

## NS5ATP9 抑制血清饥饿诱导的 HepG2 细胞凋亡

赵崇山 刘顺爱 王琦 张锦前 赵龙凤 成军

**【摘要】 目的** 探讨 HCV NS5A 反式激活基因 NS5ATP9 对肝癌细胞系 HepG2 细胞凋亡的影响。**方法** 将 NS5ATP9 基因表达质粒、NS5ATP9 干扰 RNA 质粒及各自的对照空质粒转染到 HepG2 细胞中,48 h 后换无血清培养基培养 24 h 诱导细胞凋亡,采用实时荧光定量 PCR 验证转染后 NS5ATP9 mRNA 表达水平的变化,采用 Annexin V/7-AAD 流式细胞术检测细胞凋亡情况,JC-1 检测线粒体膜电位,Western blot 检测 Bax 蛋白表达,综合观察 NS5ATP9 对 HepG2 细胞血清饥饿诱导凋亡的影响。**结果** Annexin V/7-AAD 检测结果显示,和对照组细胞相比 NS5ATP9 过表达组早期凋亡和总凋亡率显著减少( $P < 0.05$ );而 NS5ATP9 干扰 RNA 组细胞的早期凋亡、晚期凋亡和总凋亡率均显著增加( $P < 0.05$ )。JC-1 检测结果显示,和对照组相比 NS5ATP9 过表达组细胞线粒体膜电位保持正常形式的比例增加,而出现去极化电位形式的比例显著减少( $P < 0.05$ );而 NS5ATP9 干扰 RNA 组线粒体膜电位保持正常形式的比例显著减少( $P < 0.05$ )。Western blot 检测结果显示,NS5ATP9 干扰 RNA 组促凋亡分子 Bax 表达量显著升高( $P < 0.05$ ),NS5ATP9 过表达组 Bax 表达量则有下降趋势。**结论** NS5ATP9 基因抑制血清饥饿诱导的 HepG2 细胞凋亡,其机制可能是通过线粒体途径实现。

**【关键词】** NS5ATP9 基因;细胞凋亡;线粒体

**The inhibition of NS5ATP9 on the apoptosis of HepG2 induced by serum starvation** ZHAO Chong-shan, LIU Shun'ai, WANG Qi, ZHANG Jin-qian, ZHAO Long-feng, CHENG Jun. Department of Infective Diseases, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China  
Corresponding authors: CHENG Jun, chengjdt@ccmu.edu.cn; ZHAO Long-feng, Email: longfengzhao@yahoo.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of NS5ATP9 on the apoptosis of HepG2 cells. **Methods** NS5ATP9 expression plasmid (pEGFP-N1-NS5ATP9) and miR RNAi expression vectors for NS5ATP9 (pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-NS5ATP9) and their empty plasmids were transiently transfected into HepG2 cells by jet PRIME, respectively. Cell apoptosis was induced by serum starvation. The expression of NS5ATP9 in HepG2 cells was detected by semiquantitative RT-PCR. Cell apoptosis was evaluated by Annexin V/7-AAD, mitochondrial membrane potentials was detected by JC-1 staining. Bax protein was semiquantified by Western blot. **Results** After overexpression of NS5ATP9, the proportion of early and total apoptosis in HepG2 cells detected by Annexin V/7-AAD decreased significantly ( $P < 0.05$ ), when the expression of NS5ATP9 was knocked down by RNAi expression vector transfection, the proportion of early, late and total apoptosis increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the percentage of cells with polarization membrane potential increased after NS5ATP9 overexpression, meanwhile cells with depolarization membrane potential decreased significantly ( $P < 0.05$ ); after NS5ATP9 being knocked down, the percentage of cells with polarization membrane potential decreased significantly ( $P < 0.05$ ). NS5ATP9 overexpression downregulated the expression of pro-apoptotic protein Bax, and NS5ATP9 being knocked down induced upregulating of Bax significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The investigation suggested that NS5ATP9 inhibits apoptosis via mitochondrial apoptotic pathway in HepG2 cells.

**【Key words】** NS5ATP9 gene; Apoptosis; Mitochondria

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.02.001

基金项目:首都医学发展科研基金(2009-3152)

作者单位:山西医科大学第一医院感染病科(赵崇山、赵龙凤);首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所(赵崇山、刘顺爱、王琦、张锦前、成军)

通讯作者:成军,Email:chengjdt@ccmu.edu.cn;

赵龙凤,Email:longfengzhao@yahoo.com

丙型肝炎病毒(HCV)感染后常引起慢性肝炎,甚至肝硬化和肝癌。HCV相关肝病在世界范围内慢性肝病中所占的比重不断上升,严重影响人类健康<sup>[1-2]</sup>。已有研究表明HCV非结构蛋白NS5A在HCV致病过程中发挥重要作用,具有抑制肝细胞凋亡的作用<sup>[3]</sup>,可促进肝癌的发生发展,但其机制尚不明确。本课题组用抑制性消减杂交法筛选并克隆了NS5A反式激活靶基因HCV NS5A蛋白反式激活基因9(NS5ATP9)<sup>[4]</sup>。近年研究结果表明,NS5ATP9可能与细胞增殖、分化、信号转导、代谢、凋亡及肝纤维化的发生发展相关,另有研究显示其在肝癌、乳腺癌、肾上腺肿瘤、原发性肺癌等多种肿瘤组织中出现高表达,且预示着临床预后不良<sup>[5-8]</sup>,说明NS5ATP9可能在HCV相关肝癌的发生中起着重要作用,其机制研究具有重要意义。本研究旨在探讨NS5ATP9对血清饥饿所诱导的HepG2细胞凋亡的影响,以明确NS5ATP9是否通过对细胞凋亡的调控来参与肝癌的发病与进展。

## 材料与方 法

### 一、主要材料及试剂

肝癌细胞系HepG2细胞、NS5ATP9表达质粒pEGFP-N1-NS5ATP9、NS5ATP9干扰RNA质粒pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-NS5ATP9(简称pcDNA6.2-NS5ATP9)及各自相应的空质粒均为本研究所保存。

jet PRIME™ DNA&siRNA转染试剂为法国Polyplus公司产品;细胞凋亡检测试剂Annexin V-Alexa fluor 647和7-AAD Viability Staining solution为美国Biolegend公司产品;线粒体跨膜电位指示荧光染料JC-1试剂盒为美国BD公司产品;荧光定量PCR试剂Power SYBR GREEN PCR Master Mix为英国Applied Biosystem公司产品;抗-Bax、羊抗鼠二抗IgG-HRP购自北京中杉金桥生物技术公司,抗- $\beta$ -actin为美国Santa Cruz公司产品。

### 二、方 法

1. 细胞培养与转染:用含10% FBS的DMEM培养基于37℃恒温,5% CO<sub>2</sub>常规传代培养肝癌细胞系HepG2细胞。取对数生长期HepG2细胞进行NS5ATP9表达质粒和干扰RNA质粒转染,按照jet PRIME™ DNA&siRNA转染试剂说明书进行操作。

2. 实验分组:未转染质粒的空白对照组;pEGFP-N1空质粒转染组(HepG2/pEGFP-N1);NS5ATP9表达质粒转染组(HepG2/pEGFP-N1-NS5ATP9);干扰RNA空质粒转染组

(HepG2/pcDNA6.2);NS5ATP9干扰RNA质粒转染组(HepG2/pcDNA6.2-NS5ATP9)。

3. 血清饥饿诱导肝癌细胞凋亡方法:将HepG2细胞按 $2.5 \times 10^4$ /孔接种到24孔板培养24 h,按照实验分组进行细胞转染。各组细胞于转染后48 h换无血清DMEM培养基继续培养24 h,用0.25%胰酶消化收集细胞后进行以下实验。

4. Annexin V流式细胞术凋亡检测及分析:所收获细胞用预冷的染色缓冲液洗涤两次并用结合缓冲液重悬之后加入Annexin V-Alexa fluor 647和7-AAD Viability staining solution室温避光孵育15 min,加入结合缓冲液重悬细胞,BD\_FACSCalibur流式细胞仪检测并分析。AnnexinV<sup>-</sup>7-AAD<sup>-</sup>为正常细胞;AnnexinV<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup>为早期凋亡细胞;AnnexinV<sup>+</sup>7-AAD<sup>+</sup>为晚期凋亡细胞。

5. JC-1法检测线粒体膜电位:所收获细胞中加入线粒体跨膜电位指示荧光染料JC-1工作液,混匀后于37℃ 5% CO<sub>2</sub>温箱内孵育10~15 min,用缓冲液洗涤两遍,BD\_FACSCalibur流式细胞仪检测并分析。正常线粒体的膜电位具有极性,JC-1依赖于膜电位的极性被迅速摄入线粒体内,并因浓度增高而在线粒体内形成多聚体,多聚体发射光为红色和绿色荧光(R2区);当细胞凋亡时,线粒体跨膜电位去极化,JC-1从线粒体内释放,以单体形式存在,红色荧光强度减弱,仅显示绿色荧光(R3区)。用红色荧光细胞百分率、绿色荧光百分率及红/绿的荧光比值,即 $\Delta\psi_m$ 表示线粒体膜电位变化程度(图1)。

6. Western blot检测Bax蛋白表达量:提取所获细胞总蛋白,按常规方法进行Western blot检测,一抗为抗-Bax,二抗为羊抗鼠IgG-HRP。

### 三、统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0软件进行统计学分析,采用 $t$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 结 果

一、NS5ATP9表达质粒及干扰RNA质粒转染HepG2细胞后NS5ATP9表达变化

各种质粒转染48 h后荧光显微镜下观察细胞可见绿色荧光,转染效率约35%~45%。半定量Realtime PCR结果显示,NS5ATP9表达质粒转染组和空质粒对照组相比NS5ATP9 mRNA上调29.68倍,而NS5ATP9干扰RNA质粒转染组和对照组相比NS5ATP9 mRNA下降30%。

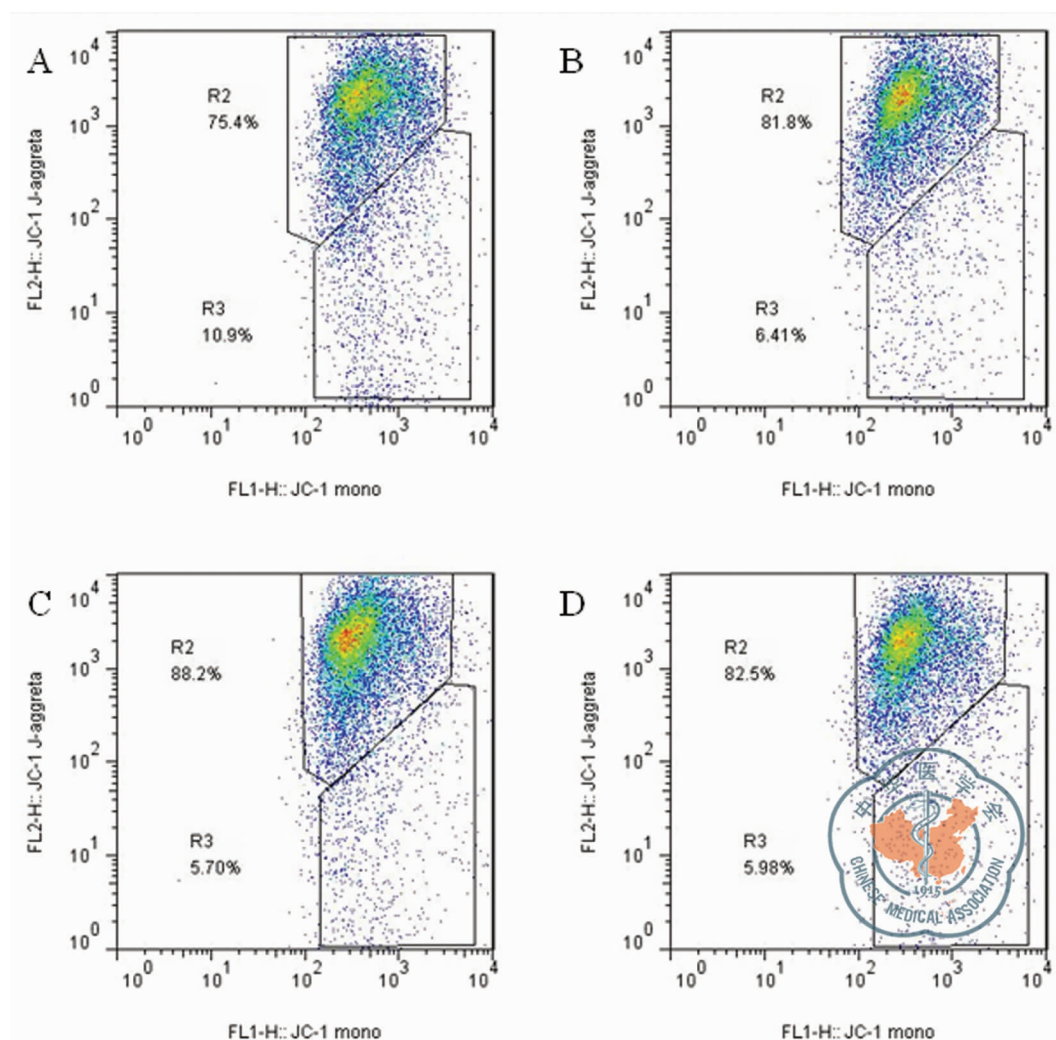


图1 NS5ATP9 表达变化对饥饿诱导的 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响

注: HepG2 细胞转染 pEGFP-N1 (A)、pEGFP-N1-NS5ATP9 (B)、pcDNA6.2 (C)、pcDNA6.2-NS5ATP9 (D) 48 h 后, 换无血清 DMEM 培养基继续培养 24 h, 收获细胞进行流式细胞检测并分析

## 二、NS5ATP9 基因表达变化对 Annexin V 表达的影响

质粒转染及血清饥饿诱导凋亡后的各组细胞 Annexin V/7-AAD 检测结果显示, NS5ATP9 表达质粒转染组与空质粒对照组相比, 早期凋亡和总凋亡率均显著减少 ( $P < 0.05$ ); 晚期凋亡率亦有减少趋势, 但无统计学差异 ( $P = 0.189$ )。而 NS5ATP9 干扰 RNA 质粒转染组与空质粒对照组相比, 早期凋亡、晚期凋亡和总凋亡率均显著增加 ( $P < 0.05$ ) (见表 1)。以上结果说明 NS5ATP9 基因表达抑制肝癌细胞凋亡。

## 三、NS5ATP9 基因表达变化对线粒体膜电位的影响

NS5ATP9 过表达组与空质粒对照组相比, R2 区细胞有所增加 ( $P = 0.053$ ), R3 区细胞显著减少 ( $P < 0.05$ ), 且  $\Delta\psi_m$  呈上升趋势 ( $P = 0.324$ )。而

NS5ATP9 干扰 RNA 质粒转染组与空质粒对照组相比, R2 区细胞显著减少 ( $P < 0.05$ ), 且  $\Delta\psi_m$  呈下降趋势 ( $P = 0.378$ ) (见表 2, 图 1)。以上结果显示, NS5ATP9 基因表达可使血清饥饿诱导凋亡的肝癌细胞线粒体膜电位去极化程度有所改善, 而干扰 NS5ATP9 基因的表达可以增强去极化, 提示 NS5ATP9 基因表达可抑制肝癌细胞线粒体膜电位的去极化, 从而抑制细胞凋亡。

## 四、NS5ATP9 表达变化对 Bax 蛋白的影响

Western blot 检测各组细胞 Bax 蛋白表达并进行灰度分析。结果显示, NS5ATP9 表达质粒转染组 ( $0.72 \pm 0.25, n = 3$ ) 和对照组 ( $0.57 \pm 0.09, n = 3$ ) 相比, Bax 表达量下降 ( $P = 0.551$ ), 而 NS5ATP9 干扰 RNA 空质粒转染组 ( $1.01 \pm 0.27, n = 4$ ) 和对照组 ( $0.57 \pm 0.10, n = 4$ ) 相比 Bax 表达量显著升高 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。以上结果说明 NS5ATP9 基因



表达导致促凋亡分子 Bax 蛋白的表达下降,从而抑制细胞凋亡。

## 讨 论

NS5ATP9 最早在增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的酵母双杂交中筛选出来,因其蛋白分子量为 15 kDa 故命名为 p15 (PAF), 随后又命名为 KIAA0101<sup>[9]</sup>。已有临床研究发现, NS5ATP9 在多种恶性肿瘤中高表达,并且与患者不良预后相关<sup>[6-8]</sup>。近年来也有基础研究表明 KIAA0101 经 siRNA 沉默后可以抑制未分化的甲状腺癌 KTA2 细胞系、胰腺癌细胞系及肾上腺皮质肿瘤细胞系 NCI-H295R 的增殖<sup>[8,10,11]</sup>。特别指出的是 Yuan 等<sup>[5]</sup>发现 216 例原发单灶 HCC 患者组织中有 131 例高表达 KIAA0101 且与肿瘤高分级、高分期,

早期循环肿瘤细胞出现及低于 5 年生存率相关。然而也有文献报道 HCC 组织低表达 KIAA0101,且体外细胞实验显示其可抑制细胞生长<sup>[12]</sup>。目前关于 NS5ATP9 对肝细胞癌细胞凋亡的深入研究尚少。

本研究 AnnexinV/7-AAD 结果显示,血清饥饿诱导可以促进 HepG2 细胞凋亡,NS5ATP9 基因过表达组较对照组的凋亡率显著减少,而 NS5ATP9 干扰组较对照组凋亡率显著增加,表明 NS5ATP9 高表达可以抑制 HepG2 细胞系饥饿诱导的凋亡,而下调 NS5ATP9 将加速凋亡。在预实验中发现 NS5ATP9 过表达对不经饥饿诱导的细胞凋亡作用较对照组无显著差异,而 NS5ATP9 干扰组较对照组出现早期凋亡增加,但幅度并不大。这表明血清饥饿后 NS5ATP9 抑制凋亡的作用可被放大。

表 1 AnnexinV/7-AAD 法检测各组 HepG2 细胞凋亡情况 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

分组	n	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
HepG2/pEGFP-N1	5	31.09 $\pm$ 13.28	5.21 $\pm$ 2.21	36.30 $\pm$ 12.46
HepG2/pEGFP-N1-NS5ATP9	5	25.56 $\pm$ 12.76 <sup>a</sup>	3.90 $\pm$ 0.90 <sup>b</sup>	29.47 $\pm$ 13.08 <sup>a</sup>
HepG2/pcDNA6.2	7	15.49 $\pm$ 9.01	3.16 $\pm$ 1.08	18.66 $\pm$ 9.02
HepG2/pcDNA6.2-NS5ATP9	7	29.98 $\pm$ 20.61 <sup>c</sup>	5.12 $\pm$ 3.19 <sup>c</sup>	35.10 $\pm$ 22.24 <sup>c</sup>

注:与 HepG2/pEGFP-N1 组相比<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P = 0.189$ ;与 HepG2/pcDNA6.2 组相比<sup>c</sup> $P < 0.05$

表 2 JC-1 流式细胞术检测各组细胞线粒体膜电位情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	R2 (%)	R3 (%)	$\Delta\psi_m$
HepG2/pEGFP-N1	11	79.36 $\pm$ 4.65	7.42 $\pm$ 1.37	1.65 $\pm$ 0.32
HepG2/pEGFP-N1-NS5ATP9	11	83.75 $\pm$ 5.30 <sup>a</sup>	5.89 $\pm$ 1.49 <sup>b</sup>	1.82 $\pm$ 0.48 <sup>c</sup>
HepG2/pcDNA6.2	8	87.16 $\pm$ 1.99	5.07 $\pm$ 0.82	2.83 $\pm$ 0.34
HepG2/pcDNA6.2-NS5ATP9	8	83.57 $\pm$ 3.55 <sup>d</sup>	5.15 $\pm$ 0.89 <sup>e</sup>	2.70 $\pm$ 0.23 <sup>f</sup>

注:与 HepG2/pEGFP-N1 组相比<sup>a</sup> $P = 0.053$ ,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ,<sup>c</sup> $P = 0.324$ ;与 HepG2/pcDNA6.2 组相比<sup>d</sup> $P < 0.05$ ,<sup>e</sup> $P = 0.845$ ,<sup>f</sup> $P = 0.378$

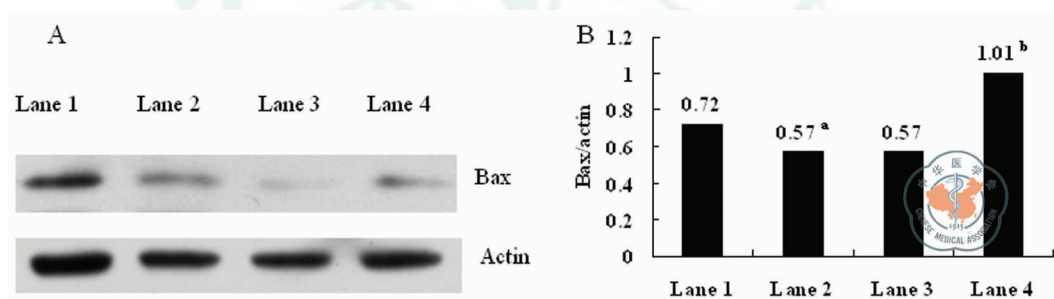


图 2 NS5ATP9 表达变化对 Bax 蛋白表达的影响

注:HepG2 细胞转染各组质粒 48 h 后,换无血清 DMEM 培养基继续培养 24 h,收获细胞提取细胞总蛋白进行 Western blot 检测。A,Western blot 结果;B,Bax 与 actin 的灰度比值。Lane 1:HepG2/pEGFP-N1, Lane 2:HepG2/pEGFP-N1-NS5ATP9, Lane 3:HepG2/pcDNA6.2, Lane 4:HepG2/pcDNA6.2-NS5ATP9。HepG2/pEGFP-N1-NS5ATP9 与 HepG2/pEGFP-N1 相比<sup>a</sup> $P = 0.551$ ; HepG2/pcDNA6.2-NS5ATP9 与 HepG2/pcDNA6.2 相比<sup>b</sup> $P < 0.05$

Simpson 等<sup>[13]</sup>用一种抗-NS5ATP9 的多克隆抗血清,发现一系列的哺乳动物肿瘤细胞和非肿瘤细胞系的内生 NS5ATP9 集中于细胞核和线粒体。因此,本研究设想 NS5ATP9 对细胞凋亡的影响可能与线粒体有关。而用 JC-1 法检测细胞线粒体膜电位结果发现 NS5ATP9 过表达组较对照组保持正常线粒体膜电位的细胞比例增加,而 NS5ATP9 干扰组较对照组保持正常线粒体膜电位的细胞比例减少,且  $\Delta\psi_m$  呈现相同趋势,由于表达载体及干扰载体使细胞携带绿色荧光蛋白会对  $\Delta\psi_m$  的分析产生影响,可能导致差异被掩盖。基于此,本研究认为 NS5ATP9 抑制 HepG2 细胞凋亡的机制涉及线粒体凋亡途径。为进一步探明 NS5ATP9 对线粒体凋亡途径的影响,本研究进行了 Bax 蛋白表达量的检测。Bcl-2/Bax 表达比例与肿瘤细胞的凋亡密切相关。Bax 是线粒体凋亡途径中具有代表性的效应分子之一,通过破坏线粒体的渗透性转换来促进细胞色素 C 释放并进一步促进凋亡的发展。本实验发现 NS5ATP9 过表达组较对照组的 Bax 表达量减少,而 NS5ATP9 干扰组 Bax 水平较对照组显著增加。进一步证实了 NS5ATP9 经由线粒体凋亡途径抑制饥饿诱导的 HepG2 细胞凋亡。

综上所述,NS5ATP9 可通过线粒体凋亡途径抑制饥饿诱导的 HepG2 细胞凋亡。然而,NS5ATP9 对线粒体凋亡途径的作用通过哪些调控水平来实现尚未明确。NS5ATP9 是否还通过其他凋亡途径影响肿瘤细胞的凋亡,如死亡受体途径、内质网应激途径等,以及这些途径与线粒体凋亡途径间是否存在复杂的相互作用仍待进一步研究。

#### 参 考 文 献

- Williams R. Global challenges in liver disease. *Hepatology*, 2006, 44 (3): 521-526.
- Koike K. Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22 (Suppl 1): S108-S111.
- Tamura R, Kanda T, Imazeki F, et al. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein inhibits lipopolysaccharide-mediated apoptosis of hepatocytes by decreasing expression of Toll-like receptor 4. *Infect Dis*, 2011, 204 (5): 793-801.
- Shi L, Zhang SL, Li K, et al. NS5ATP9, a gene up-regulated by HCV NS5A protein. *Cancer Lett*, 2008, 259 (2): 192-197.
- Yuan RH, Jeng YM, Pan HW, et al. Overexpression of KIAA0101 predicts high stage, early tumor recurrence, and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2007, 13 (18 Pt 1): 5368-5376.
- Kais Z, Barsky SH, Mathsyaraja H, et al. KIAA0101 interacts with BRCA1 and regulates centrosome number. *Mol Cancer Res*, 2011, 9 (8): 1091-1099.
- Kato T, Daigo Y, Aragaki M, et al. Overexpression of KIAA0101 predicts poor prognosis in primary lung cancer patients. *Lung Cancer*, 2012, 75 (1): 110-118.
- Jain M, Zhang L, Patterson EE, et al. KIAA0101 is overexpressed, and promotes growth and invasion in adrenal cancer. *PLoS One*, 2011, 6 (11): e26866.
- Yu P, Huang B, Shen M, et al. p15 (PAF), a novel PCNA associated factor with increased expression in tumor tissues. *Oncogene*, 2001, 20 (4): 484-489.
- 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. *Cancer*, 2005, 103 (9): 1785-1790.
- Hosokawa M, Takehara A, Matsuda K, et al. Oncogenic role of KIAA0101 interacting with proliferating cell nuclear antigen in pancreatic cancer. *Cancer Res*, 2007, 67 (6): 2568-2576.
- Guo M, Li J, Wan D, et al. KIAA0101 (OEATC-1), an expressionally down-regulated and growth-inhibitory gene in human hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 2006, 6: 109.
- Simpson F, Lammerts van Bueren K, Butterfield N, et al. The PCNA-associated factor KIAA0101/p15 (PAF) binds the potential tumor suppressor product p33ING1b. *Exp Cell Res*, 2006, 312 (1): 73-85.

(收稿日期: 2011-12-10)

(本文编辑: 孙荣华)

赵崇山, 刘顺爱, 王琦, 等. NS5ATP9 抑制血清饥饿诱导的 HepG2 细胞凋亡[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2012, 6 (2): 88-92.