

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.22.011

过表达 DcR3 对肝癌细胞自噬功能的影响^{*}

张玉达, 彭 亮, 赵静静[△]

上海市松江区中心医院检验科, 上海 201600

摘 要:目的 初步探讨过表达肝癌诱骗受体 3(DcR3)对肝癌细胞自噬功能的影响。方法 构建慢病毒载体 DcR3 稳定转染 HepG2 细胞株, 转染 72 h 后收集细胞, 做进一步处理。以感染空载慢病毒作为对照组(LV-NC 组), 以感染 DcR3 过表达慢病毒作为实验组(LV-DcR3 组), 采用免疫印迹试验(Western blot)检测自噬相关蛋白[微管相关蛋白轻链 3B(LC3B)Ⅱ/LC3BⅠ比例、程序性死亡受体 1(Beclin1)]的相对表达水平, 采用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 LC3B 和 Beclin1 mRNA 相对表达水平。结果 与 LV-NC 组相比, LV-DcR3 组 LC3B 和 Beclin1 mRNA 相对表达水平明显降低($P<0.05$), 进一步研究发现 LV-DcR3 组 LC3BⅡ/LC3BⅠ比例和 Beclin1 蛋白的相对表达水平显著下降($P<0.05$)。结论 DcR3 可抑制肝癌细胞发生自噬。

关键词:肝癌; 诱骗受体 3; 自噬
中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2021)22-3254-04

Effect of DcR3 overexpression on autophagy function of hepatoma cells^{*}

ZHANG Yuda, PENG Liang, ZHAO Jingjing[△]

Department of Clinical Laboratory, Songjiang District Central Hospital, Shanghai 201600, China

Abstract: **Objective** To preliminarily investigate the effect of DcR3 overexpression on autophagy function of hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Methods** The HepG2 cell line stably transfected by lentivirus-DcR3 was constructed. The cells were collected after 72 h of cell transfection for conducting further treatment. The infected no-load lentivirus served as the control group (LV-NC group) and the infected overexpressed DcR3 lentivirus served as the experimental group (LV-DcR3 group). Western blot (WB) was used to detect the relative expression level of autophagy-related proteins (LC3BⅡ/LC3BⅠ and Beclin1). The mRNA relative expression levels of LC3B and Beclin1 were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Compared with the LV-NC group, the mRNA relative expression levels of LC3B and Beclin1 in the LV-DcR3 group were significantly decreased ($P<0.05$). Further study found that the LC3BⅡ/LC3BⅠ ratio and Beclin1 protein relative expression level in the LV-DcR3 group were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** DcR3 can inhibit the autophagy occurrence in HCC cells.

Key words: hepatoma; decoy receptor 3; autophagy

肝癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一。据统计, 2018 年肝癌的发病率在所有癌症中排第 6 位, 是全球第 4 大癌症死亡原因, 每年约有 78.2 万人死于肝癌^[1]。肝癌的临床治疗包括肝切除、肝移植、放化疗等, 治疗效果差且易复发^[2-3], 晚期肝癌患者 5 年生存率低于 5%, 预后极差。以中国为首的亚洲发展中国家是肝癌的高发地区^[4]。肝癌严重威胁着人们的健康, 明确其发病机制, 有针对性地采取早期干预措施是当前研究的热点。

前期研究发现, 肝癌诱骗受体 3(DcR3)的表达量

越高, 其对肿瘤细胞凋亡的抑制作用越显著^[5]。有研究发现, 下调 DcR3 可以抑制肝癌细胞的侵袭性, 增强肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 介导的细胞凋亡^[6]。在先前的研究中发现, DcR3 促进了细胞的增殖和迁移, 抑制了细胞凋亡指标半胱氨酸蛋白酶 3(caspase 3)和 Bcl-2 相关 X(Bax)蛋白的表达^[5]。自噬在真核细胞中广泛存在, 是一种基本生命现象, 微管相关蛋白轻链 3B(LC3B)和程序性死亡受体 1(Beclin1)是自噬途径的关键物质^[7]。LC3B 以 LC3BⅠ和 LC3BⅡ两种形式存在并参与自噬, LC3BⅠ在正常情

^{*} 基金项目: 上海市松江区科技攻关项目(20SJKJGG36, 19SJKJGG115)。
作者简介: 张玉达, 男, 技师, 主要从事肝癌的分子机制研究。 [△] 通信作者, E-mail: 275140723@qq.com。
本文引用格式: 张玉达, 彭亮, 赵静静. 过表达 DcR3 对肝癌细胞自噬功能的影响[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(22): 3254-3256.

况下定位于细胞质,当自噬被诱导时,LC3B 的细胞质形式 LC3B I 通过与脂质分子磷脂酰乙醇胺(PE)结合转化为 LC3B II,靶向定位于自噬体膜,介导自噬溶酶体的形成^[8]。在细胞的生理过程中,自噬、凋亡、程序性坏死都是细胞的死亡形式,它们相互影响、相互调节,自噬可能在细胞死亡过程中扮演重要角色。本研究通过在肝癌细胞中过表达 DcR3 来观察其对自噬功能的影响,为肝癌的早期诊断和预后判断提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 一般材料 人肝癌细胞株 HepG2(北京中科质检生物技术有限公司)置于 37℃、5%CO₂培养箱中常规培养。

1.2 仪器与试剂 含各种氨基酸和葡萄糖的培养液(DMEM),胎牛血清,胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司);DcR3 过表达慢病毒载体和空载慢病毒均购于上海吉凯基因化学技术有限公司;DcR3 抗体、Beclin1 抗体(Abcam 公司,美国);LC3B 抗体(美国 Cell signaing 公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记亲和纯化山羊抗小鼠 IgG 二抗(美国 sigma 公司);反转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒。RT-PCR 引物序列合成(上海生工生物工程有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞转染 肝癌细胞株 HepG2 以每孔 3×10⁵ 个分布于六孔板,当细胞融合达到 70%时,分别感染 DcR3 过表达慢病毒载体和空载慢病毒。对照组

为 LV-NC 组(感染空载慢病毒),实验组为 LV-DcR3 组(感染 DcR3 过表达慢病毒载体)。以病毒滴度最小致死量(MIO)50 IU/mL 加入病毒上清液(参照预实验结果)。72 h 后收集 LV-NC 组和 LV-DcR3 组细胞,然后进行相关实验。

1.3.2 免疫印迹试验(Western blot) 用预冷却的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗收集的细胞 3 次,然后用细胞裂解液(RIPA)裂解细胞,测定蛋白量,加入 5×上样缓冲液进行混匀,在 100℃变性 10 min,取 30 μg 蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),然后转膜,将硝酸纤维素膜置于含 5%脱脂奶粉的缓冲液中封闭 2 h,吸取干净封闭液后加入一抗(均为 1:1 000),4℃摇匀过夜。洗涤缓冲液(TBST)洗膜 3 遍,每次 10 min,分别加入稀释后的二抗 IgG(1:1 000),室温避光孵育 2 h。孵育后 TBST 洗膜,电化学发光法(ECL)显色蛋白条带,然后进行凝胶成像分析,共进行平行实验 3 次。

1.3.3 RT-PCR Trizol 法提取细胞总 RNA,根据反转录试剂盒说明书将总 RNA 的 1 μg mRNA 反转录为 cDNA,反转录条件为 42℃ 60 min,70℃ 5 min。PCR 扩增:95℃预变性 30 s;94℃变性 15 s,56℃退火 45 s,72℃延伸 45 s,扩增 40 个循环。引物序列见表 1。基于 ABI7500 平台收集 RT-PCR 数据,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为对照,采用 2^{-ΔΔCt} 计算相对表达水平。

表 1 引物序列

项目	上游引物	下游引物
DcR3	5'-CCACTACACGCAGTTCTGGA-3'	5'-GTGCTCCAAGCAGAAACCAG-3'
LC3B	5'-CCTGGACAAGACCAAGTTTTTG-3	5'-GTAGACCATATAGAGGAAGCCG-3'
Beclin1	5'-AGCTGCCGTTATACTGTTCTG-3'	5'-ACTGCCTCCTGTGTCTTCAATCTT-3'
GAPDH	5'-CCT GGCACCCAGCACAAAT-3'	5'-GGGCCGGACTCGTCATAC-3'

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理和分析,图像处理使用 Photoshop5.0 及 GraphPad Prism6.0 软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DcR3 蛋白表达情况 本研究选择 DcR3 表达较低且实验常用的肝癌细胞株 HepG2 作为研究对象。DcR3 过表达慢病毒载体转染 72 h 后,用 Western Blot 验证转染情况。结果显示,在相同印迹上以肌动蛋白 B(ACTB)信号标准化成像条带为标准,测定免疫印迹条带的灰度值,LV-DcR3 组 DcR3 蛋白的表达水平(1.88±0.15)明显高于 LV-NC 组(0.74±

0.05),差异有统计学意义(*P* < 0.05),说明 DcR3 慢病毒转染效率达到实验要求。见图 1。

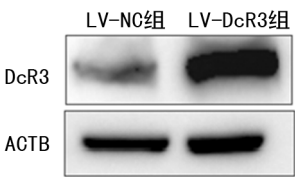
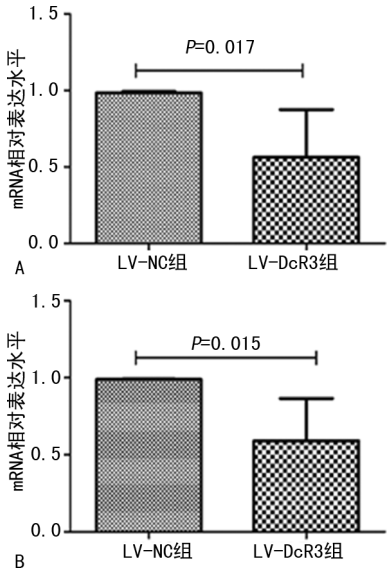


图 1 不同病毒感染细胞组的蛋白表达水平

2.2 过表达 DcR3 对肝癌细胞自噬相关基因 mRNA 的影响 肝癌细胞自噬相关蛋白 LC3B 和 Beclin1 的 mRNA 相对表达水平结果显示,LV-DcR3 组 LC3B 和 Beclin1 mRNA 相对表达水平与 LV-NC 组相比,明显下降,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见图 2。



注:A为Beclin1;B为LC3B。

图2 过表达DcR3对自噬相关指标mRNA相对表达水平的影响

2.3 从蛋白相对表达水平观察过表达DcR3对肝癌细胞自噬功能的影响 Western Blot结果显示,在相同印迹上以ACTB信号标准化成像条带为标准,与LV-NC组比较,LV-DcR3组LC3B II/LC3B I比例(1.65 ± 0.15)、Beclin1蛋白相对表达水平(0.89 ± 0.05)显著低于LV-NC组(LC3B II/LC3B I比例为 3.48 ± 0.31 、Beclin1蛋白相对表达水平为 1.41 ± 0.05),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图3。

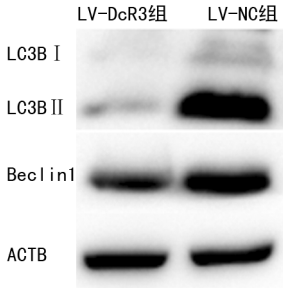


图3 过表达DcR3的肝癌细胞自噬蛋白的相对表达水平

3 讨论

DcR3是肿瘤坏死因子受体超家族(TNFR)的成员之一,可与Fas配体(FasL)、肿瘤坏死因子配体相关分子1A(TL1A)竞争结合,从而阻断以上配体诱导的凋亡^[6]。有研究认为肝癌组织中DcR3的表达水平高于癌旁组织及正常组织,且与肿瘤分化、浆膜浸润、肝外转移相关^[7]。然而,DcR3在肝癌进展和转移中的确切机制仍不清楚。

近年来,自噬作为细胞死亡方式的一种,成为肿瘤研究的热点。已有研究报道,自噬在促进肿瘤进展或抑制肿瘤转化中发挥双重作用,提示自噬缺陷诱发肿瘤是一种促癌机制^[8]。有研究表明,自噬在肝脏疾病从慢性肝病发展为肝硬化,最终发展为肝癌的病理

机制中起着重要的促死亡(促癌)作用^[9]。Beclin-1和微管相关蛋白1轻链3(LC3)是自噬途径的关键物质^[10]。笔者推测DcR3可能影响自噬的过程。本实验通过在肝癌细胞中过表达DcR3以验证此推测。

LC3B被认为是参与自噬的关键因素,是监测自噬的特殊指标。本研究结果显示,过表达DcR3时,LC3B蛋白和mRNA相对表达水平均降低。有研究表明,LC3B在肿瘤区较正常邻近组织表达水平更低^[11],与本研究结果一致。此外,一篇Meta分析显示,LC3B的表达水平与性别、年龄、肿瘤数量、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、肝硬化、TNM分期、甲胎蛋白、血管侵犯、组织学分级和肝功能无关($P > 0.05$),而与总生存期有关($P < 0.05$)^[12]。

Beclin1是首个被发现的哺乳动物自噬蛋白,在自噬活性中起着重要的调节作用,在小鼠肝癌模型中发现Beclin1发挥抑癌作用^[13]。肝癌组织中Beclin1表达水平明显低于癌旁组织,Beclin1表达水平与复发及生存率相关^[14]。本研究结果显示,DcR3过表达会抑制Beclin-1的表达。因此,这些结果表明,DcR3抑制了肝癌细胞中Beclin1和LC3B的表达,提示自噬可能受到DcR3的调控。

综上所述,本研究通过体外实验初步验证了DcR3可以抑制自噬的发生,但由于是初步研究结果,LC3B和Beclin-1是否受DcR3调控,有待进一步研究证实。

参考文献

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

[2] WANG C, VEGNA S, JIN H, et al. Inducing and exploiting vulnerabilities for the treatment of liver cancer[J]. Nature, 2019, 574(7777): 268-272.

[3] MILETTE S, HASHIMOTO M, PERRINO S, et al. Sexual dimorphism and the role of estrogen in the immune microenvironment of liver metastases[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 5745-5755.

[4] XU X, CHEN W, MIAO R, et al. Survival analysis of hepatocellular carcinoma: a comparison between young patients and aged patients[J]. Chin Med J (Engl), 2015, 128(13): 1793-1800.

[5] 彭亮, 赵静静, 姜晓丽, 等. DcR3表达在肝癌细胞凋亡和增殖中的作用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(19): 2305-2308.

[6] LIANG C, XU Y, LI G, et al. Downregulation of DcR3 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis[J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 417-428.

(下转第3260)

- [J]. Turk J Gastroenterol, 2019, 30(1): 81-87.
- [3] 黄巨霞, 李芳芳. 生大黄水浸液灌胃与芒硝外敷结合谷氨酰胺治疗重症急性胰腺炎的疗效观察[J]. 海南医学, 2019, 30(18): 2331-2334.
- [4] HOFF B M, MAKER J H, DAGER W E, et al. Antibiotic dosing for critically ill adult patients receiving intermittent hemodialysis, prolonged intermittent renal replacement therapy, and continuous renal replacement therapy: an update[J]. Ann Pharmacother, 2020, 54(1): 43-55.
- [5] ZARBOCK A, KÜLLMAR M, KINDGEN-MILLES D, et al. Effect of regional citrate anticoagulation vs. systemic heparin anticoagulation during continuous kidney replacement therapy on dialysis filter life span and mortality among critically ill patients with acute kidney injury: a randomized clinical trial[J]. JAMA, 2020, 324(16): 1629-1639.
- [6] 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组, 中华胰腺病杂志编辑委员会, 中华消化杂志编辑委员会. 中国急性胰腺炎诊治指南(2019 年, 沈阳)[J]. 中华消化杂志, 2019, 39(11): 721-730.
- [7] SENDLER M, VAN DEN BRANDT C, GLAUBITZ J, et al. NLRP3 inflammasome regulates development of systemic inflammatory response and compensatory anti-inflammatory response syndromes in mice with acute pancreatitis[J]. Gastroenterology, 2020, 158(1): 253-269.
- [8] ZUCCARI S, DAMIANI E, DOMIZI R, et al. Changes in cytokines, haemodynamics and microcirculation in patients with sepsis/septic shock undergoing continuous renal replacement therapy and blood purification with CytoSorb[J]. Blood Purif, 2020, 49(1/2): 107-113.
- [9] BIANCHI N A, ALTARELLI M, ECKERT P, et al. Complications of regional citrate anticoagulation for continuous renal replacement therapy: an observational study[J]. Blood Purif, 2020, 49(5): 567-575.
- [10] 孙博睿, 张春, 林婷, 等. CRRT 对重症急性胰腺炎患者接受经皮引流治疗的影响: 一项回顾性队列研究[J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31(6): 714-718.
- [11] 彭博, 孟德志, 黄秀峰. 连续性肾脏替代疗法治疗重症急性胰腺炎的效果及对炎性介质和凝血功能的影响[J]. 解放军预防医学杂志, 2019, 37(5): 51-52.
- [12] 郑坚江, 郭磊, 刘跃全, 等. 重症急性胰腺炎 ICU 早期 CRRT 治疗疗效评估[J]. 中国医师杂志, 2018, 20(2): 228-230.
- [13] SUN B, ZHANG C, LIN T, et al. Effect of continuous renal replacement therapy during percutaneous drainage in severe acute pancreatitis patients: a retrospective cohort study[J]. Chin Crit Care Med, 2019, 31(6): 714-718.
- [14] 吴相伟, 叶继辉, 孙敏, 等. CRRT 启动时机与脓毒症相关性 AKI 患者预后的关系[J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32(11): 1352-1355.
- [15] 朱长亮, 黎璞, 刘睿, 等. 不同时机 CRRT 治疗对脓毒症患者炎症指标血流动力学及预后的影响[J]. 河北医学, 2019, 25(11): 150-154.
- [16] SCHEPERS N J, HALLENSLEBEN N D L, BESSELINK M G, et al. Urgent endoscopic retrograde cholangiopancreatography with sphincterotomy versus conservative treatment in predicted severe acute gallstone pancreatitis (APEC): a multicentre randomised controlled trial[J]. Lancet, 2020, 396(10245): 167-176.

(收稿日期: 2021-01-16 修回日期: 2021-06-19)

(上接第 3256 页)

- [7] HUNG S C, HSU T W, LIN Y P, et al. Decoy receptor 3, a novel inflammatory maker, and mortality in hemodialysis patients[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2012, 7(8): 1257-1265.
- [8] WEI Y J, CHEN X Y, YANG J, et al. DcR3 promotes proliferation and invasion of pancreatic cancer via a DcR3/STAT1/IRF1 feedback loop[J]. Am J Cancer Res, 2019, 9(12): 2618-2633.
- [9] WHITE E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(6): 401-410.
- [10] WANG L, OU J J. Regulation of autophagy by hepatitis C virus for its replication[J]. DNA Cell Boil, 2018, 37(4): 287-290.
- [11] WU D H, JIA C C, CHEN J, et al. Autophagic LC3B overexpression correlates with malignant progression and predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Tumor Biol, 2014, 35(12): 12225-12233.
- [12] MENG Y C, LOU X L, YANG L Y, et al. Role of the autophagy-related marker LC3 expression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2020, 146(5): 1103-1113.
- [13] YUE Z, JIN S, YANG C, et al. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor[J]. Proc Natl Acad Sci, 2003, 100(25): 15077-15082.
- [14] SUN H, YU J, WEN Z, et al. Decreased expression of Beclin-1 in patients with hepatocellular carcinoma[J]. JBUON, 2019, 24(2): 634-641.

(收稿日期: 2021-01-18 修回日期: 2021-06-09)