically significant ($P=0.022$). When cultured to the 6th day, the proliferation rate of LV-DcR3 group [(65.84±6.16)] was significantly different from that of the LV-NC group [(33.34±4.55)], the difference was statistically significant ($P=0.002$). **Conclusion**　DcR3 promotes the proliferation and anti-apoptosis of liver cancer cells through up-regulation of the expression of the anti-oncogene Bcl-2.

---

* **基金项目:**上海市卫生和计划生育委员会面上项目(201540119)。

作者简介:彭亮,男,副主任技师,主要从事临床免疫学检验与肿瘤的研究。　△　**通信作者**,E-mail:jykmianyi@163.com。

本文引用格式:彭亮,赵静静,娄晓丽,等. DcR3 表达在肝癌细胞凋亡和增殖中的作用研究[J]. 国际检验医学杂志,2019,40(19):2305-2308.

Key words:hepatoma;　decoy receptor 3;　apoptosis;　proliferation

肝癌是世界上最常见的内脏肿瘤之一,在全世界所有肿瘤病死率中居于第 3 位,其发生的分子机制主要包括癌基因和抑癌基因的突变、生长因子的失控表达、HBV/HCV 病毒蛋白对肿瘤信号通路的激活和调控等[1]。诱骗受体 3(DcR3)是肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族的新成员,能够竞争性结合死亡配体 FasL、LIGHT 和 TL1A,阻断相关信号转导通路,调节细胞增殖,抑制细胞凋亡[2]。有研究发现,肝癌组织中 DcR3 的表达远远大于其癌旁组织和健康组织,提示 DcR3 可能作为癌基因在肝癌的发生、发展中起重要作用[3]。本研究通过体外试验探讨 DcR3 对肝癌凋亡和增殖的影响,为肝癌细胞分子治疗靶点的筛选和预后判断提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　仪器与试剂　人肝癌细胞株 HepG2、MHCC-LM3 和 MHCCC-97H 均购自北京中科质检生物技术有限公司;DMEM 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶均购自美国 Hyclone 公司;目的质粒(LV-DcR3)和空载质粒(LV-MCS-3FLAG-SV40-EGFP-IRES)均购自上海吉凯基因化学技术有限公司;鼠抗 DcR3 单克隆抗体(美国 Abcam 公司),鼠抗 GADPH 单克隆抗体(武汉艾美捷科技有限公司,中国)辣根过氧化物酶 HRP 标记亲和纯化山羊抗小鼠 IgG 二抗(美国 sigma 公司);逆转录试剂盒,荧光定量 PCR(qPCR) 试剂盒均购自日本 Takara 公司,PCR 引物序列(上海生工生物工程有限公司,中国),DcR3 引物序列:上游引物为 5′-CCA CTA CAC GCA GTT CTG GA-3′,下游引物为 5′-GTG CTC CAA GCA GAA ACC AG-3′,β-actin 引物序列:上游引物为 5′-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3′,下游引物为 5′-GGG CCG GAC TCG TCA TAC-3′。β-actin 作为内源对照,结果以相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　人肝癌细胞株 HepG2、MHCC-LM3 和 MHCCC-97H 均用含有 10% 胎牛血清及青链霉素双抗(均为 100 U/mL)的 DMEM 培养,常规培养于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,取对数期细胞,按照每孔 3×10^5 个细胞接种于 6 孔板中,等到细胞密度大于 80%时分别进行感染目的质粒(LV-DcR3)和空载质粒(LV-MCS-3FLAG-SV40-EGFP-IRES),感染前弃去培养基,更换新鲜培养基,根据上海吉凯基因化学技术有限公司病毒滴度测定结果按 MIO 50 TU/mL 加入病毒上清,37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 12 h 后更换培养基,72 h 后观察感染效率。通过荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(GFP)判断转染效率。继续进行下一步处理,分别收集 LV-NC 组和 LV-DcR3 组细胞进行 qPCR、蛋白质免疫印迹(Western blot)、细胞生长曲线的检测。

1.2.2　绘制细胞生长曲线　取对数期细胞,于 6 孔板接种 2.5×10^4 个细胞/孔,常规培养,时间点设置为 0、2、4、6 d,弃上清,1×磷酸缓冲盐溶液(PBS)清洗 2 次,10%福尔马林室温固定 20 min,水洗 1 次,0.1% 结晶紫(溶解在 10%乙醇中)室温染色至少 30 min,流水清洗细胞外染液,完全晾干,10%乙酸溶解,分光光度计吸光度$(A)_{590}$ 读取 A 值。以横坐标为时间(h),纵坐标为 A,绘制细胞增殖曲线。实验重复 3 次。

1.2.3　Western blot 检测 DcR3 蛋白　采用细胞裂解液(RIPA)裂解细胞,BCA 蛋白定量试剂盒定量后,加入 5×上样缓冲液(loading buffer)混匀,于 100 ℃变性 10 min 进行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,湿转 100 min,转移至 PVDF 膜上,5% 的脱脂奶粉封闭液封闭 2 h,一抗按比例加入,4 ℃孵育过夜,磷酸盐缓冲液(PBST) 漂洗 3 次,每次 10 min。加入二抗,室温孵育 1 h,PBST 漂洗 3 次,每次 5 min,结果用化学发光试剂盒检测,曝光、显影、定影、观察结果,在相同的印迹上针对 ACTB 信号标准化成像条带的光密度,用凝胶成像仪对免疫印迹条带灰度值并进行分析。

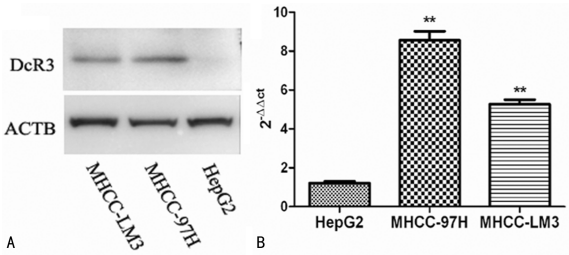
1.2.4　mRNA 表达水平检测　(1)细胞总 RNA 的提取:采用 Trizol 法提取总 RNA,采用逆转录试剂盒将总 RNA 的 1 μg mRNA 反转录成 cDNA,反转录的条件为 42 ℃ 60 min,70 ℃ 5 min。(2)qPCR:PCR 反应体系为 20 μL,每个孔设置 3 个复空,反应条件为预变性 95 ℃ 2 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 34 s,40 个循环。以 β-actin 作为内参,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 mRNA 的相对定量,$\Delta Ct = Ct_{靶基因} - Ct_{内参基因}$,$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{实验组} - \Delta Ct_{对照组}$。

1.3　统计学处理　采用 SPSS20.0 软件处理数据,符合正态分布的两组之间的比较采用独立样本 t 检验,实验结果采用 $\bar{x}\pm s$,否则采用非参数检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　不同肝癌细胞株 DcR3 蛋白及 mRNA 的表达　采用 Western blot 检测 3 株肝癌细胞 HepG2、MHCC-LM3 和 MHCC-97H 的 DcR3 蛋白表达水平,发现 MHCC-LM3[(0.258±0.058)]、MHCC-97H[(0.660±0.055)]较 HepG2[(0.028±0.009)]细胞中的 DcR3 蛋白表达水平明显升高,差异具有统计学意义($P<$

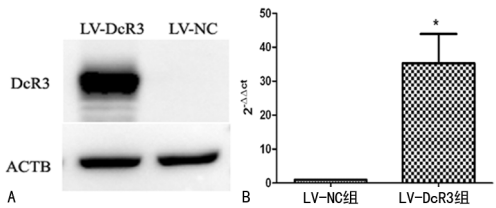
0.05)。在转录水平,发现 HepG2 mRNA 表达水平[(1.21±0.09)]较 MHCC-97H[(8.56±0.46)]和 MHCC-LM3[(5.27±0.23)]均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。因此,本研究选取了肝癌细胞株 HepG2,见图 1。



注:A 表示不同肝癌细胞株 DcR3 蛋白表达水平比较;B 表示 HepG2、MHCC-LM3 和 MHCC-97H mRNA 表达水平比较;** $P<0.05$,与 HepG2 mRNA 表达水平比较

图 1　3 株肝癌细胞 HepG2、MHCC-LM3 和 MHCC-97H 的 DcR3 蛋白和 mRNA 表达水平

2.2　LV-DcR3 组、LV-NC 组肝癌细胞 HepG2 内 DcR3 mRNA 及蛋白的表达　DcR3 过表达慢病毒 LV-DcR3 感染 HepG2 后,LV-DcR3 组蛋白表达水平[(2.44±0.43)]高于 LV-NC 组[(0.31±0.23)]。同时,在转录水平,LV-DcR3 组 mRNA 表达水平[(35.276±8.627)]均明显高于 LV-NC 组[(0.973±0.014)],差异具有统计学意义($P<0.05$),提示过表达质粒转染效果良好,见图 2。



注:A 表示 DcR3 过表达慢病毒 LV-DcR3 感染 HepG2 后 DcR3 蛋白表达水平比较;B 表示两组 mRNA 表达水平比较;* $P<0.05$,与 LV-NC 组比较

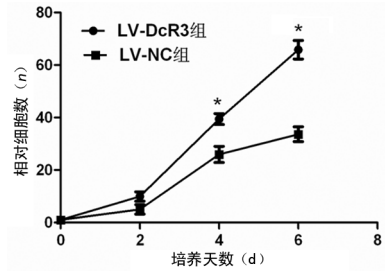
图 2　DcR3 过表达慢病毒 LV-DcR3 感染 HepG2 后 DcR3 蛋白和 mRNA 表达水平

2.3　DcR3 表达对肝癌细胞 HepG2 凋亡的影响　细胞凋亡指标半胱天冬酶-3(caspase3)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的 mRNA 水平的结果显示,LV-DcR3 组凋亡基因 caspase3 和 Bax 转录水平较 LV-NC 组均明显下降,抗凋亡基因 Bcl-2 转录水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

2.4　DcR3 表达对肝癌细胞 HepG2 增殖的影响　绘制生长曲线:当培养第 2 天时,LV-DcR3 组增殖速度[(9.95±3.06)]与 LV-NC 组[(5.06±3.11)]比较,差异无统计学意义($P=0.124$);当培养到第 4 天时,LV-DcR3 组增殖速度[(39.45±3.61)]与 LV-NC 组[(25.98±5.34)]比较,差异具有统计学意义($P=0.022$);当培养到第 6 天时,LV-DcR3 组增殖速度[(65.84±6.16)]与 LV-NC 组[(33.34±4.55)]比较,差异有统计学意义($P=0.002$),见图 3。

表 1　上调 DcR3 表达后凋亡指标转录水平($\bar{x}\pm s$)

指标	LV-DcR3 组	LV-NC 组	P
caspase 3	0.458±0.245	0.986±0.065	<0.001
Bax	0.396±0.211	0.987±0.09	0.003
Bcl-2	2.136±0.706	0.936±0.051	0.019



注:* $P<0.05$,与 LV-NC 组比较

图 3　HepG2 细胞株增殖曲线

3　讨　论

肝癌是高度恶性的肿瘤,目前手术切除是首选的治疗方式,但因为肝癌的早期诊断率很低,大部分患者就诊时已处于疾病晚期,70%的肝癌患者往往在初次就诊时,就已经错过了最佳治疗时机[4]。因此,只有通过对于癌症的发生及其发展机制的不断深入研究,才能取得更有效的预防和治疗方法。大量研究证实,DcR3 在肿瘤的发生、发展中起重要作用,DcR3 基因作为 TNFR 超家族成员之一,与 TNFR 具有高度同源性,能够通过与 Fas 等介导细胞凋亡的蛋白分子配体相结合,阻断后者介导的细胞凋亡过程[5];另外,DcR3 基因能够通过多种途径阻断 T 细胞、自然杀伤细胞诱导的肿瘤细胞凋亡,从而促进恶性肿瘤的免疫逃逸[6],在肺癌、胰腺癌、肝癌、胃癌等多种恶性肿瘤的发生与发展中扮演重要角色[7-9]。

为了探讨过表达 DcR3 对 HepG2 细胞 DcR3 蛋白表达、增殖和凋亡的影响,研究者构建了 DcR3 慢病毒载体,转染 DcR3 表达水平较低的 HepG2 细胞后,验证转染效率,上调 DcR3 的表达后可促进肝癌细胞株 HepG2 增殖和抗凋亡能力。

细胞凋亡是一种受基因调控的细胞程序性死亡方式,而异常的细胞凋亡往往会引起机体异常:凋亡不足会引发癌症[10]。Bcl-2 基因是一种癌基因,它具有抑制凋亡的作用,大多数多细胞生物的自我调节性死亡均经过一个保守的程序性过程,几乎均由 Bcl-2 调控及实施的[11]。本研究通过上调 HepG2 肝癌细胞株的 DcR3 后,发现抗凋亡基因 Bcl-2 转录水平升高,

而研究发现 caspase-3 在细胞凋亡中起着不可替代的作用,活化的 caspase-3 可引起细胞凋亡,但这个过程可以被 Bcl-2 阻断[12]。本研究发现 caspase-3 转录水平明显下降,可能的机制为 Bcl-2 系统能够稳定线粒体膜,防止 caspase3/细胞色素 C 等分子渗出而导致的细胞凋亡[13],说明 DcR3 在肝癌的凋亡过程中起着重要作用,原因可能是 Bcl-2 参与了此过程,但具体机制仍需进一步探讨。

细胞生长曲线结果显示 DcR3 具有促进肝癌细胞的增殖作用。陶振洲等[14]通过下调 DcR3 表达发现可以明显降低肝癌细胞系 HepG2 细胞的增殖能力,与本研究结果一致,进一步证实了 DcR3 能够促进肝癌细胞的增殖。研究发现 DcR3 能够中和 TLlA 诱导的抗血管生成,而新生血管是肿瘤侵袭和转移的关键步骤[15]。GE 等[16]研究发现 DcR3 通过 P13K/AKT/GSK-3β/β-catenin 信号通路促进胃癌细胞增殖、侵袭、转移和上皮间质转化,提示 DcR3 与肿瘤增殖、侵袭与转移的相关性。

4 结　　论

本研究通过体外试验探讨了 DcR3 对肝癌细胞凋亡和增殖的影响,发现 DcR3 具有促进肝癌细胞的增殖和抗凋亡作用,其机制可能是通过上调抗凋亡基因 Bcl-2 发挥作用的。其如何进行调控的仍需进一步研究,为肝癌细胞分子治疗靶点的筛选和预后判断提供理论基础,具有重要的理论和临床价值。

参考文献

[1] ALEJANDRO F, JOSEP M, JORDI B. Hepatocellular cacinoma[J]. Lancet,2012,379(1):1245-1255.

[2] HUNG S C,HSU T W,LIN Y P,et al. Decoy receptor 3, a novel inflammatory maker,and mortality in hemodialysis patients[J]. Clin J Am Soc Nephrol,2012,7(8):1257-1265.

[3] CHEN G,LUO D. Expression of decoy receptor 3 in liver tissue microarrays[J]. Natl Med J India,2008,21(6):275-278.

[4] HASHEM B,KANWAL F. α-Fetoprotein in hepatocellular carcinoma surveillance:mend it but do not end it[J]. Clin Gastroenterol Hepatol,2013,11(1):441-443.

[5] ARAI M, YOSHIOKA, NISHIMURA R, et al. FAS/FASL-mediated cell death in the bovine endometrium[J]. Anim Reprod Sci,2014,151(3/4):97-104.

[6] 阳俊,胡克,羊文芳. 不同方式肺癌抗原负载的树突状细胞在抗肿瘤免疫中的作用[J]. 解放军医药杂志,2015,27(7):48-52.

[7] ZHANG H,CHEN X,LI D,et al. DcR3 promotes hepatoma cell migration by down-regulating E-cadherin expression[J]. Oncol Rep,2017,38(1):377-383.

[8] EDFELDT K, DASKALAKIS K, BACKLIN C, et al. DcR3,TFF3,and mid-kine are novel serum biomarkers in small intestinal neuroendocfine tumors[J]. Neuro,2017,105(2):170-181.

[9] ZHOU J,SONG S,LI D,et al. Decoy receptor 3 (DcR3) overexpression predicts the prognosis and pN2 in pacreatic head arcinoma[J]. World J Surg Oncol,2014,12(1):52-58.

[10] BLEICKEN S,CLASSEN M,PADMAVATHI V L,et al Molecular details of Bax activation,oligomerization,and membrane insertion[J]. J Bio Chem,2010,285(9):6636-6647.

[11] STRASSER A,VAUX D L. Viewing BCL2 and cell death control from an evolutionary perspective[J]. Cell Death Differ,2018,25(1):13-20.

[12] 梁豪,熊志勇,姚志成,等. BDH2 基因对肝癌细胞增殖能力的抑制作用及机制[J]. 中华肝脏外科手术学电子杂志,2018,7(4):327-331.

[13] COOK S J,STUART K,GILLEY R,et al. Control of cell death and mittochondrial fission by ERK1/2 MAP kinase signalling[J]. FEBS J,2017,284(24):4177-4195.

[14] 陶振洲,伍冀湘,梁杰雄,等. 下调诱骗受体 3 对肝癌细胞系 HepG2 细胞生物学性状的影响[J]. 中国医药,2017,12(3):438-441.

[15] SIAKAVELLAS S I. Tumor necrosis factor-like cytokine TL1A and its receptors DR3 and DcR3:important new factors in mucosal homeostasis and onflammation[J]. Inflam Bowel Dis,2015,21(10):2441-2452.

[16] GE H,LIANG C,LI Z,et al. DcR3 induces proliferation,migration,invasion,and EMT in gastric cancer cells via the PI3K/AKT/GSK-β/β-catenin signaling pathway[J]. Onco Targets Ther,2018,11(1):4177-4187.

(收稿日期:2019-03-01　修回日期:2019-07-12)