

肿瘤内分泌

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002108

腺病毒介导 PSMA3 基因过表达对肝癌 SMMC7721 细胞增殖、周期、凋亡及其荷瘤生长的影响

南映瑜, 项颖, 龚奕, 肖春燕, 杨涛, 张文军, 黄德鸿, 李启英, 童永红

(重庆大学附属肿瘤医院/重庆市肿瘤研究所/重庆市肿瘤医院,

肿瘤转移与个体化诊治转化研究重庆市重点实验室, 重庆 400030)

【摘要】目的:构建蛋白酶体亚基 $\alpha 3$ (proteasome subunit alpha type 3, PSMA3) 基因腺病毒重组载体, 并观测腺病毒介导 PSMA3 基因过表达对肝癌 SMMC7721 细胞增殖、周期、凋亡及其荷瘤生长的影响。**方法:**RT-PCR 法扩增 PSMA3 基因全长 CDs 序列后, 克隆入 pTG19-T 载体, 再亚克隆入 pAdTrack-CMV 腺病毒穿梭载体中, 构建重组 pAdTrack/PSMA3 腺病毒载体, 随后与骨架质粒 pAdEasy-1 同源重组形成 pAd/PSMA3 重组腺病毒, 经包装及滴度测定, 获高感染力的 pAd/PSMA3 病毒。用 pAd/PSMA3 病毒感染人肝癌 SMMC7721 细胞, 荧光显微镜观测被感染的 SMMC7721 细胞的绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的变化情况。Cell counting kit-8 (CCK-8) 法检测 pAd/PSMA3 病毒对 SMMC7721 细胞增殖的影响。Real-time PCR 和 Western blot 分别检测被感染的 SMMC7721 细胞的 PSMA3 基因、增殖细胞核抗原基因 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、Caspase-3 促凋亡基因及其编码蛋白的表达情况。流式细胞仪 (FCM) 检测被感染的 SMMC7721 的周期、凋亡变化。将经 pAd/PSMA3 病毒感染的 SMMC7721 细胞移植裸鼠皮下以生成荷瘤, 逐日观察荷瘤的生长情况。所有实验以空病毒感染及未感染的细胞做对照。**结果:**克隆到 768 bp 的 PSMA3 基因, 并构建了其具高感染力的 pAd/PSMA3 重组病毒。CCK-8 法结果表明, 过表达 PSMA3 基因的 SMMC7721 细胞, 其增殖明显减慢 ($P < 0.05$)。Real-time PCR、Western blot 检测显示, pAd/PSMA3 重组病毒可介导 SMMC7721 细胞过表达 PSMA3 基因, 上调其 Caspase-3 基因及其编码蛋白的表达, 并下调其 PCNA 基因及其蛋白的表达 ($P < 0.05$)。FCM 检测证实, 过表达 PSMA3 基因的细胞可被阻滞于 G_1 期 (细胞周期), 并可促使其凋亡, 其凋亡率差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。动物实验证实, pAd/PSMA3 病毒可明显抑制裸鼠荷瘤的生长 ($P < 0.01$)。**结论:**重组病毒 pAd/PSMA3 可将 SMMC7721 细胞阻滞于 G_1 期 (细胞周期), 抑制其增殖, 促使其凋亡, 并可抑制其裸鼠荷瘤的生长, 这些可能和下调其增殖相关 PCNA 蛋白, 上调其凋亡相关 caspase-3 蛋白的表达密切相关。

【关键词】蛋白酶体亚基 $\alpha 3$; SMMC7721 细胞; 增殖; 凋亡; 荷瘤**【中图分类号】**R73.35.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-03-25

Effects of adenovirus-mediated PSMA3 gene overexpression on proliferation, cell cycle and apoptosis of human hepatocellular carcinoma SMMC7721 cells

Nan Yingyu, Xiang Ying, Gong Yi, Xiao Chunyan, Yang Tao,

Zhang Wenjun, Huang Dehong, Li Qiyang, Tong Yonghong

(Chongqing Key Laboratory of Translational Research for Cancer Metastasis and Individualized Treatment, Chongqing University Cancer Hospital & Chongqing Cancer Institute & Chongqing Cancer Hospital)

【Abstract】Objective: To construct the adenovirus vector of proteasome subunit alpha type 3 (PSMA3) gene and investigate whether the adenovirus vector carrying PSMA3 gene affecting the proliferation, cell cycle, apoptosis and the growth of nude mice bearing tumors of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC7721. **Methods:** cDNA fragment encoding human PSMA3 gene was amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The PCR amplified fragment was first cloned into pTG19-T vector, and then subcloned PSMA3 gene into the shuttle vector pAdTrack-CMV for constructing the recombinant plasmid pAdTrack/PSMA3, which homologously recombined with the adenoviral backbone vectors Adeasy-1 to generate recombinant adenoviral plasmids Ad/PSMA3. The recombinant adenoviruses

作者介绍: 南映瑜, Email: nanxi221@sina.com,

研究方向: 血液与肝脏肿瘤。

通信作者: 童永红, Email: 1519778438@qq.com。**基金项目:** 重庆市委应用开发计划资助项目 (编号: CSTC 2014yyk-fa110031); 中国医师协会研究资助项目 (编号: ZGYSHX 20120701)。**优先出版:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20190506.0920.006.html> (2019-05-08)

Ad/PSMA3 were generated by transfecting the recombinant adenoviral DNA into 293 cells and then employed to infect SMMC7721 cells. The expression of enhanced green fluorescent protein(EGFP) in transfected SMMC7721 cells were observed by fluorescence microscope. The proliferation of transfected SMMC7721 cells were tested via Cell count kit-8(CCK-8), and the expression levels of PSMA3, proliferating cell nuclear antigen(PCNA) and caspase-3 mRNAs proteins in transfected SMMC7721 cells were detected by RT-PCR and Western blot, respectively. The cell cycle distribution and apoptosis rate of transfected SMMC7721 cells were analyzed by flow cytometry(FCM). SMMC7721 cells infected with pAd/PSMA3 virus were transplanted subcutaneously into nude mice to generate tumors, and the growth of the tumors was observed day by day. **Results:** PSMA3 gene was successfully cloned. Adenoviral virus particles which possess infectious competent were produced from Ad/PSMA3. The results of CCK-8 revealed that the proliferation of SMMC7721 cells, which overexpressed PSMA3, were slower than the control cells, especially from 48 h after transfection ($P < 0.01$). The results of RT-PCR and Western blot demonstrated that SMMC7721 cells transfected with pAd/PSMA3 recombinant virus can effectively overexpressed PSMA3, and the expression of PSMA3, caspase-3 mRNA and protein were up-regulated, while the expression of PCNA mRNA and protein were down-regulated in the cells. FCM detection confirmed that SMMC7721 cells transfected with pAd/PSMA3 were blocked in the G1 phase of cell cycle, and promoted apoptosis, and the difference of the apoptosis rate between transfected and control cells were statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion:** PSMA3 gene was successfully cloned. The proliferation of SMMC7721 cells, which overexpressed PSMA3, can be effectively suppressed, and their apoptosis be promoted. The growth of nude mice bearing tumors of SMMC7721 cells overexpressed PSMA3 can be also inhibited. These effects may be related to the down-regulation of the PCNA expression and the up-regulation of the caspase-3 expression in the cells.

[Key words] PSMA3 gene; SMMC7721 cell line; proliferation; apoptosis; bearing tumors

恶性肿瘤的发病和死亡率逐年上升,不断给人类健康带来严重威胁。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)在全球恶性肿瘤患者的死因中位居第二,是亚洲最为致命的癌症,因其治疗措施受限、预后差,确诊者的生存时间一般不超过一年^[1]。HCC患者易死亡的主要原因是由于缺乏敏感的检测方法用于其早期诊断所致^[2-4]。

肿瘤抗原(tumor antigens, TAs)是与正常组织、细胞不同的肿瘤组织、细胞的基因表达产物,机体可受其诱导产生针对肿瘤细胞的体液免疫与细胞免疫,是恶性肿瘤分子治疗的重要基础,可对其诊断,尤其是早期诊断、治疗和监测提供有效的靶分子^[5]。

蛋白酶体在所有蛋白降解中均能发挥重要作用^[6]。PSMA3作为蛋白酶体的重要组成成分之一,能诱导恶性肿瘤细胞,如 HEK293 亚细胞的凋亡,还在肿瘤中高表达的 AGR2、PAI-1 等基因紧密关联^[7-8]。然而,PSMA3 对 HCC 的发生发展是否相关,尚未见报道。本课题组前期采用双向凝胶电泳、Western blot 及质谱鉴定等蛋白组学技术与免疫组织化学检测与验证表明,人 PSMA3 很可能是 HCC 的密切相关 TAs 之一^[9]。

为进一步弄清 PSMA3 和 HCC 的关系,首先克

隆人 PSMA3 基因,并构建其腺病毒过表达重组载体 pAd/PSMA3,然后用该重组载体感染 HCC 细胞株 SMMC7721。观测被感染的 SMMC7721 细胞在荧光显微镜下其 GFP(绿色荧光蛋白)的表达情况;CCK-8(cell counting kit-8)试剂盒检测被感染 SMMC7721 细胞的增殖变化,绘制其增殖曲线;Real-time PCR 与 Western blot 技术分别检测被感染 SMMC7721 细胞的 PSMA3 基因、促凋亡 caspase-3 基因、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)基因及其蛋白的表达变化;FCM(流式细胞仪)技术检测被感染细胞的周期和凋亡变化情况,动物实验观察感染细胞的成瘤生长情况,以期在细胞与动物水平方面探寻 PSMA3 与 HCC 的紧密关系,为 HCC 的诊断,尤其早期诊断和治疗奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人肝癌 SMMC7721 细胞株购自中国典型培养物保藏中心。

1.1.2 试剂 腺病毒载体系统、Lip2000 基因转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。Real-time PCR 试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)、PrimeScript™ RT、Taq 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、克隆载体 pTG19-T 购自大连

宝生物公司。引物合成、测序由上海捷瑞公司完成。FITC-Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒、cell counting kit-8(CCK-8)试剂盒购自日本 Toyobo 公司。PSMA3(ab109532)兔单克隆抗体购自 Abcam 公司。caspase-3(sc-1225)羊多克隆抗体、PCNA(sc-25280)、GAPDH(sc-166574)鼠单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。羊抗兔 IgG、驴抗羊 IgG、羊抗鼠 IgG 购自碧云天生物技术研究所。SuperSignal™ west femto maximum sensitivity substrate 美国 Thermo 公司。PVDF 膜购自美国 Bio-Rad 公司。

1.1.3 裸鼠 无特定病原体(specific pathogen-free, SPF)级 BALB/c 裸小鼠 12 只,雌雄不拘,4~6 周龄,体质量 11~14 g,由第三军医大学动物中心提供,生产许可证号为 SCXK(渝)2012-0003;饲养于恒温 18℃~22℃和恒湿 50%~80%条件的 SPF 级动物实验室,自由摄取标准饲料与无菌水。

1.2 方法

1.2.1 PSMA3 基因的克隆、pTG19-T/PSMA3 克隆载体的构建及鉴定 设计扩增人 PSMA3 基因(NM_002788.3)的引物,上游:5'-ATGAGCTCAATCGGCACTGG-3';下游:5'-TTAC-ATATTATCATCATC-3'。以人肝癌癌旁组织总 RNA 作模板,RT-PCR 扩增 PSMA3 基因全长编码序列,RT 反应条件为 30℃、10 min 及 42℃、30 min,生成第一链 cDNA;99℃、5 min 灭活逆转录酶;5℃、5 min,1 个循环。PCR 反应条件为 94℃、4 min 预变性,95℃、30 s 变性,60℃退火 42 s,72℃延伸 2 min 35 s,共 30 个循环,72℃延伸 10 min。反应结束后取 6 μL PCR 产物行凝胶电泳,予以确认,并将其连入克隆载体 pTG19-T,行 BamH I 限制性内切酶酶切及测序鉴定,正确者命名:pTG19-T/PSMA3 载体。

1.2.2 PSMA3 基因的腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV 的亚克隆和鉴定 pTG19-T/PSMA3 和穿梭载体 pAdTrack-CMV 经 Kpn I、Hind III 酶酶切后,回收含 PSMA3 和 pAdTrack 骨架的片段,纯化、连接、转化与培养,提取其阳性克隆质粒,经鉴定(酶切及测序)正确者命名为 pAdTrack/PSMA3 质粒。

1.2.3 pAdTrack/PSMA3 腺病毒质粒的同源重组、包装及滴度测定 用 Pme I 酶线性化 pAdTrack/PSMA3 质粒 DNA 后,转入含 pAdeasy-1 超螺旋结构病毒骨架的 BJ5183 感受态细胞中进行同源重组,取其阳性克隆命名为 pAd/PSMA3 病毒质粒,该质粒经 Pac I 酶切与电泳检测确认。以 Lip2000 基因转染试剂介导纯化的 pAd/PSMA3 转染 293T 细胞行病毒包装,荧光显微镜观察被包装细胞的 GFP 的表达变化。为提高病毒滴度,包装成功的 pAd/PSMA3 病毒细胞,经反复 5 次(第 2 次开始,包装细胞经病毒上清液感染,-80℃反复冻融)传代扩增,随后大量扩增,以倍比稀释法测定其滴度。

1.2.4 SMMC7721 细胞的 pAd/PSMA3 病毒感染 常规培养 SMMC7721 细胞,待其长至 50%~70%的贴附面积时,用感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 100 的 pAd/PSMA3 病毒感染(感染组),以未染感或经空病毒感染的相同细胞分别作空白对照与空病毒感染对照,12~24 h 后,更换新鲜培养液。

感染 48~72 h 后,倒置荧光显微镜观察被感染细胞生长情况并拍照。按发绿色荧光的细胞的百分占比评估其感染效率,达 80%以上者用于后续实验。

1.2.5 SMMC7721 细胞过表达 PSMA3 基因对其增殖的影响 收集感染 72 h 的各细胞及空白对照细胞制成细胞悬液,接种到 24 孔培养板(约 2×10^5 个/孔)中培养,分别收集 1、2、3 及 4 d 的细胞制成单细胞悬液后接种到 96 孔板(200 μL/孔)中,每组细胞设 4 个复孔,加入 CCK-8(约 10 μL/孔),继续培养 4 h,酶标仪检测其 450 nm 波长处各孔细胞的光密度(optical density, OD)值。以培养时间为横坐标,OD 值为纵坐标绘制其增殖曲线。此实验至少重复 3 次。

1.2.6 SMMC7721 细胞过表达 PSMA3 基因对其 PCNA 及促凋亡相关基因 Caspase-3 表达的影响 设计并合成人 PSMA3(NM_002788.3)、PCNA(NM_002592.2)及 Caspase-3(NM_004346.1)基因的 Real-time PCR 检测引物。PSMA3 基因上游引物:5'-TGGAATGGCAGTAGCAGGTT-3',下游引物:5'-GCCACTCTGTCTGCAAGATG-3',扩增长度 129 bp;PCNA 基因上游引物:5'-AGCCGAAACCAGCTAGACTT-3',下游引物:5'-ACCGCTGGAGCTAATATCCC-3',扩增长度 169 bp;Caspase-3 基因上游引物:5'-AGTGCTCGCAGCTCATACCT-3',下游引物:5'-GGATTTCAAGGCGACGCCAA-3',扩增长度 68 bp;内参照 GAPDH 基因(NM_002046.4)的上游引物:5'-TCGACAGTCAGCCGCATCTT-3',下游引物:5'-AGGCG-CCCAATACGACCAAA-3' 扩增长度 108 bp。分别收集感染 72 h 的各细胞和空白对照细胞,提取其总 RNA 并行定量检测。将 RNA 反转录成 cDNA,反转录条件:40℃、10 min,95℃、5 min,4℃、5 min。Real-time PCR 检测按试剂盒说明书进行,一个反应体系包含 2 μL 的 cDNA,反应条件:95℃、40 s,85℃、5 s,59℃、35 s。目的基因的相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值表示。实验重复至少 3 次。

1.2.7 SMMC7721 细胞过表达 PSMA3 基因对其 PCNA 及促凋亡相关蛋白 Caspase-3 表达的影响 分别收集感染 72 h 的各细胞和空白对照细胞,提取其总蛋白,定量后经 SDS-PAGE 分离其各蛋白后转至 PVDF 膜上。分别放入含 PSMA3 抗体(1:600 稀释)、PCNA 抗体(1:700 稀释)及 caspase-3 抗体(1:500 稀释)的封闭液内,孵育 24 h(4℃)。分别加入辣根过氧化物酶标记的相应二抗,孵育(室温)1.5 h 后,经增强化学发光液显色,GAPDH 为内参照。实验重复至少 3 次。

1.2.8 SMMC7721 细胞过表达 PSMA3 基因对其周期、凋亡的影响 参考文献[10]检测 SMMC7721 细胞过表达 PSMA3 基因对其周期、凋亡的影响。具体为,PSMA3 病毒液感染常规培养的 SMMC7721 细胞(密度: 1×10^6 个/mL)作感染组,未感染及空病毒液感染的 SMMC7721 细胞分别为空白对照和空病毒感染对照。收集感染 72 h 的各 SMMC7721 细胞和空白对照细胞,加入预冷(4℃)PBS 混匀,离心(1 000 r/min)5 min,弃上清,用 0.5 mL PBS 重悬细胞并计数,各管添加预冷(4℃)的 75%乙醇 4.5 mL 固定其细胞 24~72 h。确保细胞

含量为 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$ 个/管,经 PI 染色后,FCM 检测其周期变化情况,发射波长 $E_m=530$ nm;激发波长 $E_x=488$ nm。用 Multicycle software 分析各检测结果。实验重复至少 3 次。分别收集,并计数感染 72 h 的各细胞和空白对照细胞。分别取各组细胞样本(5 万~10 万个)悬液 100 μ L,添加 195 μ L 缓冲液重悬,加入 5 μ L Annexin V-FITC、混匀,孵育(室温,避光)12 min,离心(1 000 g)6 min,各细胞样本用 195 μ L 缓冲液重悬后添加 PI 液 10 μ L、混匀,用 FCM 检测与分析各样本凋亡变化情况。实验重复至少 3 次。

1.2.9 SMMC7721 细胞过表达 PSMA3 基因对裸鼠荷瘤生长的影响 参照文献^[10]检测 SMMC7721 细胞过表达 PSMA3 基因对裸鼠荷瘤生长的影响。具体为:15 只裸鼠称重、随机分为 3 组(pAd/PSMA3 病毒感染、空病毒感染及空白对照组),碘伏局部皮肤消毒后,于其左、右侧腋窝背侧区或左、右侧腹股沟外侧区皮下分别注射约 200 μ L($1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 个细胞/mL)各组细胞悬液。逐日观察裸鼠是否成瘤及其生长情况,并拍照。实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

实验数据采用 IBM SPSS 22.0 统计学软件进行 *t* 检验或方差分析以比较组间差异,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)呈现。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 PSMA3 基因的克隆、pTG19-T/PSMA3 载体的构建和鉴定

以人肝癌旁组织总 RNA 为模板,用 RT-PCR 法扩增到 768 bp 的 PSMA3 基因全长 CDs 序列(图 1A)。BamH I 酶切 pTG19-T/PSMA3 载体,切下 768 bp 的 PSMA3 目的片段(图 1B)。测序证实,所克隆到的 PSMA3 基因的 CDs 序列和 GenBank 库显的完全一致。

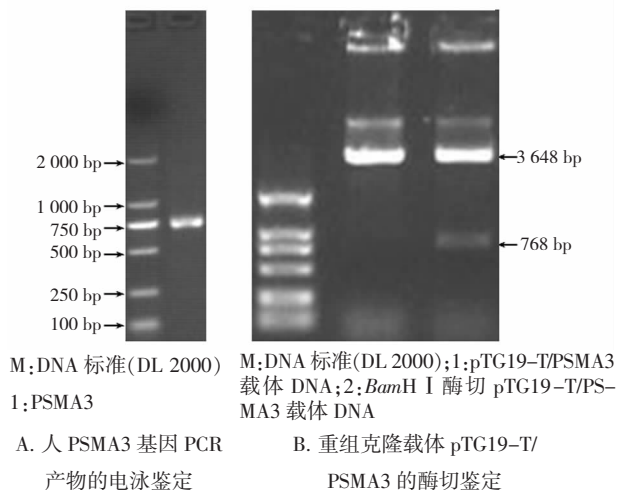


图 1 人 PSMA3 基因的克隆及其克隆载体 pTG19-T/PSMA3 的酶切鉴定

2.2 PSMA3 基因向 pAdTrack-CMV 腺病毒穿梭载体的亚克隆、鉴定与同源重组

pTG19-T/PSMA3 克隆载体经 Hind III、Kpn I 酶切下的 PSMA3 片段被亚克隆入 pAdTrack-CMV 腺病毒穿梭载体形成 pAdTrack/PSMA3 重组子,此重组子再用 Hind III、Kpn I 酶切鉴定,电泳显示切下 768 bp 的目的片段(图 2A)。测序证实,pAdTrack/PSMA3 重组腺病毒质粒得以成功构建。pAdTrack/PSMA3 重组质粒经 Pme I 酶线性化后,转入 BJ5183 感受态菌中与其病毒骨架载体 pAdeasy-1 进行同源重组,挑取重组阳性克隆(命名 pAd/PSMA3),pAd/PSMA3 阳性克隆 DNA 经 Pac I 酶切,电泳见约 4.5 kb 和 30 kb 的片段,对照克隆 DNA 经 Pac I 酶切,见约 3 kb 的片段,表明两者成功进行同源重组(图 2B)。

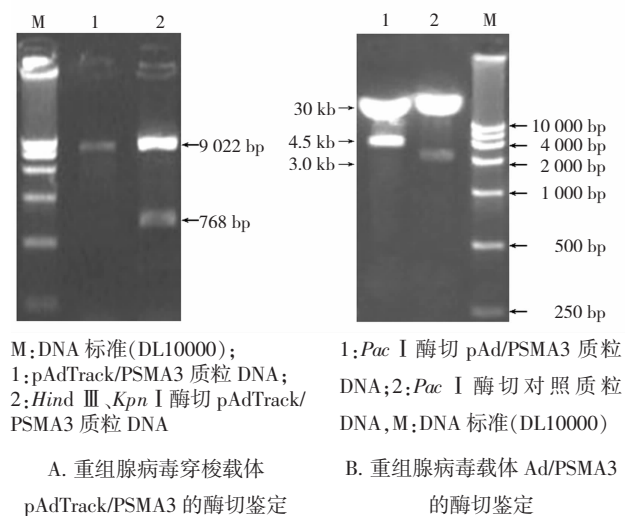


图 2 重组腺病毒穿梭载体 pAdTrack/PSMA3 与重组腺病毒载体 pAd/PSMA3 的酶切鉴定

2.3 pAd/PSMA3 病毒的包装和滴度测定

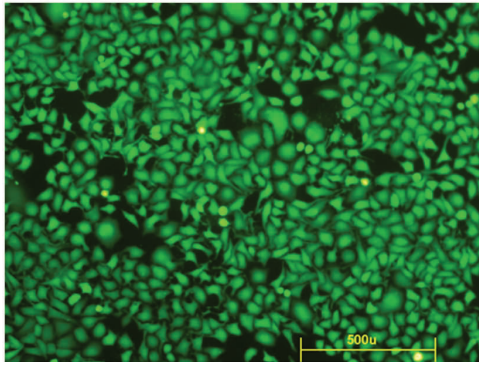
pAd/PSMA3 重组病毒经 293 细胞株包装 7 d 后,荧光倒置显微镜下见其胞核增大,胞体肿胀、变圆与细胞离壁等变化。为了增强其病毒滴度,先将该病毒细胞进行 5 轮传代、扩增,随后大量扩增,检测(倍比稀释法)到其滴度约为 7×10^7 TU/mL。

2.4 重组病毒 pAd/PSMA3 的感染率鉴定

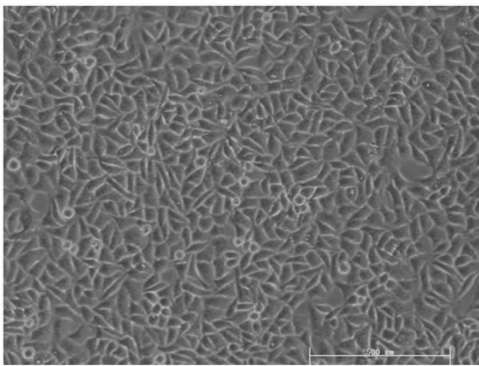
荧光倒置显微镜观测表明,SMMC7721 细胞经重组病毒 pAd/PSMA3 感染 48~72 h,其感染率为 98%以上(图 3)。

2.5 重组病毒 pAd/PSMA3 对 SMMC7721 细胞增殖的影响

CCK-8 法检测经 pAd/PSMA3 重组病毒感染 72 h 的 SMMC7721 细胞增殖情况,结果显示,继续培养 2、3 及 4 d 后,被感染细胞在 450 nm 处的 OD 值低于空白对照和空病毒感染对照细胞的 OD 值(均 $P<0.05$)(图 4、表 1),而空白对照和空病毒感染对照细胞 A 值间无统计学差异($P>0.05$),提示 SMMC7721 细胞过表达 PSMA3 基因可抑制其增殖。

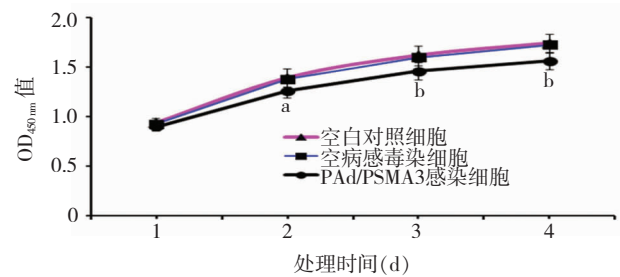


A. 感染 pAd/PSMA3 病毒的 SMMC7721 细胞明显表达 GFP



B. 未感染 SMMC7721 细胞不表达 GFP

图 3 重组病毒 pAd/PSMA3 的感染率鉴定 (标尺 =500 μm)



注:与空白对照及经空病毒感染的 SMMC7721 细胞比较,a 表示 $P<0.05$,b 表示 $P<0.01$

图 4 CCK-8 法检测经 pAd/PSMA3 感染的 SMMC7721 细胞的增殖变化

2.6 重组病毒 pAd/PSMA3 对 SMMC7721 细胞的 PSMA3、caspase-3 与 PCNA 基因及其编码蛋白表达的影响

Real-time PCR 结果(表 2、图 5A)表明,经 pAd/PSMA3 病毒感染 72 h 的 SMMC7721 细胞,其 PSMA3、caspase-3 mRNA 的表达水平较强烈于未感染或空病毒感染的细胞($P<0.05$),其 PCNA mRNA 的表达水平较弱于未感染或空病毒感染的细胞($P<0.05$);而未感染和空病毒感染细胞的 PSMA3、caspase-3 及 PCNA mRNA 的表达水平差异不具统计学意义。携带 pAd/PSMA3 病毒 72 h 的 SMMC7721 细胞,Western blot 结果(表 2、图 5B)显示,与未感染或空病毒感染的细胞相比,其 PSMA3、caspase-3 蛋白的表达水平明显增强($P<0.05$),而 PCNA 蛋白的表达水平明显减弱($P<0.05$)。上述结果提示,过表达 PSMA3 基因的 SMMC7721 细胞,其增殖受抑,其凋亡得以促进。

表 1 各组细胞的 OD_{490nm} 值检测

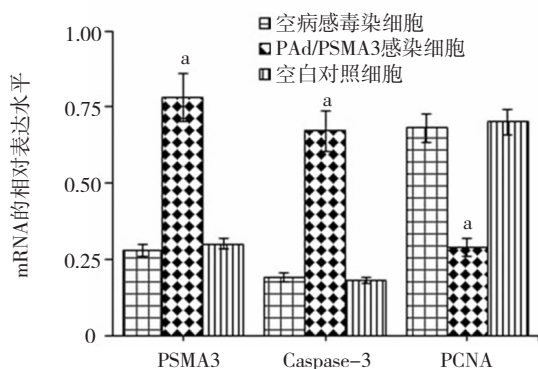
组别	1 d	2 d	3 d	4 d
空白对照细胞组	0.940 ± 0.041	1.393 ± 0.084	1.620 ± 0.087	1.743 ± 0.089
空病毒感染细胞组	0.927 ± 0.043	1.377 ± 0.083	1.597 ± 0.085	1.723 ± 0.088
pAd/PSMA3感染细胞组	0.899 ± 0.039	1.262 ± 0.078 ^a	1.456 ± 0.084 ^b	1.560 ± 0.086 ^b
F 值	2.976	53.333	26.667	1.176
P 值	0.100	0.019	0.008	0.005

注:与空白对照 SMMC7721 细胞组及空病毒感染的 SMMC7721 组比较,a, $P<0.05$,b, $P<0.01$

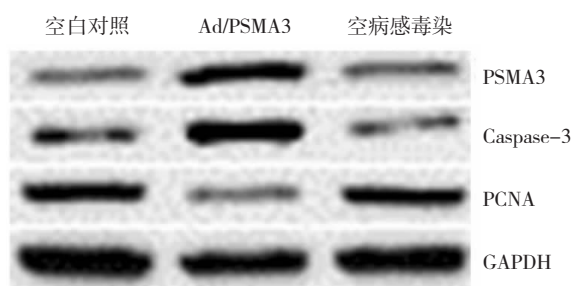
表 2 各组 PSMA3、caspase-3 与 PCNA 基因及其编码蛋白的相对表达水平

基因	组别 (72 h)	GL 级 (mRNA 水平)	P_a 值	P_b 值	OD 值 (蛋白水平)	P_a 值	P_b 值
PSMA3	空白对照细胞组	0.287 ± 0.061	0.705	0.705	0.363 ± 0.051	0.215	0.215
	pAd/PSMA3感染细胞组	0.781 ± 0.092	0.000	0.000	1.218 ± 0.183	0.000	0.000
	空病毒感染细胞组	0.301 ± 0.063	0.705	0.705	0.405 ± 0.058	0.215	0.215
caspase-3	空白对照细胞组	0.191 ± 0.049	0.885	0.885	0.658 ± 0.079	0.156	0.156
	pAd/PSMA3感染细胞组	0.670 ± 0.073	0.000	0.000	1.496 ± 0.217	0.000	0.000
	空病毒感染细胞组	0.187 ± 0.041	0.885	0.885	0.591 ± 0.072	0.156	0.156
PCNA	空白对照细胞组	0.694 ± 0.079	0.884	0.884	1.207 ± 0.179	0.682	0.682
	pAd/PSMA3感染细胞组	0.290 ± 0.062	0.000	0.000	0.354 ± 0.048	0.000	0.000
	空病毒感染细胞组	0.701 ± 0.083	0.884	0.884	1.166 ± 0.157	0.682	0.682
F 值		119.619	440.842				
P 值		0.000	0.000				

注: P_a 值,与空白对照细胞组比较; P_b 值,与空病毒感染的细胞组比较

a: $P < 0.01$

A. Real-time PCR 检测各组细胞 PSMA3、Caspase-3 与 PCNA 的表达水平,与空白对照及空病毒感染组细胞比较



B. Western blot 检测各组细胞 PSMA3、Caspase-3 与 PCNA 蛋白的表达水平

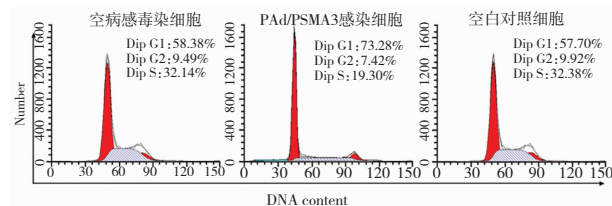
图 5 各组 SMMC7721 细胞 PSMA3、Caspase-3 与 PCNA 的 mRNA 及其蛋白的表达

2.7 重组病毒 pAd/PSMA3 对 SMMC7721 细胞的周期和凋亡的影响

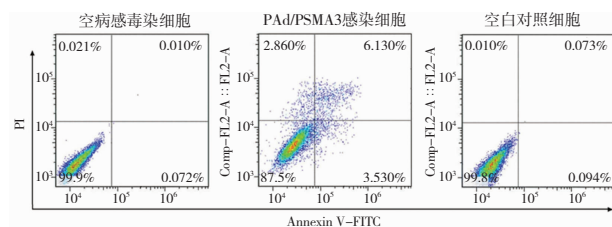
FCM 检测显示,与未感染组细胞(未见凋亡)比较(表 3、图 6A),空病毒感染组细胞(未见凋亡)的周期中各期细胞量未见明显改变,但 pAd/PSMA3 病毒感染组 G_1 期细胞显著增多(由 57.7%增至 73.28%),S 期细胞显著减少(由 32.38%减至 19.30%),差异有统计学意义($P < 0.01$);与未感染组细胞比较(表 3、图 6B),空病毒感染组细胞的凋亡率未见明显改变,但 pAd/PSMA3 病毒感染组细胞的凋亡率(早期与晚期)明显增加(由 0.17%增至 9.66%),差异亦有统计学意义($P < 0.01$)。该周期与凋亡的结果提示,过表达 PSMA3 基因的 SMMC7721 细胞,其 G_1 期被阻滞,其凋亡发生明显。

表 3 过表达 PSMA3 对 SMMC7721 细胞周期与凋亡的影响 (%)

组别	G_1	G_2	S	凋亡率
空白对照组	57.97 ± 1.91	9.71 ± 0.36	32.61 ± 1.07	0.178 ± 0.037
空病毒感染组	58.18 ± 1.96	9.59 ± 0.32	32.64 ± 0.96	0.117 ± 0.025
PAAd/PSMA3 感染组	73.39 ± 2.25 ^a	7.98 ± 0.27 ^a	19.12 ± 0.71 ^a	9.792 ± 1.163 ^a
F 值	14.343	12.743	73.142	933.463
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与空白对照组及空病毒感染组比较, $P = 0.000$ 

A. 流式细胞仪检测细胞周期变化情况



B. 流式细胞仪检测细胞凋亡变化情况

图 6 各组 SMMC7721 细胞周期与凋亡变化

2.8 SMMC7721 细胞过表达 PSMA3 基因明显抑制其裸鼠荷瘤的生长

各组细胞移植于皮下后,裸鼠全部存活,7~12 d 可见明显荷瘤形成,各组动物成瘤率均为 80%。荷瘤 21 d 内,各动物平均体重有不同程度的增加,荷瘤处皮肤基本正常,各组动物先后死亡 1 只。感染组平均荷瘤体质量的增加不如对照组明显($P < 0.01$),抑制率分别是 41.283%和 40.815%(表 4、图 7),两对照组平均荷瘤体质量的增加无明显差异(两组平均荷瘤体质量比较; $F = 10.314$, $P = 0.545$)。由此提示,SMMC7721 细胞过表达 PSMA3 基因可抑制其荷瘤生长。

表 4 3 组裸鼠荷瘤大小及体质量比较

组别	质量 (g)	抑制率 (%)
空白对照组	0.829 ± 0.039	
空病毒感染组	0.816 ± 0.032	
PAAd/PSMA3 感染组	0.485 ± 0.017 ^a	41.283/40.815 ^b
F 值	160.714	
P 值	0.000	

注:a,与空白对照组和空病毒感染组比较, $P = 0.000$;b:PAAd/PSMA3 感染组与空白对照组及空病毒感染组比较,抑制率分别是 41.283%和 40.815%

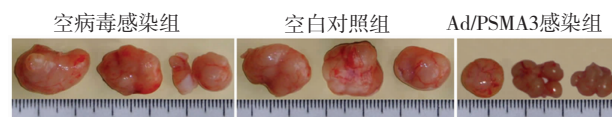


图 7 3 组裸鼠荷瘤大小比较

3 讨论

肿瘤特异性抗原(tumor specific antigens, TSAs)是通过针对瘤细胞反应的细胞毒 T 细胞所鉴定到的人、鼠肿瘤抗原来证实其存在。由于研究手段不断更新,新的 TSAs 不断被发现,有的已在临床实验

中呈现了良好的治瘤疗效。因此,肿瘤主要是恶性肿瘤组织细胞中的特性各异、种类诸多的 TSAs 吸引研究者们不断地探寻与挖掘^[11-13],以期可获得功能性、特异性更好的新 TSAs 用于肿瘤治疗,以达根治肿瘤,尤其恶性肿瘤的目的。作为恶性肿瘤 TSAs 之一的 PSMA3,可通过增加抑癌基因 Bim 的表达以诱导肿瘤 HEK293 亚细胞的凋亡,但其与 HCC 的关系常不太清楚。

就真核细胞的蛋白质降解而言,蛋白酶体在其中发挥着重要的作用^[6]。体内承担蛋白降解的分子机器是 26S 蛋白酶体,由 20S 核心颗粒与 19S 调节颗粒组成。19S 颗粒能识别带泛素链标签的蛋白底物,对其进行去折叠后,将其送至 20S 颗粒中降解。PSMA3 是 20S 颗粒的重要组成部分,能在一定程度上通过增强抑癌基因 Bim 的表达以诱导肿瘤 HEK293 亚细胞的凋亡,还和在肿瘤中高表达的 AGR2、PAI-1 等基因紧密关联^[7-8]。但 PSMA3 与 HCC 的关系尚未见报道。本课题组前期采用蛋白质组学技术检测到 PSMA3 在 HCC 组织中显著低表达,采用 Western blot 和免疫组织化学法检测表明,PSMA3 可能为 HCC 的新相关 TAs 之一^[9]。

为进一步探明 PSMA3 与 HCC 的相关性,本课题组首先克隆到人 PSMA3 基因,并构建其过表达病毒载体 pAd/PSMA3,然后用该载体感染 SMMC7721 细胞。荧光倒置显微镜观测表明,被感染的细胞明显高表达 GFP。CCK-8 法检测证实,与对照比较,过表达 PSMA3 基因的细胞,其增殖能力下降明显。细胞的生长、增殖同其 PCNA 基因紧密关联。PCNA 以不溶性与可溶性两方式存在于胞核内,不溶性者较为稳定,在细胞周期的 G₁ 期末表达明显增强,此增强同 DNA 的合成呈正相关。细胞生长、增殖情况与其 PCNA 的合成多寡相一致。本实验的 Real-time PCR 和 Western blot 检测结果显示,SMMC7721 细胞过表达 PSMA3 基因后,其 PCNA 基因及其蛋白质的表达明显减少。由于 PCNA 的变化同 DNA 的合成正相关,过表达 PSMA3 基因的 SMMC7721 细胞的 DNA 合成也相应减弱,显然,DNA 合成减弱的细胞,其生长、增殖能力随之下降。细胞周期与凋亡检测证实,过表达 PSMA3 基因的 SMMC7721 细胞被阻滞于 G₁ 细胞周期,其 caspase-3 促凋亡基因及其编码蛋白质上调明显,凋亡率亦明显增加,与对照比较,其差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。动物实验表明,过表达 PSMA3 基因的 SMMC7721 细胞,其

裸鼠荷瘤生长明显受抑。

综上所述,PSMA3 与 HCC 紧密关联,它在 HCC 的发生发展中发挥重要作用,PSMA3 可能是早期诊断、治疗与监测 HCC 的有效靶分子之一。

参 考 文 献

- [1] Lin KT, Shann YJ, Chau GY, et al. Identification of latent biomarkers in hepatocellular carcinoma by ultra-deep whole-transcriptome sequencing[J]. *Oncogene*, 2016, 35(38): 5078.
- [2] Wen Y, Han J, Chen J, et al. Plasma miRNAs as early biomarkers for detecting hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(7): 1679-1690.
- [3] Amr KS, Ezzat WM, Elhosary YA, et al. The potential role of miRNAs 21 and 199-a in early diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Gene*, 2016, 575(1): 66-70.
- [4] Khan FZ, Perumpail RB, Wong RJ, et al. Advances in hepatocellular carcinoma: nonalcoholic steatohepatitis-related hepatocellular carcinoma[J]. *World J Hepatol*, 2015, 7(18): 2155-2161.
- [5] Chua MLK, Wee JTS, Hui EP, et al. Nasopharyngeal carcinoma[J]. *Lancet*, 2016, 387(10022): 1012-1024.
- [6] Livinskaya VA, Barlev NA, Nikiforov AA. Immunoaffinity purification of the functional 20S proteasome from human cells via transient overexpression of specific proteasome subunits[J]. *Protein Expr Purif*, 2014, 97: 37-43.
- [7] Boncela J, Przygodzka P, Papiewska-Pajak I, et al. lasminogen activator inhibitor type 1 interacts with alpha3 subunit of proteasome and modulates its activity[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(8): 6820-6831.
- [8] Dumartin L, Whiteman HJ, Weeks ME, et al. AGR2 is a novel surface antigen that promotes the dissemination of pancreatic cancer cells through regulation of cathepsins B and D[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(22): 7091-7102.
- [9] 王江红, 李启英, 项颖, 等. 人原发性肝癌相关抗原的蛋白质组学初步研究[J]. *第三军医大学学报*, 2017, 39(1): 72-78.
- [10] Xiang Y, Li Q, Huang D, et al. Preparation and antitumor effect of a toxin-linked conjugate targeting vascular endothelial growth factor receptor and urokinase plasminogen activator[J]. *Exp Biol Med*, 2015, 240(2): 160-168.
- [11] Dai L, Lei N, Liu M, et al. Autoantibodies to tumor-associated antigens as biomarkers in human hepatocellular carcinoma (HCC)[J]. *Exp Hematol Oncol*, 2013, 2(1): 15.
- [12] Bermejo IA, Usabiaga I, Compañón I, et al. Water sculpts the distinctive shapes and dynamics of the tumor-associated carbohydrate antigens: implications for their molecular recognition[J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(31): 9952-9960.
- [13] Michels J, Becker N, Suci S, et al. Multiplex bead-based measurement of humoral immune responses against tumor-associated antigens in stage II melanoma patients of the EORTC18961 trial[J]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(6): e1428157.

(责任编辑:唐秋姗)