

NS5ATP9对饥饿诱导的肝母细胞瘤HepG2细胞凋亡的作用

全敏¹, 刘顺爱^{2,3}, 成军^{2,3} (1.首都医科大学附属北京地坛医院肝病中心 肝病三科, 北京 100015; 2.首都医科大学附属北京地坛医院 传染病研究所, 北京 100015; 3.新发突发传染病研究北京市重点实验室, 北京 100015)

摘要: **目的** 观察NS5ATP9对饥饿诱导肝母细胞瘤HepG2细胞凋亡的作用随时间的变化。**方法** 将NS5ATP9的表达载体、siRNA小分子干扰及其各自的对照分别转染HepG2细胞48小时后, 分别用EBSS饥饿细胞12小时、24小时、36小时和48小时后, 利用Annexin V/7-AAD流式细胞术检测细胞凋亡率的变化。同时利用化学发光法检测胱冬肽酶-3/7 (caspase-3/7) 的活性变化, 观察饥饿不同时间点NS5ATP9对细胞凋亡的作用变化。**结果** ①与对照组相比, NS5ATP9过表达组在HepG2饥饿24小时、36小时和48小时后, 总凋亡率显著减低 ($t = 17.132, 9.138, 17.318, P = 0.003, 0.012, 0.003$); 12小时、36小时和48小时caspase-3/7酶活性显著减低 ($t = 7.637, 6.944, 13.490, P = 0.017, 0.02, 0.005$), 二者均以48小时最显著。②与对照组相比, si-NS5ATP9转染组在HepG2饥饿36小时和48小时总凋亡率显著增加 ($t = -5.064, -4.342, P = 0.034, 0.049$), 12小时、36小时和48小时caspase-3/7酶活性显著增加 ($t = -8.837, -7.469, -18.630, P = 0.013, 0.017, 0.003$), 二者均以48小时最显著。**结论** 在HepG2细胞中NS5ATP9能显著抑制饥饿诱导的细胞凋亡, 随着饥饿时间的延长, NS5ATP9对细胞凋亡率的抑制越明显, 以48小时最为显著。

关键词: NS5ATP9; 饥饿; 细胞凋亡

Effects of NS5ATP9 on cell apoptosis of HepG2 cell

QUAN Min¹, LIU Shun-ai^{2,3}, CHENG Jun^{2,3} (1.Department of General Medicine, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 2.Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 3.Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of NS5ATP9 on cell apoptosis of HepG2 cells changes with the different starvation time. **Methods** NS5ATP9 expression vector, small molecules of NS5ATP9 siRNA interference and their respective control were transiently transfected into HepG2 cells for 48 hours, respectively. The cells were then starvated with EBSS for 12, 24, 36 and 48 hours. Part cells were used to observe cell apoptosis changes staining by Annexin V / 7-AAD. Part cells were used to detected caspase-3/7 activities. **Results** ①Compared with control group, the apoptosis rate of HepG2 in NS5ATP9 overexpressed group reduced at 24, 36 and 48 hours ($t = 17.132, 9.138, 17.318; P = 0.003, 0.012, 0.003$), and the caspase-3/7 activities reduced at 12, 36 and 48 hours ($t = 7.637, 6.944, 13.490; P = 0.017, 0.02, 0.005$). The differences were most significant at 48 hours. ②Compared with control group, the apoptosis rate of HepG2 in si-NS5ATP9 transfected group increased at 36 and 48 hours ($t = -5.064, -4.342; P = 0.034, 0.049$), and the caspase-3/7 activities increased at 12, 36, and 48 hours ($t = -8.837, -7.469, -18.630; P = 0.013, 0.017, 0.003$). The differences were most significant at 48 hours. **Conclusion** NS5ATP9 in HepG2 cells can significantly inhibit the apoptosis induced by starvation; with the starvated time prolonged, the effect of NS5ATP9 inhibiting cell apoptosis becomes more obvious and the difference was most significant at 48 hours.

Key words: NS5ATP9; Starvation; Apoptosis

NS5ATP9是利用抑制性消减杂交技术筛选出的HCV非结构蛋白5A(NS5A)反式激活的新基因^[1],目前已发现NS5ATP9在多种恶性肿瘤中高表达,其功能主要与细胞增殖、细胞周期及DNA损伤后修复有关,关于NS5ATP9作为NS5A反式激活基因参与NS5A的哪些致病过程的报道较少。近年来发现NS5ATP9介导了NS5A诱导的肝癌细胞自噬,同时还发现饥饿时NS5ATP9的表达增加,并且参与了饥饿诱导的细胞自噬的发生。饥饿时NS5ATP9表达的增加除了参与细胞自噬外,是否也参与饥饿诱导的细胞凋亡过程?这与其在多种肿瘤中高表达有无相关性?本实验旨在探讨NS5ATP9对肝母细胞瘤细胞饥饿不同时间后细胞凋亡作用的变化,明确NS5ATP9在饥饿时高表达的另一作用,以深入了解NS5ATP9的功能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系 肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞及pcDNA3.1/myc-His(-)-NS5ATP9(pNS5ATP9)表达载体及对照空载体pcDNA3.1/myc-His(-)(p3.1-NC)均为本实验室保存。NS5ATP9 siRNA(si-NS5ATP9)及对照空载体(si-NC)的引物由上海吉玛公司合成,序列见表1。

1.1.2 试剂 DMEM细胞培养基和胎牛血清均购自美国Gibco公司;转染试剂盒jetPRIME™(Cat.#:114-07)购自Polyplus Transfection公司;流式细胞术检测凋亡所用试剂Annexin V-Alexa fluor 647及7-AAD Viability Staining Solution购自Biolegend公司;caspase-Glo® 3/7检测试剂盒购自Promega公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及重组质粒转染 用含10%胎牛血清的DMEM培养液,于5% CO₂孵箱中培养HepG2细胞;待细胞铺满培养瓶底后,将细胞传代种植于6孔板中,待细胞达60%~70%融合度时按转染试剂说明书进行重组质粒及siRNA的转染,并设立阴性对照。通过Western blot验证NS5ATP9表达载体在HepG2细胞中的表达以及siNS5ATP9对NS5ATP9蛋白表达抑制,此部分结果本课题组已进行了验证^[2]。

1.2.2 饥饿诱导细胞凋亡 应用不含血清的平衡盐溶液(earle's balanced salt solution, EBSS)培养细胞。分别培养12小时、24小时、36小时和48小时后收集细胞,部分细胞用Annexin-V和7-AAD染色,流式细胞仪检测细胞凋亡发生率,部分细胞用caspase-3/7试剂盒检测活性。

1.2.3 Annexin V检测细胞凋亡 正常细胞中,磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)一般位于细胞膜脂质双层的内侧,但在细胞凋亡的早期,PS可从细胞膜的内侧翻转到细胞膜表面,暴露在细胞外环境中。Annexin-V是一种分子量为35~36 kD的Ca²⁺依赖性磷脂结合蛋白,与PS有高度亲和力,故可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。将Annexin-V进行荧光素(FITC、PE)标记,以标记了的Annexin V作为荧光探针,利用流式细胞仪或荧光显微镜可检测细胞凋亡的发生。Annexin V可被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。

7-AAD(7-amino-actinomycin D)是一种核酸染料,它不能通过正常质膜,随着细胞凋亡和死亡,质膜对7-AAD的通透性增加,通过标记及流式细胞仪检测可间接反映细胞凋亡情况。重组表达载体或siRNA转染HepG2细胞48小时,在不同的饥饿时间点收集细胞,按照Annexin V/7-AAD检测试剂说明书处理细胞后利用流式细胞仪检测细胞凋亡的情况。Annexin V7-AAD⁻为正常细胞;Annexin V7-AAD⁺为早期凋亡细胞;Annexin V7-AAD⁺为晚期凋亡细胞。

1.2.3 胱冬肽酶-3/7酶活性检测 caspase家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用,其中caspase-3为关键的执行分子,在凋亡信号转导的许多途径中发挥功能,caspase-3/7的活性可反映凋亡的程度。将HepG2细胞以每孔1×10⁴个细胞的密度接种于96孔板中,转染重组质粒或siRNA后48小时开始饥饿不同时间,按照caspase-3/7化学发光试剂盒的操作流程处理细胞后检测细胞内caspase-3/7的活性。

1.3 统计学方法 采用SPSS 16.0统计软件进行统计学分析,组间凋亡率的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 si-RNA 引物序列

检测基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
si-NS5ATP9	GUGUCUAGUUCUUGCUAAATT	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
si-NC	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

2 结果

2.1 NS5ATP9过表达对饥饿诱导细胞凋亡率的影响 HepG2细胞过表达NS5ATP9后,在饥饿的不同时间点检测细胞凋亡发生率。与对照组相比,饥饿诱导细胞凋亡12小时后,pNS5ATP9转染组细胞总凋亡率呈减低趋势,但差异无统计学意义($\chi^2 = 2.247$, $P = 0.154$),饥饿24小时、36小时及48小时后,pNS5ATP9转染组细胞总凋亡率显著降低,差异有统计学意义(χ^2 值分别为17.132、9.138和17.318, P 值分别为0.003、0.012和0.003),见图1、图2。饥饿12小时、36小时及48小时后,caspase-3/7活性显著减低(t 值分别为7.637、6.944和13.490, P 值分别为0.017、0.02和0.005),以48小时最显著,24小时呈减低趋势,差异无统计学差异($t = 2.993$, $P = 0.096$),见图3。

2.2 NS5ATP9表达被抑制后对饥饿诱导细胞凋亡率的影响 在HepG2细胞中转染si-NS5ATP9抑制NS5ATP9蛋白表达后,在饥饿的不同时间点检测细胞凋亡发生率;与对照组相比,在饥饿诱导细胞凋亡36

小时和48小时后,si-NS5ATP9转染组细胞发生总凋亡率显著增加($t = -5.064$ 、 -4.342 , $P = 0.034$ 、 0.049),12小时和24小时呈增加趋势,但差异无统计学意义($t = -0.961$, -1.534 , $P = 0.438$, 0.265),见图4、图5。12小时、36小时和48小时caspase-3/7活性显著增加($t = -8.837$ 、 -7.469 和 -18.630 , $P = 0.013$ 、 0.017 和 0.003),以48小时最显著;24小时呈增加趋势,差异无统计学意义($t = -2.418$, $P = 0.137$),见图6。

3 讨论

NS5ATP9蛋白是通过酵母双杂交技术筛选出来的与增殖细胞核抗原(proliferation cell nuclear antigen, PCNA)相结合的蛋白^[3],因其蛋白分子量为15 kDa故命名为p15 (PAF)。李强等^[4]利用抑制性消减杂交技术筛选NS5A反式激活的新基因,发现长度为336 bp的基因与GeneBank中注册的已知功能的基因无同源序列,命名为NS5ATP9。关于NS5ATP9的功能学研究已有很多,主要与细胞增殖、细胞周期和DNA损伤后修复等相关^[5-8],近年

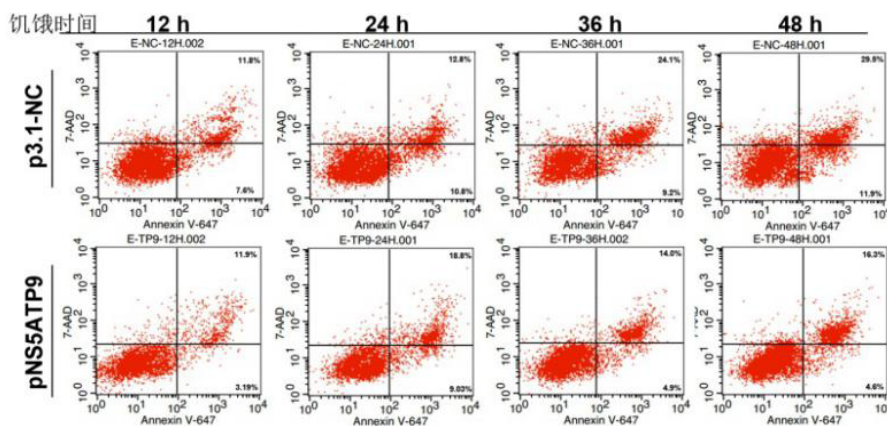


图1 NS5ATP9过表达后饥饿不同时间的HepG2细胞流式图

注:在HepG2细胞中转染pNS5ATP9及对照空载体48小时后更换培养基为EBSS,分别在12小时、24小时、36小时和48小时后收集细胞,用Annexin-V/7-AAD双染后,流式细胞仪检测细胞凋亡数量

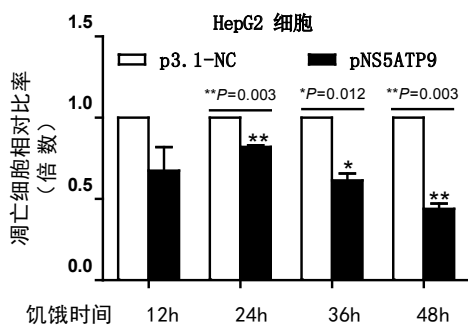


图2 NS5ATP9过表达后饥饿不同时间的HepG2细胞总凋亡率

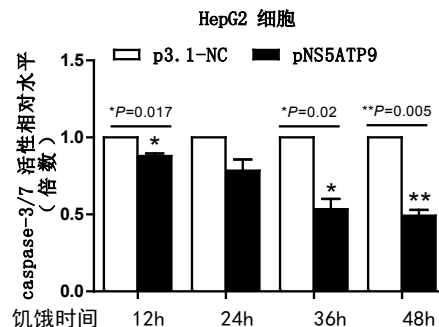


图3 NS5ATP9基因过表达对饥饿不同时间的HepG2细胞caspase-3/7活性的影响

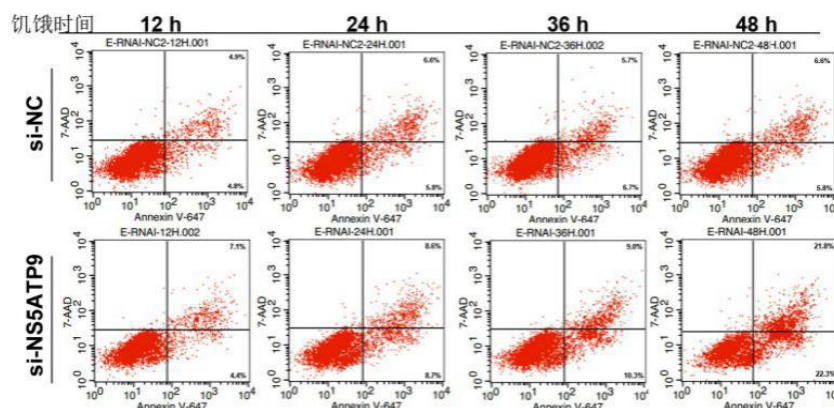


图4 NS5ATP9 基因敲降后饥饿不同时间 HepG2 的流式细胞图

注: 在 HepG2 细胞中转染 si-NS5ATP9 及对照 si-NC, 48 小时后更换培养基为 EBSS, 分别在 12 小时、24 小时、36 小时和 48 小时后收集细胞, 用 Annexin-V/7-AAD 双染后, 流式细胞仪检测细胞凋亡数量。

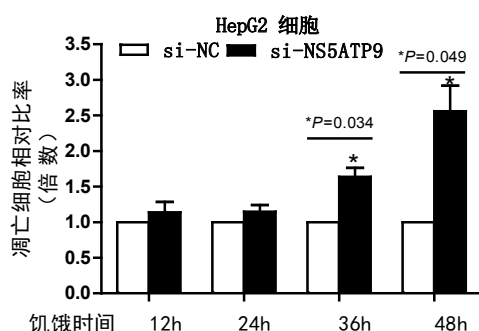


图5 NS5ATP9 基因敲降后饥饿不同时间的 HepG2 细胞总凋亡率

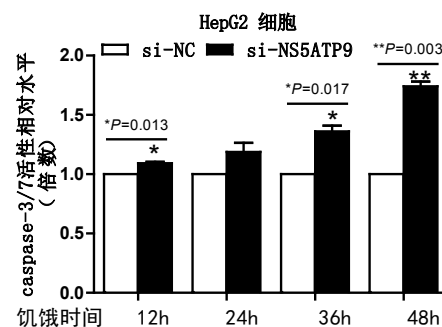


图6 NS5ATP9 基因敲降对饥饿不同时间的 HepG2 细胞 caspase-3/7 活性的影响

来较多文献报道NS5ATP9在多种肿瘤中高表达, 成为多种肿瘤的预后标记基因^[9]。Mizutani等^[10]发现NS5ATP9/OEATC-1在间质性甲状腺癌中高表达, 在正常组织中无高表达现象。Hosokawa等^[11]研究结果显示在胰腺癌细胞中NS5ATP9被沉默后, 细胞增殖速度减慢。Yuan等^[12]研究结果显示, NS5ATP9/KIAA0101是独立的危险因素, 在肝细胞癌中的高表达能够预测癌症的不良预后和肿瘤的早期复发, 其他的研究也得出类似结论^[13]。Jain等^[14]也发现在肾上腺癌中NS5ATP9的高表达能促进细胞增殖和侵袭, 在原发性肺癌中NS5ATP9同样高表达, 可以作为评估预后的独立因子^[15], 在食管癌中的高表达同样也提示了不良的预后^[16]。NS5ATP9在肿瘤中的高表达可能与其在肿瘤发生、发展中的作用有关。具体的作用机制目前尚未清晰, Simpson等^[17]发现NS5ATP9与潜在的肿瘤抑制剂产物p33ING1b相伴存在, 可能涉及调节DNA的修复、凋亡及细胞周期进程。Liu等^[18]发现, 在肝癌细胞中NS5ATP9可通过抑制p53的乙酰化, 抑制多柔比星诱导的细胞凋亡。而

护肝药水飞蓟宾可能抑制NS5ATP9的表达^[19]。从已有的文献可看出NS5ATP9参与肿瘤发展的可能机制, 近期的研究发现NS5ATP9随着HepG2细胞被饥饿其表达逐渐增加, 以48小时最为显著^[20]。为明确NS5ATP9在饥饿时高表达的作用, 我们推测肿瘤细胞在快速生长时由于营养物质相对缺乏出现饥饿状态, 而饥饿会诱发细胞自噬及细胞凋亡的发生。我们已明确NS5ATP9参与了饥饿诱导的细胞自噬的发生, 为了明确其是否参与了饥饿诱导细胞凋亡的发生, 本研究采用不同时间点饥饿细胞的方法, 检测NS5ATP9过表达及干扰后细胞凋亡的变化, 因HepG2细胞不能耐受更长时间的饥饿, 故选用了12小时、24小时、36小时和48小时为观察点。结果表明, 随着饥饿时间的延长, NS5ATP9对饥饿诱导细胞凋亡的抑制作用越来越明显, 以48小时最为显著。这一结果提示NS5ATP9在HepG2细胞饥饿时高表达的其中一个重要作用是抑制细胞凋亡的发生, 具体作用机制尚需进一步研究。因细胞自噬与肿瘤的发生发展密切相关, 而NS5ATP9在饥饿时可

参与细胞自噬的发生,推测HepG2细胞在饥饿时,NS5ATP9对细胞自噬的诱导参与了对细胞凋亡的抑制作用,这一推测尚需实验验证。目前已在体外水平验证了NS5ATP9的抗HepG2细胞凋亡的作用,同时也提示了体内水平NS5ATP9在多种肿瘤中的高表达可能的作用机制。

参考文献

- [1] SHI L, ZHANG SL, LI K, et al. NS5ATP9, a gene up-regulated by HCV NS5A protein[J]. *Cancer Lett*,2008,259(2):192-197.
- [2] QUAN M, LIU S, LI G, et al. A functional role for NS5ATP9 in the induction of HCV NS5A-mediated autophagy[J]. *J Viral Hepat*,2014,21(6):405-415.
- [3] Yu P, Huang B, Shen M, et al. p15(PAF), a novel PCNA associated factor with increased expression in tumor tissues[J]. *Oncogene*,2001,20(4):484-489.
- [4] 李强, 梁耀东, 成军, 等. 应用酵母双杂交技术筛选人白细胞中与NS5ATP9蛋白结合蛋白的编码基因[J]. *世界华人消化杂志*,2004,12(4):828-831.
- [5] Emanuele MJ, Ciccio A, Elia AE, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-associated KIAA0101/PAF15 protein is a cell cycle-regulated anaphase-promoting complex/cyclosome substrate[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011,108(24):9845-9850.
- [6] Solov'eva LV, Svetlova MP, Hancock R, et al. The dual function of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the response of human cells to UV damages[J]. *Tsitologiya*,1996,38(12):1294-1302.
- [7] Turchi L, Fareh M, Aberdam E, et al. ATF3 and p15PAF are novel gatekeepers of genomic integrity upon UV stress[J]. *Cell Death Differ*,2009,16(5):728-737.
- [8] Jung HY, Jun S, Lee M, et al. PAF and EZH2 induce Wnt/beta-catenin signaling hyperactivation[J]. *Mol Cell*,2013,52(2):193-205.
- [9] Xie C, Yao M, Dong Q. Proliferating cell nuclear antigen-associated factor (PAF15): a novel oncogene[J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2014,50:127-131.
- [10] Mizutani K, Onda M, Asaka S, et al. Overexpressed in anaplastic thyroid carcinoma-1 (OEATC-1) as a novel gene responsible for anaplastic thyroid carcinoma[J]. *Cancer*,2005,103(9):1785-1790.
- [11] Hosokawa M, Takehara A, Matsuda K, et al. Oncogenic role of KIAA0101 interacting with proliferating cell nuclear antigen in pancreatic cancer[J]. *Cancer Res*,2007,67(6):2568-2576.
- [12] Yuan RH, Jeng YM, Pan HW, et al. Overexpression of KIAA0101 predicts high stage, early tumor recurrence, and poor prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*,2007,13(18 Pt 1):5368-5376.
- [13] SU X, ZHANG T, CHENG P, et al. KIAA0101 mRNA overexpression in peripheral blood mononuclear cells acts as predictive marker for hepatic cancer[J]. *Tumour Biol*,2014,35(3):2681-2686.
- [14] Jain M, Zhang L, Patterson EE, et al. KIAA0101 is overexpressed, and promotes growth and invasion in adrenal cancer[J]. *PLoS One*,2011,6(11):e26866.
- [15] Kato T, Daigo Y, Aragaki M, et al. Overexpression of KIAA0101 predicts poor prognosis in primary lung cancer patients[J]. *Lung Cancer*,2012,75(1):110-118.
- [16] CHENG Y, LI K, DIAO D, et al. Expression of KIAA0101 protein is associated with poor survival of esophageal cancer patients and resistance to cisplatin treatment in vitro[J]. *Lab Invest*,2013,93(12):1276-1287.
- [17] Simpson F, van Bueren K L, Butterfield N, et al. The PCNA-associated factor KIAA0101/p15(PAF) binds the potential tumor suppressor product p33ING1b[J]. *Exp Cell Res*,2006,312(1):73-85.
- [18] LIU L, CHEN X, XIE S, et al. Variant 1 of KIAA0101, overexpressed in hepatocellular carcinoma, prevents doxorubicin-induced apoptosis by inhibiting p53 activation[J]. *Hepatology*,2012,56(5):1760-1769.
- [19] Ghasemi R, Ghaffari SH, Momeny M, et al. Multitargeting and antimetastatic potentials of silibinin in human HepG-2 and PLC/PRF/5 hepatoma cells[J]. *Nutr Cancer*,2013,65(4):590-599.
- [20] QUAN M, LIU S, WANG Q, et al. NS5ATP9 promotes beclin 1-dependent starvation-induced autophagy of hepatoblastoma cells[J]. *J Cell Biochem*,2015,116(8):1574-1582.

收稿日期: 2016-05-31

全敏, 刘顺爱, 成军. NS5ATP9对饥饿诱导的肝母细胞瘤HepG2细胞凋亡的作用[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*,2016,8(4):52-56.