

热休克蛋白 27 在转移潜能 不同人肝癌细胞系中的表达及机制研究*

郭 坤¹⁾ 刘银坤^{1,2)**} 周海君^{1,2)} 代 智^{1,2)}
陈 洁¹⁾ 孙瑞霞¹⁾ 孙强玲¹⁾ 卢雯静¹⁾ 康晓楠^{1,2)}

¹⁾复旦大学附属中山医院肝癌研究所, 上海 200032;

²⁾复旦大学生命医学科学院癌症研究中心, 上海 200032)

摘要 利用不同转移潜能肝癌细胞系探讨热休克蛋白 27(HSP27)参与肝癌细胞转移潜能形成的可能分子机制。细胞免疫荧光技术、RT-PCR 和免疫印迹技术显示, HSP27 在转移潜能不同的肝癌细胞 Hep3B、MHCC97L 和 MHCC97H 中定位于细胞浆, 亦可见于细胞核, HSP27 mRNA 和蛋白质的表达水平与肝癌细胞转移潜能呈正相关。高转移潜能肝癌细胞系 MHCC97H 的 HSP27 RNA 干扰试验结果显示, HSP27 RNA 干扰后 MHCC97H 的侵袭 (MHCC97H 组: 21.36 ± 2.92 ; 对照 RNAi 组: 19.88 ± 2.23 ; RNAi 组: 11.40 ± 2.05)、运动能力 (MHCC97H 组: 26.35 ± 3.29 ; 对照 RNAi 组: 24.43 ± 3.17 ; RNAi 组: 10.92 ± 2.27) 明显减弱, 细胞凋亡显著增加 (MHCC97H 组: 15.12% ; 对照 RNAi 组: 17.56% ; RNAi 组: 27.64%)。同时进行信号转导基因芯片检测发现, HSP27 干扰后核因子 κB (NF- κB) 通路抑制, 并且免疫印迹显示细胞核内活化的 NF- κB p65 减少, 细胞内磷酸化 I $\kappa B\alpha$ 降低。另外, 免疫共沉淀检测发现, 在肝癌细胞内 HSP27 可与 IKK β 、I $\kappa B\alpha$ 共沉淀, 且在 HSP27 RNA 干扰后 IKK β 与 IKK α 结合能力下降。这些结果提示, HSP27 可能通过参与细胞内 NF- κB 通路的激活, 影响细胞凋亡和细胞运动, 在肝癌细胞侵袭转移过程中发挥作用。

关键词 肝细胞性肝癌细胞, 热休克蛋白 27, 信号转导, 核因子 κB (NF- κB), 肿瘤转移, 凋亡, RNA 干扰
学科分类号 R735.7

转移是肿瘤最重要的恶性表型之一, 是多分子参与高度复杂有序的过程。越来越多的证据显示细胞凋亡与肿瘤转移存在相关性^[1]。热休克蛋白 27 (HSP27) 作为小热休克蛋白亚家族中的重要一员, 近年来与肿瘤的关系日益受到重视, 它通过对细胞的增殖、分化及细胞凋亡的信号转导调节参与了一些肿瘤的发生及侵袭转移过程^[2]。我们的前期研究也提示, 高表达的 HSP27 参与了人肝细胞肝癌的转移过程, 但具体机制仍不十分清楚^[3]。本文利用转移潜能不同的肝癌细胞系, 探讨了 HSP27 与肝癌细胞转移潜能形成的关系。

1 材料与方法

1.1 试剂

RPMI1640 和高糖 DMEM 培养液购自 Gibco 公司; RT-PCR 试剂盒 (Formants 公司产品); HSP27 RNAi 试剂盒 (Cell Signal 公司); 转染试剂

Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司); 凋亡检测试剂盒 (TUNEL 法) (Roche 公司); Matrigel 为 B. D. 生物科学公司产品; Transwell 小室 (Corning Costar 公司产品); 鼠抗人 HSP27 单克隆抗体 (StressGen 公司); IKK β 、IKK α 、I $\kappa B\alpha$ 及磷酸化 I $\kappa B\alpha$ (pI $\kappa B\alpha$) 兔多克隆抗体 (Cell Signal 公司); HRP 标记山羊抗兔、山羊抗小鼠 IgG 抗体及 cy3 标记的山羊抗小鼠荧光 IgG 抗体 (Santa cruz 公司); 活化的 NF- κB p65 抗体 (上海康成公司)。

1.2 细胞培养

非转移性人肝癌细胞系 Hep3B 为美国康奈尔大学惠赠; 转移性人肝癌细胞系 MHCC97L (低转

*国家重点基础研究发展计划 (973) (2004CB520802), 国家自然科学基金 (3017416) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 021-64041990-2501, E-mail: ykliu@zshospital.com

收稿日期: 2006-12-14, 接受日期: 2007-02-28

移)、MHCC97H(高转移)为本研究所建系保存^[4]。Hep3B 与 MHCC97L、MHCC97H 分别在含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液和高糖 DMEM 培养液进行传代培养。生长 48~72 h 后至 80%左右融合度,胰酶消化,细胞计数,用 PBS 漂洗 2 次,离心收集细胞于 1.5 ml 离心管, -70℃冻存备用。

1.3 细胞免疫荧光试验

取人肝癌细胞 Hep3B、MHCC97L 与 MHCC97H,制成浓度为 1×10^6 /ml 细胞悬液,滴加于载玻片上过夜,自然干燥,4%多聚甲醛固定,1% Triton X-100 处理,封闭后,加入小鼠抗人 HSP27 单克隆抗体(1:200),37℃保温 60 min, PBS 充分漂洗后加入 Cy3 标记的山羊抗小鼠二抗(1:200),37℃保温 30 min, PBS 充分漂洗后,甘油封片,荧光显微镜观察。

1.4 RNA 干扰试验

胰酶消化高转移性肝癌细胞系 MHCC97H 细胞,计数,用含 10%胎牛血清新鲜的 DMEM 稀释,铺入无菌 6 孔培养板中, 2.0×10^5 个/孔,培养至细胞融合度达 80%左右。第 2 天弃去细胞培养旧液,换以新鲜的含血清的 DMEM 培养液,1.5 ml/孔。取两个消毒无 RNA 酶的离心管,分别平行配制含 4 μ l Lipofectamine 2000 的无血清 DMEM 稀释液 250 μ l 和含 6 μ l siRNA 的无血清 DMEM 稀释液 250 μ l,轻轻混匀,室温静置 5 min。将 2 管液体充分混匀,室温静置 20 min,以形成 RNA-Lipofectamine 2000 复合物。然后置于 6 孔培养板中摇匀,37℃,5% CO₂ 细胞培养箱中孵育。siRNA 的终浓度为 100 nmol/L。转染 48 h 后提取细胞总 RNA 及总蛋白(RNAi 组)。HSP27 siRNA 序列: 5' ACGGUCAAGACCAAGGAUGdTdT 3' (sense); 5' CAUCCUUGGUC UUGACCGUdTdT 3' (antisense)。同时设转染非干扰 siRNA 作阴性对照组(Control RNAi 组)及未经任何处理的 MHCC97H 细胞作干扰效果对照(MHCC97H 组)。

1.5 信号转导通路发现者基因芯片的研究

取 MHCC97H、Control RNAi 组和 RNAi 组细胞各 1×10^6 , Trizol(Invitrogen 公司)法抽提总 RNA,由上海康成芯片公司进行人类信号转导通路发现者基因芯片的检测,实验重复 3 次。判断基因差异表达的筛选标准:组间的基因信号灰度比值 < 0.5 (下调大于 50%)。

1.6 RT-PCR

逆转录过程按产品说明书进行。逆转录的

cDNA 于 -20℃贮存备用。建立最适的 PCR 反应体系, Mg²⁺ 浓度为 1.5 mmol/L, 扩增程序: 95℃ 5 min; 95℃, 30 s; 57℃ 30 s, 72℃ 40 s 扩增 25 循环,最后 72℃,保温 8 min。HSP27 引物序列: 5' CCAGAGCAGAGTCAGCCAGCAT 3' (sense); 5' CGAAGGTGACTGGGATGGTGA 3' (anti-sense)。内参 GAPDH 引物序列: 5' CCATGTTTCGTCATGGTGTGAACCA 3' (sense); 5' GCCAGTAGAGGCAGGGATGATGTTC 3' (anti-sense)。

1.7 免疫印迹

用蛋白质提取试剂盒(Active Motif, 美国),提取细胞总蛋白及核蛋白,以 Bradford 法进行蛋白质定量。调整样品蛋白质浓度使每个样品孔保证蛋白质上样量一致,并加标准分子质量蛋白作为分子质量对照。12% SDS-PAGE 后,置于 Trans-Blot SD 半干电转仪,1 h。转移结束后,用含 5%脱脂奶粉(或 5% BSA)和 0.05% Tween-20 的 TBST 室温下封闭 1 h。用封闭液稀释的鼠抗人 HSP27 单克隆抗体(1:1 000)、活化的 NF- κ B p65 (1:2 000)、兔多抗 IKK β (1:1 000)、IKK α (1:1 000)、I κ B α (1:1 000)及磷酸化 I κ B α (1:1 000)与 PVDF 膜杂交,4℃过夜。加入 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体(1:5 000)或羊抗兔 IgG 抗体(1:5 000),室温反应 1 h。ECL 化学发光,于暗室压 X 光底片曝光,显影、定影,水洗胶片晾干后保存。

1.8 细胞凋亡检测 (TUNEL 法)

细胞爬片晾干后,加入适量新鲜配制的固定液(4%多聚甲醛 pH 7.4),室温放置 60 min; PBS 液充分洗涤后加入适量用新鲜 0.1%醋酸钠配制的 0.1% Trixon X-100,冰上放置 2 min,其间按 1:9 (酶溶液:标记溶液)的比例配制 TUNEL 反应混合液;玻片用 PBS 液洗涤后将细胞爬片周围的水分擦干,每个样本加入 50 μ l TUNEL 反应混合液,于湿盒 37℃孵育 60 min; PBS 液洗涤、DAPI 复染后将细胞爬片覆盖适量 PBS 液后于荧光显微镜下观察结果。同时以标记溶液代替 TUNEL 反应混合液作为阴性对照。

1.9 体外 Matrigel 侵袭、运动实验

用 35 μ g Matrigel 铺在 transwell 上室制备人工基底膜。转染 HSP27 siRNA 的 MHCC97H 细胞,用无血清 DMEM 稀释成 1×10^6 /ml 细胞悬液,100 μ l 细胞悬液加入 transwell 上室,下室加入 600 μ l 条件培养基,5% CO₂ 培养箱培养 24 h。取出 transwell 小室,吸弃上室液体,用棉签擦净基底膜胶, PBS

漂洗后 4%多聚甲醛固定 15 min, Giemsa 染色 30 min. 镜下计数. 运动试验省略铺胶步骤, 余同侵袭实验.

1.10 免疫共沉淀

siRNA 转染 48 h 后, 用 0.5 ml 裂解液 (20 mmol/L Tris pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mmol/L 焦磷酸钠, 1 mmol/L β -磷酸甘油, 1 mmol/L PMSF, 1 mg/L Leupeptin) 裂解 10^6 细胞, 4°C 、12 000 g 离心 30 min, 取上清. 免疫共沉淀时首先加入 20 μl 的 G 蛋白琼脂糖, 4°C 缓慢振荡 3 h, 12 000 g 离心 20 s, 转移上清液至一新离心管, 加适量一抗, 1 h 后再加入 25 μl 混合均匀的 G 蛋白琼脂糖, 继续振荡 4 h, 12 000 g 离心 20 s, 去上清, 用裂解液洗涤沉淀 3 次, 弃去裂解液, 加入 30 μl 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 冰浴冷却, 取 15 μl 进行 SDS-PAGE. 电泳后, 将蛋白质转印到 PVDF 膜上进行免疫印迹检测.

2 结 果

2.1 HSP27 在不同转移潜能肝癌细胞系中的表达

HSP27 在人肝癌细胞系 Hep3B、MHCC97L、MHCC97H 中主要表达于细胞浆内, 也可见细胞核内有阳性颗粒沉积 (图 1a); 图 1d, 1e 所示为 HSP27 在 Hep3B、MHCC 97L、MHCC97H 3 种肝癌细胞系中 mRNA 的表达情况. 用软件分析获得 RT-PCR 扩增的 HSP27 片段和 GAPDH 片段的条带吸光度值, 以 GAPDH 吸光度值为内参对照, HSP27 mRNA 的相对表达量依次为: 0.25, 0.41, 0.45, 转移潜能最强的 MHCC97H 表达最高, MHCC97L 其次, 均比无转移潜能的细胞系 Hep3B 显著增加. 蛋白质印迹显示, HSP27 蛋白在 3 种肝癌细胞系中均呈高表达, 表达水平高低与 mRNA 水平趋于一致, 转移潜能最强的 MHCC97H 表达最高 (图 1b, 1c). 说明 HSP27 表达水平与肝癌细胞转移潜能呈正相关.

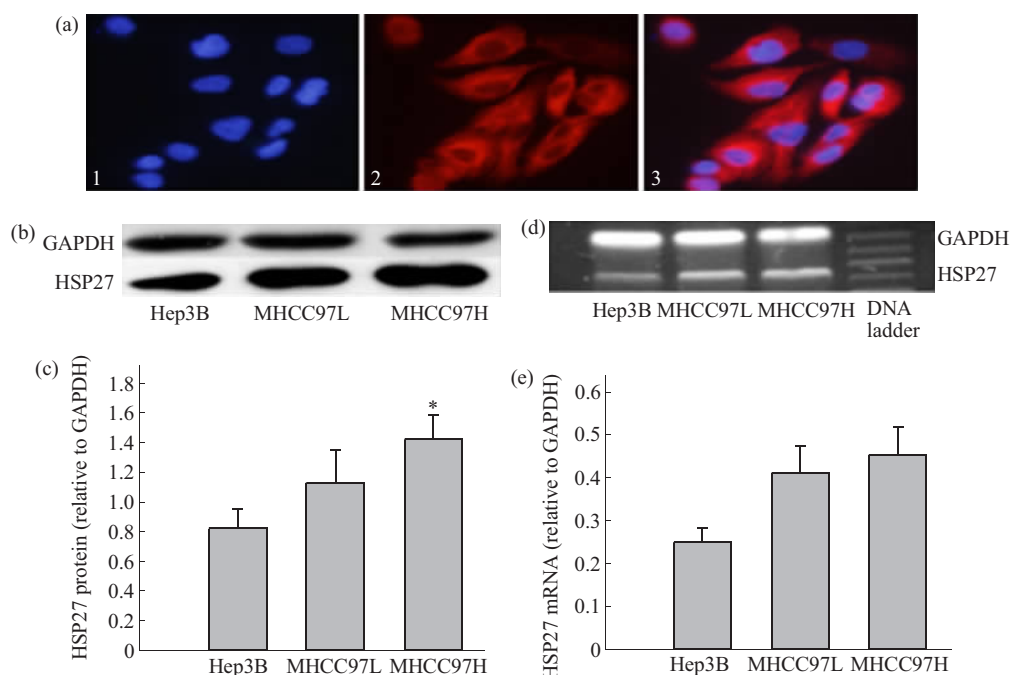


Fig. 1 Expression of HSP27 increased consistently according to cell metastatic potentials

(a) Cytoplasmic staining of HSP27 in MHCC97H (as that of Hep3B and MHCC97L, so the latter not shown) was predominant, occasionally in nuclei (400 $\times$). 1, Immuno-fluorescent nuclear staining for DAPI; 2, Cy3-immuno-fluorescent image of HSP27; 3, Merged image of 1 and 2. (b) HSP27 expression was analyzed by Western blotting in Hep3B, MHCC97L and MHCC97H cell lines, GAPDH protein (36 ku) as a loading control. (c) The Results presented were means of triplicates ($\bar{x} \pm s$). (d) PCR products of HSP27 from three cell lines were analyzed by electrophoresis through 2% agarose gels after 25 cycles, GAPDH (251 bp) as internal control. (e) The results presented were means of triplicates ($\bar{x} \pm s$).

2.2 HSP27 的抑制降低了人肝癌细胞的侵袭、迁移能力

选择 HSP27 mRNA 表达最高的 MHCC97H 细胞进行 HSP27 RNA 干扰试验, 转染 HSP27 siRNA 48 h 后提取总 RNA, 用 RT-PCR 检测 HSP27 基因的表达抑制情况, 3 个平行试验组 (RNAi 组、Control RNAi 组、MHCC97H 组) 的 HSP27 条带的吸光度值相对于 GAPDH 条带分别为: RNAi 组, 0.12; Control RNAi 组, 0.88; MHCC97H 组, 0.93 (图 2a, b). RNA 干扰明显下调了 HSP27

mRNA 水平. 用蛋白质印迹检测 3 个平行试验组的 HSP27 蛋白水平(图 2c, d), 发现 RNA 干扰后 HSP27 蛋白表达水平也明显受到抑制, 下调率达 80%以上. 体外侵袭实验结果显示, HSP27 RNAi 组穿过人工基底膜的细胞为(10.92 ± 2.27), 明显少于 Control RNAi 组的(24.43 ± 3.17)和 MHCC97H 组的(26.35 ± 3.29) (图 3a). 体外迁移实验结果也显示 HSP27 RNAi 组(11.40 ± 2.05)穿过上室底膜的细胞数少于 Control RNAi 组(19.88 ± 2.23)和 MHCC97H 组(21.36 ± 2.92) (图 3b).

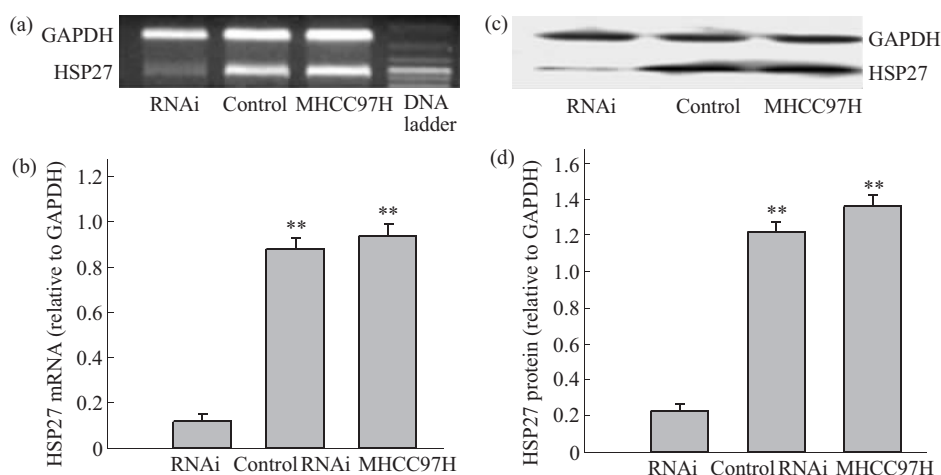


Fig. 2 Expression of HSP27 was distinctly inhibited after RNA interference

(a), (b) PCR products of HSP27 in MHCC97H were analyzed by electrophoresis through 2% agarose gels after RNA interference. GAPDH (251bp) as internal control. (c), (d) HSP27 expression was analyzed by Western blotting in RNAi, control RNAi and non-treated MHCC97H cells, GAPDH as a loading control.

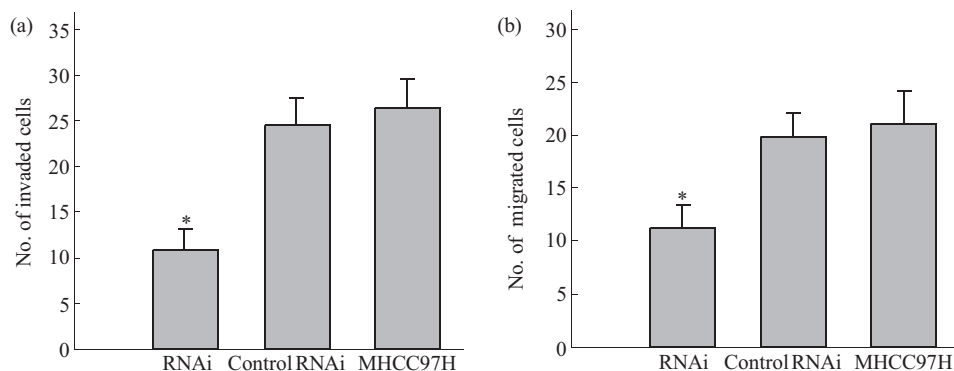


Fig. 3 Inhibition of HSP27 decreased significantly motility ability of higher metastatic potential HCC MHCC97H cells

For observing effects of HSP27 on invasive and migration ability of MHCC97H cells after HSP27 RNAi, *in vitro* invasion (a) and migration (b) assay were performed in the presence of the compound. The results represent means of triplicates. *Statistically different from control at $P < 0.05$.

2.3 细胞凋亡检测结果

流式细胞仪分析表明, RNAi 组、Control RNAi 组、MHCC97H 组 3 个平行试验组细胞凋亡比例分别为 27.64%, 17.56%, 15.12%, HSP27 RNA 干扰后 MHCC97H 细胞凋亡比例明显增加. TUNEL 法标记细胞核也显示 HSP27 RNA 干扰后 MHCC97H 细胞凋亡比例增加 (图 4).

2.4 人类信号转导基因芯片研究结果

高转移肝细胞肝癌细胞 MHCC97H RNAi 组与 Control RNAi 组、MHCC97H 组相比, IL2、LTA、NFKB1 (NfκB)、NFKBIA (IκBα)、PECAM1 均出现明显下调(图 5), 该结果经实时定量 PCR 证实. 通过 pathway miner 软件分析, 这些基因均位于 NF-κB 通路.

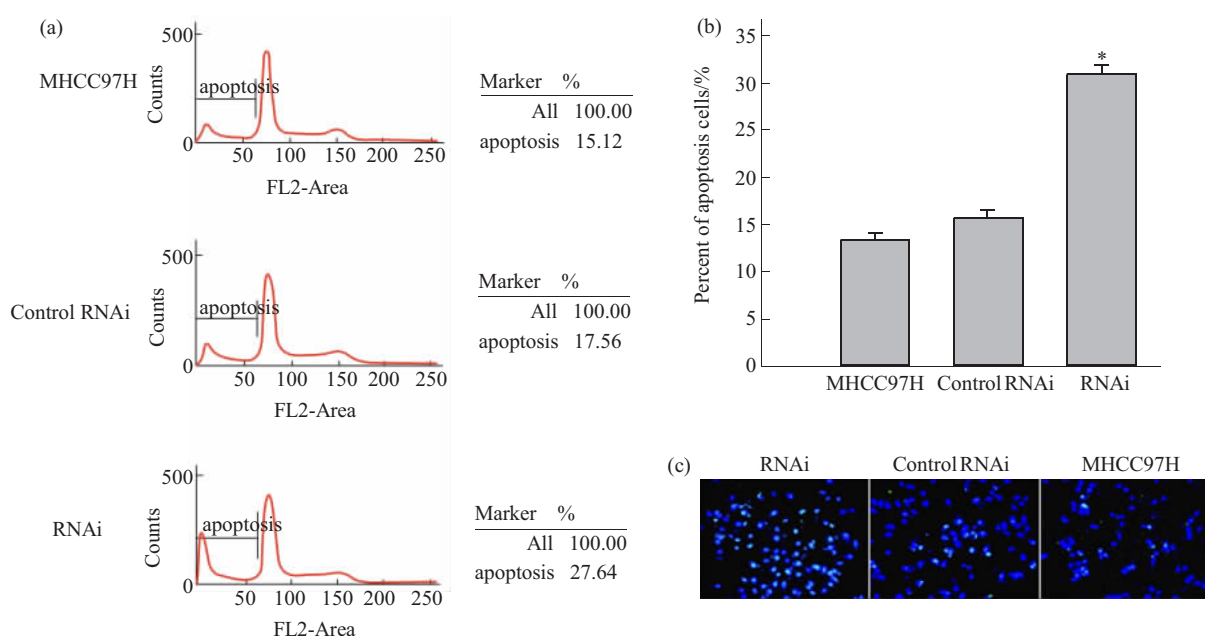


Fig. 4 Apoptosis ratio of MHCC97H cells increased after HSP27 RNA interference

Cells apoptosis were detected in situ by flow cytometry (a) and TUNEL technology in MHCC97H group, control RNAi group and RNAi group (b). Virescent reactivity in nuclei indicated cell apoptosis(c). The results in (b) presented were means of triplicates ($\bar{x} \pm s$).

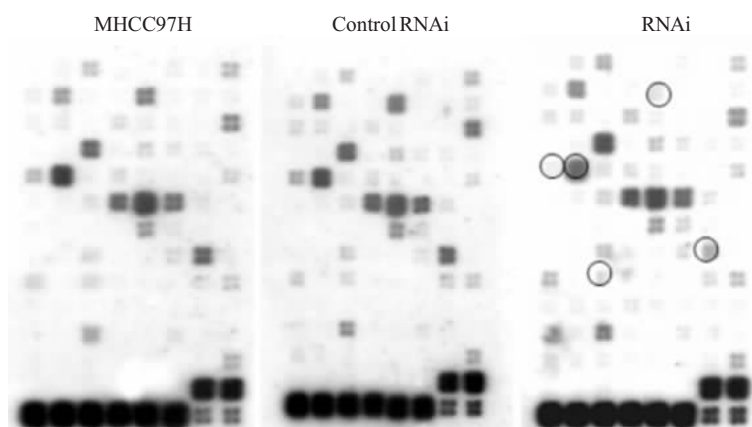


Fig. 5 Representative expression profile of signal transduction pathway-related genes in human MHCC97H cells detected by cDNA expression array system in MHCC97H group, Control RNAi group and RNAi group

NFKB1 (NfκB 0.032 ± 0.027), IL2 (0.123 ± 0.019), NFKBIA (IκBα 0.273 ± 0.033), LTA (0.381 ± 0.029), PECAM1 (0.437 ± 0.026) showed significantly downregulated and were subjected to NF-κB pathway.

2.5 HSP27 参与了肝癌细胞内 NF- κ B 通路的激活

基因芯片的分析结果提示, HSP27 与细胞内 NF- κ B 通路的相关性. 实验结果显示, HSP27 干扰后, MHCC97H 细胞核内活化的 NF- κ Bp65 减少(图 6a), 细胞内磷酸化的 I κ B α 也减少(图 6f). 对不同转移潜能肝癌细胞细胞核内活化的 NF- κ B p65 检测发现, Hep3B、MHCC97L 及 MHCC97H 细胞核内活化的 NF- κ B p65 蛋白随转移潜能的增加而增高

(图 6b). 为了进一步证实在 3 种不同转移潜能肝癌细胞内 HSP27 是否与 NF- κ B 途径的关键分子相互作用, 采用 HSP27 特异性的单克隆抗体进行免疫沉淀, 结果显示, 在 3 种肝癌细胞中 HSP27 可同 IKK β 、I κ B α 共沉淀, 而不能与活化的 NF- κ B p65 共沉淀(图 6c, 6d). 同时 IKK α 免疫共沉淀结果显示, HSP27 干扰实验后, IKK α 与 IKK β 的结合减少(图 6e).

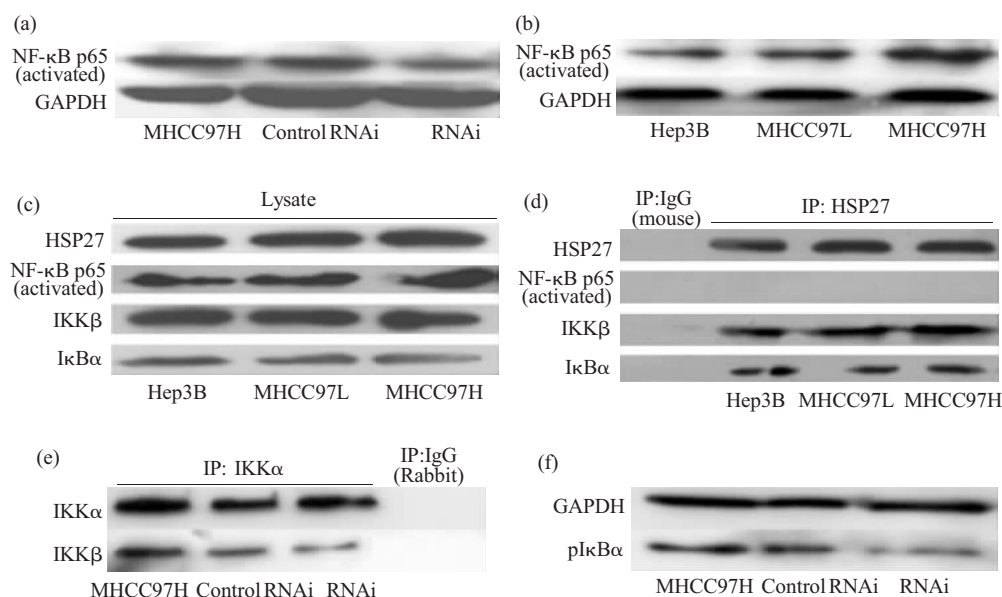


Fig. 6 HSP27 is involved in activation of NF- κ B pathway in HCC cell lines

(a) Activated NF- κ B p65 in nuclei was analyzed by Western blotting in RNAi, negative control RNAi and non-treated MHCC97H cells, GAPDH as a loading control. (b) Level of nuclear activated NF- κ B p65 was analyzed by Western blotting in Hep3B, MHCC97L and MHCC97H cells. (c) Same amount of cell total protein lysate from three cell lines were analyzed by Western blotting with antibodies directed against HSP27, IKK β 、I κ B α and activated NF- κ B p65. (d) The precipitated IKK β 、I κ B α with anti-HSP27 antibody or normal mouse IgG in HCC Hep3B, MHCC97L and MHCC97H cells, the HSP27 contents in the precipitates were used as control. (e) The precipitated IKK β with anti-IKK α antibody or normal rabbit IgG in HSP27 siRNA-treated MHCC97H, Control siRNA-treated MHCC97H and non-treated MHCC97H cells, the IKK α contents in the precipitates were used as control. (f) pI κ B α was analyzed by Western blotting in RNAi, negative control RNAi and non-treated MHCC97H cells, GAPDH as a loading control.

3 讨 论

HSP27广泛表达于各种组织细胞中, 在一些肿瘤中呈现高表达, 包括乳腺癌、神经母细胞瘤、消化道肿瘤等多种恶性肿瘤, 并与肿瘤的恶性程度及 TNM 分期有关^[5]. 此外 HSP27 可促进内皮细胞的迁移, 在乳腺癌、前列腺癌转移时表达增高, 推测 HSP27 可能参与肿瘤的侵袭转移^[6]. 本课题组前期通过对人肝细胞肝癌组织及正常人、HBV 病人和肝癌病人的血清蛋白质组学研究发现, 在恶性度高、侵袭性强的肝癌组织及肝癌患者血清中 HSP27 均呈现高表达^[3,7]. 本研究也显示, 无论在

mRNA 水平还是在蛋白质表达水平, HSP27 在人肝癌细胞中的表达随着细胞转移潜能的增加而升高, 与上述研究结果一致, 而且 HSP27 被抑制后, 高转移肝癌细胞的侵袭运动能力都明显地降低, 提示 HSP27 参与了人类肝细胞肝癌的侵袭转移过程.

大量证据表明, HSP27 可以作用于不同凋亡通路上的多个环节, 抑制细胞凋亡, 使损伤刺激下的细胞存活率显著提高. 本研究发现, HSP27 RNA 干扰后高转移潜能 MHCC97H 细胞凋亡比例明显增加, 表明 HSP27 在人肝癌细胞中起到了抑制凋亡的作用, 这与 Higaki 等^[8]的研究结论是一致的. 可能是因为 HSP27 的高表达增强了高转移潜能肝

癌细胞对凋亡诱导因素的抵抗性,使细胞获得更大的生存优势,赋予细胞更大的恶性潜能^[9].

信号转导基因芯片的分析结果提示,NF- κ B 信号转导途径在高转移肝癌细胞 HSP27 被抑制后活性下降,通过对 HSP27 RNA 干扰后的高转移 MHCC97H 细胞核内的活化 NF- κ Bp65 检测证实了这一观点,从另一方面也提示 HSP27 参与了细胞内 NF- κ B 途径的激活. NF- κ B/I κ B/IKK 信号转导途径主要通过对相关基因的转录调控,推进细胞周期演进并抑制凋亡,从而在细胞癌变发展过程中发挥重要作用^[10]. NF- κ B 途径的持续活化可促进细胞的增生、抑制细胞的凋亡,使许多本应凋亡的突变细胞得以存活,促进血管新生和肿瘤细胞的浸润、转移^[11,12]. 本研究发现,作为细胞内 NF- κ B 激活指标的细胞核内活化的 NF- κ B p65 随着肝癌细胞转移潜能增加而增多,也为上述观点提供了支持. 大多数情况下, NF- κ B 的激活过程是由于其抑制蛋白 I κ B 的磷酸化后被蛋白酶体降解,暴露 NF- κ B 的核定位信号和 DNA 结合结构域,导致 NF- κ B 入核并结合于特定基因的转录激活区,激活特定基因转录而完成的. 在这一过程中,IKK 复合体起到了关键性作用,其中 IKK β 是 IKK 复合体中的重要组分,它不仅可使 I κ B α 上的 Ser32、Ser36 磷酸化,还能使 I κ B β 上的 Ser19、Ser23 磷酸化^[13,14]. 基因靶向试验已清楚地表明 IKK β 是 NF- κ B 激活的必需亚基,抑制 IKK β 常可阻断 NF- κ B 信号通路^[5]. 我们的研究发现,在 3 种不同转移潜能的肝癌细胞中 HSP27 可同 IKK β 、I κ B α 共沉淀,并影响 IKK β 与 IKK α 的结合及 I κ B α 的磷酸化,提示 HSP27 可能是通过与 IKK β 的结合,稳定 IKK 复合物,增加了 IKK 复合物与通路中其他成分的相互作用,继而磷酸化 I κ B α ,促进 I κ B α 与 NF- κ B 的分离,激活 NF- κ B 途径. 此外, HSP27 可能还参与了活化后 I κ B α 的泛素化过程,导致磷酸化 I κ B α 被 26 S 的蛋白酶体水解,从而推动 NF- κ B 的激活.

总之, HSP27 作为热休克蛋白家族中的低分子蛋白,除作为分子伴侣保护细胞外,还通过调节细胞生长分化、抑制细胞凋亡参与多种肿瘤的发生及侵袭转移过程. 本研究不仅发现 HSP27 的高表达与肝癌细胞的转移潜能有关,而且发现 HSP27 可通过与 NF- κ B 通路中 IKK β 及 I κ B α 成分的相互作

用及影响 IKK 复合物的稳定性来参与 NF- κ B 途径的激活,抑制肝癌细胞的凋亡,为进一步揭示肝癌侵袭转移的内在机制提供理论基础.

参考文献

- 1 Townson J L, Naumov G N, Chambers A F. The role of apoptosis in tumor progression and metastasis. *Curr Mol Med*, 2003, **3** (7): 631~642
- 2 Mosser D D, Morimoto R I. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene*, 2004, **23** (16): 2907~2918
- 3 Song H Y, Liu Y K, Feng J T, *et al.* Proteomic analysis on metastasis-associated proteins of human hepatocellular carcinoma tissues. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006, **132** (2): 92~98
- 4 Li Y, Tang Z Y, Ye S L, *et al.* Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97. [see comment]. *World J Gastroenterol*, 2001, **7** (5): 630~636
- 5 Filomeni G, Aquilano K, Rotilio G, *et al.* Antiapoptotic response to induced GSH depletion: involvement of heat shock proteins and NF-kappaB activation. *Antioxid Redox Signal*, 2005, **7** (3~4): 446~455
- 6 Schepers H, Geugien M, van der Toorn M, *et al.* HSP27 protects AML cells against VP-16-induced apoptosis through modulation of p38 and c-Jun. *Exp Hematol*, 2005, **33** (6): 660~670
- 7 Feng J T, Liu Y K, Song H Y, *et al.* Heat-shock protein 27: a potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis. *Proteomics*, 2005, **5** (17): 4581~4588
- 8 Higaki K, Yano H, Kojiro M. Fas antigen expression and its relationship with apoptosis in human hepatocellular carcinoma and noncancerous tissues. *Am J Pathol*, 1996, **149** (2): 429~437
- 9 Rocchi P, Beraldi E, Ettinger S, *et al.* Increased Hsp27 after androgen ablation facilitates androgen-independent progression in prostate cancer *via* signal transducers and activators of transcription 3-mediated suppression of apoptosis. *Cancer Res*, 2005, **65** (23): 11083~11093
- 10 Moynagh P N. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci*, 2005, **118** (20): 4589~4592
- 11 Karin M. NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets. *Mol Carcinog*, 2006, **45** (6): 355~361
- 12 Gilmore T D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 2006, **25** (51): 6680~6684
- 13 Greten F R, Karin M. The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett*, 2004, **206** (2): 193~199
- 14 Kim H J, Hawke N, Baldwin A S. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ*, 2006, **13** (5): 738~747
- 15 Israel A. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB?. *Trends Cell Biol*, 2000, **10** (4): 129~133

Expression and Biological Mechanism Exploration of HSP27 in Different Metastatic HCC Cell Lines *

GUO Kun¹⁾, LIU Yin-Kun^{1,2)**}, ZHOU Hai-Jun^{1,2)}, DAI Zhi^{1,2)}, CHEN Jie¹⁾, SUN Rui-Xia¹⁾,
SUN Qiang-Ling¹⁾, LU Wen-Jing¹⁾, KANG Xiao-Nan^{1,2)}

¹⁾ Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China;

²⁾ Research Center for Cancer, Institute of Biomedical Science, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract To reveal molecular mechanisms responsible for that over-expression of heat shock protein 27 (HSP27) is associated with poor prognosis in liver cancer, expression of HSP27 was analyzed by RT-PCR and Western blot in Hep3B, MHCC97L and MHCC97H, which had higher metastasis potential than Hep3B, and after HSP27 RNA interference, MHCC97H migratory and invasive capability were evaluated by *in vitro* migration and invasion assay, apoptosis ratio was detected by flow cytometry(FCM) and TUNEL method, prominent altered signal pathway was analyzed through a Human Q Series Signal Transduction in Cancer Gene Array. The results showed that the up-regulation of HSP27 expression in HCC cell lines was consistent with metastasis potentials. Using RNA interference technique, mRNA and protein level of HSP27 in MHCC97H cell line were specifically reduced by up to 80%. *In vitro* migration and invasion assay showed the average migratory and invaded cell numbers per field were 21.36 ± 2.92 , 19.88 ± 2.23 , 11.40 ± 2.05 and 26.35 ± 3.29 , 24.43 ± 3.17 , 10.92 ± 2.27 respectively in MHCC97H, control RNAi, RNAi groups. Moreover, MHCC97H cell apoptosis ration was 15.12%, 17.56%, 27.64% (MHCC97H, control RNAi, RNAi) respectively by FCM analysis, which was reconfirmed by TUNEL morphological assessment. Furthermore cDNA microarray analysis revealed that NF- κ B pathway activation was inhibited after HSP27 RNAi. Immunoblotting analysis showed that the decreasing of nuclear activated NF- κ B p65 and phosphorylated I κ B α , meanwhile reducing of the association between IKK β and IKK α in MHCC97H cells after HSP27 RNAi, further co-immunoprecipitation assay showed interaction of IKK β , I κ B α with HSP27 in three HCC cell lines. Altogether, these findings revealed possible roles of HSP27 in being of HCC cell lines metastatic potentials through involving in cellular NF- κ B pathway activation.

Key words hepatocellular carcinoma cell, heat shock protein 27(HSP27), signal transduction, nuclear factor κ B (NF- κ B), metastasis, apoptosis, RNA interference

*This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (2004CB520802) and The National Natural Science Foundation of China (3017416).

**Corresponding author . Tel: 86-21-64041990-2501, E-mail: ykliu@zshospital.com

Received: December 14, 2006 Accepted: February 28, 2007