

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.03.019

Apaf-1 通过 wnt/ β -catenin 信号通路调控肝癌的机制研究^{*}

郭善军¹,李 晶²,杨宏静^{2 Δ}
(1.达州职业技术学院,四川达州 635001;2.重庆三峡医药高等专科学校 404120)

[摘要] 目的 研究 Apaf-1 基因在 wnt/ β -catenin 信号通路中的作用及在肝癌细胞中的调控表达机制。方法 通过 TOPflash 实验验证 Apaf-1 基因在 wnt/ β -catenin 信号通路中调控作用机制;采用实时定量 PCR 方法检测各种肝癌细胞株(HepG2、HHCC、HB611)及正常肝细胞株(LO2)中 Apaf-1 基因的表达量;构建 Apaf-1 RNA 干扰质粒,转染到 HepG2 中并检测转染效率,检测相关基因及蛋白表达。结果 TOPflash 实验发现 Apaf-1 可以抑制 wnt/ β -catenin 信号通路,并且这种抑制作用具有剂量依赖效应;在肝癌细胞株中,Apaf-1 表达量较正常肝细胞表达量降低,且在 HepG2 细胞株中表达量最低;在肝癌细胞株(HepG2)中 RNA 干扰 Apaf-1 基因,Apaf-1 基因的的表达量显著降低,wnt 信号通路下游基因及蛋白(β -catenin、Cyclin A、CDK2、wnt5a、STAT3、EGFR、APC)的表达量均显著性升高或降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 Apaf-1 基因通过 wnt/ β -catenin 信号通路在肝癌细胞的生成过程中具有重要功能。

[关键词] 肝肿瘤;信号传导;Apaf-1;wnt/ β -catenin
[中图法分类号] R73-37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)03-0349-04

Mechanism of Apaf-1 for regulating liver cancer by wnt/ β -catenin signaling pathway^{*}
GUO Shanjun¹,LI Jing²,YANG Hongjing^{2 Δ}
(1. Dazhou Vocational and Technical College, Dazhou, Sichuan 635001, China; 2. Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China)

[Abstract] **Objective** To study the rule of Apaf-1 in wnt/ β -catenin signaling pathway and its regulatory expression mechanism in hepatocellular carcinoma cells. **Methods** The regulatory mechanism of Apaf-1 gene in Wnt/ β -catenin signaling pathway was verified by the TOPflash experiment; real-time PCR was used to detect the expression amounts of Apaf-1 in various hepatoma cell lines(HepG2, HHCC, HB611) and normal liver cell line(LO2); the RNAi interference plasmid of Apaf-1 was constructed and transfected into the HepG2 cell line. Then the transfection efficiency and expression of related genes and proteins were detected. **Results** The TOPFlash experiment found that Apaf-1 gene could inhibit the wnt/ β -catenin signal pathway in a dose dependent manner; the Apaf-1 expression level in hepatoma cells was decreased compared with the normal liver cells, moreover its expression level was lowest in HepG2 cell line; RNA interfering Apaf-1 gene in HepG2 cell line, the expression level of Apaf-1 gene was significantly decreased, and the expression levels of downstream genes and protein(β -catenin, Cyclin A, CDK2, wnt5a, STAT3, EGFR, APC) in wnt signal pathway were significantly increased or decreased, the difference was statistically significant($P<0.05$). **Conclusion** Apaf-1 gene plays an important role in the formation process of hepatocarcinoma cells by wnt/ β -catenin signaling pathway.

[Key words] liver neoplasms; signal transduction; Apaf-1; wnt/ β -catenin

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,其全球发病率位居癌症第 6 位,且治疗难、预后差、生存率低,因此研究肝癌发病机制对肝癌的治疗具有指导作用^[1]。近年来,wnt 介导经典的 wnt/ β -catenin 信号通路受到人们的广泛关注,wnt/ β -catenin 信号通路不仅对脊椎动物的胚胎发育及组织稳态具有重要功能,而且肿瘤的形成与 wnt/ β -catenin 信号通路异常密切相关。该系统的激活可引起 β -catenin 在胞浆中的积聚,进而进入胞核与 TCF/LEF 转录因子结合,激活下游基因的表达。在没有激活的情况下, β -catenin 与人糖原合成酶激酶 3 β (GSK3 β)、Axin、抗原呈递细胞(APC)、蓬乱蛋白 1(DVL-1)和蛋白磷酸酶 2A(PP-2A)相结合, β -catenin 被磷酸化,进而被蛋白水解酶所降解。wnt 信号被激活时,GSK3 β 的活性被 DVL-1 所抑制,引起 β -catenin 的积聚^[2]。

凋亡酶激活因子(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)是一种新近发现的抑癌基因,参与人体线粒体凋亡途

径,作为一种多功能结构域的构架蛋白,通过与 wnt/ β -catenin 信号通路中的其他蛋白分子结合发挥生物学作用^[3]。研究证明,Apaf-1 在各种恶性肿瘤中都可能存在启动子高甲基化水平导致其自身表达降低,最终导致 wnt/ β -catenin 信号通路异常引起恶性肿瘤的发生^[4]。目前国内外关于 Apaf-1 在肝癌细胞中的表达及作用机制报道缺乏,因此对于研究 Apaf-1 基因肝癌作用机制的研究十分必要。本实验通过验证 Apaf-1 对 wnt/ β -catenin 信号通路的调控、Apaf-1 在肝癌细胞中表达和敲降 Apaf-1 对肝癌细胞的影响来探讨 Apaf-1 在肝癌细胞中的作用机制,为寻找新的肝癌治疗靶点及防治药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

肝癌细胞株 HepG2、HHCC、HB611 及正常肝细胞株 LO2 购自上海奥陆生物科技有限公司,pcDNA3.1 质粒、HEK293 细胞株来自西南大学淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室馈赠,双荧光素酶检测试剂盒(Dual-Luciferase

^{*} 基金项目:重庆市基础与前沿研究计划项目(cstc2014jcyjA10049)。 作者简介:郭善军(1967—),副教授,本科,主要从事生物化学研究。
 ^{Δ} 通信作者,E-mail:582182420@qq.com。

表 1 实时定量 PCR 相关引物

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(3'-5')
Apaf-1	TGAACCTGAAGGATACCA	ATCCAGTCGGTGATGGAGG
β-catenin	TCAAGACCATCACTATCCTG	CATCGGCGTCTTCAGCGTGCT
Cyclin A	TCACAGACTGACCGAGTG	GCGGAGCAGTTGAGAGCCTACCT
CDK2	GACTTTGGACTAGCCAGAGCTT	GTTACTTCTATGCCTGATTAC
Wnt5a	TGCAGCACTGTGGATAACACCT	GTTCGTGGACGCCCGCAGC
STAT3	CTGGATAACGTCATTAGCAG	TAACATTCTGGGCACAAAC
EGFR	CTGCCTGGTCTGCCGCAAAT	TCACTCTCCATAAATGCTACG
APC	GTGTGGCCGCCGGAAGCCT	GATAATTCCAATCATCTTAC
β-actin	TGCCTCATGCCATTCTACGC	CTCTATGCCAACACCGTGTTAT

Reporter Assay System) 购自美国 Promega 公司 (Promega, USA),RNA 提取(RNAiso Plus)、反转录试剂盒(PrimeScript RT reagent Kit)和定量 PCR 试剂盒均来自日本 TaKaRa 公司,pCDH 质粒购自维真生物;抗体购自 Bioword 公司。

1.2 方法

1.2.1 验证 Apaf-1 基因对 wnt/β-catenin 信号通路调控作用

为了验证 Apaf-1 基因对 wnt/β-catenin 信号通路具有调控作用,本研究将人的 Apaf-1、β-catenin 基因全长 cDNA 克隆连接到 pcDNA3.1 质粒,通过细胞转染至 HEK293 细胞株,转染过程每孔加入 0.50 μg TOPFlash 报告质粒(判断 wnt/β-catenin 信号通路是否激活的标志)、0.05~0.50 μg 包含 Apaf-1、β-catenin 全长的 pcDNA3.1 质粒、100 ng/孔的 pRL-TK(pRL-TK 表达的海肾荧光素酶作为一个内参因子可以用来判断转染效率,并计算相对荧光素酶活性),以未进行转染和转染空质粒为空白对照组和阴性对照组,每组 3 个复孔;转染后 48 h 收细胞;磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗 3 次,每孔加入 100 μL 裂解液,室温裂解 10 min。用 Dual-Luciferase Reporter Assay System 试剂盒在 Luminosakan Ascent 化学发光分析仪上测定荧光素酶活性^[5]。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测肝癌细胞株及正常肝细胞株中 Apaf-1 的表达

取对数生长期 HepG2、HHCC、HB611 及 LO2 细胞株,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养,然后提取各个细胞株总 RNA,反转录 cDNA,通过实时定量 PCR 方法检测 Apaf-1 的表达,以 β 肌动蛋白(β-actin)为内参基因。使用 Primer Express 软件(Applied Biosystems, USA)设计定量 PCR 引物,并遵循至少一个引物跨不同外显子从而避免基因组 DNA 污染,见表 1。使用目的基因不同浓度梯度(10²~10⁸ 拷贝)的质粒作为模板检测引物的扩增效率^[6-7]。

1.2.3 HepG2 细胞株中基因敲降 Apaf-1

取对数生长期 HepG2 细胞株,调整细胞密度 6×10⁵/mL,接种至 6 孔板,每孔 4 mL,用 10%胎牛血清的 DMEM 培养,将构建好的 Apaf-1 shRNA pCDH 质粒按 Lipofectamine2000 说明书的方法转染到 HepG2 细胞中,对照组转染阴性空载质粒,每组设置 3 个复孔。

1.2.4 转染效率

将 1.2.3 中培养的细胞株在 36 h 后放入荧光显微镜下观察,转染阳性细胞可看到荧光,阴性或者正常细胞不可见荧光。

1.2.5 实时定量 PCR 仪检测相关基因表达量及抑制效率

将 1.2.3 中培养的细胞株在 48 h 后收集,按照常规方法提取细胞总 RNA,反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板,β-actin 为内参基因进行实时定量 PCR 反应检测细胞周期蛋白 A(Cyclin A)、细胞周期素依赖性激酶 2(CDK2)、减数分裂相关蛋白(p-

CDK2)、β-catenin、APC、p-STAT3、p-STAT5、STAT3、STAT5、PRR11 基因的表达。

1.2.6 Western blot 检测相关蛋白的表达量

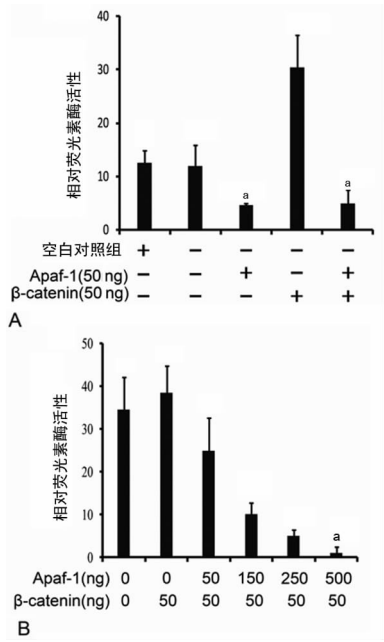
将 1.2.2 中培养的细胞株在 48 h 后收集,按照常规方法提取细胞内总蛋白,用紫外分光光度计测定吸光值分析总蛋白纯度,稀释各组蛋白的浓度至终浓度一致,每组取 50 μg 蛋白样品,进行 SDS-PAGE 电泳,然后将蛋白转移至 PVDF 膜上,5%牛血清白蛋白封闭 2 h,加一抗,室温孵育 4 h,滴加二抗,室温孵育 2 h,利用化学发光凝胶成像仪进行成像^[8]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验;计数资料用率表示,比较采用 χ^2 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Apaf-1 可抑制 wnt/β-catenin 介导的信号通路

用 Super 8×TOPFlash 报告因子研究 Apaf-1 对 β-catenin 介导的经典 wnt 信号通路的调控作用。结果发现 Apaf-1 可以抑制 β-catenin 激活的 LEF 荧光素酶活性,并且这种作用具有剂量依赖效应,见图 1。



A: TOPFlash 荧光素酶表达结果; B: TOPFlash 荧光素酶剂量效应结果; * : *P* < 0.05

图 1 TopFlash-荧光素酶报告实验

2.2 各细胞株中 Apaf-1 的表达

Apaf-1 在正常的肝细胞株 LO2 的表达量明显高于肝癌细胞株中的表达量,且在 HepG2

细胞株中的表达量最低,说明 HepG2 细胞株对 Apaf-1 的更敏感,差异均具有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

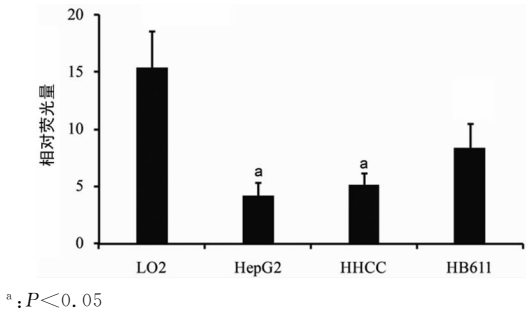
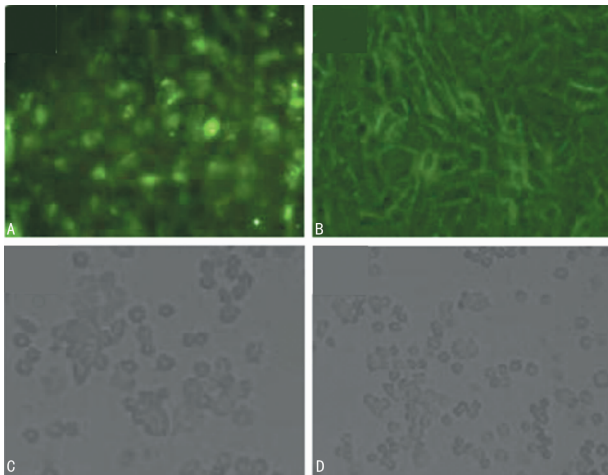


图 2 定量 PCR 检测 Apaf-1 在不同细胞株中的表达

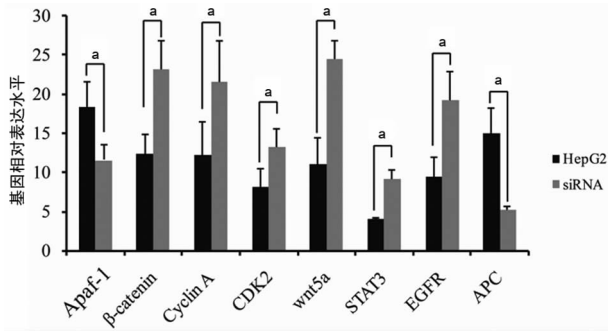
2.3 基因敲降转染效率 在 RNA 干扰的 HepG2 细胞株中,与对照组相比,实验组可以观察到明显的荧光信号,且荧光信号较多,而对照组无明显荧光信号,见图 3。



A、C 实验组;B、D 对照组

图 3 根据同一视野下标记有荧光信号细胞的多少计算转染效率($\times 100$)

2.4 Real-timePCR 检测相关基因的表达 在 RNA 干扰 Apaf-1 的 HepG2 细胞株中,与正常的 HepG2 细胞株相比,Apaf-1 的表达量降低,说明在 HepG2 细胞中,Apaf-1 敲降成功,同时 wnt/ β -catenin 信号通路的相关基因或者肝癌相关基因的表达显著升高或者降低,如 β -catenin、Cyclin A、CDK2、wnt5a、STAT3、EGFR、APC($P<0.05$),见图 4。

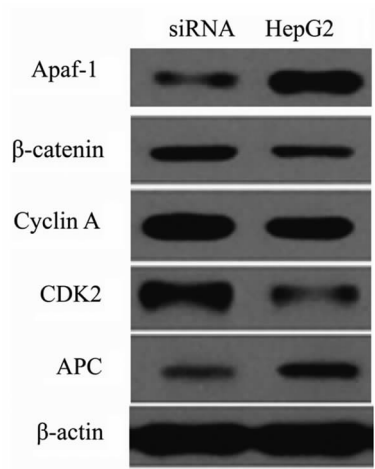


siRNA:在 HepG2 细胞株中敲降 Apaf-1 基因;*: $P<0.05$

图 4 定量 PCR 分析在 HepG2 细胞株中敲降 Apaf-1 基因后相关基因表达量变化

2.5 Western blot 检测相关蛋白表达 在 RNA 干扰 Apaf-1 的 HepG2 细胞株中,与正常的 HepG2 细胞株相比, β -catenin、Cyclin A、CDK2 的表达量显著升高,Apaf-1、APC 的表达

量降低($P<0.05$),见图 5。



siRNA:在 HepG2 细胞株中敲降 Apaf-1 基因

图 5 Western blot 检测 HepG2 和 siRNA-Apaf-1 HepG2 中相关蛋白的表达

3 讨论

近年来,我国肝癌的发病率呈上升趋势,且术后复发率高,传统的辅助治疗、放疗等治疗研究缓慢,都严重影响了肝癌患者的生存率。寻找更有效的诊断和治疗方法的首要步骤就是要了解其病理学分子机制。近年随着医学分子生物学、细胞生物学快速发展,肿瘤的治疗开始向细胞及基因水平发展^[9]。越来越多研究证明,肝癌的发生与体内癌基因的过表达及抑癌基因的表达缺失相关^[10]。因此,研究这些癌基因或抑癌基因的功能对于肝癌的治疗具有重要指导作用。

Apaf-1 作为一种新发现的多功能结构域蛋白,它通过调控 wnt/ β -catenin 信号通路的异常激活,促进靶基因的过度表达,影响细胞的增殖与分化,促进肿瘤的发生,因此,Apaf-1 属于 wnt/ β -catenin 信号通路的负调控因子^[11-12]。本研究通过 TopFlash-荧光素酶报告实验检测发现,当加入 50 ng Apaf-1 质粒时,荧光信号减弱,并且随着 Apaf-1 浓度的增加,检测到的荧光信号逐渐减弱。这些结果揭示了 Apaf-1 能够抑制 wnt/ β -catenin 信号通路活性,且具有剂量依赖效应。

在 Wnt 介导的四种通路中经典的 Rspo1/Wnt/ β -catenin 信号通路最受关注,因为经典信号通路在哺乳动物的发育过程中发挥着举足轻重的作用,例如器官再生、性别分化和肿瘤形成^[7-8]。在正常的肝细胞中, β -catenin 作为一种细胞骨架蛋白在胞膜处与钙黏蛋白(E-cadherin)形成复合体对维持同型细胞的黏附、防止细胞移动发挥作用,而在肝癌细胞中, β -catenin 与由 APC 和 Apaf-1 组成的复合物减少,从而影响 wnt/ β -catenin 信号通路异常,导致肝癌细胞的构像发生改变^[10]。本研究利用 PCR 检测肝癌细胞株 Apaf-1 的表达明显低于正常肝细胞株,验证了 Apaf-1 确实可能通过 wnt/ β -catenin 信号通路抑制肝癌细胞。

长期以来由于技术上的瓶颈,基因的研究很长一段时间大部分都停留在克隆和表达层面,功能研究比较缺乏,极大限制了对许多重要基因的功能认知。RNAi 修饰技术的出现是对基因功能研究技术的突破,具有特异性强、操作简便、高效的特点^[4]。构建 Apaf-1 表达载体转染至肝癌细胞株 HepG2 中,根据荧光信号确认成功在 HepG2 中敲降了 Apaf-1 基因。通过 PCR 和 Western blot 检测发现,敲降了 Apaf-1 基因后,HepG2 中 β -catenin 积聚,引起与相关联的 wnt/ β -catenin 信号通路的

相关基因和因子的表达量改变,例如与细胞有丝分裂相关的 CDK2 和 Cyclin A 上升,wnt/ β -catenin 信号通路上游与 β -catenin 结合的靶蛋白 APC 的表达量下降等,从而引起 wnt/ β -catenin 信号通路异常激活,促进了肿瘤的发生,这些结果都进一步揭示了 Apaf-1 可能参与调控肝癌的发生^[13]。

综上所述,Apaf-1 能够通过 wnt/ β -catenin 信号通路调控肝癌细胞的生成,为进一步在动物体内研究肝癌的发生提供了一定的理论基础和依据,同时为肝癌的治疗提供了新的思路^[14]。

参考文献

[1] ISAYAMA H, NAKAI Y, RERKNIMITR R, et al. The Asian consensus statements on endoscopic management of walled-off necrosis part 1: epidemiology, diagnosis and treatment[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2016, 4(4): 13394-13402.

[2] PÁEZ D, GERGER A, ZHANG W, et al. Association of common gene variants in the WNT/ β -catenin pathway with colon cancer recurrence[J]. Pharmacogenomics J, 2014, 14(2): 142-150.

[3] CHUNG Y J, KIM H J, PARK S H, et al. Transcriptome analysis reveals that Müllerian inhibiting substance regulates signaling pathways that contribute to endometrial carcinogenesis[J]. Int J Oncol, 2015, 46(5): 2039-2046.

[4] LI M, WANG X, JIA T, et al. Tankyrase inhibitors attenuate WNT/ β -catenin signaling and inhibit growth of hepatocellular carcinoma cells[J]. Oncotarget, 2015, 6(28): 25390-25401.

[5] WU L, YANG P, LUO F, et al. R-spondin1 signaling pathway is required for both the ovarian and testicular development in a teleosts, Nile tilapia (Oreochromis niloticus)[J]. Gen Comp Endocrinol, 2016, 4(1): 177-185.

[6] WU L, WU F, LANG X, et al. Synergistic role of β -catenin1 and 2 in ovarian differentiation and maintenance of female pathway in Nile tilapia[J]. Mol Cell Endocrinol,

2016, 15(5): 33-44.

[7] GALLINA D, PALAZZO I, STEFFENSON L, et al. Wnt/ β -catenin-signaling and the formation of Müller glia-derived progenitors in the chick retina[J]. Dev Neurobiol, 2016, 76(9): 983-1002.

[8] XIAO W, JIANG W, SHEN J, et al. Retinoic acid Ameliorates pancreatic fibrosis and inhibits the activation of pancreatic stellate cells in mice with experimental chronic pancreatitis via suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0141462.

[9] OKABE H, KINOSHITA H, IMAI K, et al. Diverse basis of β -catenin activation in human hepatocellular carcinoma: implications in biology and prognosis[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0152695.

[10] YIP L, SOSA J A. Molecular-directed treatment of differentiated thyroid cancer: advances in diagnosis and treatment[J]. JAMA Surg, 2016, 151(7): 663-670.

[11] HIRPARA J L, LOH T, NG S B, et al. Aberrant localization of apoptosis protease activating factor-1 in lipid raft sub-domains of diffuse large B cell lymphomas[J]. Oncotarget, 2016, 7(51): 83964-83975.

[12] GAO J, LU W F, DAI Z J, et al. Induction of apoptosis by total flavonoids from Scutellaria barbata, D. Don in human hepatocarcinoma MHCC97-H cells via the mitochondrial pathway[J]. Tumour Biol, 2014, 33(3): 2549-2559.

[13] PHAM H H, SEONG Y A, OH C W, et al. The herbal medicine cyperus amuricus inhibits proliferation of human hepatocellular carcinoma Hep3B cells by inducing apoptosis and arrest at the G₀/G₁ cell cycle phase[J]. Int J Oncol, 2016, 49(5): 2046-2054.

[14] PARK H J, JEON Y K, YOU D H, et al. Daidzein causes cytochrome c-mediated apoptosis via the Bcl-2 family in human hepatic cancer cells[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 60(10): 542-549.

(收稿日期: 2017-06-22 修回日期: 2017-08-30)

(上接第 348 页)

A, VANHECKE T E. Galectin-3; a novel blood test for the evaluation and management of patients with heart failure[J]. Rev Cardiovasc Med, 2011, 12(4): 200-210.

[11] LOK D J, KLIP I T, LOK S I, et al. Incremental prognostic power of novel biomarkers (growth-differentiation factor-15, high-sensitivity C-reactive protein, galectin-3, and high-sensitivity troponin-T) in patients with advanced chronic heart failure[J]. Am J Cardiol, 2013, 112(6): 831-837.

[12] WEIR R A, PETRIE C J, MURPHY C A, et al. Galectin-3 and cardiac function in survivors of acute myocardial infarction[J]. Circ Heart Fail, 2013, 6(3): 492-498.

[13] CALVIER L, MARTINEZ-MARTINEZ E, MIANA M, et al. The impact of galectin-3 inhibition on aldosterone-induced cardiac and renal injuries[J]. JACC Heart Failure, 2015, 3(1): 59-67.

[14] LIN Y H, CHOU C H, WU X U, et al. Aldosterone induced galectin-3 secretion in vitro; from cells to humans[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e95254.

[15] VERGARO G, PRUD' HOMME M, FAZAL L, et al. Inhibition of galectin-3 pathway prevents isoproterenol-induced left ventricular dysfunction and fibrosis in mice[J]. Hypertension, 2016, 67(3): 606-612.

(收稿日期: 2017-06-19 修回日期: 2017-08-27)