

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.06.008

· 基础研究 ·

过表达 PRRX1 通过 p53 介导的线粒体凋亡途径诱导肝癌 SMMC7721 细胞凋亡

尹东亮^a, 卢沛林^a, 尹润龙^a, 黄会杰^b, 林志强^a(东莞市人民医院 a. 肝胆外科; b. 病理科, 广东 东莞 523059)

[摘要] **目的:** 探讨配对相关同源框 1 蛋白 (PRRX1) 过表达对肝癌 SMMC7721 细胞凋亡的影响及其分子机制。**方法:** 分别用慢病毒介导 PRRX1 过表达载体 (pGMLV-PRRX1)、空载质粒 (Vector) 感染人肝癌 SMMC7721 细胞, 用 qPCR 和 WB 实验检测慢病毒感染后细胞中 PRRX1 mRNA 和蛋白的表达变化, 用 CCK-8 法、Annexin-V FITC/PI 染色流式细胞术分别检测 PRRX1 过表达对 SMMC7721 细胞增殖、凋亡的影响, 用线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-10 染色法) 检测细胞线粒体膜电位变化, 用 caspase 活性检测试剂盒 (分光光度法) 测定细胞中 caspase-8 和 caspase-9 酶活性, 用 WB 实验检测细胞中 p53、Bcl-2、Bax、Fas、Cleaved-caspase-3 以及线粒体和细胞质中细胞色素 C (Cyt C) 蛋白的表达。**结果:** 成功构建 PRRX1 过表达的 SMMC7721 细胞株, 感染细胞中 PRRX1 mRNA 和蛋白的表达水平显著升高 (均 $P < 0.01$)。与对照组和空载组比较, PRRX1 过表达组 SMMC7721 细胞的增殖能力显著下降、细胞凋亡率显著增高、Cleaved-caspase-3 剪切水平显著升高、线粒体膜电位显著下降、线粒体中 Cyt C 蛋白表达下调、胞质中 Cyt C 蛋白表达上调以及 caspase-9 酶活性升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 同时 p53 和 Bax 蛋白表达增加而 Bcl-2 蛋白表达降低 (均 $P < 0.05$), 但 Fas 蛋白表达及 caspase-8 酶活性无显著变化 (均 $P > 0.05$)。**结论:** PRRX1 过表达可诱导肝癌 SMMC7721 细胞凋亡, 其机制可能与 p53 介导的线粒体凋亡途径被激活有关。

[关键词] 配对相关同源框 1 蛋白; 肝癌; SMMC7721 细胞; p53; 线粒体; 凋亡

[中图分类号] R392.12; R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)06-0662-07

Over-expression of PRRX1 induces apoptosis of hepatocellular carcinoma SMMC7721 cells through a p53-mediated mitochondrial apoptosis pathway

YIN Dongliang^a, LU Peilin^a, YIN Runlong^a, HUANG Huijie^b, LIN Zhiqiang^a (a. Department of Hepatobiliary Surgery; b. Department of Pathology, Dongguan People's Hospital, Dongguan 523059, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of over-expression of paired related homoeobox 1 (PRRX1) on apoptosis of hepatocellular carcinoma SMMC7721 cells, and to explore its detailed mechanism. **Methods:** Lentivirus-mediated PRRX1 over-expression vector (pGMLV-PRRX1) and empty vector (Vector) were respectively infected into SMMC7721 cells, and the mRNA and protein expression levels of PRRX1 in infected cells were detected by qPCR and WB. The effect of PRRX1 over-expression on the cell proliferation and apoptosis of SMMC7721 cells were assessed by CCK-8 assay and Annexin-V FITC/PI double staining flow cytometry assay, respectively. The change of mitochondrial membrane potential of SMMC7721 cells was detected by mitochondrial membrane potential assay kit (JC-10 staining assay). The enzymatic activities of caspase-8 and caspase-9 in infected cells were detected by using caspase activity assay kit (spectrophotometric method). The protein expression levels of p53, Bcl-2, Bax, Fas, Cleaved-caspase-3 and Cyt C expressed in mitochondria and cytosol were evaluated by WB. **Results:** PRRX1 over-expressed SMMC7721 cell line was successfully constructed, and the protein and mRNA expression levels of PRRX1 were significantly increased in lentivirus infected cells (all $P < 0.01$). Compared with control group and vector group, over-expression of PRRX1 significantly inhibited cell proliferation, weakened mitochondrial membrane potential, but increased the rate of apoptosis, elevated the shear level of caspase-3, promoted the release of Cyt C protein from mitochondrial into cytosol and increased the enzymatic activity of caspase-9 (all $P < 0.05$ or $P < 0.01$). In addition, over-expression of PRRX1 also promoted the protein expressions of p53 and Bax but inhibited the protein expression of Bcl-2 (all $P < 0.05$ or $P < 0.01$); however, it had no significant effect on the expression of Fas protein and the enzymatic activity of caspase-8 (all $P > 0.05$). **Conclusion:** Over-expression of PRRX1 induces apoptosis in hepatocellular carcinoma SMMC7721 cells, which may be related

[基金项目] 东莞市社会科技发展(一般)项目资助(No. 2018507150011277)。Project supported by the Social Science and Technology Development (General) Foundation of Dongguan City(No. 2018507150011277)

[作者简介] 尹东亮(1977-),男,硕士,主治医师,主要从事肝胆胰脾肿瘤方面的研究,E-mail:yindl_dgs1202@163.com

[通信作者] 林志强(LIN Zhiqiang, corresponding author), 学士,主任医师,主要从事肝胆胰脾肿瘤疾病的研究,E-mail:3177286710@qq.com

to the activation of p53-mediated mitochondrial apoptotic pathway.

[Key words] paired related homoeobox 1 (PRRX1); hepatocellular carcinoma; SMMC7721 cell; p53; mitochondrion; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(6): 662-668. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.06.008]

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界范围内发病率较高、治疗难度较大的一种恶性肿瘤,其占原发性肝癌的 90% 以上,具有高度转移、易复发等特点^[1]。据 2000-2014 年全球癌症生存趋势监测计划 (CONCORD 计划) 的调查数据^[2]显示,中国肝癌发病率高居第 3 位,患者 5 年生存率仅为 14.1%。因此,寻找治疗肝癌的新靶点,对于提高肝癌治疗效果具有重要的临床意义。配对相关同源框 1 (paired related homoeobox 1, PRRX1) 是一种相对分子质量为 27 300 的 DNA 相关蛋白,其主要功能是通过增加血清反应因子的 DNA 结合活性,起转录共激活的作用。随着对 PRRX1 基因研究的不断深入,PRRX1 被证实是一种新的 EMT 诱导因子^[3],参与肿瘤侵袭转移的调控^[4-5],并与多种肿瘤的预后相关 (包括肝癌)^[6]。PRRX1 还参与肿瘤细胞凋亡的调控,如 PRRX1 表达下调可增强肺癌 A549 细胞的抗凋亡能力以及对化疗药物顺铂的耐受性^[7]。过表达 PRRX1 可以逆转 miR-124 对结肠直肠癌细胞辐射敏感性增强的作用^[8]。然而,有关 PRRX1 对肝癌细胞凋亡的研究鲜有报道。本研究用慢病毒介导 PRRX1 过表达载体感染肝癌 SMMC7721 细胞,探讨 PRRX1 过表达对 SMMC7721 细胞凋亡的影响及其分子机制,以期对肝癌的治疗提供新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

人肝癌细胞株 SMMC7721 由中国科学院细胞库提供。PRRX1 过表达质粒 (pGMLV-PA1-PRRX1) 构建及慢病毒 (2.5×10^8 TU/ml) 包装、浓缩及纯化均由吉满生物科技 (上海) 有限公司完成,PRRX1 和 GAPDH 引物序列由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成,RPMI 1640 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司,PrimeScript™ RT Reagent Kit 及 SYBR® Green PCR Kit 购自 TaKaRa 公司,山羊抗人 PRRX1 多克隆抗体购自 Novus Biologicals 公司,小鼠抗人 p53 单克隆抗体、兔抗人 Cleaved-caspase-3 多克隆抗体、兔抗人 Bax 多克隆抗体、小鼠抗人 Bcl-2 多克隆抗体、兔抗人 Fas 单克隆抗体、兔抗人细胞色素 C (Cyt C) 单克隆抗体、小鼠抗人 COXIV 单克隆抗体和兔抗人 GAPDH 单克隆抗体均购于 CST 公司,CCK-8 试剂盒、caspase-8 和 caspase-9 活性检测试剂盒、JC-10 线粒体膜电位检测试剂盒、Annexin-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司,线粒体/细胞质分

离试剂盒购自 BioVision 公司,HRP 标记的山羊抗兔或抗小鼠 IgG 二抗购自博士德生物工程有限公司。

1.2 细胞培养及感染

复苏人肝癌 SMMC7721 细胞接种 10 cm 培养皿中,加入 RPMI 1640 培养基 (含有 10% 胎牛血清、100 IU/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素),置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养,每 2~3 d 传代 1 次。根据实验需要设置对照组 (Control)、空载组 (Vector) 和 PRRX1 过表达组 (pGMLV-PRRX1)。取对数生长期的细胞,按照每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板中,根据病毒感染比率值 50:1 取过表达或空载慢病毒感染 SMMC7721 细胞。感染 8~12 h 后更换新鲜培养液继续培养,约 3 d 传代 1 次,5 d 后在荧光显微镜下观察各组细胞的绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的表达情况。

1.3 CCK-8 法检测 SMMC7721 细胞的增殖

取感染后 5 d 的各组细胞,以 2×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,每组设置 3 个复孔,分别培养 24、48 和 72 h 后,向每孔中加入 10 μl CCK-8 溶液,37 °C 避光继续培养 1 h,使用 Multiskan FC 酶标仪检测波长在 450 nm 处的光密度 (D) 值,细胞增殖以 D 值表示。

1.4 qPCR 检测 SMMC7721 细胞 PRRX1 mRNA 的表达

取感染后 5 d 的各组细胞,0.2% 胰酶消化后继续培养 48 h,收集各组细胞,用 TRIzol 法提取各组细胞总 RNA,利用 TaKaRa 逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA,以 cDNA 为模板、GAPDH 为内参,用 SYBR® Green PCR Kit 进行 qPCR。反应条件:95 °C 预变性 1 min,94 °C 变性 15 s,58 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 45 s,共 40 个循环,72 °C 延伸 7 min。引物序列:PRRX1 F 为 5'-GCACAGGCGGATGAGAAC-3',R 为 5'-TCTTCTGAGTTCAGCTGGTCAT-3';GAPDH F 为 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3',R 为 5'-GCCCAATACGACCAATCC-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。每个样品设置 3 个重复。

1.5 WB 实验检测 SMMC7721 细胞中 PRRX1 及相关蛋白的表达

取感染 5 d 后的各组细胞,0.2% 胰酶消化后继续培养 48 h,收集细胞并加入适量 RIPA 细胞裂解液,冰上充分裂解 30 min,然后 4 °C、15 000×g 离心 25 min,收集上清,采用 Bradford 法进行蛋白定量。取 25 μg 蛋白进行 SDS-PAGE、转膜、5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,洗涤后分别加入山羊抗人 PRRX1 多克隆抗体

(1:1 000)、小鼠抗人 p53 单克隆抗体(1:500)、兔抗人 Cleaved-caspase-3 多克隆抗体(1:1 000)、兔抗人 Bax 多克隆抗体(1:1 000)、小鼠抗人 Bcl-2 多克隆抗体(1:1 000)、兔抗人 Fas 单克隆抗体(1:1 000)和兔抗人 GAPDH 单克隆抗体(1:1 000), 4 °C 孵育过夜。第 2 天洗涤后, 加入 HRP 标记的山羊抗兔或抗小鼠 IgG(1:5 000)二抗, 室温孵育 1 h, 加入适量 ECL 超敏发光液, 应用天能 Tanon 3500 全自动数码凝胶成像分析系统显影。

1.6 Annexin-V FITC/PI 染色流式细胞术检测 SMMC7721 细胞的凋亡

感染后 5 d 的各组细胞经传代培养后, 取对数期细胞接种于 6 孔(1×10^5 个/孔)板中, 培养 48 h, 收集细胞, 调整细胞浓度为 2×10^5 个/ml, 经离心、洗涤后加入 500 μ l PBS 缓冲液重悬细胞, 分别加入 5 μ l Annexin-FITC 和 5 μ l PI 充分混匀, 避光孵育 15 min, 上流式细胞仪进行检测, 细胞凋亡率以双标的细胞(FITC⁺PI⁺)所占总细胞的百分比表示。

1.7 分光光度法检测 SMMC7721 细胞 caspase-9 和 caspase-8 酶活性

取感染后 5 d 的各组细胞, 0.2% 胰酶消化后继续培养 48 h。收集细胞液及细胞于 15 ml 离心管中, 40 \times g 4 °C 离心 5 min 后收集细胞沉淀, 加入适量 RIPA 裂解液, 冰上充分裂解 30 min, 然后 4 °C、15 000 \times g 离心 25 min, 收集上清。按照试剂盒说明书进行活性检测, 具体操作如下: 分别加入探针 2 mmol/L Ac-IETD-pNA(用于检测 caspase-8 酶活性)或 Ac-LETD-pNA(用于检测 caspase-9 酶活性)后混匀, 37 °C 孵育 2 h, 使用 Multiskan FC 酶标仪在波长 450 nm 处读取 *D* 值, 根据 pNA 标准曲线可计算 caspase-9 或 caspase-8 酶活性。

1.8 流式细胞术检测 SMMC7721 细胞线粒体膜电位

感染后 5 d 的各组细胞经传代培养后, 取对数期细胞接种于 6 孔(1×10^5 个/孔)板中, 培养 48 h, 收集细胞, 调整细胞密度为 1×10^5 个/ml, 经离心、洗涤后加入 2 μ mol/L JC-10, 37 °C 避光孵育 1 h, 流式细胞仪上机检测线粒体膜电位。

1.9 WB 实验检测 SMMC7721 细胞 Cyt C 蛋白的表达

取感染后 5 d 的各组细胞, 0.2% 胰酶消化后继续培养 48 h。收集细胞沉淀, 按照线粒体/细胞质分离试剂盒说明书的方法, 分别提取细胞质和线粒体蛋白, 用 Bradford 法进行蛋白定量后, 再采用 WB 实验检测细胞质及线粒体中 Cyt C 蛋白表达量, WB 实验步骤同 1.5。抗体信息: 兔抗人 Cyt C 单克隆抗体(1:1 000); 线粒体蛋白内参小鼠抗人 COX IV 单克隆抗体(1:1 000)。

1.10 统计学处理

1.3~1.9 各项实验检测均重复 3 次。用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计学分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 PRRX1 过表达 SMMC7721 细胞株

慢病毒感染 SMMC7721 细胞 5 d 后, 于荧光显微镜下观察, 可见空载组和 PRRX1 过表达组细胞均有绿色荧光颗粒, 而对照组细胞无绿色荧光颗粒(图 1A)。qPCR 检测结果(图 1B)显示, 与对照组和空载组比较, PRRX1 过表达组 SMMC7721 细胞 PRRX1 mRNA 的表达水平显著增加($t=3.865, 4.147$, 均 $P < 0.01$)。WB 实验结果(图 1C)显示, 与对照组和空载组比较, 过表达组 PRRX1 蛋白表达显著上调($t=8.341, 7.599$, 均 $P < 0.01$)。结果表明, 慢病毒介导的 PRRX1 过表达 SMMC7721 细胞构建成功。

2.2 PRRX1 过表达显著抑制 SMMC7721 细胞的增殖能力

CCK-8 法检测结果(图 2)显示, 各组细胞在感染后 48 和 72 h 时, PRRX1 过表达组 SMMC7721 细胞的增殖能力显著低于对照组和空载组(48 h: $t=2.14, 1.97$, 72 h: $t=1.86, 2.03$; 均 $P < 0.05$)。结果提示, PRRX1 过表达显著抑制 SMMC7721 细胞的增殖能力。

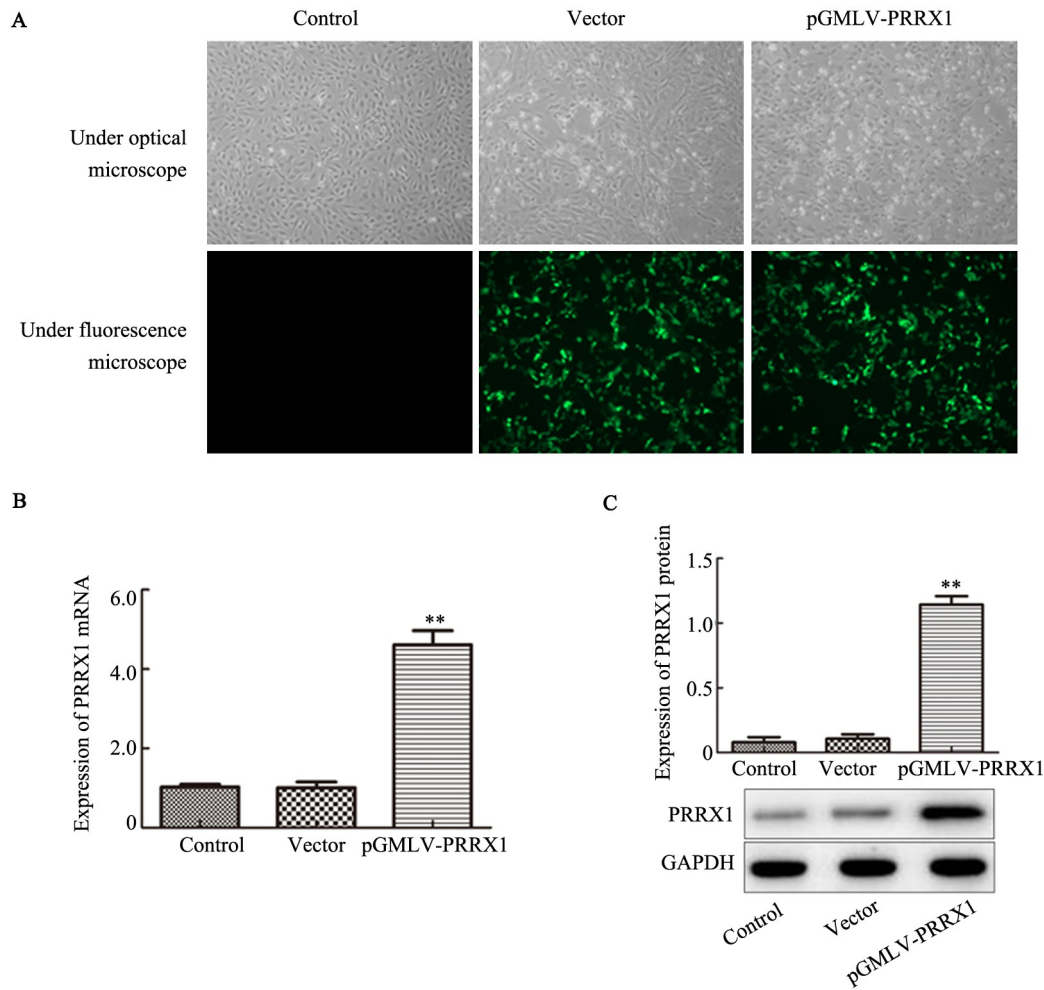
2.3 PRRX1 过表达促进 SMMC7721 细胞凋亡

Annexin-V FITC/PI 双染流式细胞术检测结果(图 3)显示, 与对照组和空载组比较, PRRX1 过表达组细胞凋亡率显著增加($t=4.368, 4.472$, 均 $P < 0.01$)。WB 实验结果(图 4)显示, 与对照组和空载组比较, 过表达组 Cleaved-caspase-3 水平显著升高($t=6.017, 7.103$, 均 $P < 0.01$)。结果表明, PRRX1 过表达促进 SMMC7721 细胞的凋亡。

2.4 PRRX1 过表达降低 SMMC7721 细胞线粒体膜电位并促进 Cyt C 释放

线粒体膜电位检测结果(图 5)显示, 与对照组和空载组比较, PRRX1 过表达组细胞线粒体膜电位下降显著($t=1.67, 1.84$, $P < 0.05$), 表明 PRRX1 过表达可诱导 SMMC7721 细胞线粒体膜电位遭受破坏。WB 实验结果(图 6)显示, PRRX1 过表达组细胞线粒体中 Cyt C 蛋白水平显著低于对照组和空载组($t=2.97, 2.86$, $P < 0.01$), 而细胞质中 Cyt C 蛋白水平又显著高于对照组和空载组($t=3.57, 3.09$, 均 $P < 0.01$), 说明 PRRX1 过表达可促进 SMMC7721 细胞线粒体 Cyt C 释放到细胞质中。上述结果提示, PRRX1 过表达诱

导的SMMC7721细胞凋亡可能与线粒体凋亡途径有 关。

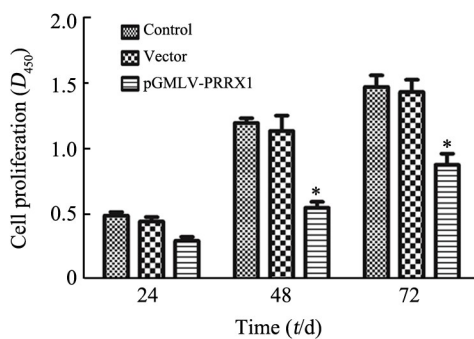


** $P < 0.01$ vs Control or Vector group

A: Green fluorescence particles under microscope ($\times 100$); B: The mRNA expression of PRRX1 in infected SMMC7721 cells was detected by qPCR; C: The protein level of PRRX1 in infected SMMC7721 cells was evaluated by WB assay

图1 感染慢病毒质粒对SMMC7721细胞中PRRX1表达的影响

Fig.1 Effect of lentiviral plasmid infection on PRRX1 expression in SMMC7721 cells



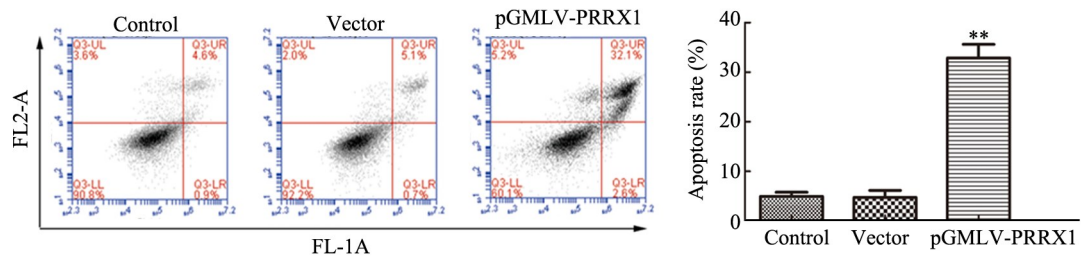
* $P < 0.05$ vs Control or Vector group

图2 CCK-8检测感染后SMMC7721细胞增殖活力

Fig.2 The proliferation viability of SMMC7721 cells after infection was detected by CCK-8

2.5 p53介导的线粒体凋亡途径参与PRRX1过表达诱导的SMMC7721细胞凋亡

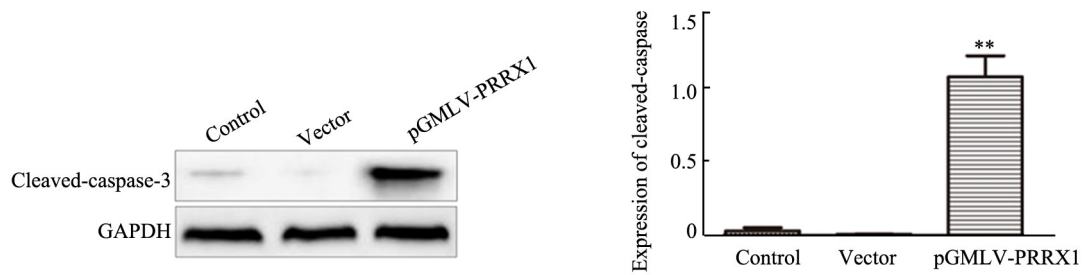
WB实验结果(图7A)显示,与对照组和空载组比较,过表达组p53和Bax蛋白表达水平显著上调 [p53: (2.137 ± 0.143) vs (0.004 ± 0.003) 、 (0.004 ± 0.002) , $t=8.769$ 、 8.658 ; Bax: (1.153 ± 0.076) vs (0.086 ± 0.028) 、 (0.117 ± 0.025) , $t=5.364$ 、 4.827 ; 均 $P < 0.01$], Bcl-2蛋白表达水平显著下调 [(0.140 ± 0.033) vs (1.000 ± 0.037) 、 (1.107 ± 0.049) , $t=5.681$ 、 5.923 ; 均 $P < 0.01$], Fas蛋白表达水平无显著变化 ($t=0.258$, $P > 0.05$)。分光光度法检测结果(图7B)显示,与对照组和空载组比较,过表达组caspase-9酶活性水平显著升高 ($t=9.614$, $P < 0.01$) , 而caspase-8酶活性水平无显著性影响 ($t=0.171$, $P > 0.05$)。结果表明,PRRX1过表达诱导的SMMC7721细胞凋亡由p53介导的线粒体凋亡途径所调控。



** $P < 0.01$ vs Control or Vector group

图3 流式细胞术检测感染后SMMC7721细胞的凋亡

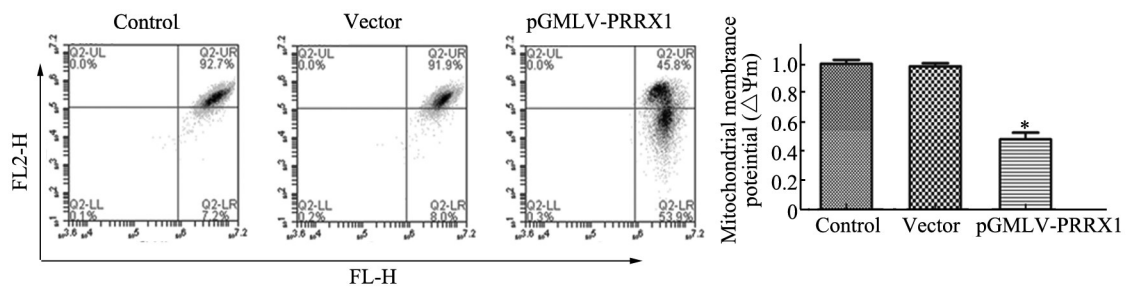
Fig.3 Apoptosis of infected SMMC7721 cells was detected by flow cytometry



** $P < 0.01$ vs Control or Vector group

图4 WB检测感染后SMMC7721细胞中Cleaved-caspase-3表达水平

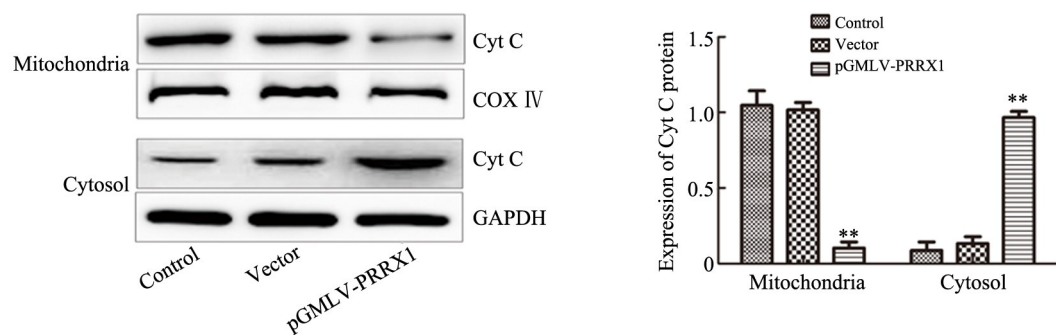
Fig.4 The protein level of Cleaved-caspase-3 in SMMC7721 cells after infection was detected by WB assay



* $P < 0.05$ vs Control or Vector group

图5 PRRX1过表达对SMMC7721细胞线粒体膜电位的影响

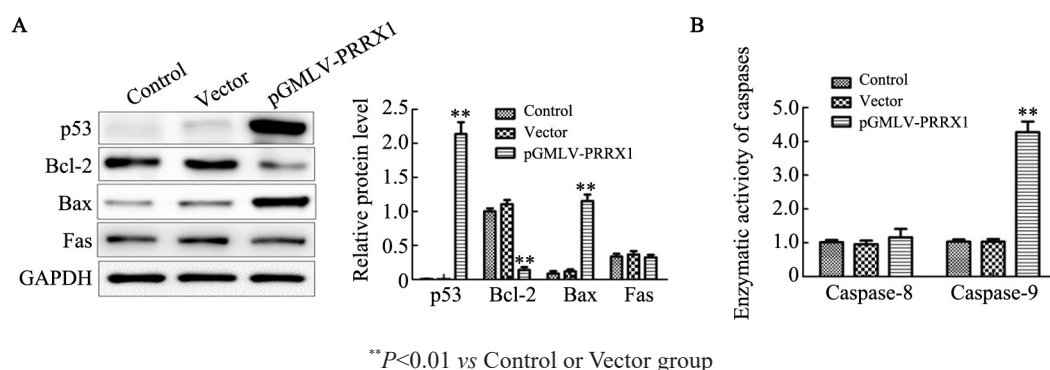
Fig.5 Effect of PRRX1 over-expression on the mitochondrial membrane potential (MMP) of SMMC7721 cells



* $P < 0.05$ vs Control or Vector group

图6 PRRX1过表达对SMMC7721细胞线粒体中Cyt C释放的影响

Fig.6 Effect of PRRX1 over-expression on the release of Cyt C from mitochondria into cytosol in SMMC7721 cells



A: The protein expressions of p53, Bcl-2, Bax and Fas in infected SMMC7721 cells were evaluated by WB assay;

B: The caspase-8 and caspase-9 activation levels were detected using fluorometric assay kit

图7 PRRX1 过表达对 p53 介导的线粒体凋亡通路蛋白表达的影响

Fig.7 Effect of PRRX1 over-expression on protein expressions related with mitochondrial apoptotic pathway mediated by p53

3 讨论

PRRX1 基因位于人 1q24.2 染色体上,其编码的是一种由 245 个氨基酸组成的相对分子质量为 27 300 的小分子蛋白质。PRRX1 蛋白由 PRRX1a 和 PRRX1b 两个亚基组成,两者区别仅为前者羧基末端多了一个保守结构域^[9]。PRRX1 存在于基质组织,在胚胎时期表达于中胚层间质的颅面、颌面、四肢和心脏区域,对颅面部、心脏和肢体形态发育起到重要的作用。有研究^[10]显示,PRRX1 在大鼠胚胎发育期间通过上皮-间质相互作用参与颅基板衍生组织的形态发生。增加 PRRX1 的表达可促进脂肪组织中转化生长因子- β (TGF- β)的活化,进而在肥胖者脂肪细胞功能异常中起调控作用^[11]。在肿瘤的发生发展过程中,PRRX1 也被普遍认为是 EMT 的诱导因子,并参与肿瘤的侵袭与转移。有研究^[6,12]表明,PRRX1 在肝癌组织中低表达,低表达与肝癌患者预后差相关。HCC 细胞系 Hep3B、Huh7、Hepg2、SMMC7721 中 PRRX1 表达水平显著低于正常肝 LO2 细胞^[12]。因此,为了进一步探讨 PRRX1 在肝癌发生发展中的作用及分子机制,本研究选择 SMMC7721 细胞为研究对象,通过慢病毒介导 PRRX1 过表达载体感染 SMMC7721 细胞,最终证实 PRRX1 过表达可经 p53 介导的线粒体凋亡途径诱导 SMMC7721 细胞凋亡。

细胞凋亡是一种细胞程序性死亡的过程,对机体内环境稳定的维持具有重要的监管作用。肿瘤的生成是细胞增殖和凋亡调控失衡的结果,通过诱导肿瘤细胞凋亡来杀死肿瘤细胞已成为一种有效而常见的肿瘤治疗途径。本研究通过慢病毒介导 PRRX1 过表达载体感染肝癌 SMMC7721 细胞,并通过 WB 和 qPCR 实验证实成功构建 PRRX1 过表达的 SMMC7721 细胞株。随后进一步证实,PRRX1 过表达可提高 SMMC7721 细胞凋亡率,并促进 caspase-3

蛋白激活,说明 PRRX1 过表达可诱导 SMMC7721 细胞凋亡。HIRATA 等^[6]研究显示,PRRX1 过表达可增强肝癌 Huh7 细胞对化疗药物 5-FU 的敏感性。FAN 等^[12]认为,沉默 PRRX1 表达可增强肝癌 SMMC7721 细胞的抗凋亡作用。但两者均未对其具体作用机制进行详细阐述。

诱导细胞凋亡的分子机制可以大致分为两大类,即由线粒体起始的内源性凋亡途径和由死亡受体起始的外源性凋亡途径^[13]。线粒体是机体能量代谢中心,其功能障碍可直接诱导细胞凋亡,因此线粒体起始的凋亡途径被认为是机体的主要凋亡途径^[14]。当线粒体受损时,将导致线粒体膜电位下降,而线粒体膜电位下降是细胞凋亡的早期事件,一旦线粒体穿膜电位崩溃,细胞凋亡将不可逆转。线粒体受损后,处于线粒体外膜和内膜间隙的凋亡启动因子 Cyt C 将被释放到细胞质中,激活下游的 caspase-9,进而激活 caspase-3 诱导细胞凋亡。而 caspase-3 是 caspase 级联反应中最关键的限速酶,是多种凋亡通路共同的下游靶点,也是细胞凋亡的重要执行者^[15]。本研究结果显示,PRRX1 过表达显著导致 SMMC7721 细胞线粒体膜电位下降,说明 PRRX1 过表达可造成 SMMC7721 细胞线粒体受损。进一步对线粒体及细胞质中 Cyt C 水平进行分析显示,PRRX1 过表达组线粒体中 Cyt C 蛋白表达显著下调,而细胞质中 Cyt C 蛋白表达水平显著上调,说明 PRRX1 过表达可促进 Cyt C 从线粒体膜间隙向细胞质释放。进一步对 Cyt C 下游的 caspase-9 酶活性检测结果也显示,PRRX1 过表达可显著提高 caspase-9 酶活性,提示 PRRX1 过表达可通过线粒体途径诱导 SMMC7721 细胞凋亡。同时,本研究还对死亡受体介导的外源性凋亡途径中 2 个关键的调控分子 Fas 和 caspase-8 的检测结果显示,PRRX1 过表达对 Fas 蛋白表达及 caspase-8 酶活性无显著性影响,说明 PRRX1 过表达介导的 SMMC7721 细胞凋亡与外源性凋亡途径无显著相关性。

作为肿瘤抑癌基因, p53 主要通过转录激活的方式, 参与细胞周期、DNA 修复和细胞凋亡等调控^[16]。在 p53 依赖的凋亡调控中, p53 蛋白可特异性抑制 Bcl-2 蛋白的表达, 且对 Bax 蛋白表达有明显的促进作用^[17]。作为抗凋亡分子, Bcl-2 定位于线粒体外膜上, 可抑制 Cyt C 及钙离子的释放, 对保护线粒体膜完整性具有重要意义^[18]。Bax 是重要的促凋亡分子, 其分布于细胞质中, 在接收凋亡信号刺激后被激活, 发生分子构象的改变, 随即进入线粒体外膜后形成大孔道, 破坏线粒体膜的完整性, 并可与 Bcl-2 等抑制凋亡的蛋白对抗发挥促凋亡作用^[19-20]。本研究结果显示, PRRX1 过表达可显著上调 p53 和 Bax 蛋白的表达, 抑制 Bcl-2 蛋白的表达。同时, FAN 等^[12]研究也证实, 沉默 PRRX1 表达也可下调肝癌 SMMC7721 细胞中 p53 和 Bax 蛋白表达, 上调 Bcl-2 蛋白表达。说明 PRRX1 过表达可促进 p53 的转录激活, 进而抑制抗凋亡 Bcl-2 蛋白表达和促进促凋亡蛋白 Bax 表达, 最终诱导线粒体凋亡途径的激活。

综上, 本研究发现 PRRX1 过表达诱导肝癌 SMMC7721 细胞凋亡, 并初步阐明 PRRX1 过表达诱导 SMMC7721 细胞凋亡可能与 p53 介导的线粒体凋亡途径相关, 该研究结果为肝癌靶向治疗提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] GILL J, BAICEANU A, CLARK P J, et al. Insights into the hepatocellular carcinoma patient journey: results of the first global quality of life survey[J]. *Future Oncol*, 2018, 14(17): 1701-1710. DOI: 10.2217/fon-2017-0715.
- [2] ALLEMANI C, MATSUDA T, DI CARLO V, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries[J/OL]. *Lancet*, 2018, 391(10125): 1023-1075[2019-01-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5879496/>. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)33326-3.
- [3] OCAÑA O H, CÓRCOLES R, FABRA A, et al. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1[J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(6): 709-724. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.10.012.
- [4] TAKANO S, REICHERT M, BAKIR B, et al. Prrx1 isoform switching regulates pancreatic cancer invasion and metastatic colonization[J/OL]. *Genes Dev*, 2016, 30(2): 233-247[2019-01-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4719312/>. DOI: 10.1101/gad.263327.115.
- [5] GUO J, FU Z, WEI J, et al. PRRX1 promotes epithelial-mesenchymal transition through the Wnt/ β -catenin pathway in gastric cancer[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(1): 393-345. DOI: 10.1007/s12032-014-0393-x.
- [6] HIRATA H, SUGIMACHI K, TAKAHASHI Y, et al. Downregulation of PRRX1 confers cancer stem cell-like properties and predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2015, 22(Suppl 3): S1402-S1409. DOI: 10.1245/s10434-014-4242-0.
- [7] ZHU H, SUN G, DONG J, et al. The role of PRRX1 in the apoptosis of A549 cells induced by cisplatin[J/OL]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(2): 396-402[2019-01-25]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/990/>.
- [8] ZHANG Y, ZHENG L, HUANG J, et al. miR-124 radiosensitizes human colorectal cancer cells by targeting PRRX1[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93917[2019-01-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3976353/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0093917.
- [9] NORRIS R A, SCOTT K K, MOORE C S, et al. Human PRRX1 and PRRX2 genes: cloning, expression, genomic localization, and exclusion as disease genes for Nager syndrome[J]. *Mamm Genome*, 2000, 11(11): 1000-1005.
- [10] HIGUCHI M, KATO T, CHEN M, et al. Temporospatial gene expression of Prx1 and Prx2 is involved in morphogenesis of cranial placode-derived tissues through epithelio-mesenchymal interaction during rat embryogenesis[J]. *Cell Tissue Res*, 2013, 353(1): 27-40. DOI: 10.1007/s00441-013-1632-8.
- [11] DU B, CAWTHORN W P, SU A, et al. The transcription factor paired-related homeobox 1 (Prrx1) inhibits adipogenesis by activating transforming growth factor - β (TGF - β) signaling[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(54): 3036-3047. DOI: 10.1074/jbc.M112.440370.
- [12] FAN M, SHEN J, LIU H, et al. Downregulation of PRRX1 via the p53-dependent signaling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(2): 1083-1090. DOI: 10.3892/or.2017.5785.
- [13] GOLDAR S, KHANIANI M S, DERAKHSHAN S M, et al. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment[J]. *Asian Pacific J Cancer Prevention*, 2015, 16(6): 2129-2144. DOI: 10.7314/apjcp.2015.16.6.2129.
- [14] BURKE P J. Mitochondria, bioenergetics and apoptosis in cancer[J]. *Trends Cancer*, 2017, 3(12): 857-870. DOI: 10.1016/j.trecan.2017.10.006.
- [15] OLA M S, NAWAZ M, AHSAN H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 351(1/2): 41-58. DOI: 10.1007/s11010-010-0709-x.
- [16] LANE D, LEVINE A. p53 Research: the past thirty years and the next thirty years[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2(12): a000893. DOI: 10.1101/cshperspect.a000893.
- [17] ZHANG L, MA L, YAN T, et al. Activated mitochondrial apoptosis in hESCs after dissociation involving the PKA/p-p53/Bax signaling pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 369(2): 226-233. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.05.024.
- [18] MARTINOU J C, YOULE R J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics[J/OL]. *Dev Cell*, 2011, 21(1): 92-101[2019-01-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3156409/>. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.06.017.
- [19] GAHL R F, DWIVEDI P, TJANDRA N. Bcl-2 proteins bid and bax form a network to permeabilize the mitochondria at the onset of apoptosis[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(10): e2424[2019-01-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5133987/>. DOI: 10.1038/cddis.2016.320.
- [20] 陈嘉羽, 蒿艳蓉, 陈甲信, 等. 集落刺激因子 1 受体介导 Bax 和 Bcl-2 表达对人鼻咽癌 6-10B 细胞凋亡的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(12): 1386-1390. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.12.008.

[收稿日期] 2019-01-25

[修回日期] 2019-03-20

[本文编辑] 党瑞山