

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.24.004

文章编号: 1005-8982 (2018) 24-0022-05

## 靶向 PDCD5-Caspase-3 融合基因过表达 对 HepG2 肝癌细胞增殖与凋亡的影响

胥丹<sup>1</sup>, 姜淮芜<sup>2</sup>, 蒲羽<sup>2</sup>

(1. 西南医科大学, 四川 泸州 646000; 2. 四川绵阳 404 医院腹部外科,  
四川 绵阳 621000)

**摘要:** **目的** 探讨靶向 PDCD5-Caspase-3 融合基因过表达对 HepG2 肝癌细胞体外增殖与凋亡的影响。**方法** 利用基因重组技术构建 PDCD5-Caspase-3 融合基因, 克隆到带有 EGFP 基因的 GV358 慢病毒表达载体, 与辅助质粒共同转染 293T 细胞, 通过同源重组, 获得融合基因重组慢病毒 PDCD5-Caspase-3。体外转染人肝癌 HepG-2 细胞 72 h 后, Western blot 检测肝癌 HepG-2 细胞中 PDCD5 蛋白和 Caspase-3 蛋白表达, CCK-8 法检测 PDCD5-Caspase-3 融合基因过表达对 HepG-2 肝癌细胞增殖的影响, 流式细胞术观察其对细胞凋亡的影响。**结果** PDCD5-Caspase-3 融合基因过表达可增加 HepG-2 肝癌细胞中 PDCD5 蛋白和 Caspase-3 蛋白合成 ( $P < 0.05$ ); 与对照组或空白组相比, 转染 72 h 后实验组细胞增殖能力下降 ( $P < 0.05$ ); 与对照组或空白组比较, 转染 72 h 后实验组细胞凋亡率增加 ( $P < 0.05$ )。**结论** 促凋亡基因 PDCD5 和 Caspase-3 联合表达可抑制 HepG2 肝癌细胞增殖, 并促进其凋亡, 可作为肝癌治疗潜在靶点。

**关键词:** PDCD5; Caspase-3; 融合基因; 细胞增殖; 细胞凋亡

**中图分类号:** R735.7

**文献标识码:** A

## Effect of PDCD5-Caspase-3 fusion gene overexpression on proliferation and apoptosis of HepG2 hepatoma cells

Dan Xu<sup>1</sup>, Huai-wu Jiang<sup>2</sup>, Yu Pu<sup>2</sup>

(1. Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Abdominal Surgery, Sichuan Mianyang 404 Hospital, Mianyang, Sichuan 621000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of PDCD5-Caspase-3 fusion gene overexpression on proliferation and apoptosis of human liver cancer HepG2 cell line. **Methods** PDCD5-Caspase-3 fusion gene was constructed and sub-cloned into GV358 eukaryotic expression vector. 293T cells were co-transfected with helper plasmid and virus. PDCD5-Caspase-3 fusion gene recombinant lentivirus was transfected into HepG2 hepatoma cells for 72 hours. Expression of PDCD5 and Caspase-3 protein was measured by Western blot. Cell proliferation and apoptosis were identified by CCK-8 and flow cytometry, respectively. **Results** PDCD5 and Caspase-3 were significantly increased in HepG2 hepatoma compared with control group ( $P < 0.05$ ). Cellular proliferation was decreased while apoptosis rate was increased 72 hours after transfection in transfection group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Overexpression of PDCD5-Caspase-3 fusion gene inhibits cancer cell growth and may be a potential therapeutic target.

**Keywords:** PDCD5; Caspase-3; fusion gene; cell proliferation; cell apoptosis

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是目前临床常见恶性肿瘤之一, 世界上癌症相关死亡的第二大肿瘤类型, 世界每年肝癌新发病例 52.3 万例<sup>[1]</sup>。目前治疗手段有限, 主要以放疗、化疗和分子靶向药物治疗为主, 5 年存活率 <5%, 预后不佳<sup>[2-3]</sup>。HCC 发生与发展与肿瘤细胞凋亡关系密切, 而诱导细胞凋亡的策略成为近年来晚期 HCC 治疗重点。PDCD5 和 Caspase-3 蛋白是目前发现的细胞凋亡关键酶, 调控细胞凋亡信号传导的中心环节, 能促进细胞凋亡发生<sup>[4-5]</sup>。本研究通过慢病毒转染靶向 PDCD5-Caspase-3 融合基因过表达作用于人肝癌细胞 HepG2, 观察 PDCD5 和 Caspase-3 蛋白对 HepG2 肝癌细胞增殖和凋亡作用的影响, 初步探讨其作为肝癌治疗潜在靶点的可行性。

## 1 材料与与方法

### 1.1 实验动物与试剂

人 HepG-2 肝癌细胞 (购自上海复祥生物科技有限公司), 胰蛋白酶、DMEM 无血清培养基和胎牛血清 (购自美国 Gibco 公司), 青霉素和链霉素 (购自上海生物工程有限公司), CCK-8 检测试剂盒、APC-Annexin V 细胞凋亡试剂盒和蛋白提取试剂盒 (购自南京凯基生物科技发展有限公司), 鼠抗人单克隆 PDCD5 抗体、鼠抗人单克隆 Caspase-3 抗体 (购自美国 Acom 公司), 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记山羊抗鼠 IgG (购自美国 Sigma 公司), 兔抗鼠  $\beta$ -actin 单克隆抗体 (购自美国 Santa Cruz 公司)。蛋白电泳仪为美国 Bio-Rad 公司产品。PDCD5-Caspase-3 融合基因合成及转染用慢病毒均由上海吉凯基因公司提供。

### 1.2 PDCD5-Caspase-3 融合基因构建及慢病毒包装

利用 PubMed 基因数据库查询 PDCD5 和 Caspase-3 基因 CDS 序列, 设计相应融合基因序列, PCR 扩增 PDCD5-Caspase-3 融合基因片段, 将目的融合基因克隆到慢病毒 GV358 中, 引物序列: 正向 5'-CCATCAGAGAGAAAACCGAAC-3', 反向 5'-CCTCTTATAGTCCACTTATGTC-3', PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共循环 40 次, 72℃ 延伸 5 min, 最后取适量菌液进行测序, 测序结果与目的基因序列进行比对分析, 测序结果与与目标序列完全一致。抽提 Ubi-PDCD5-Caspase-3-SV40-EGFP 质粒, 采用二代自失活型慢病

毒包装系统完成包装过程, 将携带 PDCD5-Caspase-3 融合基因的 GV358 载体质粒、包装质粒 pHelper 1.0 和 pHelper 2.0 共转染 239T 细胞, 转染 48 h 后, 高速离心收集含慢病毒颗粒的 239T 细胞上清液, 置于 -80℃ 冰箱冷冻保存备用。

### 1.3 HepG-2 肝癌细胞转染

HepG-2 肝癌细胞株活性强, 增殖旺盛, 2 ~ 3 d 即可传代 1 次, 待培养细胞贴壁生长至培养瓶的 80% ~ 90% 时, 0.25% 胰蛋白酶消化, 离心收集, 含 10% DMEM 培养基重悬, 按照  $3 \times 10^5$  个 /ml 种植 24 孔板中, 每孔 400  $\mu$ l。按照吉凯公司推荐的 HepG-2 肝癌细胞最佳转染复数为 100, 设置 3 组: ①实验组 (5  $\mu$ g/ml Polybrene+50  $\mu$ l Ubi-PDCD5-Caspase-3-SV40-EGFP 病毒上清液); ②对照组 (5  $\mu$ g/ml Polybrene+50  $\mu$ l 阴性对照病毒上清液); ③空白组 (不加病毒上清液); 37℃ 培养箱中孵育 12 h 后换液, 继续培养。由于质粒中含有 EGFP 基因, 本研究利用荧光显微镜和流式细胞仪检测实验组转染效率。

### 1.4 Western blot 检测 PDCD5 和 Caspase-3 蛋白表达

转染细胞 48 h 后, 离心收集  $5 \times 10^5$  个各组细胞, PBS 清洗 3 次, 蛋白裂解液提取细胞蛋白, BCA 法测定样品中总蛋白浓度, 蛋白变性, SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, PVDF 转膜 80V 2 h, 5% 脱脂奶粉封闭 1h, 剪膜, 加入 1 : 300 稀释鼠抗人单克隆 PDCD5 抗体 (一抗) 和 1 : 500 鼠抗人单克隆 Caspase-3 抗体 (一抗), 4℃ 孵育过夜, 加入 1 : 400 HRP 标记二抗室温孵育 30 min, 1 : 1 000 稀释  $\beta$ -Actin 作为内参, 在 ECL 显色系统中显色定影, AlphaEase FC 软件分析显色的杂交条带。

### 1.5 CCK-8 检测细胞增殖

HepG-2 肝癌细胞转染后, 以  $1 \times 10^5$  个 /ml 种植 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ l, 每组 9 孔, 在转染 24、48 和 72 h, 各组均分别选取 3 孔检测细胞增殖情况, 每孔加入 CCK-8 试剂 10  $\mu$ l, 37℃, 5% 二氧化碳细胞培养箱中培养 2 h, 酶联免疫监测仪检测各孔吸光度 (A) 值, 波长 450 nm, 参比波长为 630 nm。每孔复测 3 次, 取结果平均值行统计分析。

### 1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

按照 APC-Annexin V 细胞凋亡试剂盒说明书操作, 细胞转染 72 h 后, PBS 清洗 2 遍, 胰酶消化, 离

心收集细胞，每管收集  $2 \times 10^5$  个细胞，加入  $500 \mu\text{l}$  的 Binding Buffer 悬浮细胞，分别加入  $5 \mu\text{l}$  Annexin V-APC 和  $5 \mu\text{l}$  Propidium Iodide 混匀，室温避光反应 30 min，流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

### 1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件，计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，比较采用方差分析，两两比较，方差齐性用 LSD-*t* 检验，方差不齐用 Dunnett's T3 法， $P < 0.05$  为差异有统计学意义

## 2 结果

### 2.1 细胞转染效率

转染 12 h 后，PBS 清洗细胞 2 遍，流式细胞仪上样检测细胞转染率达到 98.7% (见图 1A)，荧光显微镜下观察到满视野绿色荧光分布 (见图 1B)，表明 Ubi-PDCD5-Caspase-3-SV40-EGFP 慢病毒能高效转染 HepG-2 肝癌细胞，能用于后续实验。

### 2.2 PDCD5 和 Caspase-3 蛋白表达情况

转染 72 h 后，实验组、对照组和空白组 PDCD5 蛋白相对表达量分别为 ( $0.427 \pm 0.094$ )、( $0.171 \pm 0.059$ ) 和 ( $0.202 \pm 0.077$ )，各组 PDCD5 蛋白相对表达量比较，差异有统计学意义 ( $F = 6.100$ ,  $P = 0.036$ )，实验组 PDCD5 蛋白水平较对照组或空白组均增加，对照组与空白组无差异。实验组、对照组和空白组

Caspase-3 蛋白相对表达量分别为 ( $0.625 \pm 0.132$ )、( $0.151 \pm 0.089$ ) 和 ( $0.139 \pm 0.067$ )，各组 Caspase-3 蛋白相对表达量比较，差异有统计学意义 ( $F = 8.969$ ,  $P = 0.017$ )，实验组 Caspase-3 蛋白水平较对照组或空白组均增加，对照组与空白组无差异 ( $P > 0.05$ )。见图 2。

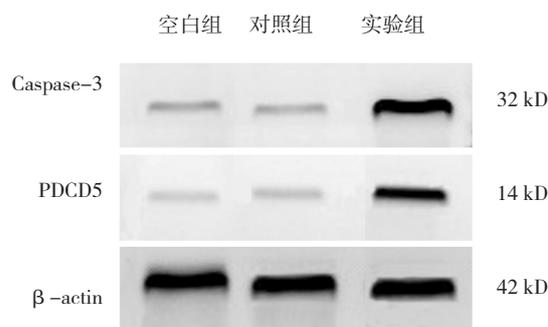


图 2 各组 PDCD5 和 Caspase-3 蛋白表达

### 2.3 细胞增殖变化

细胞转染 72 h 后，实验组细胞增殖能力较对照组和空白组降低，实验组、对照组和空白组 OD 值分别为 ( $1.19 \pm 0.23$ )、( $2.18 \pm 0.51$ ) 和 ( $2.33 \pm 0.48$ )，各组 OD 值比较，差异有统计学意义 ( $F = 5.509$ ,  $P = 0.044$ )，实验组 OD 值较对照组或空白组减少，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，对照组与空白组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.4 细胞凋亡情况

转染 72 h 后，空白组细胞凋亡率为 ( $2.33 \pm 1.02$ )%，对照组的细胞凋亡率为 ( $2.94 \pm 0.81$ )%，实验组细胞凋亡率为 ( $37.7 \pm 5.65$ )%，各组细胞凋亡率比较，差异有统计学意义 ( $F = 49.728$ ,  $P = 0.0184$ )，实验组细胞凋亡率较对照组或空白组减少，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，对照组与空白组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 3。

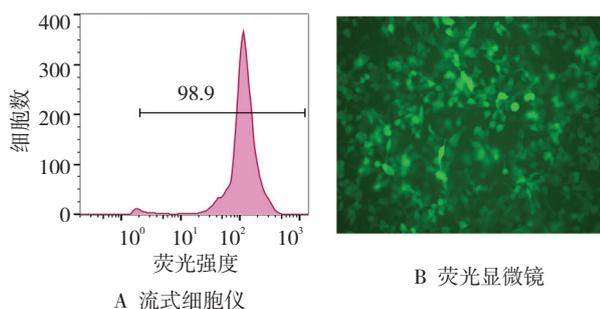
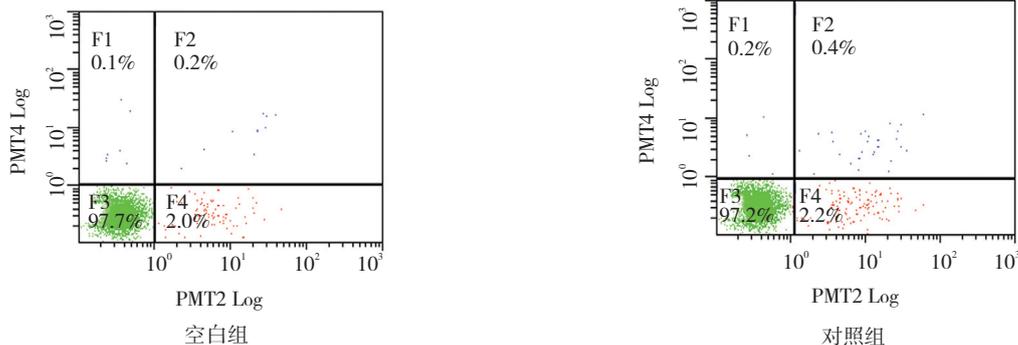


图 1 细胞转染效率



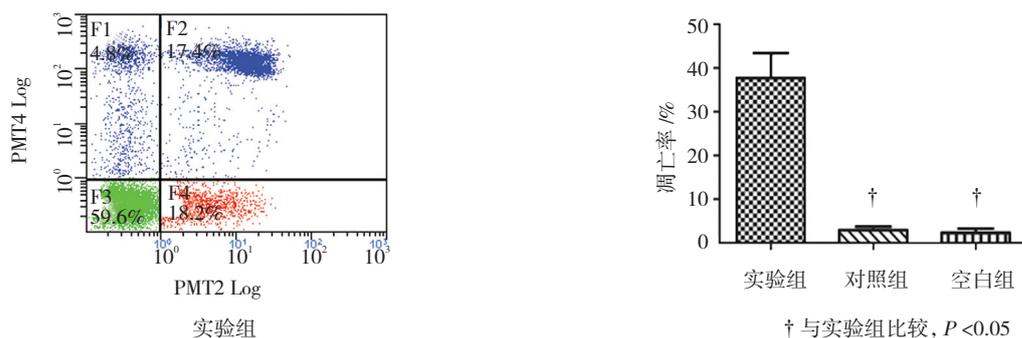


图 3 细胞凋亡率比较

### 3 讨论

近 10 年, 全世界范围内 HCC 发病率上升。若 HCC 早期诊断 (肿瘤直径  $< 2$  cm), 予以手术切除, 则生存率可达到 70%<sup>[6]</sup>。然而, 临床 HCC 患者就诊时已属癌症晚期, 治疗效果较差, 无法单靠手术切除治愈。与其他肿瘤类型发病机制类似, HCC 发生发展与癌基因活化, 抑癌基因失活, 细胞增殖 / 细胞凋亡失衡有关<sup>[7]</sup>。细胞凋亡是由基因控制的细胞自主的有序的死亡, 由一系列促凋亡基因和抑凋亡基因调控, 而肿瘤细胞抑凋亡基因活性增强, 促凋亡基因活性降低, 细胞趋向于永生<sup>[8]</sup>。

在促凋亡蛋白家族中, PDCD5 蛋白是我国率先报道的一种重要的促细胞凋亡相关因子<sup>[9]</sup>。已有报道表明, PDCD5 在肿瘤组织中表达减少, 通过与 P53 信号通路作用促进肿瘤细胞凋亡进程, 有可能作为相关肿瘤诊断与治疗靶点<sup>[10-11]</sup>。研究表明, 与正常组织比较, 肝癌细胞中 PDCD5 mRNA 和蛋白质水平均较低, PDCD5 表达与乙肝病毒感染、肿瘤数、淋巴结转移和肝癌患者存活时间密切相关, 并可作为 HCC 患者总生存期和无痛生存率的预测因子<sup>[12-13]</sup>。另外, PDCD5 基因低表达常诱导其他多种促凋亡因子表达, 维持肝癌细胞的化疗药物敏感性, 增加抗肿瘤治疗效果<sup>[14]</sup>。另外, 细胞凋亡信号通路传导依赖于下游效应蛋白 -Caspase 蛋白激活, 活化 Caspase 在细胞中能够切割 400 多种功能蛋白底物, 如 Lamins、信号分子如蛋白激酶、骨架蛋白、DNA 修复酶等, 该重要蛋白质的降解和核酸酶的激活最终导致细胞凋亡。Caspase-3 蛋白是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶, 也是细胞杀伤机制的重要组成部分。活性 Caspase-3 可作用于一些其他 Caspase 成员, 并降解相应的胞浆核底物, 诱导细胞凋亡, 如果 Caspase-3 活性受到抑制, 则出现细胞凋亡异常, 从而引起肿瘤产生<sup>[15]</sup>。研究表明, 肝癌细胞

HepG2 中 Caspase-3 蛋白活性及蛋白阳性表达率均显著低于正常肝细胞<sup>[16]</sup>。HUA 等<sup>[17]</sup>证实, HCC 分级越高, 癌细胞分化越差, Caspase-3 蛋白阳性表达率越低, 提示 Caspase-3 蛋白表达水平与 HCC 恶性程度呈负相关。

在本实验中, 基于 Caspase-3 和 PDCD5 蛋白在肝癌治疗与预后中重要作用, 笔者利用基因重组技术设计一种能同时靶向过表达上述两种蛋白的融合基因。慢病毒载体可以将外源基因有效地整合到宿主染色体上, 从而实现目的基因长期且稳定的表达, 目前已成为表达外源基因常用载体形式之一。另外, 常用的转染剂, 如脂质体和质粒, 细胞转染效率较低, 且化学转染试剂通常存在较明显的细胞毒性<sup>[18]</sup>。相比较而言, 慢病毒转染效率与细胞类型相关, 一般可达 50% ~ 80%<sup>[19]</sup>。笔者利用人类免疫缺陷型病毒为基础发展起来的慢病毒 GV358 载体, 转染 HepG2 肝癌细胞, 流式细胞仪检测 Ubi-PDCD5-Caspase-3-SV40-EGFP 慢病毒转染效率高达 98.9%, 推测这种高转染效率与细胞类型密切相关, 肿瘤细胞活性强, 其转染率随之升高。成功转染后, 蛋白水平证实转染后实验组 PDCD5 和 Caspase-3 蛋白表达明显增强。其次, 笔者进一步观察抑制 PDCD5 和 Caspase-3 蛋白过表达对于人 HepG2 肝癌细胞增殖和凋亡率的影响, 结果证实, 与未转染和阴性序列转染组比较, 实验组细胞增殖速度放缓, 表明生长状态受到影响。同时, 转染 72 h 后, 实验组 HepG2 肝癌细胞早期凋亡率增加, 且晚期细胞凋亡率和细胞坏死数量均增加。

综上所述, 通过慢病毒转染靶向 PDCD5-Caspase-3 融合基因过表达作用于人肝癌细胞系 HepG2, 可增强 PDCD5 和 Caspase-3 蛋白表达, 降低 HepG2 肝癌细胞增殖速度, 促进 HepG2 肝癌细胞凋亡, 因此有望作为肝癌治疗新型潜在靶点。

## 参 考 文 献:

- [1] DUTTA R, MAHATO R I. Recent advances in hepatocellular carcinoma therapy[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2017(173): 106-117.
- [2] WANG C H, WEY K C, MO L R, et al. Current trends and recent advances in diagnosis, therapy, and prevention of hepatocellular carcinoma[J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2015, 16(9): 3595-3604.
- [3] SINGH S, SINGH P P, ROBERTS L R, et al. Chemopreventive strategies in hepatocellular carcinoma[J]. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 2014, 11(1): 45.
- [4] MURSHED F, FARHANA L, DAWSON M I, et al. NF- $\kappa$ B p65 recruited SHP regulates PDCD5-mediated apoptosis in cancer cells[J]. *Apoptosis*, 2014, 19(3): 506-517.
- [5] SHARMA A K, ROHRER B. Calcium-induced calpain mediates apoptosis via caspase-3 in a mouse photoreceptor cell line[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(32): 13186.
- [6] VARSHOSAZ J, FARZAN M. Nanoparticles for targeted delivery of therapeutics and small interfering RNAs in hepatocellular carcinoma[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2015, 21(42): 12022.
- [7] SONG T. Recent advances in surgical treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Drug Discov Ther*, 2015, 9(5): 319-330.
- [8] BERCHTOLD L A, PRAUSE M, STØRLING J, et al. Cytokines and pancreatic  $\beta$ -cell apoptosis[J]. *Adv Clin Chem*, 2016, 75: 99-158.
- [9] GE L, MA D, CHEN Y. Cellular functions of programmed cell death 5[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2016, 1863(4): 572-580.
- [10] ZHANG S, LI G, FU X, et al. PDCD5 protects against cardiac remodeling by regulating autophagy and apoptosis[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2015, 461(2): 321-328.
- [11] ZHUGE C, SUN X, CHEN Y, et al. PDCD5 functions as a regulator of p53 dynamics in the DNA damage response[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2015, 388(7): 1-10.
- [12] FU D Z, CHENG Y, HE H, et al. PDCD5 expression predicts a favorable outcome in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *International Journal of Oncology*, 2013, 43(3): 821.
- [13] FAN G, YAO Y, YAO L I, et al. PDCD5 transfection increases cisplatin sensitivity and decreases invasion in hepatic cancer cells[J]. *Oncology Letters*, 2015, 9(1): 411-417.
- [14] FU D Z, CHENG Y, HE H, et al. Recombinant human PDCD5 exhibits an antitumor role in hepatocellular carcinoma cells via clathrin-dependent endocytosis[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 12(6): 8135.
- [15] HONG H, AN J C, CRUZ J F D L, et al. *Cnidium officinale* Makino extract induces apoptosis through activation of caspase-3 and p53 in human liver cancer HepG2 cells[J]. *Experimental & Therapeutic Medicine*, 2017, 14(4): 3191-3197.
- [16] MITUPATUM T, AREE K, KITTISENACHAI S, et al. mRNA expression of Bax, Bcl-2, p53, Cathepsin B, Caspase-3 and Caspase-9 in the HepG2 cell line following induction by a novel monoclonal ab Hep88 mAb: Cross-talk for paraptosis and apoptosis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(2): 703-712.
- [17] HUA H, ZHANG X F, ZHOU H J, et al. Expression and prognostic significance of osteopontin and caspase-3 in hepatocellular carcinoma patients after curative resection[J]. *Cancer Science*, 2010, 101(5): 1314-1319.
- [18] XIAO B, MA L, MERLIN D. Nanoparticle-mediated co-delivery of chemotherapeutic agent and siRNA for combination cancer therapy[J]. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2016, 14(1): 65-73.
- [19] WU S H, LIAO Z X, RIZAK J D, et al. Comparative study of the transfection efficiency of commonly used viral vectors in rhesus monkey (*Macaca mulatta*) brains[J]. *Zoological Research*, 2017, 38(2): 88-95.

(王荣兵 编辑)