

doi:10.11816/cn.ni.2020-193214



· 论 著 ·

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

HCV 感染患者 TGF- β 与肝癌的关系

郭丽¹, 赵虹², 张俊涛², 刘志贞², 董秀山³, 于保锋²

(1. 临汾职业技术学院基础医学教研室, 山西 临汾 041000; 山西医科大学生物化学与分子生物学教研室, 山西 太原 030001; 3. 山西医科大学附属山西白求恩医院普外科, 山西 太原 030032)

摘要: **目的** 探究慢性丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)感染通过转化生长因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β)对肝癌细胞侵袭性的影响。**方法** 选取2016年6月—2018年6月于山西医科大学附属山西白求恩医院就诊的肝癌患者68例,根据其是否被HCV感染,分为感染组($n=21$)和对照组($n=47$)。采用实时荧光定量法对血清TGF- β 进行检测;通过体外细胞侵袭实验和迁移实验分别研究TGF- β 对HepG2细胞细胞侵袭、迁移能力的影响。**结果** 感染组患者血清TGF- β 水平为(461.72 ± 24.96)mg/L 高于对照组(198.54 ± 18.10)mg/L ($P < 0.001$);感染组的侵袭细胞个数为(97.69 ± 14.52)个多于对照组(43.28 ± 8.95)个 ($P < 0.001$);感染组的迁移细胞个数为(109.85 ± 13.64)个为多于对照组的(51.30 ± 8.27)个 ($P < 0.001$)。**结论** HCV病毒感染通过TGF- β 促进肝癌细胞的侵袭性。

关键词: 慢性丙型肝炎病毒; 转化生长因子- β ; 肝癌细胞; 侵袭性

中图分类号: R512.6⁺3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-4529(2020)19-2918-04

Correlation between TGF- β and liver cancer of HCV infection patients

GUO Li*, ZHAO Hong, ZHANG Jun-tao, LIU Zhi-zhen, DONG Xiu-shan, YU Bao-feng

(* Linfen Vocational and Technical College, Linfen, Shanxi 041000, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To explore the effects of chronic hepatitis C virus (HCV) infection on invasiveness of liver cancer cells through transforming growth factor- β (TGF- β). **METHODS** A total of 68 patients with hepatocellular carcinoma (HCC) who were treated in Shanxi Bethune Hospital Affiliated to Shanxi Medical University from Jun. 2016 to Jun. 2018 were selected and divided into infection group ($n=21$) and control group ($n=47$) according to presence or absence of HCV infection. The serum TGF- β was detected by real-time fluorescence quantification methods. The effects of TGF- β on invasion and migration of HepG2 cells were studied by in vitro cell invasion and migration experiments. **RESULTS** The level of serum TGF- β in infection group was (461.72 ± 24.96) mg/L, significantly higher than that in control group (198.54 ± 18.10 mg/L) ($P < 0.001$). The number of invaded cells in the infection group was (97.69 ± 14.52), significantly more than that in control group (43.28 ± 8.95) ($P < 0.001$). And the number of migrating cells in the infection group was (109.85 ± 13.64), significantly more than that in control group (51.30 ± 8.27) ($P < 0.001$). **CONCLUSION** HCV infection can promote invasiveness of liver cancer cells through TGF- β .

Key words: Chronic hepatitis C virus; Transforming growth factor- β ; Liver cancer cell; Invasion

肝细胞肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)简称为肝癌,是国内外临床最常见的恶性肿瘤,每年

约有782 500的新发病例,并且该病的病死率较高,在恶性肿瘤中居第2位,且仍呈上升趋势,严重影响人们的身体健康和生命安全^[1]。引起肝癌的主要原因是慢性肝炎病毒的感染,而慢性丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)感染是其中的一种^[2]。在被HCV感染人群中,仅约20%能自然清除,而剩下的将会发展成为慢性HCV感染,更甚者会发展为慢性进行性肝病,包括肝癌、肝硬化等,严重影响

收稿日期:2020-04-25; 修回日期:2020-07-20

基金项目:山西省国际科技合作基金资助项目
(201703D421023)

通讯作者:于保锋, E-mail: shanxiyangcheng@126.com

作者简介:郭丽(1976—),女,硕士,副教授,研究方向:生物化学与分子生物学

人们的生活质量和生命安全^[3]。目前,许多学者虽然在 HCV 引起肝癌的研究中取得了一定的进展,但具体的发病机制尚不完全清楚。HCV 存在于细胞基质中,不能引起插入突变,同时也未检测出明确的致癌基因,有研究^[4]表明,HCV 可能是通过持续感染而引起机体慢性炎症反应,进而促进患者发生肝癌;或是宿主细胞蛋白与 HCV 编码产生的蛋白之间的相互作用,使机体的细胞增殖、凋亡、信号转导等一系列细胞生命活动发生改变,促进肝癌的发生与发展。转化生长因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β)又有研究^[5-6]显示,TGF- β 可促进癌症的发生与发展。因而,推测 HCV 病毒与 TGF- β 间可能存在一定的相关性,HCV 病毒可能是通过促进 TGF- β 的表达,进而促进肝癌的发生与发展,值得深入研究。因此本研究主要是探究 HCV 病毒感染与 TGF- β 之间的关系,观察其对肝癌细胞侵袭作用的影响,旨在为肝癌的临床治疗提供新的思路。

1 对象与方法

1.1 对象 选取 2016 年 6 月—2018 年 6 月于山西医科大学附属山西白求恩医院就诊的肝癌患者 68 例为研究对象,根据其是否有 HCV 感染,分为感染组 21 例和对照组 47 例,感染组为 HCV 感染的肝癌患者,对照组为无 HCV 感染的肝癌患者。本研究获得医院伦理委员会批准。

1.2 纳入与排除标准 纳入标准:(1)参照中国抗癌协会肝癌专业委员会制定的诊断标准^[7],两组患者均确诊为肝癌。(2)经过实验室诊断,感染组为 HCV 感染的肝癌患者,对照组为无 HCV 感染的肝癌患者。(3)未进行过相关手术或药物治疗的患者。(4)患者或其家属签订知情同意书。排除标准:(1)合并患有其他恶性肿瘤的患者。(2)患有严重感染性疾病的患者。(3)患有自身免疫缺陷性疾病的患者。(4)心、肝、肾等功能严重不全的患者。

1.3 方法

1.3.1 两组患者血清 TGF- β 的检测 在所有患者被纳入研究后的第 1 天清晨,分别抽取其空腹肘静脉血 4 ml,置于 EP 管内,在常温下静置 1 h,然后采用离心法分离出血清,置于干燥试管内,于 -80 °C 保存待测。然后使用 TGF- β ELISA 试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司)对血清 TGF- β 进行检测。

1.3.2 细胞的培养与转染 选用 DMEM 培养基培养人肝癌细胞系 HepG2(美国 Gibco 公司),其中该培养基中含有 100 U/ml 的链霉素、100 U/ml 的青霉素和 10% 的胎牛血清。在 6 孔板中接种对数

生长期的细胞,然后培养过夜,等到细胞贴壁后即开始转染。采用 ipofeetamine 2000 转染试剂盒(美国 invitrogen 公司)进行转染,操作步骤严格按说明书进行,并且转染后采用反转录 PCR(Reverse transcription PCR, RT-PCR)评估转染效果。

1.3.3 Transwell 小室法检测细胞的侵袭与迁移 将转染的两组 HepG2 细胞调整为 5×10^5 个/ml 的细胞悬液,并将其加入到铺好 Matrigel 凝胶(美国 BD 公司)的 Transwell 上室中。然后将不含胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液 100 μ l 加入到上室中,将含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液 500 μ l 加入到下室中(RPMI 1640 完全培养基:上海圻明生物科技有限公司),每组均为 3 个复孔。将其置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 48 h,然后取出小室,采用棉签将小室上层的 Matrigel 凝胶和未迁移细胞轻轻擦除,采用无水乙醇将其固定 15 min,采用结晶紫将其固定 20 min,然后采用 PBS 清洗、翻转和晾干,最后在显微镜下(400 倍)进行观察,并且每个小室任选 5 个视野,计数高倍视野下细胞数,然后取其平均值。迁移性试验与侵袭性试验步骤基本相同,不同之处为迁移实验使用的 Transwell 上室不用铺 Matrigel 凝胶。

1.4 统计分析 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 *t* 检验;计数资料以例数或百分比表示,采用 χ^2 检验;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者基本情况 两组患者性别、年龄、肝癌分期等临床资料,差异无统计学意义,具有可比性,见表 1。

表 1 两组肝癌患者临床资料

Table 1 Clinical data of two groups of patients with liver cancer

临床资料	感染组 (<i>n</i> = 21)		对照组 (<i>n</i> = 47)	
	例数	百分比	例数	百分比
性别(例)	男	14	31	0.003
	女	7	16	0.954
年龄(岁)		43.57 ± 5.21	44.02 ± 4.89	0.206
肝癌分期(例)	I	4	9	3.195
	II	6	14	
	III	8	17	
	IV	3	7	

2.2 两组患者血清 TGF- β 水平 感染组患者血清 TGF- β 水平为 (461.72 ± 24.96) mg/L,对照组患者血清 TGF- β 水平为 (198.54 ± 18.10) mg/L;感染

组患者的血清 TGF β 水平高于对照组, 差异有统计学意义 ($t=49.094, P<0.001$)。

2.3 TGF- β 对 HepG2 细胞侵袭能力的影响 感染组的侵袭细胞数为 (97.69 ± 14.52) 个, 对照组的侵袭细胞数为 (43.28 ± 8.95) 个; 感染组的侵袭细胞个数显著多于对照组, 差异有统计学意义 ($t=18.945, P<0.001$), 见图 1。

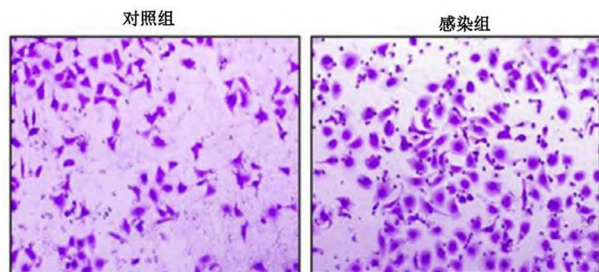


图 1 两组肝癌患者 TGF- β 对 HepG2 细胞侵袭能力的影响 ($\times 400$)

Figure 1 Effects of TGF- β on invasion ability of HepG2 cells in two groups of patients with liver cancer ($\times 400$)

2.4 TGF- β 对 HepG2 细胞迁移能力的影响 感染组的迁移细胞数为 (109.85 ± 13.64) 个, 对照组的迁移细胞数为 (51.30 ± 8.27) 个; 感染组的迁移细胞个数多于对照组, 差异有统计学意义 ($t=21.868, P<0.001$), 见图 2。

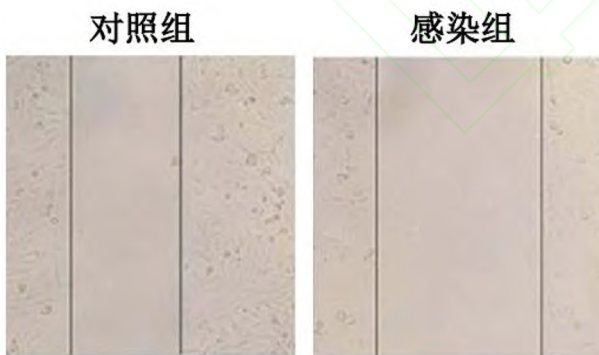


图 2 两组肝癌患者 TGF β 对 HepG2 细胞迁移能力的影响 ($\times 400$)

Figure 2 Effects of TGF β on migration ability of HepG2 cells in two groups of patients with liver cancer ($\times 400$)

3 讨论

肝癌的起病较为隐匿, 且进展迅速, 在大多数患者发现并确诊时, 已错过最佳治疗时间, 并有超过一半的患者在治疗后会复发, 而肝癌细胞的侵袭和迁

移是导致复发和治疗失败的重要原因之一^[8]。因此研究肝癌细胞的侵袭和迁移能力, 对临床治疗有一定的指导意义。HCV 感染是导致肝癌发生的重要原因之一, 但 HCV 是一种 RNA 病毒, 与 DNA 病毒比较, 该病毒不与宿主基因整合, 也无逆转录酶活性, 其一切生命活动仅在细胞质中进行, 自身也未携带明确致癌基因, 因此其对肝癌的作用机制尚不完全清楚, 值得深入研究^[9-10]。慢性炎症反应是引发肝癌的重要因素, 而炎症反应则是通过分泌多种炎症因子加快反应进程, 使病情加重, TGF- β 是其中常见的一种炎症因子^[11-12]。因此本研究主要探讨 HCV 与 TGF- β 之间的关系, 以及其对肝癌细胞侵袭和迁移的影响, 旨在提高临床治疗疗效。

研究^[13]发现肝癌患者的血清 TGF- β 水平高于健康人, 当机体发生肝癌时, 其血清 TGF- β 水平升高。提示 TGF- β 水平是引发肝癌的影响因素之一, 其水平越高, 则机体发生肝癌的概率越高。而在本研究中, HCV 感染的肝癌患者血清 TGF- β 水平高于对照组, 该结果提示 HCV 可能是通过上调 TGF- β 水平, 使机体发生肝癌。TGF- β 是调节细胞生长和分化的 TGF- β 超家族中的一员, 其生物学功能非常广泛, 参与机体的多种病理反应过程^[14-15]。在肿瘤患者中, TGF- β 能刺激肿瘤细胞的生长、分化以及凋亡, 并抑制机体的免疫反应, 是一种促癌因子^[16-17]。在发生炎症反应的患者中, 机体通过释放和分泌 TGF- β , 加快反应进程, 因此其水平越高, 则表明患者的炎症反应越严重^[18]。而 HCV 病毒感染是一种慢性炎症反应, 从慢性感染逐渐发展成为肝癌。其中当机体发生感染时, 其血清 TGF- β 水平将显著升高; 而患者从慢性感染发展成为肝癌, 其肿瘤细胞将会生长、分化和凋亡。因此, HCV 感染可能是通过上调血清 TGF- β 的表达, 导致肝癌发生。因此在临床治疗时, 可通过下调血清 TGF- β 水平, 抑制机体的炎症反应和肝癌细胞生长, 从而达到临床效果。

HCV 感染所引起的肝癌的病因较为复杂, 发病机制不明显, 但肝癌细胞的侵袭和迁移是肝癌的必经过程, 有研究^[19-20]表明, 肝癌细胞的侵袭和迁移等生物行为是影响肝癌的发生、发展以及预后的重要因素。在本研究中, HCV 感染的肝癌患者的细胞侵袭和转移数目明显多于对照组, 该研究结果表明, HCV 感染的肝癌患者的侵袭和迁移能力高于对照组, 提示 TGF- β 可能是通过促进肝癌细胞的侵袭和迁移, 进而使患者的病情复发或恶化。因此, 在临床治疗时可通过降低血清 TGF- β 水平, 使临床治疗效

果更佳,同时在预后过程中,也要密切关注患者血清 TGF- β 水平,若其水平发生显著变化,则采取相应的措施使其水平恢复正常,减少肝癌患者的复发率。

综上所述,HCV 感染通过上调 TGF- β 水平,促进肝癌细胞的侵袭。因此,对于 HCV 病毒感染的肝癌患者,在临床治疗以及预后中,可通过下调其 TGF- β 水平,抑制肝癌细胞的生长、分化、侵袭以及迁移等,提高临床有效率和改善患者的生存质量。但本研究仍然存在一些不足之处,本研究检测了侵袭和迁移的细胞数目,但尚未深入探究影响肝癌细胞侵袭及迁移的相关机制,在后续的研究中将使用 TGF- β 抑制剂作用于癌细胞,并检测侵袭和迁移相关蛋白的表达相关信号通路表达情况,对 HCV 病毒感染后促进肝癌细胞的侵袭的机制深入分析和探讨。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A, *et al.* Cancer statistics, 2017 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 7-30.
- [2] 庄海珍, 苏光扬, 林秉滔, 等. 慢性丙型肝炎患者血清抗-HCV 和 HCV-RNA 与肝功能指标变化的临床意义[J]. *中华医院感染学杂志*, 2019, 29(19): 2886-2889.
- [3] 严丽波, 唐红. 乙型肝炎病毒/丙型肝炎病毒合并感染的研究进展[J]. *中华肝脏病杂志*, 2019, 27(6): 468-472.
- [4] 周亚莉. HCV NS3 蛋白通过增强 PPM1A 的泛素-蛋白酶体途径降解促进肝癌发展的机制研究[D]. 华中科技大学, 2017.
- [5] 石波云, 周新科, 何璐, 等. TGF- β 受体 1 在肝癌组织中的表达及意义[J]. *广东医学*, 2015, 36(15): 2397-2399.
- [6] Calvisi DF, Pascale RM, Feo F, *et al.* Epidermal growth factor-like repeats and discoidin I like domains 3: a multifaceted oncoprotein at the crossroad of MAPK and TGF-beta pathways in human hepatocellular carcinoma[J]. *Transl cancer Res*, 2016, 5(2): 103-109.
- [7] 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准[J]. *肿瘤防治研究*, 2003, 29(1): 83.
- [8] Pearson H, Knisely AS, Deheragoda M, *et al.* Treatment of metastatic hepatocellular carcinoma in pediatric patients: two case reports[J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2018, 35(1): 90-94.
- [9] Schutte K, Balbisi F, Malferttheiner P. Prevention of hepatocellular carcinoma[J]. *Gastrointest Tumors*, 2016, 3(1): 37-43.
- [10] 葛藤, 李云峰, 马旭, 等. MiRNA 在丙型肝炎病毒感染中的机制研究进展[J]. *口岸卫生控制*, 2019, 12(3): 6-9.
- [11] 伍超. 复方芪参提取物经 TGF- β /T β R/Smad2/3 抗肝纤维化-肝癌作用机制研究[D]. 安徽医科大学, 2015.
- [12] Dituri F, Mazzocca A, Fernando J, *et al.* Correction; differential inhibition of the TGF- β signaling pathway in HCC cells using the small molecule inhibitor LY2157299 and the D10 monoclonal antibody against TGF- β receptor type II[J]. *Plos One*, 2016, 8(6): e67109.
- [13] 蔡宗发, 邵孔健. 炎症相关因子 IL-1 β 、TGF- β 及 MCP-1 在肝细胞肝癌中的表达变化[J]. *中外医学研究*, 2017, 15(25): 60-62.
- [14] Zhang Q, Huang F, Yao YL, *et al.* A interaction of TGF- β -Smads/miR-362-3p/CD82 mediated by M2 macrophages promotes the process of EMT in HCC cells[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(2): 35-39.
- [15] 沈艺南. TGF- β 诱导 Treg 细胞极化进而调控肝细胞癌的发展[D]. 第二军医大学, 2015.
- [16] Huang J, Qiu M, Wan L, *et al.* TGF- β 1 Promotes hepatocellular carcinoma invasion and metastasis via ERK pathway-mediated FGFR4 Expression[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(4): 1690-1699.
- [17] 朱玉峰, 祁明, 于晓东, 等. 肝细胞癌中转化生长因子 β 激酶 1、核因子- κ B 和 P53 的表达[J]. *中国老年学*, 2016, 36(17): 4246-4247.
- [18] An Y, Gao S, Zhao WC, *et al.* Transforming growth factor- β and peripheral regulatory cells are negatively correlated with the overall survival of hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(25): 2733-2740.
- [19] 陈大欣, 吴瑶强, 姜峰, 等. HOXA 末端转录本反义 RNA 在肝癌组织中的表达及对肝癌 HepG2 细胞增殖、侵袭与迁移能力的影响[J]. *肿瘤研究与临床*, 2019, 31(9): 581-585.
- [20] Guo Z, He Y, Wang S, *et al.* Various effects of hepatoma-derived growth factor on cell growth, migration and invasion of breast cancer and prostate cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(2): 511-517.