

文章编号 1006-8147(2014)02-0093-05

论 著

## xCT 影响肝癌细胞转移的作用机制研究

李 杨<sup>1</sup>, 齐建利<sup>1</sup>, 赵立平<sup>2</sup>, 郑雪婷<sup>1</sup>, 乔海暄<sup>1</sup>

(天津医科大学 1. 生物医学工程学院; 2. 康复与运动医学系, 天津 300070)

**摘要** 目的:探讨人类肝细胞癌中 xCT(氨基酸转运系统 system x<sub>c</sub><sup>-</sup>的功能性亚基)的表达对于自噬、EMT(上皮细胞间质化)和肿瘤细胞转移的影响。方法:用 Western Blot 和 RT-PCR 方法检测肿瘤细胞在 xCT 抑制剂 SASP(柳氮磺胺吡啶)的作用下,其自噬和 EMT 过程相关基因的表达水平的改变。伤口愈合实验和 Transwell 分析 xCT 在受到抑制后,肿瘤细胞迁移能力的改变。结果:SASP 处理过的 97H 人类高转移肝癌细胞与对照组相比,自噬相关蛋白 LC3 和 Beclin1 表达升高,EMT 的标志物 E-cadherin 表达升高,Vimentin 的表达降低,参与 EMT 过程的重要转录因子 Snail 表达降低。结论:抑制 xCT 的表达可以使人类高转移肝癌细胞发生自噬,降低转录因子 Snail 的表达,从而减弱 EMT 过程的发生并降低人类高转移肝癌细胞的转移能力。

**关键词** xCT;肝癌细胞;自噬;上皮细胞间质化;转移

中图分类号 R735.7

文献标志码 A

### Molecular mechanism of metastasis in hepatocellular carcinoma inhibited by xCT

LI Yang<sup>1</sup>, QI Jian-li<sup>1</sup>, ZHAO Li-ping<sup>2</sup>, ZHENG Xue-ting<sup>1</sup>, QIAO Hai-xuan<sup>1</sup>

(1.School of Biomedical Engineering; 2.Department of Rehabilitation and Sports Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To discuss the influence of xCT expression on EMT (epithelial-mesenchymal transition) and tumor metastasis in hepatocellular carcinoma. **Methods:** Western Blot and RT-PCR were used to detect the expression levels of autophagy and EMT related gene after treated with sulfasalazine (SASP), an inhibitor of xCT activity. Wound healing assay and transwell assay were performed to evaluate the disruption effect of xCT on cell motility. **Results:** The expression levels of autophagy related protein LC3 and Beclin1 were elevated in SASP treated 97H cells compared with in control 97H cells. E-cadherin was upregulated whereas Vimentin was downregulated when xCT was deficient. Both E-cadherin and Vimentin were markers of EMT process. **Conclusion:** xCT disruption can activate autophagy and attenuate EMT, and eventually suppress cell migration.

**Key words** xCT;hepatocellular carcinoma;autophagy;EMT;metastasis

肝癌是世界范围内最常见的 10 种恶性肿瘤之一。据统计,我国每年死于肝癌者超过 11 万人,占全世界肝癌死亡人数的 45%。由于癌细胞易发生转移,目前这一类疾病标准的治疗方法,外科手术和肝移植并不能令人满意<sup>[1]</sup>。癌细胞的转移是癌症致死的首要原因<sup>[2]</sup>。尽管肿瘤细胞的转移机制仍然不清楚,但是随着研究的深入,关于肿瘤转移过程的新概念已经出现<sup>[3-4]</sup>。例如,EMT(上皮细胞间质化),它是胚胎发育过程中一个必要的生物学过程,近年来研究发现 EMT 在肿瘤发生和转移的过程中起到非常重要的调控作用<sup>[5-7]</sup>。在 EMT 过程中,本来具备上皮细胞特性的肿瘤细胞,获得了间质细胞的特性,导致其细胞间连接减少、活动性增加。xCT 是氨基酸转运系统的功能性亚基,xCT 与 CD98hc

(SLC3A2)组成 Na<sup>+</sup>依赖的运输系统(system x<sub>c</sub><sup>-</sup>),其可以调控细胞内谷氨酸和细胞外胱氨酸的交换,半胱氨酸是 GSH(谷胱甘肽)合成的限速底物<sup>[8]</sup>,因此足够的胱氨酸可以保证细胞内 GSH 的合成<sup>[9-10]</sup>。GSH 是细胞内重要的抗氧化剂,也是重要的抗癌因子<sup>[11-12]</sup>。如果 GSH 在细胞内的含量降低,可能会使细胞发生自噬(autophagy)。自噬是一个涉及到细胞自身结构(蛋白质、器官)通过溶酶体机制而被分解的过程。这是一个受到紧密调控的步骤,它帮助细胞产物在合成、降解以及接下来的循环中保持一个动态平衡。前期研究中发现 xCT 在高转移癌细胞中表达升高,为了搞清楚其在肿瘤转移过程中的作用机制,我们利用 xCT 的特异性药理抑制剂 SASP(柳氮磺胺吡啶),抑制 xCT 的活性,降低细胞内 GSH 的合成,使细胞内积累过量的活性氧,观察细胞是否发生自噬。很多研究指出,活性氧(ROS)的产生对自噬的激活有必要的作用<sup>[13]</sup>。在本研究中,笔者发现

基金项目 天津市高等学校科技发展基金计划项目(20070908)

作者简介 李杨(1988-),男,硕士在读,研究方向:细胞生物学;通信作者:乔海暄, qiaohaixuan@aliyun.com。

xCT 在高转移肝癌中表达很高,降低 xCT 的表达可以通过 ROS/autophagy 路径抑制肝癌细胞的 EMT 和转移过程的发生发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 人低转移潜能肝癌细胞 HepG2,人低转移潜能肝癌细胞 MHCC97-L,人高转移潜能肝癌细胞 MHCC97-H,由天津医科大学基础研究中心尹海芳教授惠赠。于含 10%小牛血清的 DMEM 培养基中,在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养。

1.1.2 主要试剂和仪器 细胞培养基、胎牛血清、抗生素均购自 Hyclone 公司;胰酶、 $\beta$ -巯基乙醇购自 Gibco 公司;柳氮磺胺吡啶购自 Sigma 公司;Trizol 购自天根公司;M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司;SYBR green 染料购自全式金公司;抗 Beclin1 抗体、抗 LC3 抗体、抗 E-cadherin 抗体、抗 Vimentin 抗体均购自 Abcam 公司;抗 Snail 抗体购自 CST 公司;Transwell 板购自 Corning 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 细胞完全培养基成分为:DMEM 培养基+10%胎牛血清。细胞置 37℃,含 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。0.25% 胰酶用于细胞消化,传代。胎牛血清+10% DMSO 用于细胞冻存,冻存顺序为 4℃/30 min,-20℃/2 h,-80℃/过夜后保存于液氮。

1.2.2 细胞总 RNA 提取与 RT-PCR 细胞总 RNA 的提取按天根公司说明书操作。取 2  $\mu$ g 经 M-MLV 逆转录酶逆转成 cDNA 后进行 PCR 反应。PCR 引物(华大基因公司)序列如下:xCT 上游 5'-GGCAC-CGTCATCGGATCAGGCATC-3',下游 5'-CACGAG-CTTGATTGCAAGTTCAGG-3';Snail 上游 5'-AATC-GGAAGCCTAACTACAGCG-3',下游 5'-GTCCCA-GATGAGCATTGGCA-3';E-cadherin 上游 5'-GT-CACTGACACCAACGATAATCCT-3',下游 5'-CTG-GGGTATTGGGGGCATC-3';Vimentin 上游 5'-CG-CCAGATGCGTGAAATGG-3',下游 5'-ACCAGAG-GGAGTGAATCCAGA-3';GAPDH 上游 5'-AAGGT-GAAGGTCGGAGTCAAC-3',下游 5'-GGGGTCATT-GATGGCAACAATA-3'。

1.2.3 Western Blot 检测 Beclin1、LC3、Snail 和 E-cadherin 的表达情况 取 25  $\mu$ g 蛋白质样品进行电泳并转移至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶室温封闭 2 h,分别加入相应的一抗兔抗人 Beclin1、LC3、Snail 和 E-cadherin。4℃过夜,0.05% Tween 20 的 TBS 漂洗

3 次,每次 5 min,加入相应的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔的二抗(1:5 000),室温 2 h,0.05% Tween 20 的 TBS 漂洗 4 次,每次 10 min,增强化学发光显色系统显色, $\beta$ -actin 为内参照。

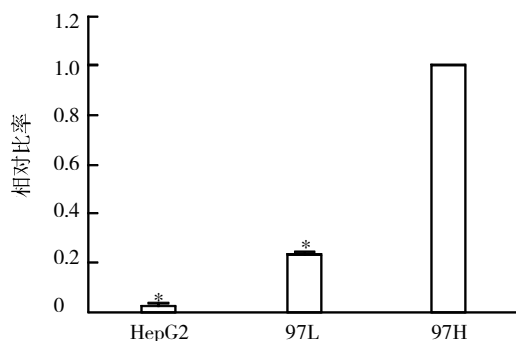
1.2.4 伤口愈合实验 伤口愈合实验以 6 孔板培养细胞,接种处理后的细胞,待细胞生长至 80%接触汇合时更换为无血清培养基,用记号笔在板底背面作平行标记线,以 200  $\mu$ L 吸头在板底内作垂直于记号线的划痕线,划痕线部位使细胞脱落形成“伤口”,以 PBS 洗细胞两次去掉游离细胞,换液,此时记为 0 h。记录每一个划痕线和标记线交汇处的“伤口宽度”,每组去 3 个数值,48 h 后再次原位测量并与同部位的 0 h 宽度作比较。

1.2.5 细胞迁移实验 将 Transwell 小室置于 24 孔板中,SASP 处理组细胞及未处理组细胞培养 48 h 后,应用无血清的 DMEM 调整细胞密度至  $3 \times 10^4$  个/mL,转至 Transwell 小室中。在小室下层加入含 10%血清的 DMEM 作为趋化剂。孵育 72 h 后,应用棉签拭去非侵袭性细胞,应用结晶紫固定并染色,在 100 倍荧光显微镜下计数细胞。

1.3 统计学方法 实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS11.5 软件进行统计学分析。两组间比较采用独立样本 *t* 检验。多组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析,组间两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验。*P*<0.05 时,差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 xCT 的表达与 HCC(人类肝癌细胞)的转移相关 为了确定 xCT 在不同转移能力的肝癌细胞中的表达变化,笔者检测了 3 种具有不同转移能力的人类肝癌细胞中 xCT 的表达水平。结果发现,在人类低转移肝癌细胞 HepG2 和 97L 中,xCT 的表达明显低于人类高转移肝癌细胞 97H(图 1)。



与对照组比较 \**P*<0.05

图 1 RT-PCR 检测 xCT 在 HepG2,97L,97H 中的表达

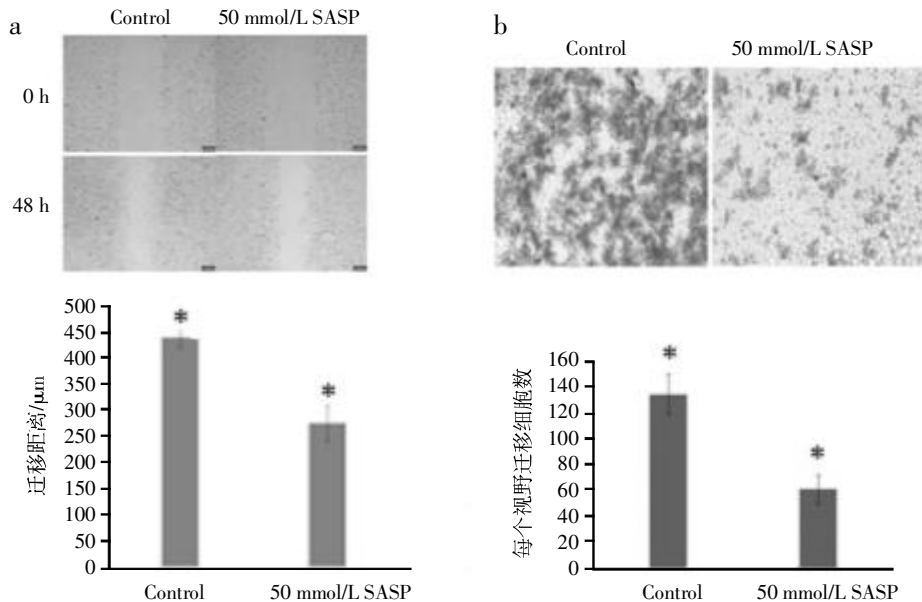
Fig 1 The mRNA expression levels of xCT in HepG2,97L and 97H cell

2.2 降低 xCT 的表达可以抑制人类高转移肝癌细胞 97H 迁移 利用伤口愈合实验可以评价细胞的迁移和运动能力, 本实验对人类高转移肝癌细胞 97H 和用 50 mmol/L 柳氮磺胺吡啶处理过的 97H 细胞进行分析, 结果表明: 97H 细胞用柳氮磺胺吡啶处理之后, 与对照组相比, 伤口愈合速度明显加快。对终末 48 h 时间点进行统计学分析, 实验组和对照组相比, 差别具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结果表明 xCT 可以促进 HCC 细胞的迁移(图 2a)。

同时, 利用 Transwell 进行细胞迁移能力的评价, 对人类高转移肝癌细胞 97H 和用 50 mmol/L 柳氮磺胺吡啶处理过的 97H 细胞进行分析, 结果表明: 97H 细胞用柳氮磺胺吡啶处理之后, 与对照组

相比, 穿膜细胞减少。对终末 72 h 时间点进行统计学分析, 实验组和对照组相比, 差别具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结果表明 xCT 可以促进 HCC 细胞的迁移能力(图 2b)。

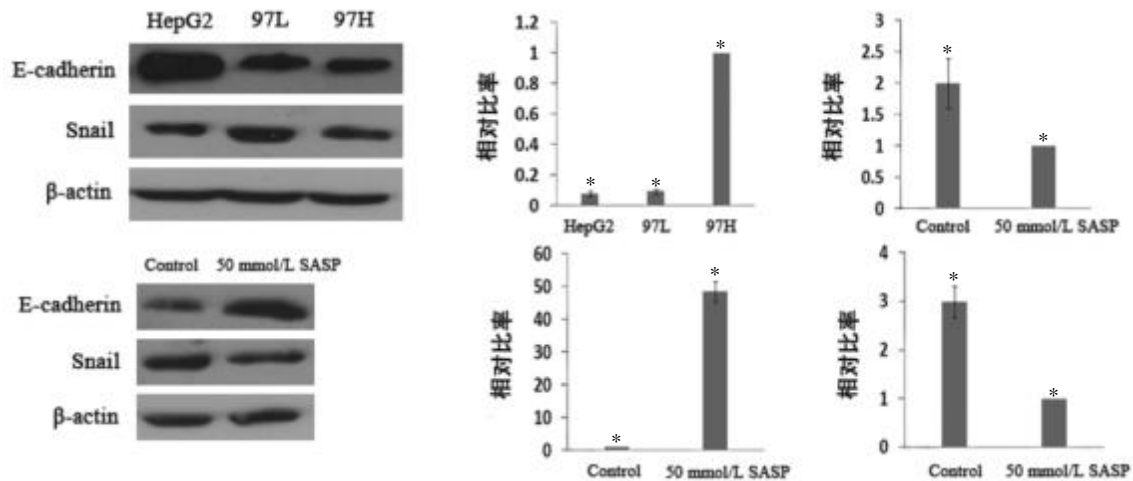
2.3 转录因子 Snail 介导 xCT 对于 EMT 发生的影响 为了研究 xCT 在 EMT 过程中的作用机制, 笔者检测了 EMT 的相关标志物在 3 种细胞中的表达情况, 发现低转移肿瘤细胞 HepG2、97L 中上皮型细胞标志物 E-cadherin 的表达要高于高转移肿瘤细胞 97H。进一步向 97H 中加入 50 mmol/L 柳氮磺胺吡啶后, 发现 E-cadherin 的表达升高, 而 Vimentin 的表达降低。因此推测 xCT 在 EMT 过程中起调控作用(图 3)。



与对照组比较  $*P < 0.05$

图2 SASP 对人类肝癌细胞迁移能力的影响

Fig 2 The effect of SASP on metastasis of hepatocellular carcinoma



与对照组比较  $*P < 0.05$

图3 SASP 处理前后 EMT 相关标志物表达的改变

Fig 3 The expression levels of EMT markers with and without SASP

检测 97H 细胞中和 50 mmol/L 柳氮磺胺吡啶处理过的 97H 细胞中转录因子 Snail 的表达情况,发现经过处理过的 97H 细胞 Snail 的表达降低。推测 xCT 可能是通过下调转录因子 Snail 来抑制 EMT 的发生(图 3)。

2.4 降低 xCT 的表达可使人类高转移肝癌细胞发生自噬进而降解 Snail 为了确定自噬溶酶体系统是否在 xCT 的表达降低后,参与了 Snail 的降解,笔者检测了两个自噬发生的重要标志物 LC3 和 Beclin。结果显示加入 SASP 处理过的 97H 细胞中 LC3-II/LC3-I 的比值增高,同时 Beclin 的表达显著升高,说明 97H 细胞发生了自噬(图 4)。

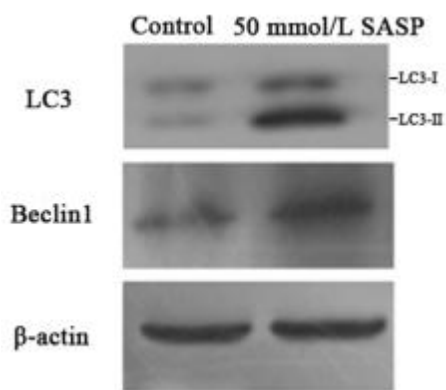


图 4 Western Blot 检测 SASP 处理后 97H 细胞 LC3 和 Beclin1 表达水平的变化

Fig 4 The protein expression levels of LC3 and Beclin1 in hepatocellular carcinoma after treated with SASP

### 3 讨论

最近的研究发现 xCT 在乳腺癌、黑色素瘤和肝癌细胞中高表达,但其在肿瘤细胞中的作用及其机制尚不清楚,因此本实验利用 SASP 抑制 xCT 的活性,观察其对于人类高转移肝癌细胞转移过程的影响及其机制。结果发现 xCT 在高转移肝癌细胞 97H 中的表达明显高于低转移肝癌细胞 HepG2 和 97L 的表达。在高转移肝癌细胞 97H 中加入 xCT 的抑制剂 SASP 后,发现细胞的迁移能力明显降低。这之前报道的 xCT 缺陷可以抑制食管鳞状细胞癌的转移能力的报道一致<sup>[14]</sup>。由于 EMT 在肿瘤发生和转移的过程中起到非常重要的调控作用,因此我们进一步检测了与肿瘤转移密切相关的 EMT 标志物 E-cadherin 和 Vimentin 的表达,发现 xCT 缺陷可以抑制 EMT 过程的发生发展。通过 SASP 下调肝癌细胞 97H 中 xCT 的表达,抑制了肝癌细胞 97H 的 EMT 过程。本文首次发现 xCT 的表达与肿瘤细胞 EMT

过程相关。

氨基酸转运系统在很多氨基酸依赖的细胞代谢过程中发挥必要作用,包括蛋白质的合成、能量代谢以及细胞的自我保护<sup>[15-16]</sup>。其中胱氨酸/谷氨酸转运系统(system x<sub>c</sub><sup>-</sup>)在维持细胞内氧化还原水平上起重要作用。它可以使细胞外的胱氨酸进入细胞,同时,使细胞内的谷氨酸释放到细胞外。胱氨酸是 GSH 的生物合成的限速底物,而 GSH 在增殖、氧化还原反应以及抗氧化防御中起着重要的作用<sup>[17-18]</sup>。最近的研究发现,在肝癌细胞中,xCT 缺陷可以降低细胞内 GSH 的水平,进而提高 ROS 的水平<sup>[19]</sup>。近年来研究还发现,ROS 在细胞内的积累,会诱导细胞发生自体吞噬。但是,在肝癌细胞中 xCT 缺陷是否通过 ROS 在细胞内的积累诱导肿瘤细胞发生自噬尚不清楚。因此,我们进一步在高转移肝癌细胞 97H 培养基中加入 xCT 的抑制剂 SASP,检测自噬标志物 LC3 和 Beclin1 的表达。结果发现 xCT 缺陷可以诱导 97H 细胞发生自噬,而自噬溶酶体系统的激活可以降解细胞内的 Snail 等转录因子<sup>[20]</sup>,这与我们的实验结果 Snail 表达下调相一致。肿瘤迁移是一个复杂的多步骤的过程,大概可以分为两个阶段,包括肿瘤细胞从原发部位迁移到远距离组织中以及在远距离组织中分化和发育。EMT 过程不仅与这两个阶段密切相关,而且参与了肿瘤进程的调控。转录因子 Snail 是 EMT 过程的重要调控因子,由于 xCT 缺陷而诱导的自噬过程中,Snail 的降解可能通过影响 EMT 过程进而抑制肿瘤迁移的发生。

总之,本研究表明 xCT 是人类肝癌细胞转移的内在调控物,可以影响肝癌的转移,因此,进一步阐明 xCT 在人类肝癌细胞转移中的作用机制可以促进以 xCT 为靶点的肿瘤转移的治疗。

#### 参考文献:

- [1] Liu L, Zhu X D, Wang W Q, et al. Activation of beta-catenin by hypoxia in hepatocellular carcinoma contributes to enhanced metastatic potential and poor prognosis[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(10):2740
- [2] Chaffer C L, Weinberg R A. A perspective on cancer cell metastasis[J]. Science, 2011, 331(6024):1559
- [3] Coghlin C, Murray G I. Current and emerging concepts in tumour metastasis[J]. J Pathol, 2010, 222(1):1
- [4] Klein C A. Cancer: the metastasis cascade[J]. Science, 2008, 321(5897):1785
- [5] Ledford H. Cancer theory faces doubts[J]. Nature, 2011, 472(7343):273
- [6] Thierry J P, Acloque H, Huang R Y, et al. Epithelial-mesenchymal

- transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(7343): 871
- [7] Reiman J M, Knutson K L, Radisky D C. Immune promotion of epithelial mesenchymal transition and generation of breast cancer stem cells[J]. Cancer Res, 2010, 70(8):3005
- [8] Bannai S, Ishii T. Transport of cystine and cysteine and cell growth in cultured human diploid fibroblasts: effect of glutamate and homocysteate[J]. J Cell Physiol, 1982, 112(2):265
- [9] Sato H, Shiiya A, Kimata M, et al. Redox imbalance in cystine/glutamate transporter-deficient mice[J]. J Biol Chem, 2005, 280(45): 37423
- [10] Huang Y, Dai Z, Barbacioru C, et al. Cystine-glutamate transporter SLC7A11 in cancer chemosensitivity and chemoresistance[J]. Cancer Res, 2005, 65(16):7446
- [11] Calvert P, Yao K S, Hamilton T C, et al. Clinical studies of reversal of drug resistance based on glutathione[J]. Chem Biol Interact, 1998, 111(2):213
- [12] Goto S, Yoshida K, Morikawa T, et al. Augmentation of transport for cisplatin-glutathione adduct in cisplatin-resistant cancer cells[J]. Cancer Res, 1995, 55(19):4297
- [13] Ruth S, Zvulun E. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology[J]. Cell, 2011, 36(1):30
- [14] Chen R S, Song Y M, Zhou Z Y, et al. Disruption of xCT inhibits cancer cell metastasis via the caveolin-1/b-catenin pathway[J]. Oncogene, 2009, 28(4): 599
- [15] Christensen H N. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism[J]. Physiol Rev, 1990, 70(1): 43
- [16] Chillaron J, Roca R, Valencia A, et al. Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2001, 281(6):995
- [17] Reddy N M, Kleeberger S R, Bream J H, et al. Genetic disruption of the Nrf2 compromises cell-cycle progression by impairing GSH-induced redox signaling[J]. Oncogene, 2008, 27(44): 5821
- [18] Seiler A, Schneider M, Forster H, et al. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent and AIF-mediated cell death[J]. Cell Metab, 2008, 8(3): 237
- [19] Guo W, Zhao Y, Zhang Z, et al. Disruption of xCT inhibits cell growth via the ROS/autophagy pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Letters, 2011, 312(1): 55
- [20] Lv Q, Wang W, Xue J, et al. DEDD interacts with PI3KC3 to activate autophagy and attenuate epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2012, 72(13): 3238
- (2013-11-08 收稿)

.....

## 《天津医科大学学报》编辑部网络采编办公系统开通运行通知

各位作者您好! 为提高稿件处理和办公效率,《天津医科大学学报》编辑部将从 2014 年 2 月开始使用网络采编办公系统。

作者投稿采用新的网络平台(<http://tjykdxxb.paperopen.com>),不再使用纸质投稿,特此公告,望作者们予以支持与合作。

在使用网络投稿系统中您有任何疑问、意见和建议,请您电话 022-83336719;022-83336803 或者发邮件到 [xuebao@tjmu.edu.cn](mailto:xuebao@tjmu.edu.cn)。

注意:投稿作者请详细阅读网站首页——左侧栏目——作者园地相关说明,谢谢!

(本刊编辑部)