

营养缺乏状况下干扰 *ASPP2* 通过调节自噬促进肝癌细胞增殖

梁蓓蓓¹, 郭亚军², 赵 健^{2*}

1. 上海交通大学药学院, 上海 200240

2. 第二军医大学国际合作肿瘤研究所, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察营养缺乏状况下干扰 *p53* 凋亡刺激蛋白 2(*ASPP2*)对肝癌细胞增殖和凋亡的影响及机制。**方法** 构建 RNA 干扰抑制 *ASPP2* 的慢病毒载体表达体系并感染肝癌细胞 HepG2, 通过电镜观察、MTS 法检测、流式细胞术检测以及形态学观察, 探讨在缺乏氨基酸和血清的培养条件下干扰 *ASPP2* 表达对肝癌细胞 HepG2 增殖和凋亡的影响, 并以自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)进行干预, 探讨 *ASPP2* 下调后对细胞的作用是否与自噬有关。**结果** 在缺乏氨基酸和血清的培养系统里, 电镜观察显示干扰 *ASPP2* 后自噬泡形成明显增加($P < 0.05$), 荧光显微镜下可见 GFP-LC3 荧光自噬小体的表达提高($P < 0.05$)。MTS 检测显示干扰 *ASPP2* 表达后 HepG2 细胞的增殖能力明显增强($P < 0.05$), 而自噬抑制剂 3-MA 能够抑制其作用($P < 0.05$)。形态学观察发现干扰 *ASPP2* 能够提高 HepG2 细胞的抗凋亡能力, 应用自噬抑制剂 3-MA 后细胞活性明显降低, 出现了细胞内颗粒物增加等一系列早期死亡的症状。Annexin V-PI 双染显示干扰 *ASPP2* 使细胞凋亡率由 $(38 \pm 5)\%$ 下降为 $(15 \pm 4)\%$ ($P < 0.05$), 加入自噬抑制剂 3-MA 后细胞凋亡率上升至 $(36 \pm 3)\%$ ($P < 0.05$)。**结论** 在缺乏营养的状态下, 下调 *ASPP2* 可能通过调节自噬促进肝癌细胞的增殖和存活。

[关键词] *ASPP2*; 肝细胞癌; 细胞增殖; 缺营养; 自噬

[中图分类号] R 735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2013)03-0266-05

ASPP2 gene silence promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation via regulating autophagy under starvation

LIANG Bei-bei¹, GUO Ya-jun², ZHAO Jian^{2*}

1. School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

2. International Joint Cancer Research Institute, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To study the effects of apoptosis-stimulating protein of *p53-2* (*ASPP2*) gene on hepatocellular carcinoma (HCC) cell proliferation and apoptosis under starvation and the related mechanism. **Methods** Lentivirus encoding shRNA against *ASPP2* was constructed to knockdown *ASPP2* expression in hepatoma cell HepG2. Cell proliferation and apoptosis were observed by transmission electron microscopy, MTS analysis, flow cytometry analysis and morphologic changes. The influence of silencing *ASPP2* gene on the proliferation and apoptosis under amino acid-starvation and serum-deprivation culture was observed; autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA) was added in the experiment so as to detect the involvement of autophagy in the changes induced by *ASPP2* down-regulation. **Results** Transmission electron microscopy showed cytoplasmic accumulation of autophagosomes when *ASPP2* was knocked down under amino acid-starvation and serum-deprivation ($P < 0.05$), with increased GFP-LC3 dots ($P < 0.05$). MTS analysis showed that silence of *ASPP2* gene greatly enhanced the proliferation of HepG2 cells ($P < 0.05$), which could be inhibited by addition of 3-MA ($P < 0.05$). Microscope observation showed that silence of *ASPP2* gene promoted the anti-apoptotic ability of HepG2 cells, which was reversed by treatment with 3-MA. Early sign of apoptosis was observed in sh*ASPP2*+3-MA group. Annexin V-PI double staining showed that *ASPP2* silence decreased the apoptotic rate of HepG2 cells from $(38 \pm 5)\%$ to $(15 \pm 4)\%$ ($P < 0.05$), and 3-MA treatment increased it to $(36 \pm 3)\%$ ($P < 0.05$). **Conclusion** Down-regulation of *ASPP2* expression may facilitate the survival and proliferation of HCC cells through activating autophagy under starvation.

[Key words] *ASPP2*; hepatocellular carcinoma; cell proliferation; nutrition deprivation; autophagy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(3):266-270]

[收稿日期] 2013-01-07

[接受日期] 2013-02-05

[基金项目] 国家自然科学基金(81030042). Supported by National Natural Science Foundation of China (81030042).

[作者简介] 梁蓓蓓, 博士, 讲师. E-mail: willie-lbb@hotmail.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81870810, E-mail: zj_xd@126.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一,其恶性程度高、发展速度快。尽管人们对肝癌发生的致病因素有了一定的认识,如肝炎病毒感染、酒精性/脂肪性肝硬化、摄取黄曲霉素等,但是肝癌的发生发展机制尚不完全清楚。深入探讨肝癌发生发展的作用机制,对于发现肝癌诊断与治疗的新靶点具有重要的理论指导意义和临床应用价值。

ASPP2 是 *p53* 凋亡刺激蛋白(apoptosis-stimulating protein of *p53*, ASPP)家族中最早被发现的分子,其最显著的功能是调节 *p53* 及其家族成员的促凋亡作用^[1-2],在肿瘤的发生发展中扮演重要角色^[3]。本课题组前期对 ASPP2 蛋白的研究表明 DNA 甲基化导致肝癌细胞 ASPP2 表达下调,有利于肝癌细胞的生长和转移^[4]。本研究采用 RNA 干扰抑制 ASPP2 的表达并通过模拟肿瘤细胞生存状态下营养缺乏的微环境诱导自噬,探讨 ASPP2 对肝癌细胞增殖和凋亡的影响及与自噬的关系。

1 材料和方法

1.1 细胞、试剂与仪器 HepG2 肝癌细胞株由第二军医大学国际合作肿瘤研究所保存,用含 10%胎牛血清的 DMEM/RPMI 1640 混合培养液,于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养,隔日换液一次。自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)试剂盒购自 Sigma 公司;Lipofectamine 2000 试剂购自 Invitrogen 公司;Earle 平衡盐溶液(EBSS)购自 Hyclone 公司;质粒抽提试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;细胞凋亡检测试剂购自北京四正柏生物科技有限公司;MTS 检测试剂盒购自 Promega 公司。流式细胞仪购自 BD 公司;荧光显微镜 Axiovert 135 购自 Zeiss 公司;荧光照相系统购自 Nikon 公司。

1.2 shRNA 慢病毒的构建及干扰效果验证 表达 shRNA 的慢病毒载体由第二军医大学国际合作肿瘤研究所陆斌博士设计构建,shASPP2 靶位序列为 5'-GCT GAG GGA GAA AGA GAA GAA-3';shNon 为针对没有已知基因的序列而设计的 shRNA(5'-AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT-3'),作为阴性对照,病毒包装按照慢病毒的包装过程进行^[5]。将肝癌细胞 HepG2 分为 shNon 组和 shASPP2 组,分别用相应慢病毒载体感染 72 h 后,用 RT-PCR 方法验证正常培养液培养状态下的干扰效果。

1.3 细胞分组与处理 将肝癌细胞 HepG2 分为 shNon 组、shASPP2 组和 shASPP2+3-MA 组,细胞分

别以相应慢病毒载体感染 72 h 后,在无氨基酸无血清的 EBSS 培养液中培养 8~12 h,以模拟肿瘤细胞生存状态下营养能量缺乏的微环境。shASPP2+3-MA 组细胞在用无氨基酸无血清的 EBSS 培养液培养前 1 h 加入 3-MA(10 mmol/L)^[6]。倒置显微镜下观察细胞形态的改变。

1.4 细胞自噬的检测 (1)透射电子显微镜观察:收集在无氨基酸无血清的 EBSS 培养液中培养了 8~12 h 的 shNon 组和 shASPP2 组细胞,用 2.5%戊二醛固定,其余按照常规电镜标本送检前处理流程。用 JEM-2000EX 透射电子显微镜观察并拍片。计数 50 个细胞切面的自噬泡总数,计算单个细胞切面自噬泡数量平均值,代表自噬的程度。

(2)荧光显微镜观察:细胞通过转染表达外源 GFP-LC3 荧光质粒,转染 48 h 后各组分别采用不同慢病毒载体进行干扰,72 h 后随机选取视野,荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白 GFP-LC3 在细胞中的定位,分别计数呈弥散状分布的细胞和呈点状分布的细胞,含点状绿色荧光的细胞即为发生自噬的细胞。共计至少 50~100 个细胞,有 3 个以上针状点的细胞记为发生自噬的细胞。细胞自噬率(%)=自噬细胞数/细胞总数×100%。

1.5 MTS 法检测细胞增殖能力 shNon 组、shASPP2 组和 shASPP2+3-MA 组细胞感染 72 h 后,在无氨基酸无血清的 EBSS 培养液中培养 8~12 h,分别用 0.25%胰蛋白酶消化,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液配成单个细胞悬液,以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔培养板,第 3 天小心吸弃孔内培养上清液,加入 100 μ L 培养液,每孔再加入 MTS 溶液 20 μ L,37℃下继续孵育 3 h 后终止培养。用酶联免疫检测仪测定 492 nm 处各孔光密度值,记录结果取多复孔平均值,连续观察 5 d,绘制细胞增殖曲线。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡 shNon 组、shASPP2 组和 shASPP2+3-MA 组细胞感染 72 h 后,在无氨基酸无血清的 EBSS 培养液中培养 8~12 h,收集细胞,采用 Annexin V/FITC 检测试剂盒通过流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用成组资料的 *t* 检验比较组间差异,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 shRNA 慢病毒体系干扰效果验证 由图 1 可

见, *shASPP2* 慢病毒具有较好的干扰效果, 能够降低 HepG2 细胞中 *ASPP2* 的表达 ($P < 0.05$)。

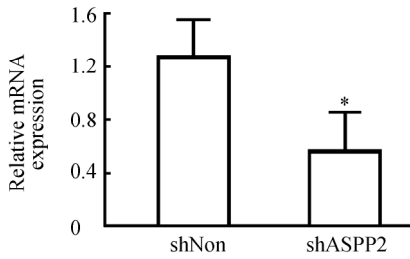


图 1 *shASPP2* 慢病毒降低 HepG2 细胞中 *ASPP2* 表达
Fig 1 *shASPP2* lentivirus down-regulating *ASPP2* expression in HepG2 cells

* $P < 0.05$ vs shNon group; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

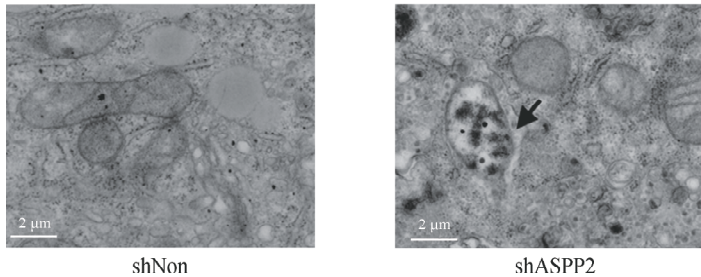


图 2 *ASPP2* 表达下调促进 HepG2 细胞自噬泡的形成

Fig 2 Depletion of *ASPP2* gene promoting formation of autophagic vacuolization in HepG2 cells

Arrow indicates autophagic vacuolization. Bar = 2 μm . * $P < 0.05$ vs shNon group; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

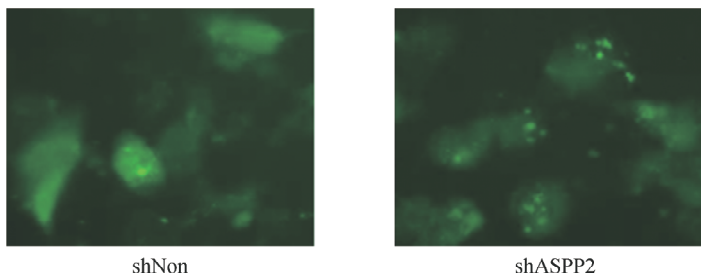
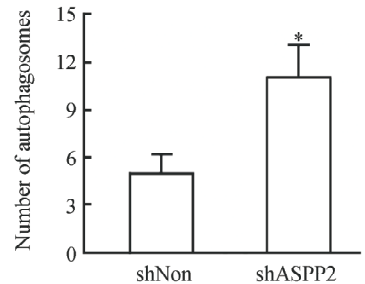
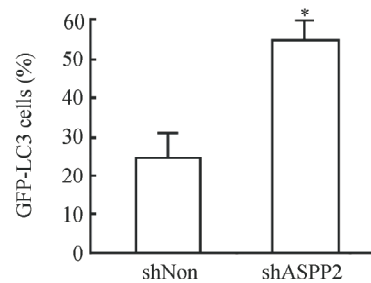


图 3 *ASPP2* 表达下调促进 HepG2 细胞 GFP-LC3 荧光自噬小体的表达

Fig 3 Depletion of *ASPP2* promoting GFP-LC3 dots expression in HepG2 cells

Original magnification: $\times 200$. * $P < 0.05$ vs shNon group; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$



2.3 下调 *ASPP2* 通过调节自噬促进肝癌细胞的增殖 MTS 检测结果显示, 在缺乏氨基酸和血清的培养系统里, 下调 *ASPP2* 表达水平 (*shASPP2* 组) 能够显著增强 HepG2 细胞的增殖能力, 与 *shNon* 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 当加入自噬抑制剂 3-MA 后, HepG2 细胞的增殖能力明显减弱 ($P < 0.05$, 图 4)。说明 *ASPP2* 对细胞增殖能力的影响可能是通过调节自噬而发挥作用的, 下调 *ASPP2* 可能通过增强自噬从而促进肝癌细胞的增殖。

2.2 下调 *ASPP2* 促进肝癌细胞自噬水平 为了验证肝癌细胞中的 *ASPP2* 对细胞自噬的抑制作用, 我们首先采用透射电镜观察 HepG2 细胞中自噬表达水平并对自噬泡的数量进行统计。结果显示: *shASPP2* 组细胞内含有内容物的囊泡状结构明显增加, 自噬泡的数量与 *shNon* 组相比明显增多 ($P < 0.05$), 其内可见部分未被消化的细胞器或残留物质 (图 2)。随后又在荧光光显微镜下观察了 *ASPP2* 表达下调后含 GFP-LC3 荧光自噬小体细胞, 实验证实 *shASPP2* 慢病毒干扰后, HepG2 细胞中含绿色荧光颗粒的细胞数量明显增加, 与 *shNon* 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3)。

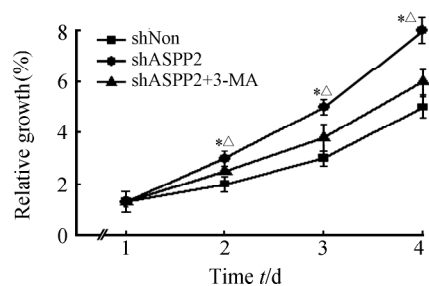


图 4 MTS 法检测 HepG2 细胞增殖能力
Fig 4 Proliferation potential evaluation in HepG2 cells by MTS analysis

* $P < 0.05$ vs shNon group; $\Delta P < 0.05$ vs shASPP2+3-MA group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.4 下调 ASPP2 通过调节自噬抑制肝癌细胞的凋亡 倒置显微镜下可见, 在营养缺乏的条件下, shNon 组细胞状态明显变差, 出现细胞内颗粒物增加等一系列早期凋亡迹象, 而 shASPP2 组的凋亡细胞数量明显减少; 应用了自噬抑制剂 3-MA 后 shASPP2 组细胞活性明显降低, 也出现了细胞状态变差、细胞内颗粒物增加等早期死亡的现象(图 5)。

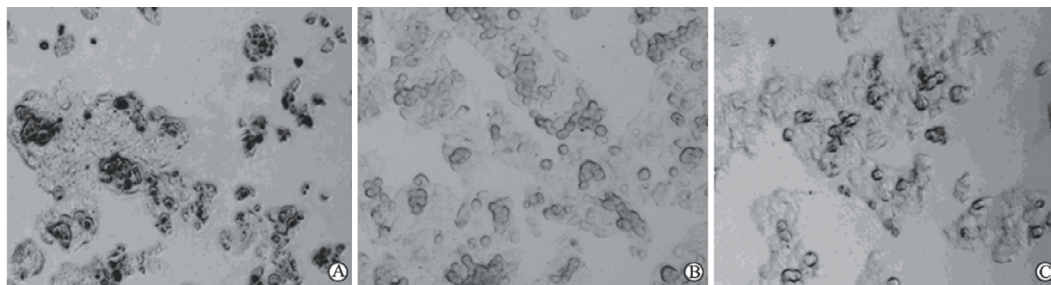


图 5 倒置显微镜下观察各组 HepG2 细胞形态学变化

Fig 5 Morphology observations in HepG2 cells under microscope

A: shNon group; B: shASPP2 group; C: shASPP2+3-MA group. Original magnification: $\times 200$

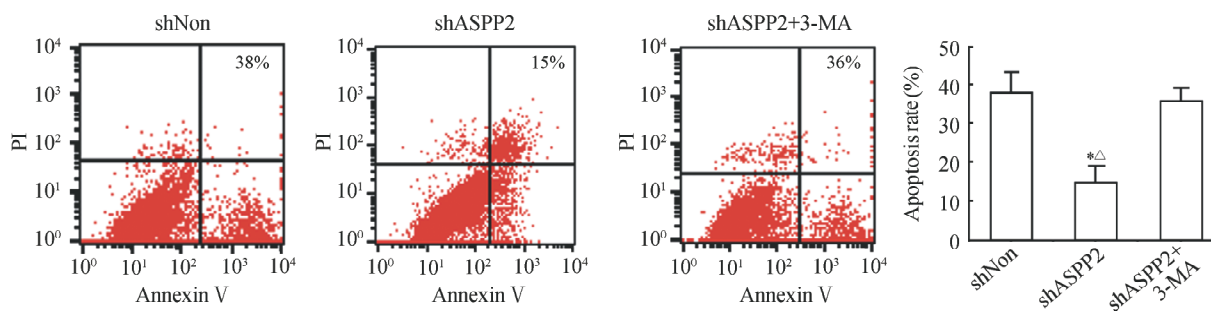


图 6 流式细胞术检测 HepG2 细胞凋亡情况

Fig 6 Evaluation of cell apoptosis in HepG2 cells by Annexin V-PI double staining

* $P < 0.05$ vs shNon group; $\Delta P < 0.05$ vs shASPP2+3-MA group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

ASPP2 是 ASPP 家族中最早被发现的成员, 对其功能研究较为充分。大量研究表明 ASPP2 表达的降低在肿瘤的发生发展中发挥着重要作用。动物实验发现, ASPP2^{-/-} 小鼠无法长期存活, 而 ASPP2^{+/-} 小鼠可自发形成多种肿瘤, 与野生型小鼠相比, ASPP2^{+/-} 小鼠对 γ 射线介导的肿瘤生成敏感性显著增加^[7]。临床研究发现, 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中, ASPP2 的低表达和不良的临床结果有关^[8]; Cobleigh 等^[9] 发现在乳腺癌患者中 ASPP2 低表达与无瘤生存期短有关; Sgroi 等^[10] 利用基因芯片方法比较转移的乳腺癌与非转移乳腺癌, 发现转移的乳腺癌中 ASPP2 表达下降, 表明 ASPP2 表

Annexin V-PI 双染流式细胞仪检测结果显示, shNon 组细胞凋亡率为 $(38 \pm 5)\%$, 而下调 ASPP2 细胞凋亡率下降为 $(15 \pm 4)\%$ ($P < 0.05$), 当加入 3-MA 之后, 细胞凋亡率上升至 $(36 \pm 3)\%$ ($P < 0.05$, 图 6)。上述实验结果说明, 肝癌细胞中下调 ASPP2 可能通过增强自噬抑制细胞凋亡, 从而有利于细胞生存。

达下降可能与乳腺癌的转移、进展有关。本课题组前期研究表明肝癌患者肝癌组织中 ASPP2 表达下调, 而在肝癌细胞株中采用 RNA 干扰技术沉默 ASPP2 表达可促进肝癌细胞的生长和转移^[4]。本研究采用 RNA 干扰技术抑制 ASPP2 的表达, 同时通过模拟肿瘤细胞生存状态下营养缺乏的微环境, 结果发现营养缺乏状态下下调 ASPP2 可促进肝癌细胞的增殖并抑制肝癌细胞凋亡。

肿瘤细胞是一类失去了接触抑制、表现出异常自主性增殖的细胞。在异常增殖的过程中, 肿瘤细胞常常面临缺氧和饥饿, 如何适应这些恶劣环境是肿瘤得以发展的关键。自噬是肿瘤细胞适应饥饿的重要机制之一, 自噬的缺失与肿瘤的发生有一定的关系: 乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌大都表现为自噬相

关基因 *beclin1* 的缺失,在 *beclin1*^{+/-} 的鼠身上更易发肿瘤^[11-13]。此外还有实验证实 *beclin1*^{+/-} 永生化的内皮细胞在应对代谢压力的环境下比 *beclin1*^{+/+} 永生化的内皮细胞更易癌变,而且在凋亡缺失时这种致癌性将更高^[14]。本研究通过透射电镜和荧光显微镜观察了下调 *ASPP2* 对肝癌细胞自噬的影响,结果发现 *ASPP2* 表达下调可促进细胞自噬现象的发生;应用自噬抑制剂后,*ASPP2* 下调促进肝癌细胞的增殖并抑制肝癌细胞凋亡的作用被逆转。上述实验结果说明,*ASPP2* 的低表达可能通过增强自噬促进肝癌细胞的增殖和生存,但其机制尚不明确。最近 Behrends 等^[15] 在人类自噬系统的网络组成研究数据中通过核磁图谱分析推测出:*ASPP2* 能够与自噬相关蛋白 Beclin1 物理性结合,肝癌细胞中 *ASPP2* 的低表达对自噬的增强作用是否与 Beclin1 有关尚需进一步证实。

综上所述,我们通过 RNA 干扰技术、透射电镜观察和形态学观察、细胞增殖及凋亡检测等实验证实了促凋亡基因 *ASPP2* 对肿瘤生长的抑制作用以及这种作用的自噬依赖性,靶向干扰 *ASPP2* 表达激活自噬促进肿瘤细胞生长这一发现也为抗癌药物研发进程提供了新思路。但是 *ASPP2* 如何调控细胞自噬、调控自噬的具体分子机制以及体内外的生物学效应都还需要更为深入透彻的探索。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Samuels-Lev Y, O'Connor D J, Bergamaschi D, Trigiante G, Hsieh J K, Zhong S, et al. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53 [J]. *Mol Cell*, 2001, 8: 781-794.
- [2] Bergamaschi D, Samuels Y, O'Neil N J, Trigiante G, Crook T, Hsieh J K, et al. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human [J]. *Nat Genet*, 2003, 33: 162-167.
- [3] Trigiante G, Lu X. ASPPs and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 217-226.
- [4] Zhao J, Wu G, Bu F, Lu B, Liang A, Cao L, et al. Epigenetic silence of ankyrin-repeat-containing, SH3-domain-containing, and proline-rich-region-containing protein 1 (*ASPP1*) and *ASPP2* genes promotes tumor growth in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2010, 51: 142-153.
- [5] Zhao J, Lu B, Xu H, Tong X, Wu G, Zhang X, et al. Thirty-kilodalton Tat-interacting protein suppresses tumor metastasis by inhibition of osteopontin transcription in human hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2008, 48: 265-275.
- [6] Kim K W, Mutter R W, Cao C, Albert J M, Freeman M, Hallahan D E, et al. Autophagy for cancer therapy through inhibition of pro-apoptotic proteins and mammalian target of rapamycin signaling [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 36883-36890.
- [7] Kampa K M, Acoba J D, Chen D, Gay J, Lee H, Beemer K, et al. Apoptosis-stimulating protein of p53 (*ASPP2*) heterozygous mice are tumor-prone and have attenuated cellular damage-response thresholds [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 4390-4395.
- [8] Lossos I S, Natkunam Y, Levy R, Lopez C D. Apoptosis stimulating protein of p53 (*ASPP2*) expression differs in diffuse large B-cell and follicular center lymphoma: correlation with clinical outcome [J]. *Leuk Lymphoma*, 2002, 43: 2309-2317.
- [9] Cobleigh M A, Tabesh B, Bitterman P, Baker J, Cronin M, Liu M L, et al. Tumor gene expression and prognosis in breast cancer patients with 10 or more positive lymph nodes [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11 (24 Pt 1): 8623-8631.
- [10] Sgroi D C, Teng S, Robinson G, LeVangie R, Hudson J R Jr, Elkhoulou A G. *In vivo* gene expression profile analysis of human breast cancer progression [J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 5656-5661.
- [11] Liang X H, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by *beclin 1* [J]. *Nature*, 1999, 402: 672-675.
- [12] Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the *beclin 1* autophagy gene [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112: 1809-1820.
- [13] Yue Z, Jin S, Yang C, Levine A J, Heintz N. *Beclin 1*, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 15077-15082.
- [14] Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2006, 10: 51-64.
- [15] Behrends C, Sowa M E, Gygi S P, Harper J W. Network organization of the human autophagy system [J]. *Nature*, 2010, 466: 68-76.