GPC3 уургийн нийлэгжилтийг агаарын нарийн ширхэгт PM2.5 тоосонцроор өдөөгдсөн элэгний эст өмөнгийн шугаман эсийн өсгөвөрт иммуноцитохимийн аргаар үнэлсэн нь

Т.Одончимэг[1], Б.Батчимэг[1,2], Д.Юндэндаш[1,2], Н.Ням-Эрдэнэ[1], Б.Мөнхцэцэг[1], Э.Есүхэй[1], Л.Сугар[1], Э.Билгүүн[1], Н.Мөнхтүвшин[1], П.Эрхэмбулган[1], Ж.Сарантуяа[2], С.Мөнхбаяр[1]

[1]АШУҮИС, Анагаах Ухааны Хүрээлэн
[2]АШУҮИС, БАС, Молекул биологи-Удамзүйн тэнхим
Цахим шуудан: odonchimeg.ims@mnums.edu.mn, Утас: 88175599

Түлхүүр үг:
HepG2
Агаарын бохирдол
Хавдар
Particulate matter

Товч утга:

Үндэслэл: Монгол улсад 2022 онд нийт хорт хавдрын 6,885 шинэ тохиолдол оношлогдсоноос элэгний эст өмөн 2,286 буюу 33.2%-ийг дангаар эзэлж байна. PM2.5 нь тээврийн хэрэгсэл, үйлдвэрийн болон ахуйн гаралтай түлшний шатах процессын үед ялгардаг олон төрлийн химийн бодисын нэгдэл юм. PM2.5 нь гуурсан хоолой, түүнчлэн альвеолд нэвчиж, агаар цусны хоригийг нэвтрэн цусны эргэлтэд ордог. Ингэснээр амьсгалын замд нөлөөлөхөөс гадна эд эрхтэнд тархан байрлаж элэгний хатуурал, хавдар, зүрх судасны өвчин гэх мэт олон эмгэгт нөлөөлдөг талаар судалгаанууд хийгдсээр байна. Qian zhang (2017) нарын судалгаанд элэгний эст өмөнгийн эсийн үржил, нэвчилт, нүүн шилжилтэд PM2.5 тоосонцор нөлөөлж буйг дурджээ. Элэгний эст өмөнгийн үед GPC3 уураг ERK/MAPK дохио дамжилтын механизмыг идэвхжүүлснээр хавдрын эсийн хуваагдал, нэвчилт, нүүн шилжилтийг нэмэгдүүлдэг. **Зорилго:** GPC3 уургийн нийлэгжилтийг агаарын PM2.5 нарийн ширхэгт тоосонцроор өдөөгдсөн HepG2 шугаман эсийн өсгөвөрт үнэлэх. **Арга, аргачлал:** Анагаах Ухааны Хүрээлэн (АУХ)-ийн Эрдэм шинжилгээний төв лабораторийн эсийн банкинд хадгалагдаж буй элэгний эст өмөнгийн HepG2 шугаман эсийг ашиглаж дулбеккогийн эсийн тэжээлт орчинд 10% ургийн үхрийн ийлдэс, 1%-ийн антибиотикийн холимог нэмэн 5%-ийн CO_2-ийн агууламжтай 37°C-ийн орчинд өсгөвөрлөж, 4-5 удаагийн сэлгэн зорчуулалт хийсний дараа туршилтад ашигласан. PM2.5 нарийн ширхэгт тоосонцрын тунгуудаар HepG2 эсэд үйлчилж, MTT шинжилгээний аргаар эсийн амьдрах чадварыг тодорхойлон сонгосон тунгаар HepG2 эсэд үйлчлэв. 24 цагийн дараа иммуноцитохимийн шинжилгээг туяаруулагч бодис (Alexa-488) болон өнгө үзүүлэгч бодис (AEC) ашиглан 2 төрлийн аргаар протоколын дагуу туршилтыг хийж гүйцэтгэсэн. Микроскопын тусламжтай зураг авч Image J программыг ашиглан үр дүнг боловсруулав. **Үр, дүн:** MTT шинжилгээний үр дүнд PM2.5 тоосонцрын 5, 15 мкг/мл тунгууд эсийн амьдрах чадварыг нэмэгдүүлж (103.2, 108.1%) байсан бол 25 мкг/мл-ээс дээш тун хамааралтайгаар эсийн амьдрах чадварыг дарангуйлж байв. MTT шинжилгээний үр дүнгээр сонгон авсан PM2.5 тоосонцрын 15мкг/мл тунгаар HepG2 эсийг 24 цаг үйлчилсний дараа GPC3 уургийн нийлэгжилтийг дархан туяаруулагчийн тусламжтайгаар илрүүлж харьцуулан үнэлэв. PM2.5 тоосонцроор үйлчилсэн бүлэгт GPC3 эерэг эсүүд хяналтын бүлгийнхээс 2-3 дахин их тоологдсон (p=0.034). **Дүгнэлт:** Агаарын бохирдол, ялангуяа PM2.5 нь *in-vitro* нөхцөлд GPC3 уургийн илэрцийг ихэсгэж байгаа бөгөөд судалгааны үр дүнтэй холбогдох механизмыг цаашид судлах шаардлагатай.

Үндэслэл: Элэгний эст өмөн (HCC-Hepatocellular carcinoma) нь дэлхий даяар хорт хавдартай холбоотой нас баралтын зонхилох шалтгаануудын нэг юм[1]. Монгол улсад 2022 онд нийт хорт хавдрын 6,885 шинэ тохиолдол оношлогдсоноос элэгний эст өмөн 2,286 буюу 33.2%-ийг дангаар эзэлж, үүнээс элэгний хавдрын эрт үеийн байран өмөн 0%, I шат 3.6%, II шат 24.2% оношлогдсон нь нийт тохиолдлын 27.8%-

ийг эзэлж, улмаар элэгний хавдрын шалтгаант нас баралт өндөр байх нөхцөл болж байна[2]. Элэгний эст өмөнгийн эсийн идэвхжил, үсэрхийлэл нь хавдрын эсийн үржил, нэвчилт, нүүр шилжилт зэрэг нэгдмэл үйл ажиллагаагаар явагддаг[3].

Zhang X (2016) нарын судалгаанд элэгний эст өмөнгийн эсийн үржил, нэвчилт, нүүр шилжилтэд PM2.5 тоосонцор нөлөөлж буйг дурджээ[4]. Агаарын нарийн ширхэгт тоосонцор (PM-Particulate matter) нь 2.5 микрометрийн аэродинамик голчтой ба тээврийн хэрэгсэл, үйлдвэрийн болон ахуйн гаралтай түлшний шатах процессын үед ялгардаг олон төрлийн химийн бодис бүхий холимог төлөвтэй бодисуудын нэгдэл юм[5,6]. Нарийн ширхэгт тоосонцор (PM2.5) нь гуурсан хоолой, цаашлаад альвеолд нэвчиж, агаар цусны хоригийг нэвтрэн цусны эргэлтэд ордог[7]. Ингэснээр амьсгалын замд нөлөөлөхөөс гадна эд эрхтэнд тархан байрлаж уушгины гэмтэл, элэгний хатуурал, үрэвсэл, хавдар, зүрх судасны өвчин, бодисын солилцооны алдагдал гэх мэт олон эмгэгт нөлөөлдөг талаар судалгаанууд хийгдсээр байна[8]. Эпидемиологийн хэд хэдэн судалгаагаар агаарт агуулагдах PM2.5-ын концентраци өндөр (>35 мкг/м^3) байх нь хорт хавдар үүсэх эрсдэлийг нэмэгдүүлдэг болохыг дурдсан[9] бөгөөд олон улсын хорт хавдрын судалгааны агентлагаас хавдар үүсгэгчийн 1 дүгээр бүлэгт багтдаг[10,11]. Глипикан 3 (GPC3) нь 580 амин хүчил бүхий 70 кД молекул жинтэй нэг төрлийн гепарин сульфат протеогликан бөгөөд эсийн мембраны гликозил-фосфатидилинозитол хэсэгт холбоотой оршдог[12,13].

Элэгний хавдрын үед GPC3 ERK/MAPK дохио дамжилтын механизмыг идэвхжүүлснээр хавдрын эсийн хуваагдал, нэвчилт, нүүр шилжилтийг нэмэгдүүлж идэвхжсэн GPC3 уураг нь сульфатаз-2 (SULF2) энзимээр дамжуулан хавдрын эсээс гепарин сульфат өсөлтийн хүчин зүйлсийн нийлэгжилтийг нэмэгдүүлэх замаар эсийн үржил, өсөлтийг нэмэгдүүлдэг талаар дурджээ[14,15,16].

Зорилго: GPC3 уургийн нийлэгжилтийг агаарын PM2.5 нарийн ширхэгт тоосонцроор өдөөгдсөн HepG2 шугаман эсийн өсгөвөрт үнэлэх

Зорилт:

1. PM2.5 тоосонцор HepG2 шугаман эсийн амьдрах чадварт үзүүлэх нөлөөллийг МТТ шинжилгээгээр тодорхойлох
2. HepG2 шугаман эс дэх GPC3 уургийн нийлэгжилтийг иммуноцитохимийн шинжилгээгээр харьцуулан үнэлэх

Арга, аргачлал:

Агаарын PM2.5 нарийн ширхэгт тоосонцрын сорьц: Энэхүү судалгаанд АУХ-ийн Эрдэм шинжилгээний төв лабораторид 2018-2020 онд хийж гүйцэтгэсэн “Хавдрын эсийн идэвхжлийг өдөөх PM2.5 тоосонцрын нөлөөг эдийн маркер ашиглан судалсан дүн” сэдэвт суурь судалгааны төслийн хүрээнд SIBATA брендийн HV-500F аппарат ашиглан цуглуулсан PM2.5 тоосонцрын сорьцыг ашиглав.

Эсийн өсгөвөр: АУХ-ийн Эрдэм шинжилгээний төв лабораторийн эсийн банкинд хадгалагдаж буй элэгний эст өмөнгийн HepG2 шугаман эсийг дулбеккогийн эсийн тэжээлт орчинд 10% ургийн үхрийн ийлдэс нэмэн, 5%-ийн CO_2-ийн агууламжтай 37^{o}C-ийн орчинд өсгөвөрлөж, 4-5 удаагийн сэлгэн зорчуулалт хийсний дараа туршилтад ашигласан.

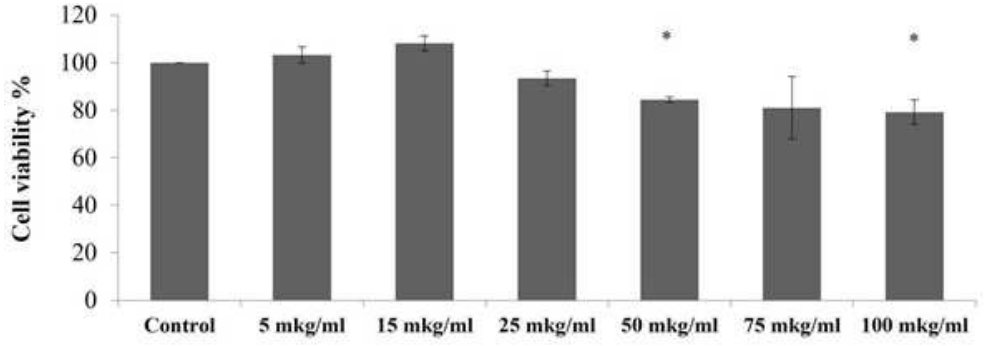
Эсийн амьдрах чадвар тогтоох МТТ шинжилгээ: 96 үүрт бичил хавтанд эсийг өсгөвөрлөн PM2.5 нарийн ширхэгт тоосонцрын 5, 15, 25, 50, 75, 100, 125 мкг/мл тунгаар үйлчилж, МТТ шинжилгээний аргаар эсийн амьдрах чадварыг тодорхойлов.

Иммуноцитохимийн шинжилгээ: HepG2 шугаман эсийг 2*10^6 эс байхаар тооцож урьдчилан бэлтгэж ариутгасан 2.5х2.5 см хэмжээтэй бүрхүүл шилийг 35 мм-ийн эсийн өсгөврийн тавганд байрлуулан, эсийн дүүрэлт 80-90% болох хүртэл өсгөвөрлөнө. Цаашид МТТ шинжилгээний үр дүнгээр тодорхойлсон PM2.5 тоосонцрын тохирох тунгаар үйлчилж, иммуноцитохимийн шинжилгээг туяаруулагч бодис (Alexa-488) болон өнгө үзүүлэгч бодис (AEC) ашиглан 2 төрлийн аргаар протоколын дагуу туршилтыг хийж гүйцэтгэсэн. Туяаралтын эрчмийг флюоресценци филтерээр тоноглогдсон Olympus BX-53 микроскопоор, өнгөний эрчим, эсийн будагдалтын хувийг Olympus CKX41 микроскопоор харж х100, х200, х400 өсгөлтөөр зургийг авч баталгаажуулан, Image J программыг ашиглан үр дүнг боловсруулав.

Статистик боловсруулалт: Үр дүнгийн статистик боловсруулалтын аргыг Microsoft Excel 2010 программ ашиглан хийж гүйцэтгэлээ. Бүлгүүдийн хоорондын ялгааг Стюдентийн Т тестээр үр дүнг тооцоолон боловсруулсан ба р утгыг <0.05 байх үед ач холбогдолтой гэж үзэв.

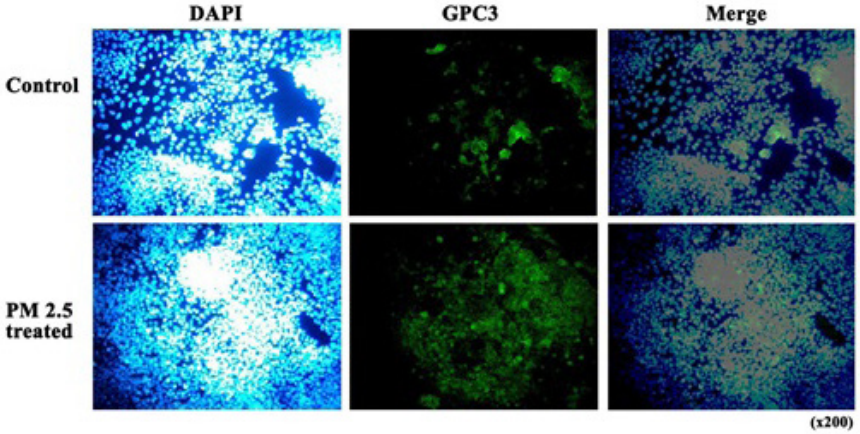
Үр дүн:

МТТ шинжилгээний үр дүн: HepG2 эсийн өсгөврийг Улаанбаатар хотын Бөхийн өргөө орчмоос 2019 оны 03 сард цуглуулсан PM2.5 тоосонцрын 0, 5, 15, 25, 50, 75, 100 мкг/мл тунгаар 24 цагийн турш үйлчилж эсийн амьдрах чадварыг МТТ шинжилгээгээр тодорхойлов. PM2.5 тоосонцрын 5, 15 мкг/мл тунгууд эсийн амьдрах чадварыг нэмэгдүүлж (103.2, 108.1%) байсан бол 25 мкг/мл-ээс дээш тун хамааралтайгаар эсийн амьдрах чадварыг дарангуйлж байна (Зураг 1).



Зураг 1. Эсийн амьдрах чадварыг үнэлсэн MTT шинжилгээний үр дүн

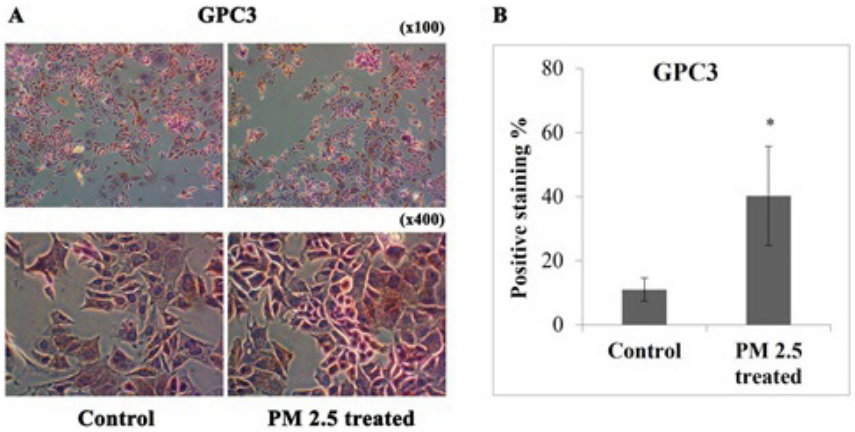
GPC3 уургийн нийлэгжилтийг дархан туяаруулагчийн тусламжтайгаар иммуноцитохимийн шинжилгээ хийж үнэлсэн дүн: MTT шинжилгээний үр дүнгээр сонгон авсан PM2.5 тоосонцрын 15мкг/мл тунгаар HepG2 эсийг 24 цаг үйлчилсний дараа GPC3 уургийн нийлэгжилтийг дархан туяаруулагчийн тусламжтайгаар илрүүлэн харьцуулан үнэлэв. Хяналтын бүлэгт харах талбайн нийт эсийн 23.19% (15.0-30.5%), PM2.5 тоосонцроор үйлчилсэн бүлэгт 42.50% (37.51-50.0%)-д GPC3 уураг эерэг илэрцтэй буюу статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай байлаа (p=0.028) (Зураг 2).



Зураг 2. HepG2 эсэд GPC3 уургийн нийлэгжилтийг дархан туяаруулагчийн тусламжтайгаар илрүүлсэн иммуноцитохимийн шинжилгээний үр дүн.

Тайлбар: 1 дүгээр баганад цэнхэр өнгө (DAPI)-өөр HepG2 эсийн бөөмийн будагдсан байдал, 2 дугаар баганад ногоон өнгө (Alexa Fluor 488)-өөр GPC3 уураг будагдсан байдал, 3 дугаар баганад нэгтгэсэн байдал. GPC3 иммуноцитохими, өсгөлт x200.

GPC3 уургийн нийлэгжилтийг AEC (3-Amino-9-ethylcarbazole) будагч бодисын тусламжтайгаар иммуноцитохимийн шинжилгээ хийж үнэлсэн дүн: MTT шинжилгээний үр дүнгээр сонгон авсан PM2.5 тоосонцрын 15мкг/мл тунгаар HepG2 эсийг 24 цаг үйлчилсний дараа GPC3 уургийн нийлэгжилтийг AEC будагч бодисын тусламжтайгаар илрүүлэн үнэлэв. Хяналтын бүлэгт харах талбайн нийт эсийн 11% (5.74-16.47%), PM2.5 тоосонцроор үйлчилсэн бүлэгт 40.23% (28.3-69.75%)-д GPC3 уураг эерэг илэрцтэй буюу статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай байлаа (p=0.034) (Зураг 3).



Зураг 3. GPC3 уургийн нийлэгжилтийг AEC будагч бодисын тусламжтайгаар илрүүлсэн иммуноцитохимийн шинжилгээний үр дүн.

Тайлбар: А. 1 дүгээр баганад улаан өнгө (AEC)-өөр хяналтын бүлгийн HepG2 эс дэх GPC3 уургийн будагдсан байдал, 2 дугаар баганад улаан өнгө (AEC)-өөр PM2.5-аар үйлчилсэн HepG2 эс дэх GPC3 уургийн будагдсан байдал. GPC3 иммуноцитохими, өсгөлт x100, x400. В. Хяналтын бүлгийн HepG2 эс болон PM2.5-аар үйлчилсэн HepG2 эсэд агуулагдах GPC3 уургийн хэмжээг ImageJ програм ашиглан тооцоолж хувиар илэрхийлсэн байдал.

Хэлцэмж: Монгол улс элэгний эст өмөнгийн тохиолдол, нас баралтын тоогоор дэлхийн дунджаас даруй 8 дахин өндөр байна. Элэгний эст өмөн үүсэхэд олон хүчин зүйл нөлөөлдөг. Үүнд гепатитийн B, C вирус, элэгний хатуурал, амьдралын хэв маяг, архи, тамхины хэрэглээ, агаарын бохирдол зэрэг багтдаг[17-19]. Үр хөврөлийн хөгжлийн үед GPC3 уураг Wnt, фибробластын өсөлтийн фактор (FGF), ясны морфогенетикийн уургууд (BMPs) зэрэг дохио дамжилтын уургуудтай хоршиж эсийн хуваагдал, үржил, апоптоз (сөнөрөл)-ийн үйл ажиллагааг зохицуулдаг[20-23].

Сүүлийн үед хийгдэж буй судалгаануудаар энэхүү уураг элэг, уушги, ходоод, өндгөвч, арьсны меланом, хүүхдийн ургийн үед үүссэн хавдрын үед илэрч буй боловч эдгээрийн дотроос элэгний хавдрын үед илэрхий ихэсдэг тухай харьцуулсан судалгаанууд цөөнгүй хийгдсэн байна[24-28]. Мөн бидний судалгаагаар элэгний эст өмөнтэй өвчтөнүүдийн ийлдэс болон мэс заслаар авсан хавдрын эдэд GPC3 уургийн илэрц эрүүл хяналтын бүлэг болон хавдаргүй эдэд ялгаатай үр дүнтэй гарсан нь энэхүү уураг элэгний эст өмөнгийн эмгэг жамд чухал оролцоотойг харуулж байна[29]. Элэгний эст өмөнгийн үед GPC3 уураг Wnt/β-catenin дохио дамжилтын механизмаар эсийн хуваагдлыг нэмэгдүүлэх бөгөөд GPC3-ын цөм уураг Wnt-ийн рецептор болох Frizzled (FZD)-тай холбогдсоноор энэхүү дохио дамжилтыг өдөөдөг гэж үзэж байна. Түүнчлэн идэвхэжсэн GPC3 уураг нь сульфатаз-2 (SULF2) энзимээр дамжуулан хавдрын эсээс гепарин сульфат өсөлтийн хүчин зүйлсийн нийлэгжилтийг нэмэгдүүлэх замаар эсийн үржил, өсөлтийг нэмэгдүүлдэг талаар судалгаанд дурджээ[30,31].

Zhang Q (2017) нарын судалгаанд тээврийн хэрэгсэл, үйлдвэрийн болон ахуйн гаралтай түлшний шатах процессын үед ялгардаг агаарын нарийн ширхэгт тоосонцор буюу PM2.5 элэгний эст өмөнгийн шугаман эсийн загварт тунгаас хамаарч эсийн нэвчилт, нүүн шилжилтийг нэмэгдүүлдэг болохыг тогтоожээ[32].

Бидний туршилтын үр дүнгээр PM2.5 тоосонцроор үйлчилсэн HepG2 шугаман эсүүдэд GPC3 уургийн хэмжээ нэмэгдсэн байгаа нь агаарын бохирдлын зэрэглэл тогтоох PM2.5 нарийн ширхэгт тоосонцор элэгний хавдрын үржил, өсөлт, нүүн шилжилт, дохио дамжилтанд оролцдог уургуудыг идэвхжүүлдэг болохыг харуулж байна.

Дүгнэлт: Улаанбаатар хотын Бөхийн өргөө орчмоос 2019 оны 3 дугаар сард цуглуулсан PM2.5 тоосонцрын 5-15 мкг/мл тунгууд *in-vitro* орчинд HepG2 эсийн амьдрах чадварыг нэмэгдүүлж байсан бол 25 мкг/мл-ээс дээш тунгууд эсийн амьдрах чадварыг дарангуйлж байна. Агаарын бохирдлын зэрэглэл тогтоох PM2.5 нарийн ширхэгт тоосонцор нь *in-vitro* нөхцөлд элэгний эст өмөнгийн HepG2 шугаман эсээс нийлэгжих GPC3 уургийн хэмжээг ихэсгэж байгаа бөгөөд цаашид холбогдох механизмыг дэлгэрүүлэн судлах шаардлагатай.

Ном зүй:

1. *Tang D, Sun B, Yu H, Yang Z, and Zhu L: Tumor-suppressing effect of miR-4458 on human hepatocellular carcinoma. Cell Physiol Biochem 35: 1797-1807, 2015.*
2. *Эрүүл мэндийн хөгжлийн төв, Эрүүл мэндийн үзүүлэлт, 2022 он, хуу 134-136*
3. *Gores GJ: Decade in review-hepatocellular carcinoma: HCC-subtypes, stratification and sorafenib. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 11: 645-647, 2014.*
4. *Zhang X, Ng HL, Lu A, Lin C, Zhou L, Lin G, Zhang Y, Yang Z, and Zhang H: Drug delivery system targeting advanced hepatocellular carcinoma: Current and future. Nanomedicine 12: 853-869, 2016.,*
5. *Yuan Cheng, Ke-bin He, Zhen-yu Du, Mei Zheng, Feng-kui Duan, Yong-liang Ma, Humidity plays an important role in the PM2.5 pollution in Beijing, Environmental Pollution, Volume 197, 2015, Pages 68-75, ISSN 0269-7491, https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.11.028.*
6. *Guoyuan Hu, Yangmei Zhang, Junying Sun, Leiming Zhang, Xiaojing Shen, Weili Lin, Yun Yang, Variability, formation and acidity of water-soluble ions in PM2.5 in Beijing based on the semi-continuous observations, Atmospheric Research, Volumes 145–146, 2014, Pages 1-11, ISSN 0169-8095, https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2014.03.014.*
7. *Eze IC, Schaffner E, Fischer E, Schikowski T, Adam M, Imboden M, Tsai M, Carballo D, von Eckardstein A, Künzli N, et al: Long-term air pollution exposure and diabetes in a population-based Swiss cohort. Environ Int 70: 95-105, 2014.*
8. *Fongsodsri K, Chamnanchanunt S, Desakorn V, Thanachartwet V, Sahassananda D, Rojnuckarin P, Umemura T. Particulate Matter 2.5 and Hematological Disorders From Dust to Diseases: A Systematic Review of Available Evidence. Front Med (Lausanne). 2021 Jul 14;8:692008. doi: 10.3389/fmed.2021.692008. PMID: 34336895; PMCID: PMC8316685.*
9. *Chow JC: Health effects of fine particulate air pollution: Lines that connect. J Air Waste Manag Assoc 56: 707-708, 2006.*
10. *Hou X, Strickland MJ, and Liao KJ: Contributions of regional air pollutant emissions to ozone and fine particulate matter-related mortalities in eastern U.S. urban areas. Environ Res 137: 475-484, 2015*
11. *Eze IC, Schaffner E, Fischer E, Schikowski T, Adam M, Imboden M, Tsai M, Carballo D, von Eckardstein A, Künzli N, et al: Long-term air pollution exposure and diabetes in a population-based Swiss cohort. Environ Int 70: 95-105, 2014.*
12. *Filmus J, Capurro M. Glypican-3: a marker and a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. FEBS J. 2013;280(10):2471-2476. doi:10.1111/febs.12126*
13. *Filmus, J., M. Capurro, and J. Rast, Glypicans. Genome Biol, 2008. 9(5): p. 224.*
14. *Wu Y, Liu H, Weng H, et al. Glypican-3 promotes the epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells through ERK signaling pathway. Int J Oncol. 2015;46(3):1275-1285. doi:10.3892/ijo.2015.2827*
15. *Lai JP, Sandhu DS, Yu C, et al. Sulfatase 2 up-regulates glypican 3, promotes fibroblast growth factor signaling, and decreases survival in hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2008;47(4):1211-1222. doi:10.1002/hep.22202*
16. *Haruyama, Y., et al., High preoperative levels of serum glypican-3 containing N-terminal subunit are associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. Int J Cancer, 2015. 137(7): p. 1643-51.*
17. *El-Serag H. B. (2012). Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology, 142(6), 1264–1273.e1. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.061*
18. *Bradbury, K. E., Appleby, P. N., & Key, T. J. (2014). Fruit, vegetable, and fiber intake in relation to cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). The American journal of clinical nutrition, 100 Suppl 1, 394S–8S. https://doi.org/10.3945/ajcn.113.071357*
19. *Gan, T., Bambrick, H., Tong, S., & Hu, W. (2023). Air pollution and liver cancer: A systematic review. Journal of environmental sciences (China), 126, 817–826. https://doi.org/10.1016/j.jes.2022.05.037*
20. *Iglesias, B.V., et al., Expression pattern of glypican-3 (GPC3) during human embryonic and fetal development. Histol Histopathol, 2008. 23(11): p. 1333-40.*
21. *Paine-Saunders, S., et al., glypican-3 controls cellular responses*

to Bmp4 in limb patterning and skeletal development. Dev Biol, 2000. 225(1): p. 179-87.
22. *Capurro, M.I., et al., Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding. Dev Cell, 2008. 14(5): p. 700-11.*
23. *Midorikawa, Y., et al., Glypican-3, overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling. Int J Cancer, 2003. 103(4): p. 455-65.*
24. *Zhu, Z.W., et al., Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders. Gut, 2001. 48(4): p. 558-64.*
25. *Lin, Q., et al., Expression of GPC3 protein and its significance in lung squamous cell carcinoma. Med Oncol, 2012. 29(2): p. 663-9*
26. *Ushiku, T., et al., Glypican 3-expressing gastric carcinoma: distinct subgroup unifying hepatoid, clear-cell, and alpha-fetoprotein-producing gastric carcinomas. Cancer Sci, 2009. 100(4): p. 626-32.*
27. *Maeda, D., et al., Glypican-3 expression in clear cell adenocarcinoma of the ovary. Mod Pathol, 2009. 22(6): p. 824-32.*
28. *Ortiz, M.V., et al., Immunotherapeutic Targeting of GPC3 in Pediatric Solid Embryonal Tumors. Front Oncol, 2019. 9: p. 108.*
29. *Б.Батчимэг, Г.Үнэнбат, Х.Гэрэлээ, Т.Одончимэг, Н.Нямэрдэнэ, Р.Мөнхбат, Э.Дөлгөөн, Б.Минжүүр, Б.Мөнхдэлгэр, А.Ерболат, Ч.Мөнхзаяа, Г.Нямсүрэн, Б.Амгалантуул, Д.Цэрэндорж, Б.Энхцацрал, Л.Тулгаа, П.Эрхэмбулган, Б.Мөнхбат, Ж.Сарантуяа, С.Мөнхбаяр2, "Элэгний эст өмөнгийн эдэд GPC3 уургийг иммуногистохимийн аргаар үнэлсэн дүн", Онош сэтгүүл, 2023 он №5, хуу 15-23*
30. *Lai, J.P., et al., Sulfatase 2 up-regulates glypican 3, promotes fibroblast growth factor signaling, and decreases survival in hepatocellular carcinoma. Hepatology, 2008. 47(4): p. 1211-22.*
31. *Gao, W., H. Kim, and M. Ho, Human Monoclonal Antibody Targeting the Heparan Sulfate Chains of Glypican-3 Inhibits HGF-Mediated Migration and Motility of Hepatocellular Carcinoma Cells. PLoS One, 2015. 10(9): p. E0137664*
32. *Zhang Q, Luo Q, Yuan X, et al. Atmospheric particulate matter2.5 promotes the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. Oncol Lett. 2017;13(5):3445-3450. doi:10.3892/ol.2017.5947*

Evaluation of GPC3 expression in PM2.5-treated hepatocellular carcinoma cell line by immunocytochemistry

Odonchimeg T[1], Batchimeg B[1,2], Yundendash D[1,2], Nyam-Erdene N[1], Munkhtsetseg B[1], Yesukhei E[1], Sugar L[1], Bilguun E[1], Munkhtuvshin N[1],Erkhembulgan P[1], Sarantuya J[2], Munkhbayar S[1]

[1]*Institute of Medical Sciences, MNUMS*
[2]*Department of Molecular Biology and Genetics, School of Biomedicine, MNUMS*
E-mail: odonchimeg.ims@mnums.edu.mn, Tel: +976-88175599

Background: Among the population of Mongolia, 6,885 new cancer cases were registered in 2022 and 33.2% of the new cases were hepatocellular carcinoma (HCC). PM2.5 is a mixture of various chemical substances that are released during the combustion of vehicles, and industrial and household fuels. It penetrates into the alveoli and enters the bloodstream. There are many studies conducted on diseases such as liver cirrhosis, cancer, and cardiovascular diseases. In the study of Qian Zhang et al., PM2.5 particles had an effect on the proliferation, invasion, and migration of HCC. During cancer, GPC3 increases proliferation, invasion, and migration by activating the ERK/MAPK signaling pathway. Therefore, we aimed to evaluate GPC3 expression in PM2.5-treated HepG2 cell lines using immunocytochemistry.
Aim: To evaluate GPC3 protein expression in HepG2 cell lines that are treated by PM2.5 particulate matter.
Materials and Methods: A human liver cancer cell line (HepG2), was obtained from the Central Scientific Research Laboratory at the Institute of Medical Sciences. HepG2 cell was seeded at a concentration of $1*10^5$ cells/mL in a culture flask and cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS, and 1% antibiotic mix (penicillin, streptomycin) in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37 °C. The cytotoxic effect of PM 2.5 in HepG2 cells was evaluated by an MTT assay. After the MTT assay, HepG2 cells were seeded on cell culture dishes with prepared cover glasses and treated with the chosen PM 2.5 dosage. After 24 hours, GPC3 expression was evaluated by immunocytochemistry staining by Alexa-488 and AEC substrate method. Results were taken by fluorescence and biological microscopes and each photo was processed by the Image J program for positive cell quantification.
Results: By MTT assay. PM2.5 doses of 5 and 15 μg/ml increased cell viability (103.2 and 108.1%), while doses above 25 μg/ml decreased cell viability. Then, HepG2 cells were treated with a 15 μg/ml dose of PM2.5 particles for 24 hours, and the expression of GPC3 protein was evaluated with immunocytochemistry by Alexa Fluor 488 dye and AEC substrate respectively. GPC3 positive cells were counted 2-3 times more in the PM2.5-treated group than the control group ($p=0.034$).
Conclusions: Air pollution, especially PM2.5 induced higher GPC3 protein level *in-vitro* condition.These results require further study of related mechanisms.

Keywords: HepG2, Air pollution, Cancer, Particulate matter