

文章编号:1004-7220(2019)02-0133-06

基质刚度对肝癌细胞增殖及糖代谢的影响

刘秋萍, 田博仁, 罗庆, 宋关斌

(重庆大学 生物工程学院, 重庆 400030)

摘要:目的 研究不同基质刚度对肝癌细胞 HepG2 增殖和糖代谢的影响,探究细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)刚度对肝癌细胞代谢和生物学行为影响的相关性。方法 采用 CCK8 和细胞计数法检测培养在不同刚度基质上 HepG2 细胞增殖的变化,利用 2-(N-7-硝基-2,1,3-苯并恶二唑-4-氨基)-2-脱氧-D-葡萄糖 (2-NBDG)并通过流式细胞术检测基质刚度对 HepG2 葡萄糖摄取的影响,利用荧光定量 RT-PCR 检测基质刚度对 HepG2 葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter 1, Glut1)表达的影响,并利用糖酵解抑制剂 2-脱氧葡萄糖 (2-deoxy-D-glucose, 2-DG)阻断糖酵解途径后检测基质刚度对 HepG2 细胞增殖的影响。结果 随基质刚度增加, HepG2 细胞增殖能力、葡萄糖摄取和 Glut1 表达都显著增加。糖酵解途径被阻断后,不同刚度基质上 HepG2 细胞增殖能力基本相同。结论 肝癌细胞所处力学微环境对肝癌细胞的增殖有重要影响;较大的基质刚度可能通过调控糖代谢途径促进肝癌细胞的增殖。研究结果为肝癌的临床治疗以及糖代谢为治疗靶点的药物开发提供相应的实验依据。

关键词:基质刚度; 肝癌细胞; 细胞增殖; 糖代谢; 生物力学

中图分类号: R 381.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2019.02.004

Effects of Matrix Stiffness on Proliferation and Glucose Metabolism of Hepatocellular Carcinoma Cells

LIU Qiuping, TIAN Boren, LUO Qing, SONG Guanbin

(College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: Objective To investigate the influences of different matrix stiffness on proliferation ability and glucose metabolism of hepatocellular carcinoma (HCC) cells and to explore the correlation between metabolism and biological behavior changes of HCC cells resulted from the stiffness of extracellular matrix (ECM). **Methods** The proliferation changes of HepG2 cells cultured on matrix with different stiffness were detected by CCK-8 assay and cell count assay. 2-NBDG and flow cytometry were used to detect the effect of matrix stiffness on glucose uptake. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression level of Glut1. Then, 2-DG was used to inhibit glycolysis, and the influences of matrix stiffness on proliferation of HepG2 cells were detected. **Results** The proliferation ability, glucose uptake and the expression of Glut1 of HepG2 cells increased with the matrix stiffness increasing. When glycolysis was inhibited, the proliferation ability of HepG2 cells grown on matrix with different stiffness was similar. **Conclusions** The mechanical microenvironment had an important effect on proliferation of HCC cells; matrix with a larger stiffness might promote proliferation of HCC cells through regulating glycolysis. The research findings provide a corresponding experimental basis for the clinical treatment of HCC cells and drug development targeting glucose metabolism.

收稿日期:2019-01-15; 修回日期:2019-02-11

基金项目:国家自然科学基金项目(11832008)

通信作者:宋关斌,教授,博士研究生导师, E-mail:song@cqu.edu.cn

Key words: extracellular matrix (ECM); hepatocellular carcinoma (HCC) cell; glucose metabolism; cell proliferation; biomechanics

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)刚度增加是大部分实体瘤的特征^[1-2]。目前,肿瘤微环境的力学因素被认为是在肿瘤发生发展和侵袭转移中起重要作用的因素^[3-4]。研究表明,ECM刚度增加能够促进肿瘤细胞增殖、侵袭、转移和上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)等生物学行为的变化^[5-6]。

代谢重编程是肿瘤细胞的一个典型特征,肿瘤细胞最典型的代谢表型是 Warburg 效应^[7],即细胞在有氧条件下也以糖酵解为主要糖代谢途径提供能量。肿瘤细胞糖代谢途径的改变表现为葡萄糖的大量摄取、高糖酵解速率和核酸合成速率等,这为肿瘤细胞的快速生长和增殖提供了重要的能量和物质基础^[8]。研究发现,肝癌细胞的增殖活性与细胞葡萄糖代谢密切相关,Glut1 在肝癌组织和细胞中的表达与正常肝细胞和非肿瘤组织相比显著增加,并且与增殖呈正相关;干扰 Glut1 表达,则显著抑制肝癌细胞的增殖和迁移能力^[9-10]。

Tilghman 等^[11]研究发现,生长在较硬基质(>10 kPa)上的细胞表现出较短的细胞周期,细胞代谢活性增强,细胞内腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)水平升高。而肿瘤细胞 ATP 供应率和细胞增殖率成正比^[12],提示 ECM 刚度不仅能够影响肿瘤细胞的生物学行为,还可能对其代谢也有调控作用。因此,本文以 HepG2 肝癌细胞为研究对象,考察不同基质刚度对肝癌细胞增殖能力和糖代谢的影响,探究 ECM 刚度引起的肝癌细胞增殖变化与细胞糖代谢之间的相关性,为肝癌的临床治疗提供新思路和理论基础。

1 材料和方法

1.1 主要仪器设备和试剂

CO₂ 细胞培养箱(Thermo Fisher 公司,美国)、倒置相差显微镜(Leica 公司,德国)、蛋白电泳及凝胶成像系统(Bio-Rad 公司,美国)、低温离心机(Eppendorf 公司,德国)、酶标仪(Bio-Rad 公司,美国)、流式细胞仪(BD 公司,美国)、荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司,美国)。

高糖 DMEM 培养基(Gibco 公司,美国)、胎牛血清(HyClone 公司,美国)、BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术有限公司,中国)、CCK8 试剂盒(Dojindo 化学研究所,日本)、2-(N-7-硝基-2,1,3-苯并恶二唑-4-氨基)-2-脱氧-D-葡萄糖(2-NBDG; Apexbio 公司,美国)、2-脱氧葡萄糖(2-DG; MCE 公司,美国)、丙烯酰胺(索莱宝公司,中国)、甲叉双丙烯酰胺(索莱宝公司,中国)、过硫酸铵(索莱宝公司,中国)、N, N, N', N'-四甲基乙二胺(TEMED; Thermo Fisher 公司,美国)、Sulfosuccinimidyl 6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino) hexanoate (sulfo-SANPAH; Thermo Fisher 公司,美国)、鼠尾胶原(生友生物技术有限公司,中国)、RNA 提取试剂盒(百泰克公司,中国)、反转录试剂盒(Takara 公司,日本)、SYBR Premix Ex Taq II(Takara 公司,日本)、兔抗人 Actin 抗体(博奥森生物技术有限公司,中国)、兔抗人 Glut1 抗体(Cell Signaling Technology 公司,美国)、山羊抗兔 IgG 抗体(中杉金桥生物技术有限公司,中国)。

1.2 细胞培养

人肝癌细胞系 HepG2,由中国人民解放军第三军医大学基础部提供。细胞复苏后,采用高糖 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素)于 37 °C、5% CO₂、95% 空气饱和湿度细胞培养箱中进行常规培养。每隔 2~3 d 传代 1 次,待细胞处于对数生长期时用于实验。

1.3 不同刚度基质胶制备及弹性模量测定^[13]

制备 2% N, N'-亚甲基双丙烯酰胺、40% 丙烯酰胺;按比例向烧杯中加入 2% N, N'-亚甲基双丙烯酰胺、40% 丙烯酰胺, dH₂O 定容至 10 mL;再向溶液中加入 10% 过硫酸铵 50 μL, TEMED 5 μL,充分混匀确保无气泡后加入硅板下方,室温凝固 40 min;凝胶固化后使其吸水溶胀,多次换水析出未固化单体;将水凝胶切成所需形状放入孔板,用 0.1 mg/mL 交联剂 sulfo-SANPAH 处理,然后用 0.1 mg/mL 鼠尾 I 型胶原包被,孵箱放置过夜, PBS 清洗 1~2 遍即可用于培养细胞。

水凝胶受到外力拉伸去除外力后可恢复到自

重拉伸状态,表明水凝胶为完全弹性体。使用自重拉伸法测定不同配比聚丙烯酰胺水凝胶(PA水凝胶)的弹性模量,其计算公式为:

$$E = \frac{G/A}{\Delta L/L}$$

式中: G 为对水凝胶施加的拉力; A 为水凝胶自重状态宽度; L 为水凝胶自重状态长度; ΔL 为水凝胶拉伸长度。

1.4 细胞增殖分析

CCK-8试剂盒检测细胞增殖能力:取对数生长期的细胞以 3×10^4 /mL接种于铺有不同刚度PA水凝胶的24孔板中,每组设立3个复孔,48 h后去除旧培养基,将CCK-8试剂:培养基=1:10比例混合,按照每孔400 μ L加入,37 $^{\circ}$ C孵育1 h后用酶标仪在450 nm波长处测定其吸光度(OD)值。

细胞计数法检测细胞增殖:取对数生长期的细胞以 5×10^4 /mL接种于铺有不同刚度PA水凝胶的6孔板中,每组设立3个复孔,48 h后去除旧培养基,0.25%胰蛋白酶消化制成细胞悬液,对每孔细胞进行计数。

1.5 葡萄糖摄取实验

取对数生长期细胞以 5×10^4 /mL接种于铺有不同刚度PA水凝胶的6孔板中,每组设立3个复孔,培养48 h后去除培养基,PBS洗3次,加入200 μ mol/L的2-NBDG在37 $^{\circ}$ C孵育20 min,PBS洗3次,0.25%胰蛋白酶消化后收集细胞,流式细胞仪检测分析每组细胞荧光强度的变化情况。

1.6 实时荧光定量PCR检测Glut1 mRNA表达

在不同刚度基质上培养HepG2细胞后,利用实时荧光定量PCR检测细胞中Glut1的表达情况。按照RNA提取试剂盒的操作方法提取细胞总RNA,按照反转录试剂盒的操作方法合成cDNA。以反转录后的cDNA为模板检测Glut1 mRNA水平的表达。利用Primer Premier 5.0设计Glut1和内参

β -Actin引物,并由华大基因合成。Glut1引物序列:上游引物GCGGGTTGTGCCATACTCATGACC,下游引物AGGCCACAAAGCCAAAGATGGCC。 β -Actin引物序列:上游引物AAAGACCTGTACGCCAACAC,下游引物GTCATACTCCTGCTTGCTGAT。

反应体系:SYBR[®]Premix Ex Taq 10 μ L,双蒸水7.2 μ L,上下游引物各0.4 μ L,cDNA 2 μ L。PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,62 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共40个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算Glut1 mRNA水平相对表达量。

1.7 糖酵解抑制实验

取对数生长期的细胞接种于铺有不同刚度PA水凝胶的24或6孔板中,4 h后加入浓度为10 mmol/L的2-DG进行处理,48 h后进行CCK-8或者细胞计数实验。

1.8 细胞铺展面积分析

取对数生长期的细胞以 3×10^4 /mL接种于铺有不同刚度PA水凝胶的24孔板中,每组设立3个复孔。24 h后用倒置显微镜随机拍照。用Image J软件分析不同刚度聚丙烯酰胺水凝胶上单个细胞的投影面积,每个刚度至少选取30个细胞用于测量。

1.9 数据分析

所有数据均以均数 \pm 标准差表示,显著性差异通过双尾非配对 t 检验分析组间均数所决定。使用SPSS 17.0软件进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 建立不同基质刚度细胞培养模型

通过调整丙烯酰胺和N,N'-亚甲基双丙烯酰胺的比例,制备不同刚度的聚丙烯酰胺水凝胶,并测定其弹性模量。选择3种不同弹性模量(6、25、54 kPa)的聚丙烯酰胺水凝胶分别模拟正常肝组织、肝硬化组织和肝癌组织的刚度。这3种弹性模量10 mL体系溶液配比如表1所示。

表1 不同比例丙烯酰胺和N,N'-亚甲基双丙烯酰胺制备不同弹性模量水凝胶($n=3$)

Tab.1 Hydrogels with different elastic modulus were prepared by acrylamide and N, N'-methylene diacrylamide with different ratios

40% 丙烯酰胺/mL	2% 双丙烯酰胺/mL	水/mL	APS/ μ L	TEMED/ μ L	弹性模量/kPa	St.Dev.
2.5	0.15	7.35	50	5	5.9	2.227 854
2.5	0.65	6.85	50	5	24.8	2.821 938
2.5	1.50	6.00	50	5	53.4	4.119 871

以相同密度将 HepG2 细胞接种在 6、25、54 kPa 聚丙烯酰胺水凝胶上, 24 h 后细胞的形态和铺展面积如图 1 所示。HepG2 细胞在弹性模

量较大的基质上细胞铺展面积大, 而在弹性模量较小的基质上生长的细胞铺展面积较小, 形状接近圆形。

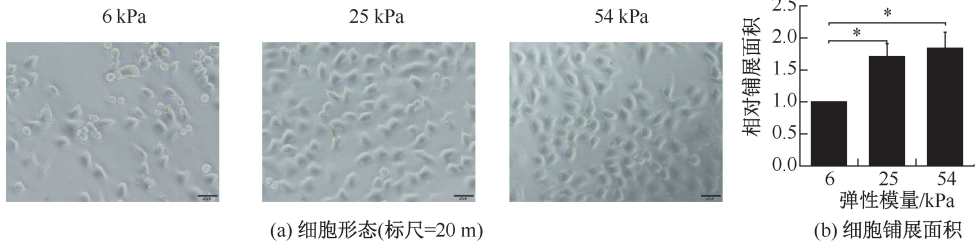


图 1 不同刚度基质 HepG2 细胞生长情况 (* $P < 0.05$, $n = 3$)

Fig.1 HepG2 cell growth on matrix with different stiffness (a) Cell morphology, (b) Cell spreading area

2.2 基质刚度对 HepG2 细胞增殖能力的影响

为了探究基质刚度对肝癌细胞增殖的影响, 采用 CCK8 和细胞计数法检测不同刚度基质上培养 HepG2 细胞对其增殖的影响。结果显示, 随基质刚度的增加, 其增殖能力也显著增加(见图 2)。

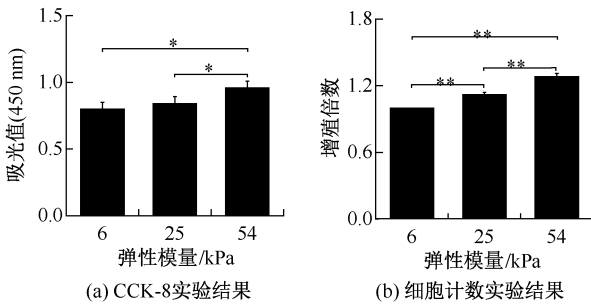


图 2 基质刚度对 HepG2 细胞增殖的影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$)

Fig.2 Effects of matrix stiffness on proliferation of HepG2

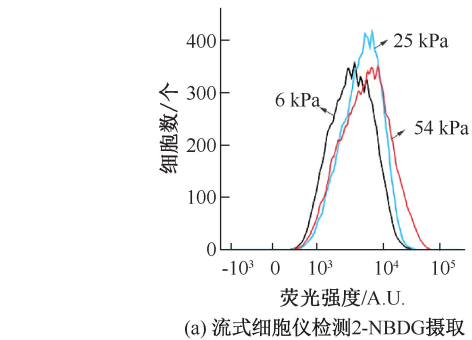
(a) CCK-8 assay results, (b) Cell count assay results

2.3 基质刚度对 HepG2 细胞葡萄糖摄取和 Glut1 表达的影响

利用 2-NBDG 检测基质刚度对 HepG2 细胞葡萄糖摄取能力的影响。流式细胞仪结果表明, 随基质刚度增加, 2-NBDG 摄取显著增加。利用实时荧光定量 PCR 检测基质刚度对糖酵解关键酶 Glut1 表达的影响。结果显示, 随基质刚度增加, Glut1 mRNA 水平表达显著增加(见图 3)。

2.4 抑制糖酵解后基质刚度对 HepG2 细胞增殖的影响

CCK8 和细胞计数法检测 2-DG 处理抑制糖酵解途径后基质刚度对 HepG2 细胞增殖的影响。结



(a) 流式细胞仪检测 2-NBDG 摄取

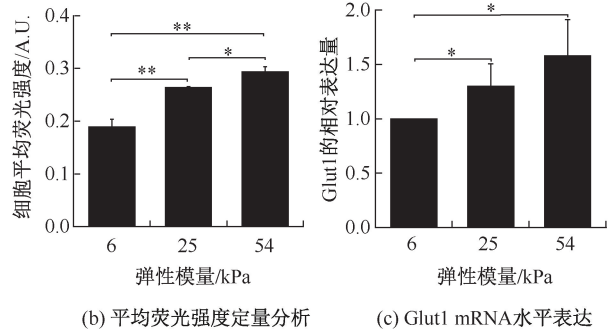


图 3 基质刚度对 HepG2 细胞葡萄糖摄取的影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$)

Fig.3 Effects of matrix stiffness on glucose uptake and Glut1 expression of HepG2 (a) Glucose uptake indicator 2-NBDG detected by flow cytometry, (b) Quantitative analysis of mean fluorescence intensity, (c) Glut1 mRNA expression

果显示, 不同刚度基质上 HepG2 细胞增殖能力基本没有差异(见图 4)。

3 讨论与结论

癌细胞转移能力是其恶性程度的标志之一, 细

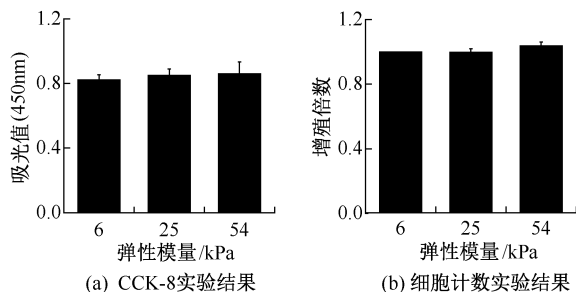


图4 抑制糖酵解后基质刚度对 HepG2 细胞增殖的影响 ($n=3$)

Fig.4 Effects of matrix stiffness on proliferation of HepG2 cells after glycolysis inhibition (a) CCK-8 assay results, (b) Cell count assay results

胞通过增殖或是迁移两种形式使得它们发生转移^[14]。Schrader 等^[15]研究发现,在较硬基质(12 kPa)上培养的 Huh7 和 HepG2 细胞与较软基质(1 kPa)上培养的细胞相比,增殖能力都显著增加。本文研究结果表明,在较硬基质上 HepG2 细胞的增殖能力增强;ECM 刚度增加可能在肝癌发展中具有重要作用。

Otto Warburg 效应指出,即使在氧气充足的条件下,增殖活跃的肿瘤细胞依然会依赖于糖酵解供能,将摄取的大部分葡萄糖转化为乳酸^[16]。ECM 力学特性与代谢之间的关系在很大程度上仍然未知。本文考察了基质刚度对 HepG2 细胞糖代谢的影响。通过流式细胞仪检测不同刚度基质上培养的 HepG2 细胞对 2-NBDG 摄取和实时荧光定量 PCR 实验发现,随基质刚度增加,葡萄糖摄取量增加,并且 Glut1 的表达增加。本实验结果表明,基质刚度参与调控肝癌细胞的糖代谢。

目前大多数研究认为,癌基因和抑癌基因的突变导致细胞内多个信号通路的改变,这些信号通路影响肿瘤细胞的新陈代谢,并促进肿瘤生存和生长。有趣的是,许多致瘤信号通路由 ECM 变硬激活^[17]。例如,PI3K/AKT 是调控肿瘤的有氧糖酵解的重要途径^[18-20],并影响细胞增殖;而 ECM 的刚度增加会激活 PI3K 途径,增强乳腺肿瘤恶性^[21]。因此,ECM 的力学信号或许通过调控癌细胞代谢进而影响其生物学行为。为探究基质刚度、糖代谢和增殖之间的联系,本文使用 2-DG 抑制糖酵解后,考察基质刚度对 HepG2 细胞增殖能力的影响。通过 CCK-8 和细胞计数实验发现,抑制糖酵解后不同基

质刚度对 HepG2 细胞的增殖基本没有影响。本实验结果表明,基质刚度增加,促进 HepG2 细胞的增殖,并依赖于其糖酵解活性的增强。

综上所述,基质刚度增加能够促进 HepG2 细胞增殖,并且依赖于其糖酵解活性。研究结果为肝癌的临床治疗以及糖酵解代谢为治疗靶点的药物开发提供相应的实验依据。

参考文献:

- [1] CROTTI S, PICCOLI M, RIZZOLIO F, et al. Extracellular matrix and colorectal cancer: How surrounding microenvironment affects cancer cell behavior? [J]. J Cell Physiol, 2017, 232(5): 967-975.
- [2] BISSELL MJ, HINES WC. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression [J]. Nat Med, 2011, 17(3): 320-329.
- [3] SCHOEPP NG, KHOROSHEVA EM, SCHLAPPI TS, et al. Forcing through tumor metastasis: The interplay between tissue rigidity and epithelial-mesenchymal transition [J]. Trends Cell Bio, 2017, 55(33): 9557-9561.
- [4] 冯西桥,薛时磊,李博,等. 肿瘤力学生物学[J]. 医用生物力学, 2018, 33(S): 61-73.
- [5] FENG XQ, XUE SL, LI B, et al. Mechnobiology of tumors [J]. J Med Biomech, 2018, 33(S): 61-73.
- [6] 杨本艳姿,王红兵,谭乔燕,等. 不同基底硬度对人肝癌细胞黏附、铺展和迁移的影响[J]. 医用生物力学, 2012, 27(3): 305-311.
- [7] YANG BYZ, WANG HB, TAO QY, et al. Effects of different substrate stiffness on adhesion, spreading and migration of human hepatocellular carcinoma cells [J]. J Med Biomech, 2012, 27(3): 305-311.
- [8] 谭乔燕,王红兵,杨本艳姿,等. 基底硬度对肝细胞与肝癌细胞迁移行为的影响[J]. 医用生物力学, 2011, 26(6): 566-573.
- [9] TAN QY, WANG HB, YANG BYZ, et al. Effects of substrate stiffness on the migration of hepatic and hepatoma carcinoma cells [J]. J Med Biomech, 2011, 26(6): 566-573.
- [10] WARBURG O. The metabolism of tumors in the body [J]. J Genl Physiol, 1927, 8(6): 510-530.
- [11] CAIRNS RA, HARRIS IS, MAK TW. Regulation of cancer cell metabolism [J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(1): 85-95.
- [12] KITAMURA K, HATANANO E, HIGASHI T, et al. Proliferative activity in hepatocellular carcinoma is closely correlated with glucose metabolism but not angiogenesis [J]. J Hepatol, 2011, 55(4): 846-857.
- [13] AMANN T, MAEGDEFRAU U, HARTMANN A, et al.

- GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis [J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(4): 1544-1552.
- [11] TILGHMAN RW, BLAIS EM, COWAN CR, *et al.* Matrix rigidity regulates cancer cell growth by modulating cellular metabolism and protein synthesis [J]. *PloS One*, 2012, 7(5): e37231.
- [12] SCHMIDT H, SIEMS W, MULLER M, *et al.* ATP-producing and consuming processes of Ehrlich mouse ascites tumor cells in proliferating and resting phases [J]. *Exp Cell Res*, 1991, 194(1): 122-127.
- [13] 罗春花. 人胚胎干细胞(hESCs)的生长与分化调控[D]. 重庆: 重庆大学, 2016.
- [14] ZHENG X, CARSTENS JL, KIM J, *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer [J]. *Nature*, 2015, 527(7579): 525-530
- [15] SCHRADER J, GORDON-WALKER TT, AUCOTT RL, *et al.* Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Hepatology*, 2011, 53(4): 1192-1205.
- [16] WEINHOUSE S, WARBURG O, BURK D, *et al.* On respiratory impairment in cancer cells [J]. *Science*, 1956, 124(3215): 267-272.
- [17] TUNG JC, BARNES JM, DESAI SR, *et al.* Tumor mechanics and metabolic dysfunction [J]. *Free Radical Bio Med*, 2015, 79: 269-280
- [18] ELSTROM RL, BAUER DE, BUZZAI M, *et al.* Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3892-3899.
- [19] FAN Y, DICKMAN KG, ZONG WX. Akt and c-Myc differentially activate cellular metabolic programs and prime cells to bioenergetic inhibition [J]. *J Bio Chem*, 2010, 285(10): 7324-7333.
- [20] ROBEY RB, HAY N. Is Akt the “Warburg kinase”? Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis [J]. *Semin Cancer Bio*, 2009, 19(1): 25-31.
- [21] LEVENTAL KR, YU H, KASS L, *et al.* Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling [J]. *Cell*, 2009, 139(9): 891-906.