

羧基末端结合蛋白1对肝癌细胞HepG2增殖的影响



李运千, 黄承信, 曾思恩, 刘晓佳, 刘 勤, 肖胜军

Impact of C-terminal Binding Protein 1 on Cell Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cell HepG2

LI Yunqian,HUANG Chenxin,ZENG Sien,LIU Xiaojia,LIU Qin,XIAO Shengjun
Department of Patholgy,Affiliated Hospital of Guilin Medical University,Guilin 541001,
China

Corresponding Author: XIAO Shengjun, E-mail: kent805xsj@gmail.com

Abstract: Objective To investigate the impacton of C-terminal binding protein 1 (CtBP1) on proliferation of hepatocellular carcinoma cell HepG2 and related mechanism.**Methods** siRNA targeting for CtBP1 were introduced into HepG2 cells to knock down CtBP1,3 control groups including blank control, transfection reagent and control siRNA were used as controls.At different time points after transfection, HepG2 cells were collected for MMT assay to detect cell proliferation and flowcytometry to detect cell cycle distribution and apoptosis.**Results** CtBP1 siRNA effectively knocked down CtBP1 in HepG2 cell. Compared with control group, CtBP1 protein significantly was decreased by 57.80%.Cell growth were significantly inhibited after CtBP1 knockdown ($P<0.05$). The inhibition rates of cell growth were 22.34%,52.15%,53.97% and 54.77% at 24, 48, 72 and 96 h respectively. The distribution of cell cycle was not changed but apoptotic cells were increased significantly compared with control group.**Conclusion** CtBP1 knockdown could inhibit cell proliferation of HepG2 mainly through apoptosis instead of cell cycle arrest. CtBP1 is involved in cell growth and apoptosis inhibition of tumor cells, and could be a candidate for cancer targeted therapy.

Key words:Hepatocellular carcinoma;RNA interference;C-terminal binding protein 1;Cell proliferation; Apoptosis

摘 要: 目的 研究羧基末端结合蛋白1 (C-terminal binding protein1,CtBP1) 对人肝癌细胞HepG2增殖的影响及机制。**方法** 采用CtBP1 siRNA转染HepG2细胞, 实验分为4个组: 空白对照组、转染试剂对照组、阴性序列对照组与干扰组。于转染后不同的时间收集细胞, 用MTT法检测细胞增殖、流式细胞术检测细胞周期及凋亡情况。**结果** CtBP1 siRNA转染有效抑制了HepG2细胞中CtBP1蛋白表达, 与空白对照组比较, 转染后72 h后, CtBP1蛋白下调了57.80%。CtBP1沉默后细胞生长受到抑制 ($P<0.05$), 转染后24、48、72、96 h生长抑制率分别为22.34%、52.15%、53.97%和54.77%;而对细胞周期分布无明显影响 ($P>0.05$); 但CtBP1表达下调有促凋亡作用, 与对照组相比, 干扰组的细胞凋亡率显著升高 ($P<0.05$)。**结论** CtBP1沉默能抑制HepG2细胞增殖, 其机制是通过促凋亡来实现的。CtBP1能促进肿瘤生长和抑制凋亡, 是潜在的肿瘤治疗靶点。

关键词: 肝细胞肝癌; RNA干扰; 羧基末端结合蛋白1; 细胞增殖; 凋亡

中图分类号: R735.7 文献标识码: A

0 引言

原发性肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 其发生发展过程涉及到癌基因、肿瘤抑制基因、凋亡调节基因和DNA修复调节基因等多种基因的异常。羧基末端结合蛋白 (C-terminal binding

protein 1, CtBP1) 是一个癌基因, CtBP能作为转录辅抑制因子抑制多个肿瘤抑制基因的转录, 并且与肿瘤的生物行为密切相关^[1]。我们前期研究发现肝细胞肝癌组织中CtBP1表达上调; 肝细胞肝癌组织中其表达与肿瘤的分级相关^[2]。为进一步阐明CtBP1在肝细胞肝癌中的作用及机制, 本研究通过RNAi技术抑制HepG2细胞中CtBP1的表达, 观察CtBP1表达下调对细胞增殖、细胞周期与凋亡的影响, 为肝细胞肝癌发生发展的机制提供理论和实验基础。

收稿日期: 2013-04-29; 修回日期: 2013-07-02
作者单位: 541001 广西桂林, 桂林医学院附属医院病理科
通信作者: 肖胜军, E-mail:kent805xsj@gmail.com
作者简介: 李运千 (1974-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤发生分子机制的基础和临床研究

1 材料与方法

1.1 材料

高糖型DMEM培养液购自Hyclone公司，control siRNA-A、CtBP1 siRNA(h)、CtBP(C-1)均购自Santa Cruz公司，X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent购自Roche公司，Opti-MEM-1 Medium购自Gibco公司，MTT购自Sigma公司，DMSO购自Amresco公司。

1.2 细胞株及其体外培养

人肝癌细胞株HepG2由桂林医学院科学实验中心保存，用含10%胎牛血清及1%的青霉素和1%链霉素的高糖型DMEM培养液培养于37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中。

1.3 CtBP1 siRNA转染

对数生长期的HepG2细胞接种于6孔细胞培养板或96孔培养板中，培养过夜至细胞融合度约70%时转染，设空白对照组、转染试剂对照组、阴性序列对照组和干扰组，每组设重复3孔。简述如下：细胞1×10⁵/ml接种于培养板中（六孔板2 ml，96孔板100 μl）；无抗生素DMEM培养液中培养过夜至细胞融合度约70%时，转染细胞，siRNA的最终浓度为20 pmol/ml（六孔板加入总体积100 μl的siRNA-转染试剂混合物，96孔板15 μl）；转染8 h后换成完全培养液，培养至相应的时间用于后续相关指标检测。

1.4 Western blot检测CtBP1的表达

转染后72 h收集细胞，加入含有PMSF及蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液，充分裂解后，4℃下12 000 r/min离心30 min，取上清液即为蛋白样品。BCA蛋白浓度测定法对蛋白样品进行定量。取30 μg总蛋白进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳，半干转膜法转膜，室温条件下用牛奶封闭液封闭1h，一抗CtBP(C-1)（用含5%脱脂奶粉的TBST配制）4℃孵育过夜，洗膜，二抗辣根酶标记山羊抗小鼠IgG（H+L）（用含5%脱脂奶粉的TBST配制）室温孵育1 h，洗膜，发光、暴光、显影、定影，对X光胶片扫描记录，测定各条带灰度值，蛋白相对表达量=目的蛋白条带灰度值/内参照蛋白条带灰度值。蛋白表达抑制率（%）=（1-干扰组相对表达量/空白对照组相对表达量）×100%。

1.5 MTT法检测转染后HepG2细胞的增殖情况

细胞接种于96孔板中，分组及转染方法同1.3，每组设6个复孔。分别于转染24、48、72、96 h后，弃去培养液，PBS缓冲液冲洗2次，每孔加入0.5%MTT溶液，置细胞培养箱中培养4 h后取出，

弃上清液，每孔加入150 μl DMSO，低速振荡10 min，待结晶物充分溶解后，酶标仪上于490 nm波长处测量各孔的吸光度值（OD值），并以时间为横坐标，OD值为纵坐标，绘制细胞生长曲线，按生长抑制率=（1-实验组平均OD值/空白对照组平均OD值）×100%计算转染后细胞生长抑制率。

1.6 流式细胞术检测HepG2细胞的细胞周期分布及凋亡

细胞接种于6孔细胞培养板，分组及转染方法同1.2，每组设3复孔，于转染后48 h收集细胞，用4℃预冷的70%乙醇溶液重悬，4℃固定过夜，PI染色法进行流式细胞术检测。以DNA含量检测细胞周期分布和凋亡情况。

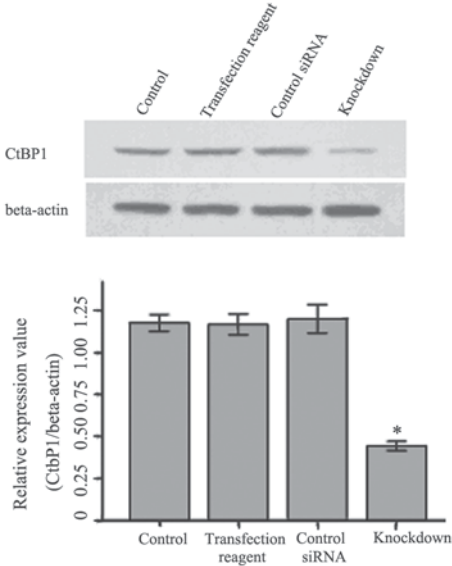
1.7 统计学方法

应用SPSS17.0统计软件。数据用均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，数据采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CtBP1 siRNA转染抑制CtBP1蛋白的表达

与对照组相比，干扰组CtBP1的表达水平下调，差异具有统计学意义（ $P < 0.05$ ），蛋白质抑制率为57.80%，对照组之间的差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ），见图1。



*:compared with control group, $P < 0.05$

图1 转染后各组HepG2细胞CtBP1的表达

Figure1 CtBP1 expression after transfected with siRNA in HepG2 cells

2.2 CtBP1 siRNA转染对HepG2细胞增殖的影响

转染后24、48、72、96 h，干扰组OD值明显低于对照组的OD值，差异具有统计学意义

表1 转染CtBP1 siRNA后各组HepG2细胞的OD值($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table1 Optical density value of HepG2 cells detected by MTT after CtBP1 knockdown ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Groups	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	0.414 ± 0.053	0.646 ± 0.014	0.859 ± 0.026	1.048 ± 0.048
Transfection reagent	0.409 ± 0.024	0.613 ± 0.031	0.820 ± 0.027	1.061 ± 0.045
Control siRNA	0.420 ± 0.053	0.621 ± 0.024	0.821 ± 0.018	1.054 ± 0.050
Knockdown	0.306 ± 0.036	0.271 ± 0.024	0.349 ± 0.025	0.428 ± 0.040

表2 转染CtBP1 siRNA后各组HepG2细胞的细胞周期变化及凋亡情况($\%, \bar{x}\pm s, n=3$)

Table2 Cell cycle distribution and apoptosis of HepG2 cells after CtBP1 knockdown($\%, \bar{x}\pm s, n=3$)

Groups	Cell cycle distribution			Cells of apoptosis
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
Control	69.85±0.73	18.69±0.38	11.46±0.97	2.21±0.34
Transfection reagent	67.45±3.59	21.23±1.45	11.32±2.14	2.46±0.29
Control siRNA	68.76±2.11	20.14±0.54	11.10±1.67	2.47±0.28
Knockdown	69.54±0.83	18.83±1.17	11.63±1.06	9.99±0.07

(< 0.05)。干扰组细胞生长受到抑制,生长抑制率在转染后24、48、72、96 h分别为22.34%、52.15%、53.97%和54.77%,细胞生长曲线低平、上升缓慢,对照组之间的差异不具有统计学意义($P > 0.05$),见表1和图2。

用,但观察到CtBP1 siRNA(h)对HepG2细胞有促凋亡作用,与对照组相比,干扰组的细胞凋亡率显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),对照组之间的差异不具有统计学意义($P > 0.05$),见图3、表2。

3 讨论

肝癌是常见的恶性肿瘤,死亡人数占到人类恶性肿瘤的第三位^[3]。其中肝细胞肝癌占到肝癌总数的75%,肝细胞肝癌的病因包括肝炎病毒、酗酒、代谢异常和环境毒物等^[4]。发病机制涉及到多个肿瘤相关基因的异常表达及其参与的多个信号通路的异常^[5]。

CtBP1是最近发现的一个癌基因^[6]。CtBP1能与腺病毒E1A蛋白结合,从而解除E1A蛋白羧基末端的肿瘤抑制作用^[7]。深入研究发现CtBP1可以作为转录辅抑制因子抑制多个肿瘤抑制基因、上皮细胞黏附分子的表达,从而调节多种细胞生物学行为,包括上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、细胞凋亡、细胞周期进程、迁移、侵袭、血管生成及有丝分裂,从而促进肿瘤的发生发展^[8-9]。

应用RNAi抑制CtBP1基因表达后,人乳腺细胞

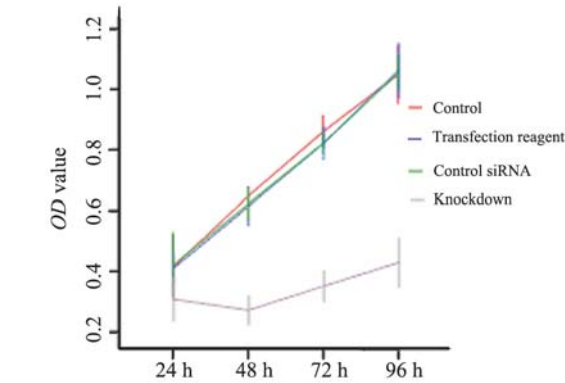
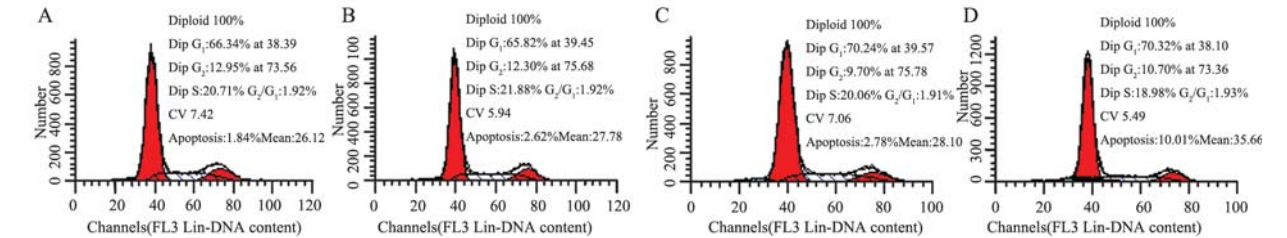


图2 转染CtBP1 siRNA后各组HepG2细胞的增殖情况
Figure2 Proliferation curves of HepG2 cells after transfection with CtBP1 siRNA

2.3 流式细胞术检测转染后HepG2细胞周期变化及凋亡

四个组之间细胞周期各时相细胞数的差异无统计学意义($P > 0.05$),未观察到CtBP1 siRNA(h)对HepG2细胞的细胞周期分布有影响作



A:control group;B:transfection reagent group;C:control siRNA group;D:knockdown group

图3 转染CtBP1 siRNA后各组HepG2细胞的细胞周期变化及凋亡情况

Figure3 Cell cycle distribution and apoptosis cells of HepG2 cells after transfection with CtBP1 siRNA

株MDA-MB-231及MCF-7的凋亡增加、增殖能力下降、细胞有丝分裂减少^[8]；人结肠癌细胞株HCT116的CtBP1表达下调可促进细胞凋亡^[9]。我们前期研究，发现肝细胞肝癌组织中CtBP1表达上调，肝细胞肝癌组织中其表达与肿瘤的分级相关^[2]。

为进一步明确CtBP1在肝细胞肝癌中的具体作用机制，本研究在CtBP1高表达的肝细胞肝癌细胞HepG2中，采用CtBP1 siRNA下调其表达，并观察细胞生物学行为改变。结果显示，CtBP1 siRNA有效抑制了CtBP1蛋白的表达，转染72 h后抑制率达57.80%。通过MTT法检测细胞增殖，发现干扰组细胞增殖受到明显抑制，证实了肝细胞肝癌中CtBP1下调能抑制肿瘤细胞生长，与乳腺癌^[8]和结肠癌^[9]中的结果相一致。表明CtBP1在肝细胞肝癌中表达上调可能促进肿瘤的生长，与前期研究发现的CtBP1高表达者肿瘤分级较高的结果相符^[2]。

流式细胞术分析细胞周期发现，CtBP1沉默48 h后，各组细胞在细胞周期各时相的分布无明显差别；而凋亡细胞比例显著增加。表明HepG2细胞中，CtBP1表达下调导致细胞生长抑制的主要机制是通过促进细胞凋亡而非细胞周期阻滞来实现的。

CtBP1作为转录辅抑制因子能抑制多个促凋亡蛋白的表达，包括pmp-22 相关p53效应因子（p53-effector related to pmp-22, PERP）、PTEN、p21、Bax和Noxa等^[10]。HepG2细胞中CtBP1干扰导致CtBP1表达下调，解除了CtBP1对其促凋亡靶基因的抑制，因而促进了细胞的凋亡，其具体机制仍需进一步深入研究。

研究表明，CtBP1能抑制p16启动子的活性，使p16 的表达下调^[11]。p16是一个细胞周期抑制因子，使细胞周期被阻滞于G₁期。CtBP1能通过对p16的抑制而促进细胞周期进展。而本研究表明，HepG2细胞中CtBP1沉默对细胞周期分布无明显影响，可能与HepG2细胞内p16基因的CpG岛高度甲基化^[12]而表达缺失有关：CtBP1沉默能解除对p16启动的抑制，但对其CpG岛高度甲基化并无影响；同时表明CtBP1对细胞周期的影响依赖于p16。

上述数据表明，HepG2细胞中CtBP1沉默通过促进细胞凋亡而抑制细胞生长。CtBP1是肝细胞肝癌的潜在治疗靶点。

参考文献:

[1] Boyd JM,Subramanian T,Schaeper U,*et al.*A region in the C-terminus of adenovirus 2/5 E1a protein is required for association with a cellular phosphoprotein and important for the negative modulation of T24-ras mediated transformation, tumorigenesis and metastasis[J].EMBO J, 1993,12(2):469-78.

[2] Zeng SE,Xiao SJ,Zhang XL,*et al.*Expression of transcriptional corepressor CtBP1 and it's target gene E-cadherin in hepatocellular carcinoma[J].Lin Chuang Yu Shi Yan Bing Li Xue Za Zhi,2010,26(6):655-7.[曾思恩,肖胜军,张小玲,等.肝细胞肝癌中转录辅抑制因子CtBP1与其靶基因E-cadherin的表达[J].临床与实验病理学杂志, 2010,26(6):655-7.]

[3] Forner A,Llovet JM,Bruix J.Hepatocellular carcinoma[J].Lancet, 2012,379(9822):1245-55.

[4] Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2003, 362(9399): 1907-17.

[5] Iakova P,Timchenko L,Timchenko NA.Intracellular signaling and hepatocellular carcinoma[J].Semin Cancer Biol,2011, 21(1):28-34.

[6] Schaeper U,Boyd JM,Verma S,*et al.*Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation[J].Proc Natl Acad Sci U S A,1995,92(23):10467-71.

[7] Schaeper U, Subramanian T, Lim L, *et al.* Interaction between a cellular protein that binds to the C-terminal region of adenovirus E1A (CtBP) and a novel cellular protein is disrupted by E1A through a conserved PLDLS motif[J]. J Biol Chem, 1998, 273(15):8549-52.

[8] Bergman LM,Birts CN,Darley M,*et al.*CtBPs promote cell survival through the maintenance of mitotic fidelity[J].Mol Cell Biol, 2009,29(16):4539-51.

[9] Bergman LM,Blaydes JP.C-terminal binding proteins: emerging roles in cell survival and tumorigenesis[J].Apoptosis,2006, 11(6):879-88.

[10] Chinnadurai G.The transcriptional corepressor CtBP: a foe of multiple tumor suppressors[J].Cancer Res,2009, 69(3):731-4.

[11] Mroz EA,Baird AH,Michaud WA,*et al.*COOH-terminal binding protein regulates expression of the p16INK4A tumor suppressor and senescence in primary human cells[J].Cancer Res,2008, 68(15):6049-53.

[12] Zang JJ,Xie F,Xu JF,*et al.*P16 gene hypermethylation and hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis[J].World J Gastroenterol, 2011, 17(25):3043-8.

[编辑：黄国玲；校对：邱颖慧]