

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00028

糖原合酶激酶-3β 在肝癌细胞迁移过程中的作用

王剑飞¹, 侯 瑛², 葛瑞良¹, 王以政², 沈 锋^{1*}, 吴孟超¹

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438

2. 中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所, 上海 200031

[摘要] **目的** 通过调节糖原合酶激酶-3β(GSK-3β)来观察其对肝癌细胞迁移能力的影响,研究 GSK-3β 在肝癌细胞迁移过程中发挥的作用。**方法** 分别应用 GSK-3 特异性抑制剂 LiCl 和 SB216763 抑制 GSK-3β 的活性,或转染 GSK-3β WT、GSK-3β S9A、GID5-6 质粒影响 GSK-3β 的活性,通过划痕实验、小室迁移实验、微管组织中心体(MTOC)实验等观察处理前后肝癌细胞系 SMMC-7721 和 Hep3B 迁移能力的改变,并用免疫细胞化学法观察肝癌细胞迁移后磷酸化 GSK-3β(pGSK-3β)的分布。**结果** 划痕实验发现,用 LiCl 和 SB216763 处理后,SMMC-7721 细胞的相对迁移率分别下降 36.44% 和 41.78%, Hep3B 细胞的相对迁移率都下降 26.66%。转染 GSK-3β WT 后,GSK-3β 和 pGSK-3β 表达上调,SMMC-7721 细胞相对迁移率降为 61.27%;转染 GSK-3β S9A 后,GSK-3β 表达上调,pGSK-3β 变化不明显,SMMC-7721 细胞相对迁移率降为 38.61%;转染 GID5-6 后,GSK-3β 变化不明显,pGSK-3β 表达增多,SMMC-7721 细胞相对迁移率降为 36.49%。免疫细胞化学可见,在正常培养的条件下肝癌细胞发生迁移 3 h 后,细胞内 pGSK-3β 呈现出在细胞前沿边缘附集的现象;而加入 LiCl 后,pGSK-3β 的分布则未呈现这种边缘附集的现象。MTOC 实验发现,未加入抑制剂时 Hep3B 细胞 MTOC 阳性率在 60% 以上,而应用 GSK-3β 抑制剂后 MTOC 阳性率明显下降。**结论** GSK-3β 在肝癌细胞的迁移过程中起到重要作用,应用针对 GSK-3β 的特异性抑制药物能够影响肝癌细胞的极化性,降低肝癌细胞的迁移能力。

[关键词] 糖原合酶激酶-3β; 肝肿瘤; 肝细胞癌; 细胞迁移

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)01-0028-05

Role of GSK-3β in hepatocellular carcinoma cell migration

WANG Jian-fei¹, HOU Ying², GE Rui-liang¹, WANG Yi-zheng², SHEN Feng^{1*}, WU Meng-chao¹

1. Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

2. Institute of Neuroscience, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

[Abstract] **Objective** To study the effects of GSK-3β on the migration ability of hepatocellular carcinoma cells. **Methods** Inhibition tests with specific inhibitors of GSK-3 (LiCl and SB216763) and transfection with different plasmids(GSK-3β WT, GSK-3β S9A, and GID5-6) were used to alter the activity of GSK-3β. The migration ability of SMMC-7721 and Hep3B cells was observed using wound healing assay, transwell assay and the microtubule-organizing center (MTOC) test before and after treatment. Immunocytochemistry was used to investigate the distribution of phospho-GSK-3β. **Results** Wound healing assay showed that LiCl and SB216763 decreased the migration of SMMC-7721 cells by 36.44% and 41.78%, respectively; and decreased the migration of Hep3B cells by both 26.66%. Transfection with GSK-3β WT increased the expression of GSK-3β and pGSK-3β, and the migration rate of SMMC-7721 cells decreased to 61.27%. Transfection with GSK-3β S9A increased GSK-3β expression and had no noticeable influence on pGSK-3β expression, and the migration rate of SMMC-7721 cells decreased to 38.61%. Transfection with GID5-6 had no noticeable influence on GSK-3β and increased pGSK-3β expression, and the migration rate decreased to 36.49%. Immunocytochemical staining showed that LiCl blocked pGSK-3β accumulation on cell edge as that in normally cultured cells. MTOC test showed that the MTOC positive rate was above 60% in Hep3B cells before adding inhibitors of GSK-3β, and it decreased after exposure to the inhibitors. **Conclusion** GSK-3β plays an important role in migration of hepatocellular carcinoma cells. Inhibitors of GSK-3β can affect the polarization and decrease the migration ability of hepatocellular carcinoma cells.

[Key words] GSK-3β; liver neoplasms; hepatocellular carcinoma; cell migration

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(1): 28-32]

[收稿日期] 2009-06-11

[接受日期] 2009-09-20

[作者简介] 王剑飞, 硕士, 住院医师. E-mail: jeffwang365@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81875005, E-mail: shenfengdfgd@yahoo.com.cn

糖原合酶激酶-3 β (Glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β),是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,早期研究认为该酶的功能仅是磷酸化肝糖原合成酶(GS)并使之失活,但是后来发现该酶可磷酸化众多底物,参与蛋白合成及细胞增殖、分化、运动等^[1-4]。已有研究表明,GSK-3 β 在肝癌的发生发展过程中起重要作用,并参与肝癌细胞生长和细胞凋亡信号通路调控^[5-6],但是GSK-3 β 是否参与了肝癌细胞的转移仍有待研究。本研究通过上调和下调GSK-3 β 的活性,观察其活性改变后肝癌细胞系SMMC-7721、Hep3B迁移能力的变化,以探讨GSK-3 β 在肝癌细胞迁移过程中所发挥的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 DMEM培养液购自Gibco公司,GSK-3特异性抑制剂LiCl、SB216763购自CalBiochem公司,GSK-3 β 、pGSK-3 β 购自Cell Signaling公司,pericentrin抗体购自BabCo公司, α -tubulin抗体购自Sigma公司。Nucleofector电转仪购自Amaxa公司,荧光显微镜购自Olympus公司,Chamber小室购自Corning公司。

1.2 细胞培养 肝癌细胞系SMMC-7721、Hep3B均由第二军医大学东方肝胆外科医院卫立辛教授惠赠。置于含10%小牛血清的DMEM培养液,37℃、5%CO₂条件下培养。以0.25%胰酶、0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)消化、传代。

1.3 细胞划痕实验检测GSK-3 β 抑制剂对细胞迁移的影响 将细胞种于6孔板内,待细胞长满后,用10 μ l微量移液器枪头在其中划痕,用DMEM培养液冲洗并吸净后,分别孵育以含10 μ mol/L NaCl(NaCl组)、10 μ mol/L LiCl(LiCl组)、20 μ mol/L DMSO(DMSO组)、20 μ mol/L SB216763(SB216763组)的10%小牛血清的DMEM培养液。分别于划痕后0、24 h拍照,利用显微镜拍照程序测量划痕宽度,每条划痕测量5次,取其平均值。利用公式计算:细胞迁移距离(d)=划痕后24 h宽度-初始划痕后宽度。NaCl组平均值记为 d_1 ,LiCl组平均值记为 d_2 ,DMSO组平均值记为 d_3 ,SB216763组平均值记为 d_4 ,以NaCl组作为标准,LiCl组、DMSO组、SB216763组的相对迁移率分别为: $d_2/d_1 \times 100\%$ 、 $d_3/d_1 \times 100\%$ 、 $d_4/d_1 \times 100\%$ 。共进行12组实验。

1.4 Chamber小室检测质粒转染对细胞迁移的影响

1.4.1 细胞转染 质粒GSK-3 β S9A、GSK-3 β WT(Wild Type)、GID5-6、GID5-6LP均由中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所王以政教授馈

赠。SMMC-7721细胞常规培养,取对数生长期的细胞,采用Nucleofector电转仪,按操作步骤进行转染。取 1.5×10^6 个细胞离心去培养液,加入电转缓冲液100 μ l,加所需质粒3 μ g和绿色荧光蛋白基因(GFP)1 μ g共转,对照仅转染GFP 1 μ g。将细胞、电转缓冲液和质粒吹打混匀,加入电转杯中,选取所需的程序,用电穿孔法转染SMMC-7721细胞。应用蛋白质印迹法检测转染后GSK-3 β 及pGSK-3 β 的表达。

1.4.2 转染细胞的迁移实验 将转染后的细胞常规培养24 h后,取约 2×10^5 的细胞,加入0.5%小牛血清的DMEM培养液100 μ l,滴加于趋化小室内,于24孔板中加入1 ml 10%小牛血清的DMEM培养液,将小室置于24孔板内。8 h后于荧光显微镜下观察拍照并计数。将趋化小室底膜之上的细胞拭去,再次拍照并计算穿膜细胞数。重复2次,以GFP为GSK-3 β S9A、GSK-3 β WT的阴性对照组,以GID5-6LP为GID5-6的对照组。

1.5 免疫细胞化学检测肝癌细胞内pGSK-3 β 的分布 将Hep3B细胞接种于消毒后的盖玻片上,待细胞长满后,用10 μ l微量移液器枪头在其中划痕,用DMEM培养液冲洗并吸净后,分别孵育以10%小牛血清的DMEM培养液、10%小牛血清的DMEM培养液+10 μ mol/L LiCl。3 h后吸净培养液,PBS冲洗2次,4%多聚甲醛4℃固定30 min,PBS冲洗2次后,用0.1% TritonX-100室温下孵育10 min,PBS冲洗2次,3%山羊血清4℃封闭1 h,吸净后,予以1:100 GSK-3 β 抗体孵育,4℃过夜,PBS冲洗6次后,加入1:2 000荧光标记鼠抗兔抗体孵育1 h,PBS冲洗6次后封片,于荧光显微镜下观察。

1.6 微管组织中心体(MTOC)实验检测GSK-3 β 抑制剂对MTOC极性的影响

1.6.1 MTOC实验步骤 将Hep3B细胞接种于消毒后的盖玻片上,待细胞长满后,用10 μ l微量移液器枪头在其中划痕,用DMEM培养液冲洗并吸净,分别孵育以含10 μ mol/L NaCl、10 μ mol/L LiCl、20 μ mol/L DMSO、20 μ mol/L SB216763的10%小牛血清的DMEM培养液。16 h后吸净培养液,PBS冲洗2次,4%多聚甲醛4℃固定30 min,PBS冲洗2次后,用0.1% TritonX-100室温下孵育10 min,PBS冲洗2次,3%山羊血清4℃封闭1 h,吸净后,予以1:100 Pericentrin抗体孵育,4℃过夜,PBS冲洗6次后,加入1:2 000荧光标记鼠抗兔抗体孵育1 h,PBS冲洗6次,以1:10 000 Hoechst核染色10 min,PBS冲洗2次后封片,于荧光显微镜下观察。共进行6组实验。

1.6.2 结果统计 MTOC 实验所标记的 pericentrin 蛋白是微管组织中心体的特异成分(红色),利用 Hoechst 染色细胞核(蓝色),并将两个图像融合,以细胞核的中心为顶点,朝向划痕区域作一 120°角,如果 MTOC 分布在该角内,则记为阳性,否则记为阴性。每组取 5 个视野拍照,计数其中阳性细胞百分比。分别以 DMSO 组和 NaCl 组为对照,其余为处理组。实验重复 2 次。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件进行统计

学分析,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 GSK-3β 抑制剂对细胞迁移的影响 由细胞划痕实验结果(图 1)可见,应用 GSK-3 特异性的抑制剂 LiCl 和 SB216763 后,肝癌细胞的迁移能力明显下降,SMC-7721 细胞的相对迁移率分别下降 36.44%和 41.78%(*P*<0.01),Hep3B 细胞的相对迁移率都下降 26.66%(*P*<0.01)。

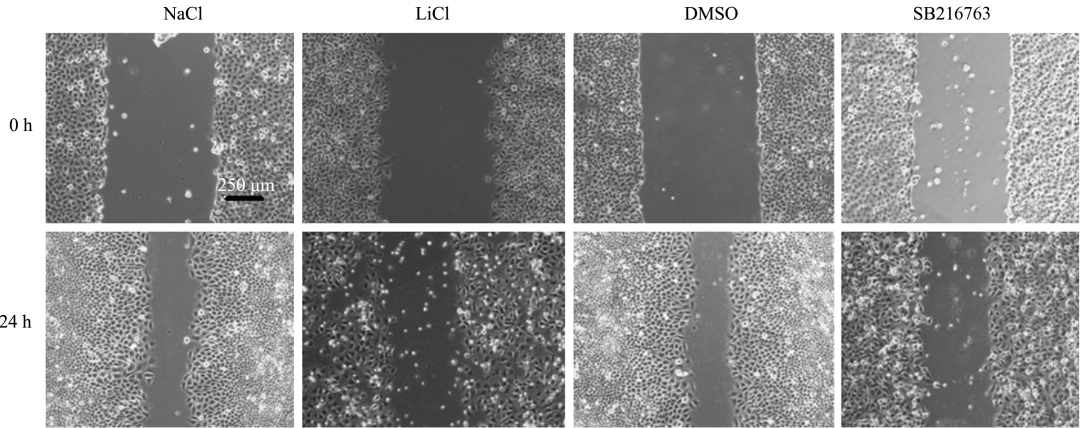


图 1 SMMC-7721 细胞孵育于不同液体的划痕实验

Fig 1 Results of wound healing assay of SMMC-7721 cells incubated with NaCl, LiCl, DMSO, and SB216763

2.2 GSK-3β WT、GSK-3β S9A、GID5-6 对肝癌细胞迁移能力的影响

2.2.1 转染后 GSK-3β 及 pGSK-3β 的表达 蛋白质印迹结果(图 2)显示,转染 GSK-3β WT 后,GSK-3β 表达上调,pGSK-3β 同时增多;转染 GSK-3β S9A 后,GSK-3β 表达上调,但 pGSK-3β 与 GFP 对照组相比变化不明显;转染 GID5-6LP 后,GSK-3β、pGSK-3β 的表达情况与转染 GFP 一致;转染 GID5-6 后,GSK-3β 表达未出现明显变化,pGSK-3β 则明显增多。

GSK-3β S9A、GSK-3β WT、GID5-6LP、GID5-6 质粒本身不具有荧光,故加入 GFP 共转,进行荧光标记(图 3)。转染不同质粒后,SMMC-7721 细胞迁移能力明显下降。对照组中,将转染 GFP 的 SMMC-7721 细胞加入小室后 8 h,约有 50.4%的肝癌细胞穿过纤维膜,进入了纤维膜的下方。将实验结果标准化后发现,处理组中,转染 GSK-3β S9A 和 GID5-6 后,SMMC-7721 细胞相对迁移率分别下降为 38.61%和 36.49%;转染 GSK-3β WT 后,相对迁移率降为 61.27%。

2.3 GSK-3β 抑制剂对肝癌细胞内 pGSK-3β 分布的影响 在正常培养的条件下,肝癌细胞发生迁移 3 h 后,Hep3B 细胞内 pGSK-3β 呈现出在细胞前沿边缘附集的现象,而加入 GSK-3β 的抑制剂 LiCl 后,pGSK-3β 的分布未呈现这种边缘附集的现象(图 4)。

2.4 GSK-3β 抑制剂对肝癌细胞 MTOC 的影响 Hep3B 细胞 MTOC 染色及 Hoechst 染色结果如图 5 所示,未加入抑制剂时,Hep3B 细胞 MTOC 阳性率在 60%以上,其中 DMSO 组为 62.76%,NaCl 组为 61.22%。而应用 GSK-3β 抑制剂后,MTOC 阳性率明显下降,SB216763 组降为 31.17%,LiCl 组降为 29.09%,差异有统计学意义(*P*<0.01)。

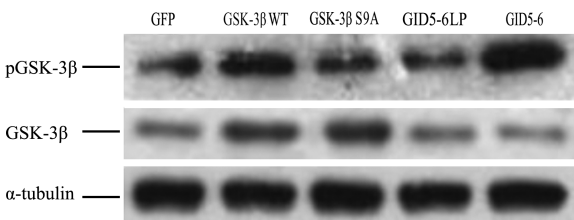


图 2 转染不同质粒后 SMMC-7721 中 GSK-3β 及 pGSK-3β 的表达

Fig 2 Western blotting analysis of GSK-3β and pGSK-3β protein expression in SMMC-7721 cells after transfection with different plasmids

2.2.2 转染后肝癌细胞迁移能力的变化 由于

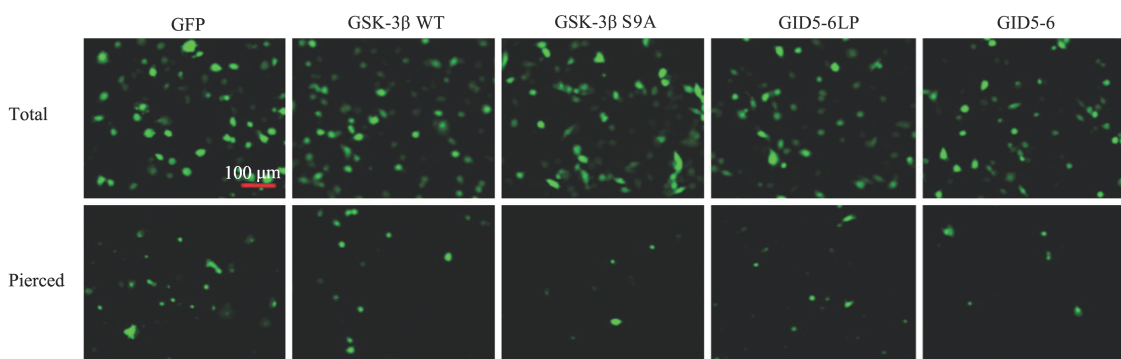


图 3 不同质粒转染后 SMMC-7721 细胞迁移能力的改变

Fig 3 Changes of SMMC-7721 cell migration ability after transfection with different plasmids

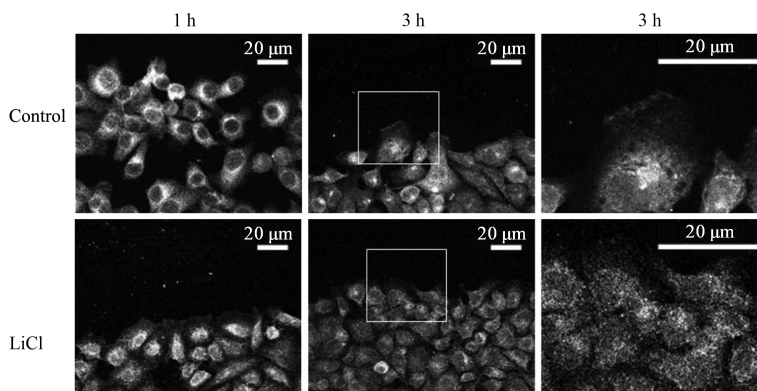
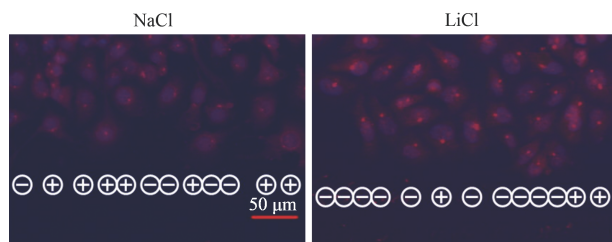
图 4 Hep3B 细胞划痕后 pGSK-3 β 分布的变化Fig 4 Changes of pGSK-3 β distribution in Hep3B cells after scratching

图 5 Hep3B 细胞 MTOC 染色及 Hoechst 染色

Fig 5 MTOC and Hoechst staining of Hep3B cells

3 讨论

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,居恶性肿瘤病死率的第 2 位。了解肝癌细胞的迁移机制对于防治肝癌具有重要意义。肿瘤的转移由一系列独立的生物学过程所组成。首先,肿瘤细胞必须侵入原发灶周围的组织,然后进入淋巴管或血管,在其中得以生存并在适当的条件下附壁,最后从血管或淋巴管中渗出,进入另一组织并继续生长。在侵袭过程中,各种溶解酶破坏肿瘤细胞外基质的同时,肿瘤细胞必须移动进入基质,虽然有组织特异性趋化因子和结合趋化因子能增强肿瘤细胞的运动性,但肿瘤细胞自身的运动也是必不可少的^[7]。早在 1863 年病理学家 Virchow 就提出肿瘤细胞具有阿

米巴样运动,现已被国内外研究者所证实。多数学者观察到,具有侵袭性的肿瘤细胞有较强的运动性,主要表现为伪足样伸展、膜流动性及向量变化等。Mohler 课题组通过体外实验证实肿瘤细胞的运动能力与转移倾向呈正比关系^[8]。肿瘤细胞中一部分具有较强的转移活性的细胞同时具有较强迁移能力和分泌蛋白酶降解细胞外基质的能力,能够顺利侵入肿瘤周边的正常组织中,一方面浸润侵袭正常组织,另一方面,它们有更多的机会侵袭到血管、淋巴管等结构,使肿瘤发生远隔转移^[9]。

本研究发现 GSK-3 β 在肝癌细胞的迁移过程中发挥了重要作用。首先,以 GSK-3 β 的小分子抑制剂 Li⁺ 及 SB216763^[1,4] 处理肝癌细胞,通过细胞划痕实验可以看到, Li⁺ 及 SB216763 可以有效地抑制肝癌细胞的划痕恢复。这与 GSK-3 β 抑制剂对于神经胶质瘤细胞的划痕恢复的影响是一致的^[10]。由于这类抑制剂对于同家族的 GSK-3 α 也具有抑制作用,我们进一步用 GSK-3 β 相关质粒转染肝癌细胞,以更特异性地证明其在肝癌细胞迁移中的作用。GID5-6 为一个能与 GSK-3 β 结合的肽段,与此肽段结合后 GSK-3 β 无法与 Axin 蛋白结合,引起细胞动力学改变,而其对照组中 GID5-6LP 是 GID5-6 变异

体,编码产物对 GSK-3 β 和 Axin 蛋白的结合无影响^[11]。转染 GID5-6 后,GSK-3 β 发生磷酸化,活性下降,细胞迁移能力明显降低。这一系列证据都证明 GSK-3 β 对于肝癌细胞的迁移非常重要。

进一步探讨 GSK-3 β 影响肝癌细胞迁移的机制,我们发现 GSK-3 β 可能是通过影响肿瘤细胞运动时细胞极性建立的影响而作用于细胞迁移。首先,我们发现 GSK-3 β 抑制剂可以影响 MTOC 的转向,这提示细胞的极性被破坏。而我们通过对 GSK-3 β 的 9 位丝氨酸的磷酸化的检测,发现在细胞极性建立过程中,该抑制性磷酸化仅发生在细胞内朝向迁移方向的边缘,这说明 GSK-3 β 的调节是局部的,进一步提示它在细胞极性建立中扮演一定角色。更为重要的是我们将 GSK-3 β WT 和能使 GSK-3 持续激活的 GSK-3 β S9A^[11] 转染肝癌细胞后,发现虽然有活性的 GSK-3 β (即非磷酸化型)表达水平上调了,但转染的细胞迁移能力还是降低了。这说明肝癌细胞的迁移能力并非单纯仅与 GSK-3 β 的活性强弱有关,还可能与其在细胞内的活性分布相关。蒋辉等^[3,11]认为 GSK-3 β 在神经细胞极性发育过程中其分布存在着极性化,它在发放信号的轴突中的活性比接受信号的树突中的活性要低;抑制 GSK-3 β 可使神经细胞长出多个轴突,而增强 GSK-3 β 活性,神经细胞仅能发育出树突,没有轴突。本研究的一系列证据表明,GSK-3 β 可能在肝癌细胞中存在着极性化的不对称分布,这种不对称分布在肝癌细胞的迁移中发挥重要的作用。肝癌细胞利用不对称性地分子调节机制控制其迁移的相关报道尚不多见。

细胞的极性是所有细胞具有的基本特性之一,也影响着细胞的形态、发育、运动等各项功能^[12]。细胞若要进行迁移运动,须在外界趋化因素的影响下,使在细胞内部的分子发生变化,一些蛋白质和离子重新排列,呈现出均匀分布,形成了所谓极性化,获得一种空间上的非对称性,而这种极性化改变所带来的结果就是细胞膜的变化,包括层形足板及足丝的形成^[13]。Sandrine 等^[14]认为,细胞迁移是以一系列细胞前缘(划痕边缘)的形态学改变为开始的,这包括向划痕区域伸展出伪足、细胞向划痕区域拉伸等。本研究进一步证实了癌症细胞在迁移时保守地采用了正常细胞运动中的相关机制。在 MTOC 实验中,我们发现在加入 GSK-3 β 的特异性抑制剂 LiCl 后,划痕边缘细胞的微管组织中心向划痕方向的极性化表现明显减少,有的细胞微管组织中心甚至背向划痕方向移动,呈现出极性化紊乱的现象。部分趋向划痕方向迁移的细胞仍可出现叶状伪足,但出现叶状伪足的细胞数量明显较未加入抑

制剂时少。推测加入 LiCl 后,肝癌细胞发生迁移的方式并未受到影响,而是通过影响细胞内物质的不对称分布,即改变细胞的极性来改变细胞的迁移能力。

目前,GSK-3 已经成为糖尿病及神经退行性疾病的治疗靶点,GSK-3 的一些抑制剂能在 2 型糖尿病以及阿尔茨海默病的细胞及动物模型中起到有效的治疗作用。我们的研究提示 GSK-3 β 在肝癌细胞的迁移中发挥了重要作用,这可能为治疗肝癌提供新的靶点。

[参考文献]

- [1] 毛伟峰,李 佳,袁崇刚. 多功能的蛋白:糖原合成酶激酶-3 [J]. 生命科学,2005,17:45-48.
- [2] 曹 琦,丰有吉. 糖原酶激酶-3 β 活性改变对卵巢癌细胞周期的调节及其对泰素增敏作用的研究[J]. 中华医学杂志,2006,86:1497-1499.
- [3] 蒋 辉. 蛋白激酶 GSK-3 β 控制了神经细胞极性的形成[J]. 中国基础科学,2006,8:8-9.
- [4] Doble B W, Woodgett J R. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase[J]. J Cell Sci,2003,116(Pt 7):1175-1186.
- [5] Erdal E, Ozturk N, Cagatay T, Eksioglu-Deмирalp E, Ozturk M. Lithium-mediated downregulation of PKB/Akt and cyclin E with growth inhibition in hepatocellular carcinoma cells[J]. Int J Cancer,2005,115:903-910.
- [6] Macanas-Pirard P, Yaacob N S, Lee P C, Holder J C, Hinton R H, Kass G E. Glycogen synthase kinase-3 mediates acetaminophen-induced apoptosis in human hepatoma cells[J]. J Pharmacol Exp Ther,2005,313:780-789.
- [7] Steeg P S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenge[J]. Nat Med,2006,12:895-904.
- [8] Rinker-Schaeffer C W, Chekmareva M A, Mohler J L. The role of motility proteins and metastasis-suppressor genes in prostate cancer progression[J]. Stem Cells,1996,14:508-516.
- [9] Khanna C, Hunter K. Modeling metastasis *in vivo* [J]. Carcinogenesis,2005,26:513-523.
- [10] Nowicki M O, Dmitrieva N, Stein A M, Cutter J L, Godlewski J, Saeki Y, et al. Lithium inhibits invasion of glioma cells; possible involvement of glycogen synthase kinase-3 [J]. Neuro Oncol,2008,10:690-699.
- [11] Jiang H, Guo W, Liang X, Rao Y. Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanism: critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators [J]. Cell,2005,120:123-135.
- [12] Etienne-Manneville S, Hall A. Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity [J]. Nature,2003,421:753-756.
- [13] Lauffenburger D A, Horwitz A F. Cell migration: a physically integrated molecular process [J]. Cell,1996,84:359-369.
- [14] Etienne-Manneville S, Hall A. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta [J]. Cell,2001,106:489-498.