

NS5ATP3通过调节胆固醇代谢促进HepG2细胞生长

刘雨薇¹, 韩凯², 韩铭³, 袁晓雪³, 梁璞³, 成军³ (1.首都医科大学附属北京地坛医院 急诊科, 北京 100015; 2.首都医科大学附属北京世纪坛医院 生物医学创新中心, 北京 100038; 3.首都医科大学附属北京地坛医院 传染病研究所, 北京 100015)

目的 探讨NS5ATP3在非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 相关肝细胞癌 (hepatic cell carcinoma, HCC) 发生发展中的作用机制。**方法** 转染pNS5ATP3或si-NS5ATP3后检测HepG2细胞内总胆固醇 (total cholesterol, TC) 水平, 分别采用CCK8法、划痕实验、Caspase-3活性检测法检测细胞增殖、凋亡及迁移情况。通过聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 和Western blot检测胆固醇合成、细胞增殖、凋亡及细胞周期相关基因和蛋白 (SREBP2、HMGCR、FoxM1) 的表达。比较共转染pNS5ATP3和si-HMGCR与单纯转染pNS5ATP3时下游HCC关键基因FoxM1的表达水平及细胞增殖能力。**结果** NS5ATP3过表达增加了细胞内TC水平 [(0.044 ± 0.008) pmol/mg vs (0.034 ± 0.004) pmol/mg; $t = 3.231$, $P = 0.023$], 而NS5ATP3沉默后降低了TC水平 [(0.025 ± 0.002) pmol/mg vs (0.033 ± 0.003) pmol/mg; $t = 3.846$, $P = 0.009$]。Western blot表明, 与对照组相比, 过表达NS5ATP3可引起SREBP2和HMGCR蛋白水平增加, p-AMPK α 水平显著降低; 沉默NS5ATP3后, SREBP2和HMGCR蛋白水平下降, p-AMPK α 水平增高。qRT-PCR结果也显示, 与对照组相比, NS5ATP3过表达上调SREBP2 mRNA (2.45 ± 0.75 vs 1 ± 0.33; $t = 5.159$, $P = 0.037$) 和HMGCR mRNA (2.30 ± 0.30 vs 1 ± 0.10; $t = 4.432$, $P = 0.047$) 的表达, 而沉默NS5ATP3后, SREBP2 mRNA (0.24 ± 0.21 vs 1 ± 0.26; $t = 4.769$, $P = 0.041$) 和HMGCR mRNA (0.47 ± 0.13 vs 1 ± 0.21; $t = 4.522$, $P = 0.046$) 表达水平显著下降。在48 h和72 h时, 过表达NS5ATP3组细胞相对活力显著高于对照组 (1.85 ± 0.06 vs 1.56 ± 0.12, $t = 4.583$, $P = 0.010$; 3.08 ± 0.19 vs 2.61 ± 0.21, $t = 4.790$, $P = 0.009$), 24 h时差异无统计学意义 (1.10 ± 0.06 vs 1 ± 0.08, $t = 1.873$, $P = 0.088$)。在24 h、48 h和72 h时, 沉默NS5ATP3组细胞相对活力均显著低于对照组 (0.90 ± 0.07 vs 0.98 ± 0.09, $t = 3.378$, $P = 0.020$; 1.57 ± 0.05 vs 1.63 ± 0.11, $t = 2.717$, $P = 0.035$; 1.82 ± 0.23 vs 2.61 ± 0.21, $t = 5.010$, $P = 0.004$)。与对照组相比, 过表达NS5ATP3后, 细胞中caspase-3/7水平降低 (0.69 ± 0.09 vs 1 ± 0.15; $t = 3.128$, $P = 0.026$), 而沉默siNS5ATP3后, caspase-3/7活性增高 (1.34 ± 0.11 vs 1 ± 0.05; $t = 5.141$, $P = 0.004$)。在24 h、48 h和72 h, 过表达NS5ATP3后, 细胞迁移率显著升高 (21.00 ± 2.08 vs 33.33 ± 2.40, $t = 3.879$, $P = 0.018$; 67.33 ± 1.20 vs 78.00 ± 1.53, $t = 5.488$, $P = 0.005$; 85.33 ± 2.60 vs 99.00 ± 0.58, $t = 5.125$, $P = 0.007$); 沉默NS5ATP3后, 细胞迁移能力显著下降 (36.00 ± 2.65 vs 24.33 ± 2.91, $t = 2.969$, $P = 0.041$; 67.33 ± 1.20 vs 48.00 ± 3.22, $t = 5.633$, $P = 0.005$; 92.33 ± 1.45 vs 83.33 ± 1.67, $t = 4.070$, $P = 0.015$)。过表达NS5ATP3可显著上调FoxM1 mRNA (1.43 ± 0.10 vs 1 ± 0.06; $t = 3.533$, $P = 0.024$) 和CCNB1 mRNA表达 (2.07 ± 0.16 vs 1 ± 0.28; $t = 4.305$, $P = 0.013$); 沉默NS5ATP3可显著下调FoxM1 mRNA (0.47 ± 0.17 vs 1 ± 0.21; $t = 3.153$, $P = 0.034$) 和CCNB1 mRNA

(0.49 ± 0.20 vs 1 ± 0.11 ; $t = 3.676$, $P = 0.021$) 的表达水平。Western blot表明, 过表达 *NS5ATP3* 后, FoxM1和Bcl-2的蛋白质表达水平上调; 沉默*NS5ATP3*后, FoxM1和Bcl-2的蛋白表达水平下调。*HMGCR*基因沉默后*FoxM1* mRNA (0.63 ± 0.18 vs 1 ± 0.17 ; $t = 2.698$, $P = 0.036$) 和蛋白质表达水平均显著下降, 提示*FoxM1*受*HMGCR*调控。与单纯过表达*NS5ATP3*相比, 同时过表达*NS5ATP3*和沉默*HMGCR*, *HMGCR* mRNA (0.83 ± 0.17 vs 2.13 ± 0.26 ; $t = 7.776$, $P = 0.016$) 和*FoxM1* mRNA (0.92 ± 0.21 vs 1.48 ± 0.10 ; $t = 4.323$, $P = 0.049$) 表达水平均显著下降, 48 h细胞增殖相对活力也显著降低 (0.91 ± 0.18 vs 1.33 ± 0.04 ; $t = 4.946$, $P = 0.016$)。结论 *NS5ATP3*通过*HMGCR*-*FoxM1*轴参与HCC的发生发展, 部分解释了NAFLD相关HCC的分子机制。

关键词: 肝细胞癌; 胆固醇代谢; *NS5ATP3*; *FoxM1*; *HMGCR*

***NS5ATP3* promotes HepG2 cell growth by regulating cholesterol metabolism**

Liu Yuwei¹, Han Kai², Han Ming³, Yuan Xiaoxue³, Liang Pu³, Cheng Jun³ (1.Department of Emergency, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 2.Biomedical Innovation Center, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China; 3.Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of *NS5ATP3* in the occurrence and development of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)-related hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** The HepG2 cell line was transfected with p*NS5ATP3* or si-*NS5ATP3*, and the concentration of total cholesterol (TC), cell proliferation, apoptosis and migration were detected by TC test kit, CCK8 method, scratch test and caspase-3 activity detection, respectively. Meanwhile, key genes and proteins (SREBP2, *HMGCR*, FoxM1) involved in cholesterol synthesis, cell proliferation, apoptosis and cell cycle were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot assay. Expression of *FoxM1*, which had important roles in the tumorigenesis of HCC and cell proliferation were compared between HepG2 cell line transfected with p*NS5ATP3* or co-transfected with p*NS5ATP3* and si-*HMGCR*. **Results** *NS5ATP3* overexpression increased the intracellular TC level [(0.044 ± 0.008) pmol/mg vs (0.034 ± 0.004) pmol/mg; $t = 3.231$, $P = 0.023$], while *NS5ATP3* silencing decreased the TC level [(0.025 ± 0.002) pmol/mg vs (0.033 ± 0.003) pmol/mg; $t = 3.846$, $P = 0.009$]. Western blot showed that overexpression of *NS5ATP3* could increase the protein levels of SREBP2 and *HMGCR* and decrease the protein level of p-AMPK α ; after silencing *NS5ATP3*, the protein levels of SREBP2 and *HMGCR* decreased and p-AMPK α increased. qRT-PCR results also showed that compared with the control group, *NS5ATP3* overexpression could up-regulate the mRNA expression of *SREBP2* (2.45 ± 0.75 vs 1 ± 0.33 ; $t = 5.159$, $P = 0.037$) and *HMGCR* (2.30 ± 0.30 vs 1 ± 0.10 ; $t = 4.432$, $P = 0.047$). After *NS5ATP3* was silenced, the mRNA level of *SREBP2* (0.24 ± 0.21 vs 1 ± 0.26 ; $t = 4.769$, $P = 0.041$) and *HMGCR* (0.47 ± 0.13 vs 1 ± 0.21 ; $t = 4.522$, $P = 0.046$) decreased. At 48 h and 72 h, the relative viability of cells in *NS5ATP3* overexpression group was significantly higher than that in control group (1.85 ± 0.06 vs 1.56 ± 0.12 , $t = 4.583$, $P = 0.010$; 3.08 ± 0.19 vs 2.61 ± 0.21 , $t = 4.790$, $P = 0.009$) and there was no significant difference at 24 h (1.10 ± 0.06 vs 1 ± 0.08 , $t = 1.873$, $P = 0.088$). At 24 h, 48 h and 72 h, the relative viability of cells in *NS5ATP3* silenced group was significantly lower than that in control group (0.90 ± 0.07 vs 0.98 ± 0.09 , $t = 3.378$, $P = 0.020$; 1.57 ± 0.05 vs 1.63 ± 0.11 , $t = 2.717$, $P = 0.035$; 1.82 ± 0.23 vs 2.61 ± 0.21 , $t = 5.010$, $P = 0.004$). Compared with control group, the level of caspase-3/7 decreased after *NS5ATP3* overexpression (0.69 ± 0.09 vs 1 ± 0.15 ; $t = 3.128$, $P = 0.026$), while the activity of caspase-3/7 increased after silencing *NS5ATP3* (1.34 ± 0.11 vs 1 ± 0.05 ; $t = 5.141$, $P = 0.004$). After overexpression of *NS5ATP3* at 24 h, 48 h and 72 h, the cell migration ability increased significantly (21.00 ± 2.08 vs

33.33 ± 2.40, $t = 3.879$, $P = 0.018$; 67.33 ± 1.20 vs 78.00 ± 1.53, $t = 5.488$, $P = 0.005$; 85.33 ± 2.60 vs 99.00 ± 0.58, $t = 5.125$, $P = 0.007$) and after silencing *NS5ATP3*, the cell migration ability decreased significantly (36.00 ± 2.65 vs 24.33 ± 2.91, $t = 2.969$, $P = 0.041$; 67.33 ± 1.20 vs 48.00 ± 3.22, $t = 5.633$, $P = 0.005$; 92.33 ± 1.45 vs 83.33 ± 1.67, $t = 4.070$, $P = 0.015$). Overexpression *NS5ATP3* significantly up-regulated the mRNA levels of *FoxM1* (1.43 ± 0.10 vs 1 ± 0.06; $t = 3.533$, $P = 0.024$) and *CCNB1* (2.07 ± 0.16 vs 1 ± 0.28; $t = 4.305$, $P = 0.013$), silencing *NS5ATP3* significantly decreased the mRNA levels of *FoxM1* (0.47 ± 0.17 vs 1 ± 0.21; $t = 3.153$, $P = 0.034$) and *CCNB1* (0.49 ± 0.20 vs 1 ± 0.11; $t = 3.676$, $P = 0.021$). Western blot showed that the protein expression levels of FoxM1 and Bcl-2 were up-regulated after overexpression of *NS5ATP3*. After silencing *NS5ATP3*, the protein levels of FoxM1 and Bcl-2 were down-regulated. After silencing *HMGCR*, the mRNA (0.63 ± 0.18 vs 1 ± 0.17; $t = 2.698$, $P = 0.036$) and protein expression levels of *FoxM1* decreased significantly, suggesting that *FoxM1* was regulated by *HMGCR*. Compared with overexpression of *NS5ATP3* group, the mRNA levels of *HMGCR* (0.83 ± 0.17 vs 2.13 ± 0.26; $t = 7.776$, $P = 0.016$) and *FoxM1* (0.92 ± 0.21 vs 1.48 ± 0.10; $t = 4.323$, $P = 0.049$) in the group of both overexpression *NS5ATP3* and silencing *HMGCR* decreased significantly, and the ability of cell proliferation decreased significantly at 48 h (0.91 ± 0.18 vs 1.33 ± 0.04; $t = 4.946$, $P = 0.016$). **Conclusions** *NS5ATP3* participated in the occurrence and development of HCC through *HMGCR-FoxM1* axis, and ultimately participated in the transformation of NAFLD to HCC.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Cholesterol metabolism; *NS5ATP3*; *FoxM1*; *HMGCR*

肝细胞癌(hepatic cell carcinoma, HCC)是肝脏常见的异质性癌症,严重危害人类健康^[1]。HCC病因较多,以往乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)和丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染造成的慢性病毒性肝炎是HCC的主要原因。近年来,通过疫苗接种及抗病毒治疗,各类慢性病毒性肝炎得到控制,病毒性肝炎相关HCC发病率逐渐下降。有研究表明,自20世纪中期开始广泛接种乙肝疫苗以来,HBV相关肝癌发病率下降了70%~85%^[2]。然而随着个体饮食和生活方式的改变,与非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)相关的HCC发病率逐年增加^[3]。NAFLD是一种临床综合性疾病,其病变特征涵盖了从简单的脂肪变性到以肝细胞损伤、炎症或纤维化为特征的非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)^[4],并可进一步发展为肝纤维化、肝硬化和HCC^[5]。大量研究证实NAFLD是HCC的独立危险因素^[6]。在NAFLD向HCC的演变中,包括胆固醇代谢在内的细胞代谢和能量功能障碍发挥关键作用。研究表明,负责胆固醇生物合成的甲羟戊酸途径的过度激活可促进HCC形成^[7,8],而3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, HMGCR)是甲羟戊酸途径的限速酶,它可通过调控胆固醇合成参与肿瘤的发生发展过程^[9]。但调控这些关键代谢限速酶的上游机制尚未明确。丙型肝炎

炎病毒非结构蛋白5A反式激活基因(hepatitis C virus NS5A-transactivated protein 3, *NS5ATP3*)是由本实验室通过酵母双杂交技术鉴别得到的一种新基因,既往研究表明凋亡相关分子p53蛋白和胆固醇代谢相关的miR-145均可调节*NS5ATP3*的表达^[10,11]。由于p53基因是人体内重要的抑癌基因,而miR-145可限制动脉粥样硬化斑块形态和细胞组成^[12]。这些研究间接表明*NS5ATP3*可能在HCC和胆固醇代谢中发挥一定作用,但具体作用及机制目前尚未明确。综合上述研究,我们假设*NS5ATP3*可能通过调节胆固醇代谢参与NAFLD向HCC的演化进程。为探讨这一问题,本研究通过体外细胞实验,使用HepG2细胞系分析*NS5ATP3*在NAFLD相关HCC进展过程中的分子机制。

1 资料与方法

1.1 细胞培养和质粒转染 肝癌细胞系HepG2细胞由本实验室保存,用含有10%新生牛血清和100单位/ml青霉素、100 mg/ml链霉素(美国GIBCO公司)的DMEM培养基,在37℃、5% CO₂条件下培养。根据说明书操作,使用jetPRIME(法国Polyplus-transfection公司)瞬时转染pcDNA3.1/myc-His-*NS5ATP3*(p*NS5ATP3*)或*NS5ATP3*的siRNA(si-*NS5ATP3*)(苏州吉玛基因公司)。

1.2 细胞内总胆固醇水平的检测 HepG2细胞转染48 h后,按照说明书操作,使用组织细胞总胆固醇(total cholesterol, TC)检测试剂盒(北京普利莱

公司)检测HepG2细胞内TC水平。使用细胞总蛋白浓度对胆固醇水平进行标化。

1.3 RNA提取和实时荧光定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测基因表达 按说明书操作,使用总RNA试剂盒(美国Omega公司)从HepG2细胞中提取总RNA。使用PrimeScript RT试剂盒(日本TaKaRa公司)将总RNA逆转录为cDNA。通过qRT-PCR(美国ABI公司)扩增获得mRNA相对表达水平。引物序列见表1。

1.4 Western blot检测蛋白表达 HepG2细胞在含有蛋白酶抑制剂(5872 s, 美国CST公司)的哺乳动物细胞裂解缓冲液中4℃下裂解30 min, 使用Pierce BCA检测试剂盒(23225, 美国Thermo Scientific公司)测量蛋白质浓度。将60 mg总蛋白质进行SDS-PAGE电泳, 然后转印到PVDF膜(ISEQ00010, 美国Millipore公司)上。用5%脱脂牛奶封闭1 h后, 将膜与指定的一抗在4℃下孵育过夜。使用以下一抗: 抗NS5ATP3(美国Invitrogen公司)、抗胆固醇调节元件结合蛋白2(sterol-regulatory element binding protein 2, SREBP2)(美国CST公司)、抗HMGCR(美国Abcam公司)、抗GAPDH(美国Abcam公司)、抗p-AMPK α (美国Abcam公司)、抗AMPK(美国Abcam公司)、抗Forkhead家族转录因子叉头框蛋白M1(forkhead box protein M1, FoxM1)(美国Abcam公司)、抗Bcl-2(美国CST公司)。然后, 将膜与抗兔或抗小鼠二抗(中国中杉金桥公司)在室温下孵育1 h, 使用增强型化学发光系统(美国Millipore公司)检测蛋白质条带, 并使用Fusion Solo系统(VILBER, 法国)进行分析。

1.5 CCK8法、划痕实验检测细胞增殖及迁移能力 实验处理前将HepG2细胞以10000个细胞/孔的密度接种到96孔板上。24 h细胞贴壁后, 去除培养基并更换为100 μ l培养基和10 μ l CCK-8溶液(日本Dojindo公司)。37℃孵育30 min, 使用Varioskan Flash(美国Thermo Fisher Scientific公司)在450 nm处测

量吸光度。采用12孔板培养细胞, 在板底画线标记, 待细胞增殖到80%~90%时, 用小号枪头尖端垂直于标记线进行划痕, 用PBS洗涤3次去除漂浮的细胞, 换无血清的DMEM培养基培养。在0 h、24 h、48 h和72 h在显微镜下观察细胞划痕愈合情况并计算迁移率(迁移率=迁移距离/原始距离)。

1.6 Caspase-3/7活性检测 将HepG2细胞以15000个细胞/孔的密度接种到96孔板上。转染后48 h移除培养基并更换为100 μ l caspase-Glo 3/7试剂(美国Promega公司)。室温下裂解细胞1 h。然后使用Veritas Microplate Luminometer(美国Turner Biosystems公司)测量上清液Caspase-3/7活性。

1.7 统计学处理 使用SPSS 17.0软件和GraphPad Prism 7软件进行统计学分析, 所有数据均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NS5ATP3调节HepG2细胞内TC水平 NS5ATP3过表达增加了细胞内TC水平[(0.044 \pm 0.008) pmol/mg vs (0.034 \pm 0.004) pmol/mg; $t = 3.231$, $P = 0.023$], 而NS5ATP3沉默后降低了TC水平[(0.025 \pm 0.002) pmol/mg vs (0.033 \pm 0.003) pmol/mg; $t = 3.846$, $P = 0.009$], 见图1。

2.2 NS5ATP3通过SREBP2/HMGCR信号转导通路调节HepG2细胞内TC水平 Western blot表明, 与对照组相比, 过表达NS5ATP3可引起SREBP2和HMGCR蛋白水平增加, p-AMPK α 水平显著降低; 沉默NS5ATP3后, SREBP2和HMGCR蛋白水平下降, p-AMPK α 水平增加, 见图2A、2B。qRT-PCR结果也显示, 与对照组相比, NS5ATP3过表达上调SREBP2 mRNA (2.45 \pm 0.75 vs 1 \pm 0.33; $t = 5.159$, $P = 0.037$) 和HMGCR mRNA (2.30 \pm 0.30 vs 1 \pm 0.10; $t = 4.432$, $P = 0.047$) 的表达, 而沉默NS5ATP3后, SREBP2 mRNA (0.24 \pm 0.21 vs 1 \pm 0.26; $t = 4.769$, $P = 0.041$) 和HMGCR mRNA (0.47 \pm 0.13 vs 1 \pm 0.21; $t = 4.522$, $P = 0.046$) 表达水平显著下降, 见图2C、2D。

表1 引物序列

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
<i>β-actin</i>	CATCCGCAAAGAC CTG	AGTACTTGCCTCAGGAGGA
<i>NS5ATP3</i>	TTGAGTGAACCTCTGTATGTGC	CCTCACACGAGACTTTTGGG
<i>SREBP2</i>	CCCTTCAGTGCAACGGTCATTAC	TGCCATTGGCCGTTTGTGTC
<i>HMGCR</i>	CTTGTGTGCTTGGTATTAGAGC	ATCATCTTGACCCTCTGAGTTACAG
<i>FoxM1</i>	AGAAGTGACCCTGGAGACCT	CCTGCTGCCTCACCATCTG
<i>CCNB1</i>	GCAGCAGGAGCTTTTGCTT	CCAGGTGCTGCATAACTGGA

注: β -actin 为 β -肌动蛋白, NS5ATP3为丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活基因(hepatitis C virus NS5A-transactivated protein 3), SREBP2为胆固醇调节元件结合蛋白(sterol-regulatory element binding proteins), HMGCR为3-羟羧基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase), FoxM1为叉头框M1蛋白(forkhead Box M1), CCNB1为细胞周期蛋白B1(cyclinB1)。

2.3 *NS5ATP3*对细胞增殖、迁移和凋亡的影响 在48 h和72 h时,过表达*NS5ATP3*组细胞相对活力显著高于对照组 (1.85 ± 0.06 vs 1.56 ± 0.12 , $t = 4.583$, $P = 0.010$; 3.08 ± 0.19 vs 2.61 ± 0.21 , $t = 4.790$, $P = 0.009$),24 h时差异无统计学意义 (1.10 ± 0.06 vs 1 ± 0.08 , $t = 1.873$, $P = 0.088$)。在24 h、48 h和72 h时,沉默*NS5ATP3*组细胞相对活力均显著低于对照组 (0.90 ± 0.07 vs 0.98 ± 0.09 , $t = 3.378$, $P = 0.020$; 1.57 ± 0.05 vs 1.63 ± 0.11 , $t = 2.717$, $P = 0.035$; 1.82 ± 0.23 vs 2.61 ± 0.21 , $t = 5.010$, $P = 0.004$),见图3A、3B。此外,与对照组相比,过表达*NS5ATP3*后,细胞中caspase-3/7水平降低 ($0.69 \pm$

0.09 vs 1 ± 0.15 ; $t = 3.128$, $P = 0.026$),而沉默*NS5ATP3*后,caspase-3/7活性增加 (1.34 ± 0.11 vs 1 ± 0.05 ; $t = 5.141$, $P = 0.004$),见图3C、3D。在24 h、48 h和72 h,过表达*NS5ATP3*后,细胞迁移率显著升高 (21.00 ± 2.08 vs 33.33 ± 2.40 , $t = 3.879$, $P = 0.018$; 67.33 ± 1.20 vs 78.00 ± 1.53 , $t = 5.488$, $P = 0.005$; 85.33 ± 2.60 vs 99.00 ± 0.58 , $t = 5.125$, $P = 0.007$);沉默*NS5ATP3*后,细胞迁移能力显著下调 (36.00 ± 2.65 vs 24.33 ± 2.91 , $t = 2.969$, $P = 0.041$; 67.33 ± 1.20 vs 48.00 ± 3.22 , $t = 5.633$, $P = 0.005$; 92.33 ± 1.45 vs 83.33 ± 1.67 , $t = 4.070$, $P = 0.015$),见图3E~3H。以上结果表明*NS5ATP3*可

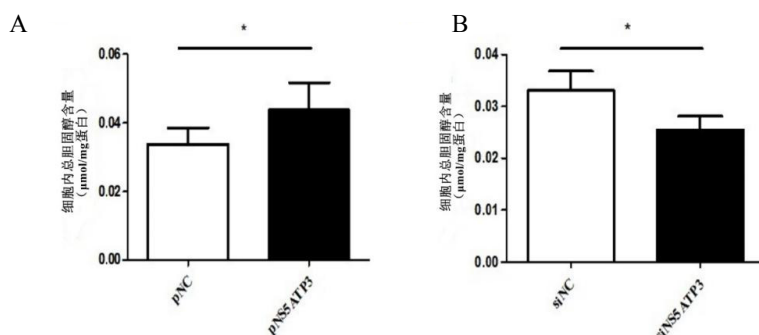


图1 *NS5ATP3*对细胞内TC含量的影响

注: A以pcDNA3.1/myc-His-NC (pNC)载体作为对照,用pcDNA3.1/myc-His-NS5ATP3载体(pNS5ATP3)转染导致细胞内TC含量增加 ($t = 3.231$, $P = 0.023$); B与阴性对照 (siNC)相比,沉默*NS5ATP3* (siNS5ATP3)降低了细胞内TC含量 ($t = 3.846$, $P = 0.009$); * $P < 0.05$ 。

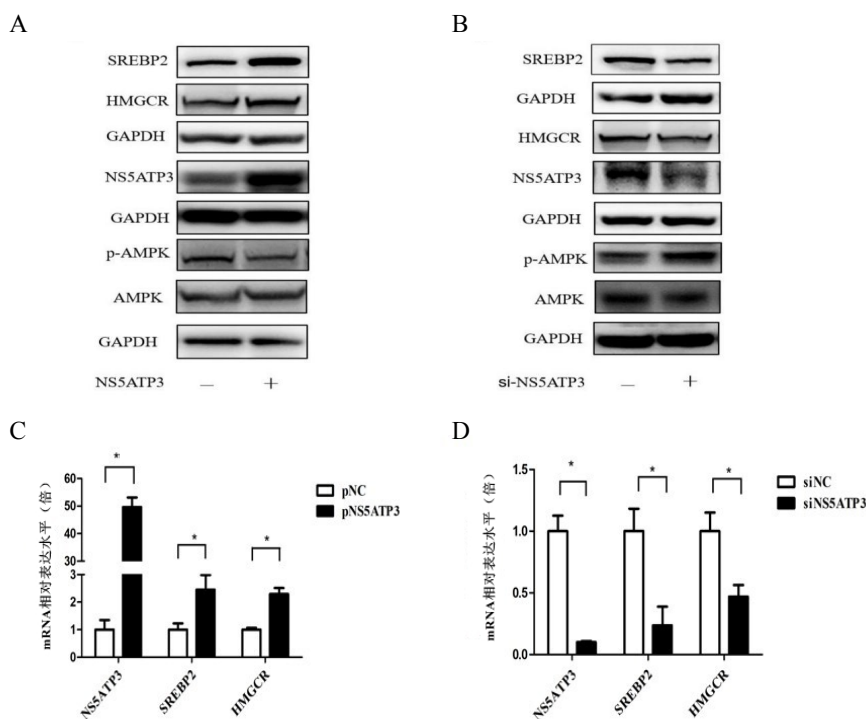


图2 *NS5ATP3*对SREBP2、HMGCR蛋白和mRNA水平以及p-AMPK蛋白水平的调节作用

注: A、C为*NS5ATP3*过表达导致SREBP2和HMGCR在蛋白质和mRNA水平上的表达增加,p-AMPK α 表达水平显著降低; B、D为*NS5ATP3*的沉默降低了SREBP2和HMGCR在蛋白质和mRNA水平上的表达,p-AMPK α 表达显著上调; * $P < 0.05$ 。

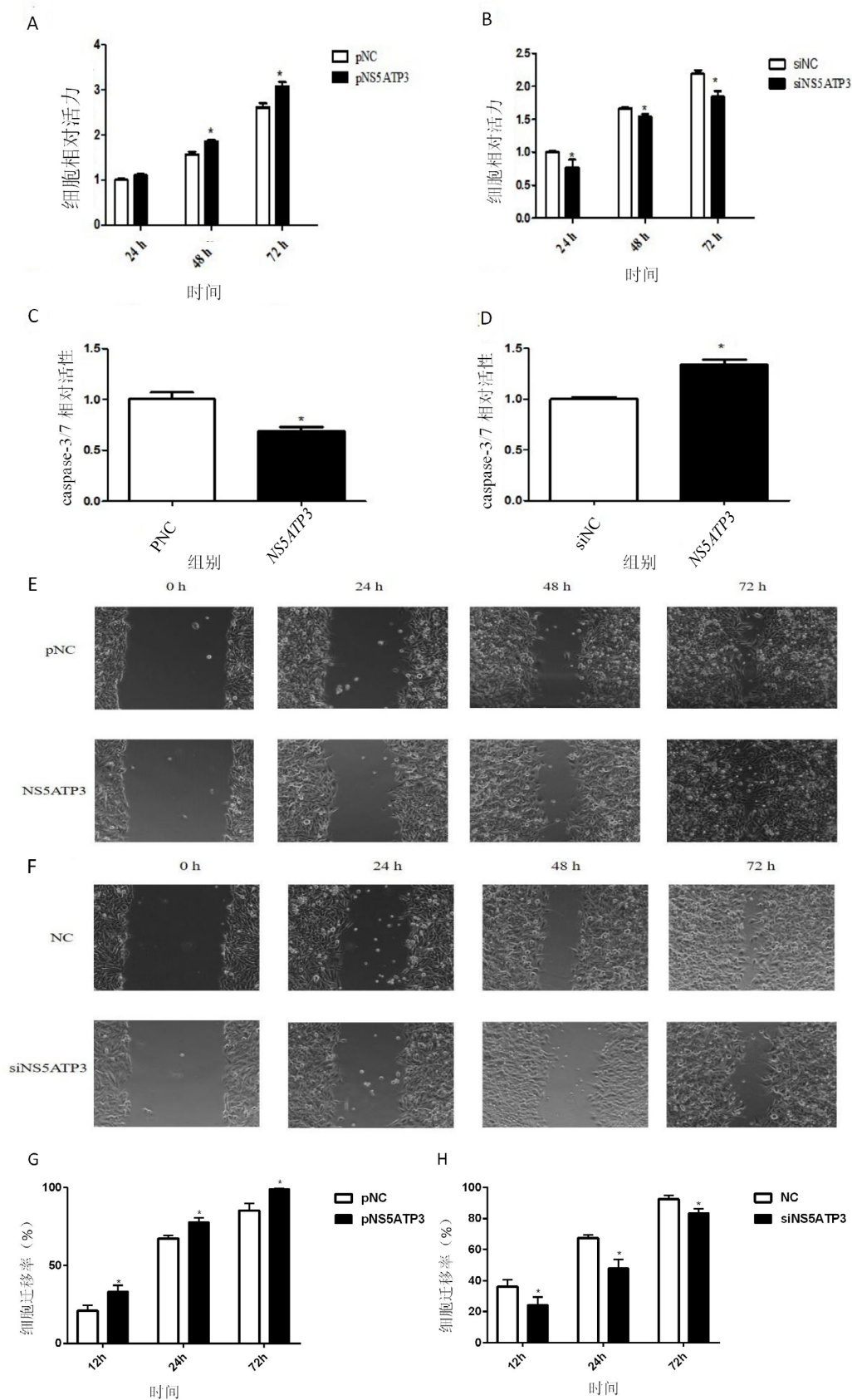


图3 NS5ATP3 促进细胞增殖、迁移并抑制细胞凋亡

注: A 图示过表达 NS5ATP3 在 48 h 和 72 h 显著促进 HepG2 细胞增殖; B 图示沉默 NS5ATP3 在所有时间点均抑制 HepG2 细胞增殖; C 图示 NS5ATP3 过表达组 caspase-3/7 水平受抑制, D 图示转染 siNS5ATP3 后, caspase-3/7 活性得到促进; E ~ H 示在每个时间点, NS5ATP3 过表达组细胞迁移更快, 而沉默 NS5ATP3 后细胞迁移更慢; * $P < 0.05$ 。

促进细胞增殖和迁移并抑制细胞凋亡。

2.4 NS5ATP3调节FoxM1、细胞增殖、凋亡和细胞周期相关基因的表达 过表达NS5ATP3可显著上调FoxM1 mRNA (1.43 ± 0.10 vs 1 ± 0.06 ; $t = 3.533$, $P = 0.024$) 和CCNB1 mRNA的表达 (2.07 ± 0.16 vs 1 ± 0.28 ; $t = 4.305$, $P = 0.013$); 沉默NS5ATP3可显著下调FoxM1 mRNA (0.47 ± 0.17 vs 1 ± 0.21 ; $t = 3.153$, $P = 0.034$) 和CCNB1 mRNA (0.49 ± 0.20 vs 1 ± 0.11 ; $t = 3.676$, $P = 0.021$) 的表达水平。Western blot表明, 过表达NS5ATP3后, FoxM1和Bcl-2蛋白表达水平上调; 沉默NS5ATP3后, FoxM1和Bcl-2蛋白表达水平下调。见图4。

2.5 HMGCRC调节FoxM1的表达 HMGCRC基因沉默后FoxM1 mRNA (0.63 ± 0.18 vs 1 ± 0.17 ; $t = 2.698$, $P = 0.036$) 和蛋白表达水平均显著下降, 提示FoxM1受HMGCRC调控, 见图5。

2.6 NS5ATP3通过HMGCRC调控FoxM1表达促进细胞增殖 与单纯过表达NS5ATP3相比, 同时过表达NS5ATP3和沉默HMGCRC, HMGCRC mRNA (0.83 ± 0.17 vs 2.13 ± 0.26 ; $t = 7.776$, $P = 0.016$) 和FoxM1 mRNA (0.92 ± 0.21 vs 1.48 ± 0.10 ; $t = 4.323$, $P = 0.049$) 表达水平均显著下降, 48 h细胞增殖相对活力也显著降低 (0.91 ± 0.18 vs 1.33 ± 0.04 ; $t = 4.946$, $P = 0.016$)。提示NS5ATP3通过HMGCRC调控FoxM1表达, 从而促进细胞增殖。

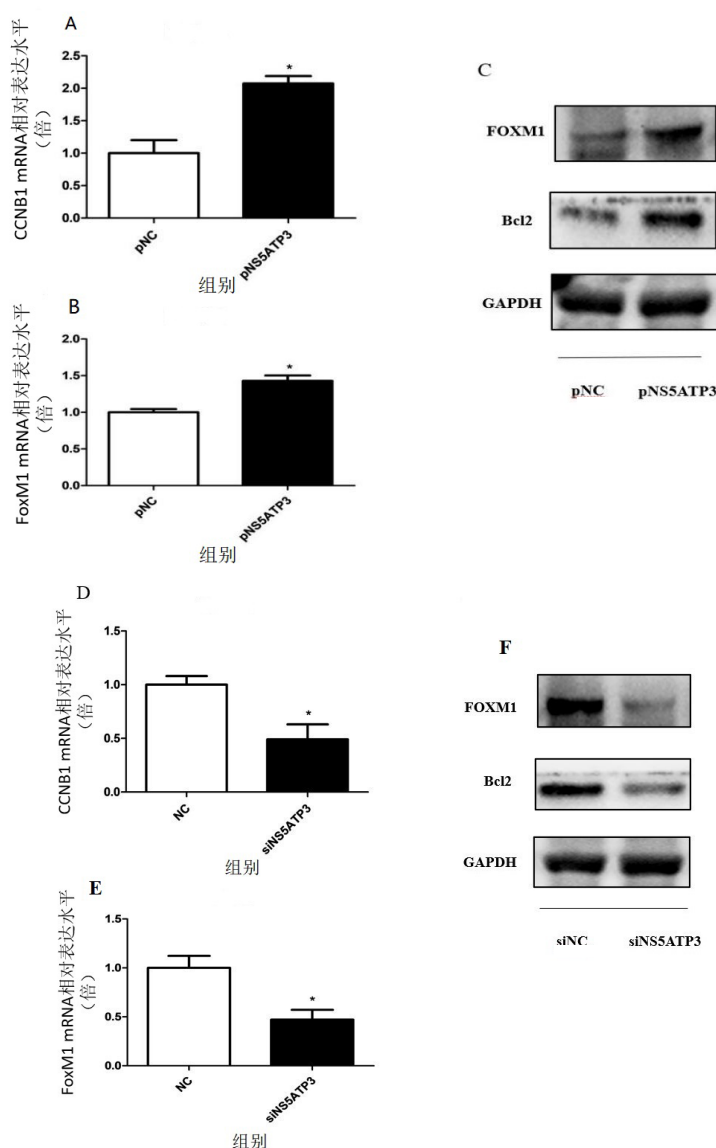


图4 NS5ATP3对FoxM1、细胞增殖、凋亡和细胞周期相关基因 mRNA 和蛋白水平的调控作用

注: A、B、C 示 NS5ATP3 过表达上调 FoxM1、CCNB1 mRNA 表达水平和 FoxM1、Bcl-2 蛋白表达水平; D、E、F 示 NS5ATP3 沉默下调 FoxM1、CCNB1 mRNA 表达水平和 FoxM1、Bcl-2 蛋白表达水平; * $P < 0.05$ 。

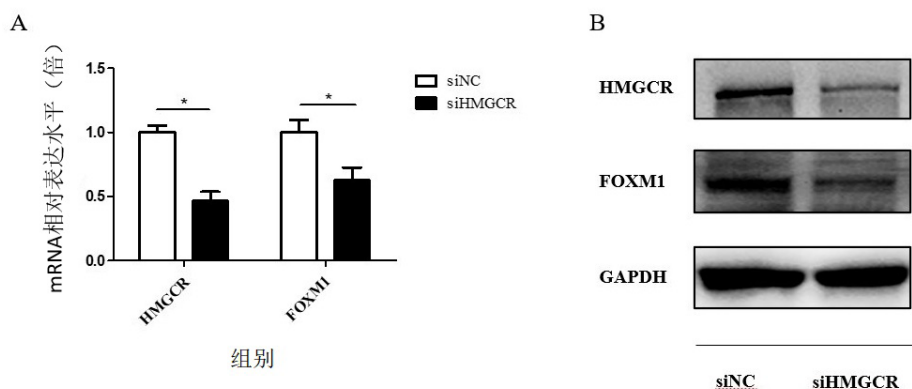


图5 HMGCR 调控 FoxM1 表达

注: A 示 HMGCR 沉默导致 HepG2 细胞中 FoxM1 mRNA 表达水平下降; B 示 HMGCR 沉默导致 HepG2 细胞中 FoxM1 蛋白水平表达降低; * $P < 0.05$ 。

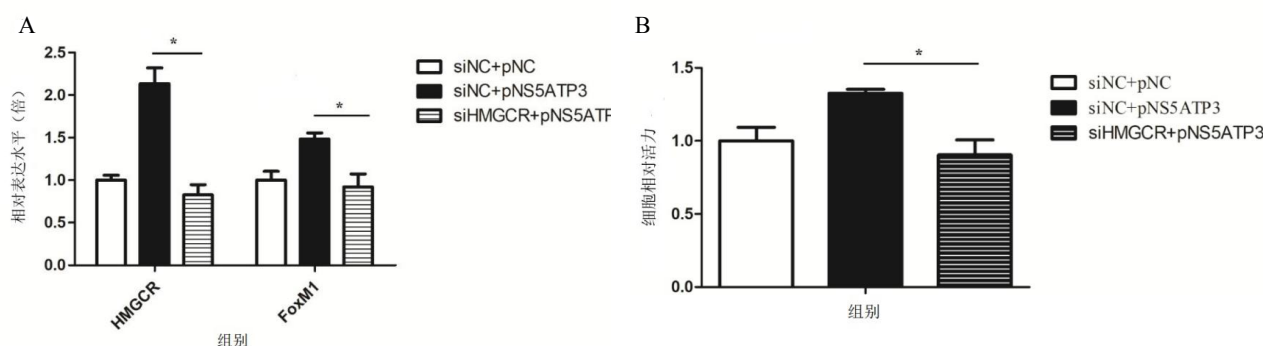


图6 NS5ATP3 部分通过 HMGCR 调控 FoxM1 表达促进细胞增殖

注: A 图示与单纯过表达 NS5ATP3 相比,同时过表达 NS5ATP3 和沉默 HMGCR, HMGCR 和 FoxM1 mRNA 表达水平显著下降; B 图示与单纯过表达 NS5ATP3 相比,同时过表达 NS5ATP3 和沉默 HMGCR, 48 h 细胞增殖能力也显著降低; * $P < 0.05$ 。

3 讨论

HCC是常见的肝脏恶性肿瘤,发病率和恶性程度均较高。NAFLD、2型糖尿病和代谢综合征等近年来也被认为是HCC的诱发因素之一。NAFLD是全球最常见的慢性肝病^[13,14],其主要表现为肝脏脂肪代谢功能障碍,大量脂肪类物质蓄积造成肝细胞脂肪变性,尽管这种变性是可逆的,仍有部分患者会进展为NASH,而NASH可能会发展为HCC。胆固醇是在NASH期间观察到的一种已知的细胞毒性脂质^[15],其可能会诱导NASH发展为HCC,但具体作用机制尚未明确。

在NAFLD发生发展的众多潜在机制中,AMPK参与的能量代谢紊乱是近年来的研究热点。AMPK负责多种代谢酶的磷酸化和失活,包括糖原合酶、乙酰辅酶A羧化酶(acetyl CoA carboxylase, ACC)、SREBP2、HMGCR和CREB调节的转录共激活因子2(CREB-regulated transcription coactivator 2, CRTC2)^[16,17]。最近研究表明,AMPK可能

是代谢紊乱的治疗靶点^[18,19],其可与SREBP-1和SREBP-2相互作用并使其磷酸化,通过阻遏蛋白水解成熟和核转位来抑制SREBP激活途径^[20]。此外,胆固醇合成限速酶HMGCR的启动子含有SRE结合位点,是SREBP-2蛋白的靶标^[21]。因此,AMPK磷酸化后会抑制SREBP2/HMGCR信号转导通路,减少胆固醇合成,从而抑制NAFLD进展。本研究则证明了沉默NS5ATP3后激活了AMPK磷酸化,导致SREBP2和HMGCR mRNA和蛋白质水平降低,从而降低细胞内总胆固醇水平。而当NS5ATP3过表达时则促进细胞内胆固醇水平生成。以上结果提示NS5ATP3通过p-AMPK/SREBP2/HMGCR信号转导通路参与了胆固醇合成过程,从而在NAFLD发生发展中发挥作用。

NAFLD向HCC的转变需要多种分子协同作用,在这些分子中FoxM1起关键作用。首先,FoxM1是一种与癌症高度相关的转录因子,在包括HCC在内的多种人类癌症中均有高表达^[22,23]。小

鼠遗传学研究表明FoxM1与HCC的进展和转移有关^[24,25]。并且,肿瘤组织中FoxM1的表达是影响肝癌术后复发和总生存率的独立预后因素,这表明FoxM1可能不仅是一个潜在的治疗靶点,也是评价肝癌预后的生物标志物^[26,27]。其次,FoxM1也是控制胆固醇生物合成的甲羟戊酸途径下游的重要靶点之一。研究发现,他汀类药物即HMGCR抑制剂,可显著降低FoxM1的表达^[28]。本研究也再次证实了这一点,当沉默HMGCR后,FoxM1表达也显著下降。同时,在临床样本中也观察到FoxM1基因表达与HMGCR或SREBP2在HCC组织中的表达显著正相关。此外,FoxM1和HMGCR或SREBP2表达决定了肝癌患者的预后^[28]。结合以上研究结果可推论,NAFLD患者SREBP2/HMGCR途径表达异常会影响FoxM1表达,进而参与HCC的发生发展过程。本研究表明NS5ATP3对p-AMPK/SREBP2/HMGCR信号转导通路具有调控作用,那么NS5ATP3是否会通过HMGCR进一步调控FoxM1的表达呢?这是本研究接下来的重点。研究结果显示,过表达NS5ATP3后,HMGCR表达水平升高,进而导致FoxM1的表达显著升高,并间接对HepG2细胞的增殖、迁移起促进作用。而将HMGCR沉默后,可解除过表达NS5ATP3对FoxM1表达和HepG2细胞增殖能力的影响。上述研究结果表明,NS5ATP3高表达会激活AMPK通路中的重要分子HMGCR,加剧脂肪肝症状,并进一步促进FoxM1的表达而参与NAFLD向HCC的转变。

本研究同样也存在不足。本研究希望发现NAFLD向HCC转变的分子机制,HCC的发生发展包括癌细胞增殖、凋亡及迁移等。本研究中关键基因NS5ATP3具有促进细胞增殖、迁移及抑制凋亡的作用。但本研究仅发现NS5ATP3可通过HMGCR调控FoxM1表达,进而促进HepG2细胞增殖,而NS5ATP3在HCC中促进迁移、抑制凋亡的作用是否与NAFLD具有相关性,其机制为何,目前暂不清楚,这也是未来继续研究的重点。

综上,新基因NS5ATP3可通过抑制AMPK磷酸化上调SREBP2/HMGCR表达促进肝脏胆固醇合成,并通过HMGCR-FoxM1轴参与HCC的发生发展。

参考文献

- [1] 傅毅振,徐立.肝细胞癌综合治疗进展[J].临床肝胆病杂志,2020,36(10):2179-2183.
- [2] MCGLYNN K A, PETRICK J L, LONDON W T. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability[J]. Clin Liver Dis,2015,19(2):223-238.
- [3] 刘伟鸿,李磊.慢性乙型肝炎合并非酒精性脂肪性肝病的研究进展[J].临床肝胆病杂志,2021,37(12):2905-2908.
- [4] 肖伟松,乐澄玉,曾胜澜,等.非酒精性脂肪性肝病的发病机制研究进展[J].临床肝胆病杂志,2020,36(8):1874-1879.
- [5] 高静静,汪涛,蒋元烨,等.非酒精性脂肪性肝病代谢组学与中医证候[J].临床肝胆病杂志,2020,36(8):1880-1882.
- [6] 罗燕,施军平.非酒精性脂肪性肝病相关肝细胞癌的发病机制[J].临床肝胆病杂志,2020,36(6):1217-1220.
- [7] WADA A, FUKUI K, SAWAI Y, et al. Pamidronate induced anti-proliferative, apoptotic, and anti-migratory effects in hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol,2006,44(1):142-150.
- [8] HONDA Y, AIKATA H, HONDA F, et al. Clinical outcome and prognostic factors in hepatocellular carcinoma patients with bone metastases medicated with zoledronic acid[J]. Hepatol Res,2017,47(10):1053-1060.
- [9] CHOU R, DANA T, BLAZINA I, et al. Statins for prevention of cardiovascular disease in adults: evidence report and systematic review for the US preventive services task force[J]. JAMA,2016,316(19):2008-2024.
- [10] NEILSEN P M, NOLL J E, SUETANI R J, et al. Mutant p53 uses p63 as a molecular chaperone to alter gene expression and induce a pro-invasive secretome[J]. Oncotarget,2011,2(12):1203-1217.
- [11] VILA-CASADESÚS M, GIRONELLA M, LOZANO J J. MiRComb: an R package to analyse miRNA-mRNA interactions. examples across five digestive cancers[J]. PLoS One,2016,11(3):e0151127.
- [12] WEI Y, NAZARI-JAHANTIGH M, NETH P, et al. MicroRNA-126, -145, and -155: a therapeutic triad in atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2013,33(3):449-454.
- [13] 钱帅杰,谷劲岳,高锦航,等.非酒精性脂肪性肝炎治疗药物的进展[J].临床肝胆病杂志,2020,36(12):2826-2830.
- [14] 龚航,李良平.非酒精性脂肪性肝病并发门静脉血栓的研究进展[J].临床肝胆病杂志,2020,36(9):2107-2110.
- [15] LASTUVKOVA H, FARADONBEH F A, SCHREIBEROVA J, et al. Atorvastatin modulates bile acid homeostasis in mice with diet-induced nonalcoholic steatohepatitis[J]. Int J Mol Sci,2021,22(12):6468.
- [16] LI X, HU X, PAN T, et al. Kanglexin, a new anthraquinone compound, attenuates lipid accumulation by activating the AMPK/SREBP-2/PCSK9/LDLR signalling pathway[J]. Biomed Pharmacother,2021,133:110802.
- [17] ZHANG Z, LIANG X, TONG L, et al. Effect of inonotus obliquus (Fr.) pilat extract on the regulation of glycolipid metabolism via PI3K/Akt and AMPK/ACC pathways in mice[J]. J Ethnopharmacol,2021,273:113963.
- [18] 刘妍,李翠茹.津力达颗粒对高脂饮食诱导的肥胖小鼠代谢紊乱及FGF21/AMPK信号通路的影响[J].中草药,2021,52(5):1351-1359.
- [19] YANG C, GUO J, LIN Y, et al. Peripheral blood miR-937 may serve as a biomarker for metabolic disorders by targeting AMPKα[EB/OL]. (2019-06-01)[2022-01-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31232032/>.
- [20] LI Y, XU S, MIHAYLOVA M M, et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice[J]. Cell Metab,2011,13(4):376-388.
- [21] SONG Y, XU C, SHAO S, et al. Thyroid-stimulating hormone

- regulates hepatic bile acid homeostasis via *SREBP-2*/HNF-4 α /CYP7A1 axis[J]. J Hepatol, 2015, 62(5):1171-1179.
- [22] 许君伟, 梁亚林, 宋丽. *FoxM1*/FOXO3a在乙肝相关性肝癌中的表达及临床意义[J]. 实用癌症杂志, 2021, 36(5):709-712.
- [23] 龚军, 孙峰, 金聪慧, 等. *FoxM1*和GRP78在进展期胃癌组织中的表达及其临床意义[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2019, 13(8):566-571.
- [24] SU W L, CHUANG S C, WANG Y C, et al. Expression of *FoxM1* and aurora-A predicts prognosis and sorafenib efficacy in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Biomark, 2020, 28(3):341-350.
- [25] WU C H, YEH C T, LIN K H. Thyroid hormones suppress *FoxM1* expression to reduce liver cancer progression[J]. Oncol Rep, 2020, 44(4):1686-1698.
- [26] 卓恩清, 吴依霖, 蔡长青, 等. 肝细胞肝癌潜在预后分子标志物筛选[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2021, 28(14):1093-1098.
- [27] 时佳琪, 刘超, 张艳桥. *FoxM1*调节网络—抗癌新靶点[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(6):1059-1063.
- [28] OGURA S, YOSHIDA Y, KURAHASHI T, et al. Targeting the mevalonate pathway is a novel therapeutic approach to inhibit oncogenic *FoxM1* transcription factor in human hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2018, 9(30):21022-21035.

收稿日期: 2022-01-16

刘雨薇, 韩凯, 韩铭, 等. *NS5A*TP3通过调节胆固醇代谢促进HepG2细胞生长[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2022, 14(2):1-10.

• 消息 •

《中华实验和临床感染病杂志(电子版)》征稿启事

本刊为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)收录, 且拥有国家新闻出版署等多种网上查询路径。

本刊特色栏目:

- (1) 继续教育园地(视频);
- (2) 临床病例荟萃(病例分析、典型图像分析、专家点评)。

本刊的办刊宗旨是:

贯彻党和国家的卫生工作方针政策, 贯彻理论与实践、普及与提高相结合的办刊方针, 反映我国感染病临床和科研工作的重大进展, 促进国内外感染病学学术交流。

欢迎登陆本刊采编系统, 网址为: <http://zhshylcgr.j-ditan.com/>, 欢迎您点击和投稿。您只需简单登陆, 即可免费下载期刊的PDF版文章。

本刊为双月刊, 每期定价28元, 全年定价168元。编辑部常年办理邮购, 邮发代号: 80-729, 欢迎订阅。

通讯地址: 北京市朝阳区京顺东街8号《中华实验和临床感染病杂志(电子版)》编辑部

邮编: 100015

电话: 010-84322058

传真: 010-84322059