

PIG11 高表达诱导 HepG2 细胞凋亡及其机制的初步探讨

郭彩霞, 王晓娟, 王 燕, 梁晓秋

(南华大学 肿瘤研究所, 湖南 衡阳 421001)

摘 要: **目的** 利用已建立的稳定高表达 PIG11 蛋白的 HepG2 细胞株, 探讨 PIG11 蛋白表达对 HepG2 细胞凋亡的影响, 以及线粒体膜电位改变和 Cyt C 释放在凋亡过程中的作用。阐明 PIG11 诱导细胞凋亡的分子机制。

方法 PI 染色, 流式检测细胞的凋亡情况。用 Rh123 标记, 流式测定线粒体膜电位。Western Blot 检测胞浆和线粒体中 Cyt C 的含量变化。 **结果** 流式细胞仪检测 Rh123 荧光强度, 结果显示: pLXSN - PIG11 - HepG2 细胞荧光强度 (5.4 ± 0.15) 低于 HepG2 细胞 (14.7 ± 0.56) 和 pLXSN - HepG2 细胞 (13.2 ± 0.53) ($P < 0.01$)。表明 PIG11 高表达诱导细胞凋亡过程中存在线粒体膜电位去极化。用 CsA ($10 \mu\text{mol/L}$) 抑制各组细胞的线粒体通透性转移孔后, 流式凋亡检测结果显示 pLXSN - PIG11 - HepG2 细胞凋亡率明显降低。Western Blot 检测发现存在线粒体 Cyt C 向胞浆释放。 **结论** PIG11 高表达可诱导 HepG2 细胞凋亡, PIG11 诱导细胞凋亡机制可能由线粒体膜电位改变及 Cyt C 向胞浆释放而介导。

关键词: PIG11; 凋亡; 线粒体; HepG2 细胞

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

文章编号: 2095 - 1116(2011)01 - 0022 - 03

The Apoptosis Induced by PIG11 Protein in HepG2 Cells and the Discussion of its Mechanism

GUO Cai-xia, WANG Xiao-juan, WANG Yan, et al

(Cancer Research Institute of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective Explore the effect of PIG11 gene expression on HepG2 cell line apoptosis with HepG2 cells line high expressing PIG11 gene. Mitochondrial dysfunction were researched to get the more information of apoptotic mechanism induced by PIG11. **Methods** The role of PIG11 in apoptosis was analyzed by the flow cytometer scans (FACS). Apoptotic cells were quantified by sub-G1DNA content. The fluorescent probe rhodamine 123 was used to analyze the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi\text{m}$) and the cellular fluorescence intensity was measured by FACS. Cytochrome C (Cyt C) protein was analyzed by western blot. **Results** Rh 123 fluorescence showed a decrease in pLXSN-PIG11-HepG2 cells (5.4 ± 0.15), compared with HepG2 cells (14.7 ± 0.56) and pLXSN-HepG2 cells (13.2 ± 0.53) ($P < 0.01$), suggesting a loss of the $\Delta\psi\text{m}$ in pLXSN-PIG11-HepG2 cells. The apoptosis was blocked visibly by CsA (an effective and specific inhibitor of mitochondrial permeability transition pore, mtPTP). Cyt c content extracted from HepG2 cells with pLXSN-PIG11 was decreased considerably in the mitochondria, whereas it increased in the cytosol. These demonstrated that loss of $\Delta\psi\text{m}$ with the release of Cyt c in the apoptosis induced by PIG11. **Conclusion** These findings suggest that over-expression of PIG11 induce HepG2 cells apoptosis through mitochondrial pathway.

Key words: PIG11; apoptosis; mitochondria; HepG2 cell

PIG11 基因 (p53-induced gene 11), 也称为 TP53I11 (tumor protein p53 inducible protein 11), 是

由 Polyak 等^[1]于 1997 年在研究人结肠癌细胞经历 p53 依赖的凋亡机制中,应用 SAGE 技术,首先鉴定的 p53 高表达所诱导的系列 PIGs 基因之一。PIG11 在 H1299 细胞和 ECV-304 细胞中能被野生型 p53 激活,参与细胞凋亡。同时有研究证实,PIG11 在多种化学试剂诱导细胞凋亡过程中表达上调^[2~4],表明 PIG11 高表达参与细胞凋亡。

本课题组前期实验已证实在肝癌组织中 PIG11 蛋白表达显著低于正常肝组织,且 PIG11 的高表达可诱导人肝癌细胞株 HepG2 凋亡^[5];但其具体的分子机制还不清楚。文献发现 PIG11 蛋白高表达能通过升高细胞内 ROS 水平而介导凋亡^[6,7]。本实验探讨线粒体膜电位改变和 Cyt C 释放在 PIG11 蛋白高表达诱导 HepG2 细胞凋亡过程中的作用,进一步阐明 PIG11 诱导细胞凋亡的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI-1640 培养基购自 GIBCO 公司;Rh 123、碘化丙锭 (PI):Sigma 公司产品,BCA 蛋白定量试剂盒:Pierce 公司产品,线粒体蛋白提取试剂盒:Active Motif,细胞裂解液:碧云天公司,抗 β -actin、Cyt C 一抗,抗鼠、兔二抗:Santa Cruz 公司,CsA:ALEXIS 公司。人肝癌细胞株 HepG2 中南大学湘雅医学院肿瘤所引进,pLXSN-HepG2 和 pLXSN-PIG11-HepG2 细胞模型为本课题组前期构建^[5]。

1.2 细胞培养

各组细胞 (HepG2、pLXSN-HepG2 和 pLXSN-PIG11-HepG2) 用含体积分数为 0.10 小牛血清的 RPMI-1640 培养基,37℃,体积分数为 0.05 的 CO₂,湿度为 95% 的二氧化碳培养箱内培养。培养细胞呈单层生长,融合贴壁达 90% 时常规传代。取对数生长期细胞用于实验。

1.3 细胞凋亡检测

收集各组细胞,离心沉淀 (1 000 rpm,5 min),冷 PBS 漂洗 2 次,加 70% 乙醇 1 mL 重悬细胞,4℃ 过夜固定;冷 PBS 漂洗 2 次,加 15 μ L RNaseA (10 g/L) 作用 3~5 min,400 μ L PI (50 mg/L),4℃ 避光作用 30 min,滤过,流式细胞仪上样检测凋亡率。

1.4 线粒体膜电位检测

Rh123 是一种阳离子亲脂性荧光染料,对膜具有通透性,活细胞线粒体内外膜之间跨膜电位的存在,使它能特异地聚集于线粒体。Rh123 荧光强度

降低,反映线粒体数量减少和/或 $\Delta\psi_m$ 的降低或丧失。CsA 作为 MPTP 的专一抑制剂,可有效抑制 MPTP 的开放和随后的 $\Delta\psi_m$ 去极化^[8]。收集各组细胞 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 。Rh123 探针用无血清培养液稀释,终浓度为 10 μ mol/L,分装于 1.5 mL 的 EP 管。细胞收集后,预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,1 000 rpm,5 min,离心,倒去上清,将细胞悬浮于稀释好的 Rh123 溶液中,37℃ 细胞培养箱内孵育 20 min。每隔 3~5 min 颠倒一下,之后用无血清培养液洗涤细胞 3 次,上机检测,激发波长 488 nm,发射波长 525 nm。所有数据通过仪器软件被收集、储存和分析。

1.5 Western Blot 检测 Cyt C 蛋白表达情况

分别收集各组细胞,用线粒体蛋白提取试剂盒提取胞浆线粒体成分蛋白,进行定量做 Western Blot。经 12% SDS-PAGE、转膜、封闭,孵育一抗、二抗,一抗为 Cyt C (1:500), β -actin 单抗 (1:1 000),二抗为 HRP-山羊抗兔或山羊抗小鼠二抗 (1:5 000),ECL 试剂显影。分析结果,以 β -actin 为内参照。

1.6 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计分析软件包,进行 one-way ANOVA 检验及两个独立样本的 *t*-test 分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性。统计图采用 OriginPro7.0 绘制。

2 结 果

2.1 PIG11 高表达可诱导细胞线粒体膜电位下降

平均荧光强度数据显示 pLXSN-PIG11-HepG2 细胞线粒体膜电位明显低于 HepG2 细胞和 pLXSN-HepG2 细胞。用 CsA (10 μ mol/L) 抑制各组细胞的线粒体膜电位后,线粒体凋亡率数据显示 PIG11 高表达诱导细胞凋亡中线粒体膜电位去极化主要是线粒体通透性转移孔的开放引起,即 PIG11 高表达可引起线粒体膜通透性增高和线粒体膜电位去极化 (表 1、图 1)。

表 1 PIG11 高表达诱导细胞凋亡中线粒体膜通透性结果

组 别	平均荧光强度	细胞凋亡率 (%)	
		CsA (-)	CsA (+)
HepG2	14.7 $\pm$ 0.56 ^a	4.45 $\pm$ 0.95	2.25 $\pm$ 0.15
pLXSN-HepG2	13.2 $\pm$ 0.53 ^a	6.23 $\pm$ 0.75	4.85 $\pm$ 0.95 ^a
pLXSN-PIG11-HepG2	5.4 $\pm$ 0.15	18.60 $\pm$ 1.25	11.43 $\pm$ 0.75

与 pLXSN-PIG11-HepG2 比较,a: $P < 0.01$

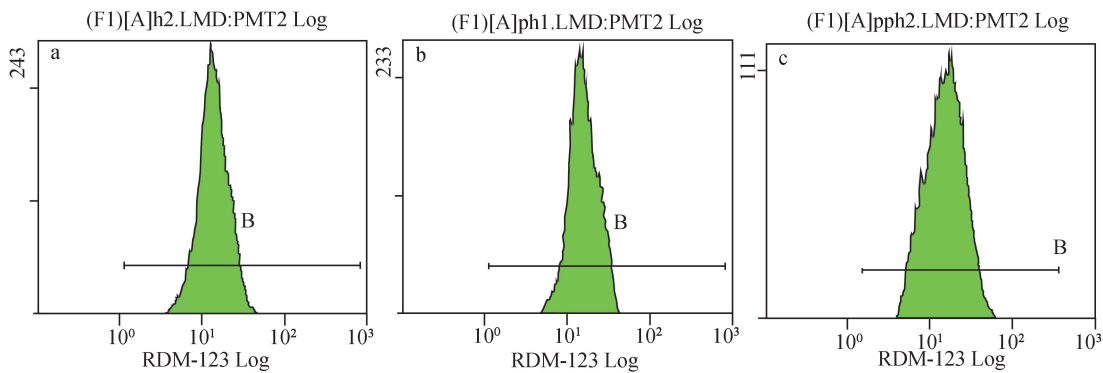


图1 PIG11 高表达引起线粒体膜电位去极化

a: HepG2 组; b: pLXSN-HepG2 组; c: pLXSN-PIG11-HepG2 组

2.2 PIG11 蛋白高表达引起 Cyt C 向胞浆的释放

选用胞浆和线粒体成分蛋白提取试剂盒提取胞浆和线粒体成分蛋白,进行 Cyt C 蛋白免疫印迹分析(见图2)。结果显示(表2):在 pLXSN-PIG11-HepG2 细胞的胞浆中 Cyt C 表达明显上调,是 HepG2 细胞的 1.71 倍($P < 0.05$)。线粒体蛋白成分中 pLXSN-PIG11-HepG2 细胞 Cyt C 表达较 HepG2 细胞有明显下调。作为对照的 β -actin 蛋白水平无明显变化。即 PIG11 高表达可引起线粒体 Cyt C 向胞浆的释放。

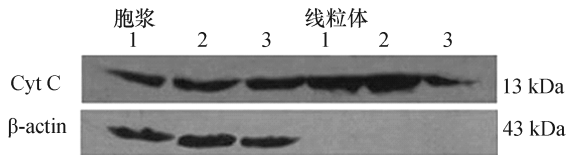


图2 三组细胞胞浆和线粒体成分蛋白的 Western Blot 分析

1: HepG2; 2: pLXSN-HepG2; 3: pLXSN-PIG11-HepG2, β -actin 为内参

表2 PIG11 高表达可引起线粒体 Cyt C 向胞浆的释放

组别	线粒体 Cyt C (相对灰度值)	胞浆中 Cyt C (相对灰度值)	细胞凋亡率 (%)
HepG2	21.1 $\pm$ 0.15 ^a	12.2 $\pm$ 0.35 ^a	4.45 $\pm$ 0.95 ^a
pLXSN-HepG2	20.1 $\pm$ 0.21 ^a	13.9 $\pm$ 0.20 ^a	6.23 $\pm$ 0.75 ^a
pLXSN-PIG11-HepG2	9.7 $\pm$ 0.11	20.9 $\pm$ 0.91	18.60 $\pm$ 1.25

与 pLXSN-PIG11-HepG2 比较; a: $P < 0.01$

3 讨论

PIGs 基因为 p53 诱导凋亡途径中的下游靶基因,PIGs 编码的蛋白的活性与细胞内的氧化还原状态密切相关。先前在研究中证实 PIG11 基因高表达参与了 As_2O_3 诱导细胞凋亡的过程,并能通过升高细胞内活性氧水平而增强细胞对 As_2O_3 介导凋亡的

敏感性^[6]。PIG11 高表达可影响细胞内的氧化还原状态,引起 ROS 水平的升高^[7]。

线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 与膜的通透性(mitochondrial permeability transition, MPT) 改变在细胞凋亡过程中起重要作用。有研究表明细胞膜电位的下降发生在细胞凋亡的形态学改变之前。Rh123 是亲脂性阳离子荧光染料,线粒体膜只在维持其生理状态跨膜电位的情况下才能对 Rh123 进行有效摄取。 $\Delta\psi_m$ 去极化可导致荧光染料摄入量下降,线粒体受损。本实验中 PIG11 高表达诱导细胞凋亡的同时伴随着 pLXSN-PIG11-HepG2 细胞 $\Delta\psi_m$ 的下降,及后续的线粒体膜间隙 Cyt C 向胞浆释放,提示 PIG11 诱导细胞凋亡的过程中存在线粒体损伤。

有研究认为 $\Delta\psi_m$ 下降源于 MPT 的改变, MPT 的改变受线粒体通透性转移孔 MPTP 调控。MPTP 是由外膜的电位依赖性离子通道(VDAC),内膜的腺苷酸转运蛋白(ANT)及基质的亲环蛋白 D 组成的蛋白复合体。研究发现生理状态下 MPTP 的周期开放可防止外室正离子过度蓄积,而在凋亡信号的诱导下(低 ATP,胞质 Ca^{2+} 升高及 ROS 的增加)。MPTP 开放。

环孢菌素 A(CsA)是 MPTP 抑制剂,可有效抑制 MPTP 的开放和随后的 $\Delta\psi_m$ 去极化^[8]。有研究发现当 CsA 与亲环蛋白 D 结合后,亲环蛋白 D 与 MPTP 中的 ANT 结合位点分离,使 MPTP 开放受到抑制。本实验结果显示:PIG11 高表达引起的凋亡可被 MPTP 抑制剂 CsA 部分抑制,即通过抑制 $\Delta\psi_m$ 的下降可以阻止凋亡的部分发生,说明 PIG11 诱导细胞凋亡机制中 $\Delta\psi_m$ 的下降可能是 MPTP 开放引起的。

MPTP 的持续开放可以使 $\Delta\psi_m$ 崩解,呼吸链解偶联,线粒体基质渗透压升高,内膜肿胀,并可伴随线粒体膜间隙的 Cyt C、细胞凋亡诱导因子和 Caspase 酶原等的释放,通过凋亡的级联反应(下转第 44 页)

(上接第 24 页)

引起细胞凋亡。本实验中 PIG11 高表达引起细胞 $\Delta\psi_m$ 下降和 Cyt C 向胞浆释放,而 CsA 能部分抑制 PIG11 高表达引起的细胞凋亡,提示线粒体凋亡信号通路可能参与了 PIG11 蛋白诱导 HepG2 细胞凋亡的过程。

综上所述,PIG11 蛋白稳定高表达可诱导细胞凋亡,且 PIG11 蛋白稳定高表达引起 HepG2 细胞 $\Delta\psi_m$ 下降和 Cyt C 向胞浆释放,可能是其诱导凋亡的机制之一。

参考文献:

- [1] Polyak K, Xia Y, Zweier JL, et al. A model for p53-induced apoptosis[J]. Nature, 1997, 389 (6648): 300-305.
- [2] Liang XQ, Cao EH, Zhang Y, et al. P53-induced gene 11 (PIG11) involved in arsenic trioxide-induced apoptosis in human gastric cancer MGC-803 cells[J]. Oncology Reports, 2003, 10(5): 1265-1269.
- [3] Chiba T, Yokosuka O, Fukai K, et al. Cell growth inhibition and gene expression induced by the histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, on human hepatoma cells

[J]. Oncology, 2004, 66(6): 481-491.

- [4] Ramachandran C, Rodriguez S, Ramachandran R, et al. Expression profiles of apoptotic genes induced by curcumin in human breast cancer and mammary epithelial cell lines[J]. Anticancer Res, 2005, 25(5): 3293-3302.
- [5] Yan Wu, Xiao-Min Liu, Xiao-Juan Wang, et al. PIG11 is Involved in Hepatocellular Carcinogenesis and Its Overexpression Promotes HepG2 Cell Apoptosis[J]. Pathol. Oncol. Res, 2009, 15(3): 411-416.
- [6] Liang XQ, Cao EH, Zhang Y, et al. A p53 target gene, PIG11, contributes to chemosensitivity of cells to arsenic trioxide[J]. FEBS Letters, 2004, 569(1-3): 94-98.
- [7] 刘小敏, 王晓娟, 张 杨, 等. 活性氧改变在 PIG11 高表达诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡中的作用[J]. 肿瘤, 2009, 29(12): 1116-1119.
- [8] Peter JA, Vladimir L, Keir JM, et al. Differential susceptibility of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria to apoptotic stimuli[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 289: 994-1001.

(此文编辑 蒋湘莲)