

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.03.006

## CAAP1 抑制肝癌 HepG2 细胞凋亡而促进其增殖、迁移和侵袭

王一同<sup>a</sup>, 卢鸿健<sup>a</sup>, 孔艺璇<sup>a</sup>, 苏静慧<sup>a</sup>, 刘雨谭<sup>a</sup>, 张荣花<sup>a</sup>, 侯晓丽<sup>a</sup>, 章广玲<sup>b</sup> (华北理工大学 a. 基础医学院, 河北省慢性疾病基础医学重点实验室; b. 临床医学院, 河北 唐山 063210)

**[摘要]** **目的:** 探讨 CAAP1 对肝癌 HepG2 细胞凋亡、增殖、迁移和侵袭的影响及其作用机制。**方法:** 构建 CAAP1 过表达载体 pcDNA3/CAAP1 和敲降载体 pSilencer 2.1-U6 neo/shR-CAAP1, 转染肝癌 HepG2 细胞后, qPCR 和 WB 实验分别检测 CAAP1 mRNA 和蛋白的表达水平。实验分为过表达对照组 (pcDNA3)、过表达组 (pcDNA3/CAAP1)、敲降对照组 (pSilencer 2.1-U6 neo, pSilencer) 和敲降组 (pSilencer 2.1-U6 neo/shR-CAAP1, shR-CAAP1), 流式细胞术检测各组细胞凋亡水平, WB 检测 cleaved caspase 3 蛋白表达水平, CCK-8 实验检测各组细胞的增殖情况, 克隆形成实验检测各组细胞的集落形成能力, 划痕和 Transwell 小室实验检测各组细胞迁移和侵袭能力。检索 TCGA 数据库, 分析 CAAP1 对肝癌患者 OS 的影响。**结果:** 成功构建 CAAP1 的过表达载体 pcDNA3/CAAP1 和敲降载体 shR-CAAP1, 转染后 pcDNA3/CAAP1 组和 shR-CAAP1 组细胞中 CAAP1 mRNA 及蛋白表达水平均明显增高或降低 (均  $P < 0.05$ )。与 pcDNA3 组比较, pcDNA3/CAAP1 组细胞凋亡率下降 32%、cleaved caspase 3 蛋白表达水平显著降低 (均  $P < 0.05$ ); 与 pSilencer 组比较, shR-CAAP1 组细胞凋亡率上升 73%, cleaved caspase 3 蛋白表达水平显著升高 (均  $P < 0.05$ )。pcDNA3/CAAP1 组细胞增殖显著增强 ( $P < 0.05$ ), shR-CAAP1 组细胞增殖显著降低 ( $P < 0.05$ )。pcDNA3/CAAP1 组细胞迁移数增加 48%、细胞迁移距离增加 59%、细胞侵袭数增加 52% (均  $P < 0.05$ ), shR-CAAP1 组细胞迁移数减少 53%、细胞迁移距离减少 29%、细胞侵袭数减少 45% (均  $P < 0.05$ )。TCGA 数据库数据分析显示, 肝癌组织中 CAAP1 的高表达与肝癌患者 OS 呈负相关 ( $P < 0.05$ )。**结论:** CAAP1 能够抑制肝癌 HepG2 细胞凋亡从而促进其增殖、迁移和侵袭, 其可能与肝癌的发生发展密切相关。

**[关键词]** 肝癌; HepG2 细胞; CAAP1; 凋亡; 增殖; 迁移; 侵袭

**[中图分类号]** R735.7; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)03-0254-07

## CAAP1 inhibits apoptosis and promotes proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma HepG2 cells

WANG Yitong<sup>a</sup>, LU Hongjian<sup>a</sup>, KONG Yixuan<sup>a</sup>, SU Jinghui<sup>a</sup>, LIU Yutan<sup>a</sup>, ZHANG Ronghua<sup>a</sup>, HOU Xiaoli<sup>a</sup>, ZHANG Guangling<sup>b</sup> (a. Hebei Provincial Key Laboratory for Chronic Diseases, School of Basic Medical Sciences; b. School of Clinical Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of CAAP1 on apoptosis, proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma (HCC) HepG2 cells and its mechanism. **Methods:** The pcDNA3/CAAP1 (CAAP1 over-expression) and pSilencer 2.1-U6 neo/shR-CAAP1 (CAAP1 knockdown) plasmids were constructed and transfected into HepG2 cells. The mRNA and protein levels of CAAP1 were detected by qPCR and WB, respectively. The cells were divided into four groups, namely overexpression control group (pcDNA3), CAAP1 over-expression group (pcDNA3/CAAP1), silence control group (pSilencer 2.1-U6 neo, pSilencer) and CAAP1 silence group (pSilencer 2.1-U6 neo/shR-CAAP1, shR-CAAP1). Flow cytometry was used to analyze the apoptosis, and WB was used to detect the protein expression of cleaved caspase 3 in each group. CCK-8 assay was used to detect the proliferation of HepG2 cells, Colony formation assay was used to detect the clonogenesis, and Transwell assay and wound healing assay were used to detect the invasion and migration abilities of HepG2 cells in each group. The effect of CAAP1 on overall survival (OS) of HCC patients was analyzed after searching TCGA database. **Results:** PcDNA3/CAAP1 with CAAP1 over-expression and shR-CAAP1 with CAAP1 knockdown were successfully constructed. It was confirmed that pcDNA3/CAAP1 could increase the mRNA and protein expressions of CAAP1,

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金资助项目 (No. 81201281); 河北省自然科学基金项目 (No. C2012401037); 2020 年政府资助临床医学优秀人才培养项目 (No. 冀财预复[2020]397 号); 河北省唐山市科学技术研究与发展计划 (No. 19130204C)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81201281), the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. C2012401037), the Government Funded Clinical Medicine Talents Training Project in 2020 (No. jeyf [2020]397), and the Science and Technology Research and Development Program from Tangshan City of Hebei Province (No. 19130204C)

**[作者简介]** 王一同 (1994-), 女, 硕士生, 主要从事肝癌发病机制的研究, E-mail: 1751299916@qq.com

**[通信作者]** 章广玲 (ZHANG Guangling, corresponding author), 博士, 教授, 研究生导师, 主要从事病毒相关肿瘤学的研究, E-mail: zhanggl@ncst.edu.cn

while shR-CAAP1 could decrease the mRNA and protein expressions of CAAP1 (all  $P < 0.05$ ). The cell apoptotic rate in pcDNA3/CAAP1 group decreased by 32% as compared to pcDNA3 group, and the cleaved caspase 3 protein expression was significantly decreased (all  $P < 0.05$ ); while the cell apoptotic rate in shR-CAAP1 group increased by 73% as compared to pSilencer group, and the cleaved caspase 3 protein expression was significantly increased (all  $P < 0.05$ ). The cell proliferation in pcDNA3/CAAP1 group significantly increased ( $P < 0.05$ ), while the cell proliferation in shR-CAAP1 group significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The cell migration number increased by 48%, the cell migration distance increased by 59% ( $P < 0.05$ ) and the cell invasion number increased by 52% in pcDNA3/CAAP1 group (all  $P < 0.05$ ). The cell migration number decreased by 53%, cell migration distance decreased by 29% and cell invasion number decreased by 45% in shR-CAAP1 group (all  $P < 0.05$ ). TCGA database analysis showed that the high expression of CAAP1 was negatively correlated with the OS of HCC patients ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** CAAP1 can promote the proliferation, migration and invasion of HepG2 cells by inhibiting its apoptosis, and it may be closely related to the occurrence and development of HCC.

**[Key words]** hepatocellular carcinoma(HCC); HepG2 cell; CAAP1; apoptosis; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(3): 254-260. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2021.03.006]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)每年以超过 84 万例的新发病例数居世界第六位、超过 78 万例的死亡人数居世界第四位的最常见恶性肿瘤<sup>[1-5]</sup>。尽管近年来许多学者专注于肝癌预防和治疗策略的研究,包括患癌风险评估、手术切除、肝移植、综合治疗等,但肝癌患者的 5 年生存率仍不超过 20%,早期诊断率低和复发风险高仍然是困扰治疗的重要问题<sup>[6-9]</sup>。肝癌涉及多个基因的表达失调,其治疗是一个急需解决的临床问题。因此,阐明肝癌的分子机制和确定新的分子靶点对肝癌的治疗至关重要。

CAAP1 是一种广泛表达且进化高度保守的蛋白,也称为 C9orf82 蛋白或 caspase 活性和凋亡抑制因子 1,它能够调控拓扑异构酶 II (Topo II) 后对 DNA 双链断裂(double strand break, DSB)修复的速度<sup>[10]</sup>, DSB 通过放松缠绕的 DNA 来改变 DNA 拓扑结构。通过生物信息学分析发现 CAAP1 启动子有 MKL1 的结合位点(CArG box),MKL1 可通过上调 CAAP1 的表达进而促进胃癌细胞的自噬并抑制其凋亡,可能是因为 CAAP1 作为抗凋亡蛋白下调 caspase 3 蛋白的表达,抑制了细胞凋亡,但同时又可增强胃癌细胞的自噬能力<sup>[11]</sup>。也有研究<sup>[12]</sup>指出,CAAP1 上调在海马细胞中起抗凋亡作用,CAAP1 和其他基因的相互作用调节海马细胞功能。但到目前为止,尚未发现 CAAP1 对肝癌作用机制的研究。

本研究以肝癌细胞 HepG2 为研究对象,旨在探讨 CAAP1 对肝癌细胞 HepG2 凋亡、增殖、迁移和侵袭的作用,为肝癌的治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

人肝癌细胞系 HepG2 购自中国科学院上海细胞库。质粒 pcDNA3、pSilencer 2.1-U6 neo 由天津医科大学生命科学中心实验室汤华教授惠赠。DMEM 培养基、青霉素链霉素双抗混合液、PBS 缓冲液、胰

酶(含 0.02% EDTA)购自美国 GIBCO 公司, TRIzol reagent、Lipofectamine™2000 reagent、Opti-MEM 细胞培养基、qPCR 试剂盒、DEPC 水、琼脂糖、ECL 显色试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,胎牛血清购自美国 BI 公司,二甲基亚砜购自美国 Sigma 公司,CCK-8 试剂盒、质粒小提中量试剂盒购自庄盟生物有限公司,逆转录试剂盒购自上海生工生物工程有限公司,限制性内切酶 BamH I、HindIII 和 Xho I 购自美国 NEB 公司,HiScript II QRT superMix 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司,SDS-PAGE 凝胶试剂盒、Tween-20 试剂购自上海碧云天公司,兔源抗 CAAP1、cleaved caspase 3、GAPDH 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司,HRP 标记抗兔二抗购自美国 KPL 公司。酶标仪、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱、离心机购自美国 Thermo 公司,WB 电泳及转膜仪购自美国 Bio Rad 公司,倒置显微镜购自日本奥林巴斯。

### 1.2 CAAP1 过表达和敲降载体的构建

以 BamH I 和 Xho I 为限制性内切酶位点,将扩增后的 CAAP1 序列连接到 pcDNA3 质粒中,构建过表达质粒 pcDNA3/CAAP1;以 BamH I 和 HindIII 为限制性内切酶位点,将扩增的 CAAP1 shRNA 连接到 pSilencer 2.1-U6 neo 质粒载体中,构建 CAAP1 的敲降质粒 pSilencer 2.1-U6 neo/shR-CAAP1 (shR-CAAP1),然后鉴定重组子。pSilencer 2.1-U6 neo 质粒的 5' 测序用 U6 引物 5'-ATGGACTATCATATGCTTACCGTA。实验中所用到的引物由通用生物系统(安徽)有限公司合成。引物序列如下:CAAP1 上游引物为 5'-GCGGGATCCATGACGGGGAAAAAGTCCTCC-3',CAAP1 下游引物为 5'-GCTCAGCTCGAGGGCTGGCTTTTTTATATCACC-3'; CAAP1-shR 上游引物为 5'-GATCCAACCTGAAGGTTTGGAAATTAAGTTCGAGTTAATTCCAAACCTTCA GGTTTTTTTGA-3',CAAP1-shR 下游引物为 5'-AGC TTCAAAAAAACCTGAAGTTTGGAAATTAAGTTCGA GTTAATTCCAAACCTTCAGGTTG-3'。

### 1.3 细胞培养及CAAP1过表达或敲降质粒的转染

人肝癌细胞系HepG2接种于含有10%胎牛血清(FBS)、100 U/mL青霉素和100 μg/ml链霉素的DMEM培养基中,置于37℃含5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养。细胞培养至约70%汇合度时,用Lipofectamine™ 2000试剂介导CAAP1过表达或敲降质粒转染肝癌细胞。实验分为四组:pcDNA3对照组、pcDNA3/CAAP1组、pSilencer组、shR-CAAP1组,转染48 h后进行后续实验。

### 1.4 qPCR检测各组细胞中CAAP1 mRNA表达水平

TRIzol法提取各组细胞总RNA,用Oligo(dT)引物对cDNAs进行RT反应。采用SYBR Premix Ex-Taq试剂进行PCR,各组分别按说明书配置好体系,反应条件:95℃预变性3 min,95℃变性12 s,58℃退火40 s,72℃延伸30 s,45个循环,每组设3个重复。上下游引物序列如下:β-actin上游引物为5'-CGTGACATTAAGGAGAAGCTG-3',β-actin下游引物为5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGAC-3';CAAP1上游引物为5'-GCCGTGGAATGTAAAGAAGTATG-3',CAAP1下游引物为5'-ATGACACAGTCAGGTC-CAGT-3'。按照Comparative Delta Ct相对定量方法进行分析,CAAP1 mRNA的相对表达量=2<sup>-ΔΔCt</sup>,其中ΔCt=Ct<sub>目的基因</sub>-Ct<sub>对照基因</sub>。

### 1.5 WB实验检测各组细胞中CAAP1蛋白的表达水平

将过表达质粒pcDNA3/CAAP1和敲降质粒shR-CAAP1分别转染HepG2细胞,转染48 h后收集细胞,采用RIPA裂解缓冲液(1% Nonidet P-40、1% Triton X-100、1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.1% SDS和10 mmol/L Tris HCl, pH7.4)提取细胞总蛋白。然后取适量蛋白样品与1×SDS上样缓冲液按体积比1:5混匀,沸水中煮5 min使蛋白变性。冷却后进行10% SDS-PAGE并将蛋白条带转移到聚偏二氟乙烯膜上,在5%脱脂乳中封闭1 h。洗膜后,与稀释的抗体CAAP1(1:500)、cleaved caspase 3(1:200)和GAPDH(1:2 000)4℃过夜孵育,然后用TBS-T洗膜3次,在室温下与二抗孵育2 h。加入ECL显影液显影,放入Gel-Pro凝胶成像系统中曝光、拍照,使用Image J软件获得每个条带的积分灰度,并以GAPDH为内参校正各自的强度。

### 1.6 流式细胞术检测各组细胞的凋亡情况

各组HepG2细胞转染48 h后收集,3 000×g离心5 min,PBS洗涤2次,加入5 μl Annexin V-FITC和5 μl PI暗染10 min。采用FITC信号检测仪和PI流式细胞仪对细胞进行分析,每个样品至少分析1×10<sup>5</sup>个细胞,每组重复3次。

### 1.7 CCK-8法检测细胞增殖活性

将各组HepG2细胞接种于96孔板中,接种量为5×10<sup>3</sup>个细胞/孔。分别于转染后0、24、48、72、96 h向各孔内加入10 μl CCK-8溶液。培养3 h后,在波长450 nm处测量每孔的D值,以表示细胞增殖活力。

### 1.8 集落形成实验检测细胞的克隆形成能力

转染48 h后,以每孔800个HepG2细胞的密度将细胞接种于12孔板中。培养15 d后,用结晶紫染色,计数50个以上细胞的集落,将对照组的细胞集落数标准化为“1”,计算实验组的相对细胞集落数。每组实验重复3次。

### 1.9 划痕实验检测细胞的迁移能力

将HepG2细胞以8×10<sup>4</sup>个/孔的密度接种于24孔板中,用微量移液管尖端进行划痕处理,PBS冲洗细胞3次,然后加入新鲜培养基,24 h后通过显微照片评估划痕间隙宽度,将对照组细胞的迁移距离标准化为“1”,计算实验组的相对迁移距离。每组实验重复3次。

### 1.10 Transwell实验检测细胞迁移和侵袭能力

使用无基质凝胶或预铺基质凝胶的Transwell小室进行细胞迁移和侵袭能力分析。HepG2细胞转染48 h后,以5×10<sup>4</sup>个/孔或1×10<sup>5</sup>个/孔细胞的密度接种至Transwell小室的上室,并加入200 μl无血清培养基。下室中加入含有20% FBS的培养基进行迁移试验或加入含有30% FBS的培养基进行侵袭试验。培养48 h后,用棉签擦掉上室细胞,结晶紫染色,显微镜计数,将对照组的迁移、侵袭细胞数标准化为“1”,计算实验组的相对迁移、侵袭细胞数。每组试验重复3次。

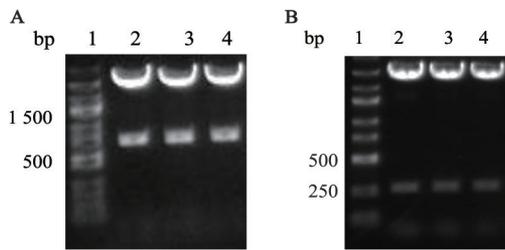
### 1.11 统计学处理

使用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析,正态分布的计量数据以均数±标准差表示,两组间比较采用t检验,组间比较采用单因素方差分析,检验水准:α=0.05,P<0.05被认为差异具有统计学意义<sup>[13]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 CAAP1过表达和敲降质粒构建成功

合成CAAP1的基因序列以及CAAP1的shRNA序列,分别通过BamH I和Xho I酶切或BamH I和Hind III酶切后连接到对应的载体质粒pcDNA3和pSilencer2.1-U6neo中,构建过表达质粒pcDNA3/CAAP1和敲降质粒shR-CAAP1。扩增两个质粒后进行酶切鉴定,酶切产物经0.8%琼脂糖凝胶电泳,图1A所示的第2、3、4泳道的酶切产物大小为1 050 bp,图1B中第2、3、4泳道的酶切产物大小为300 bp,与测序结果一致,质粒构建成功。



A: Enzyme-digested products of pcDNA3-CAAP1 over-expression plasmids after agarose gel electrophoresis; B: Enzyme-digested products of shR-CAAP1 knockdown plasmids after agarose gel electrophoresis; 1: DNA marker; 2,3,4: Sizes of enzyme-digested products of plasmids

图1 CAAP1 过表达和敲降载体酶切产物的琼脂糖凝胶电泳  
Fig. 1 Enzyme-digested products of CAAP1 over-expression and knockdown plasmids after agarose gel electrophoresis

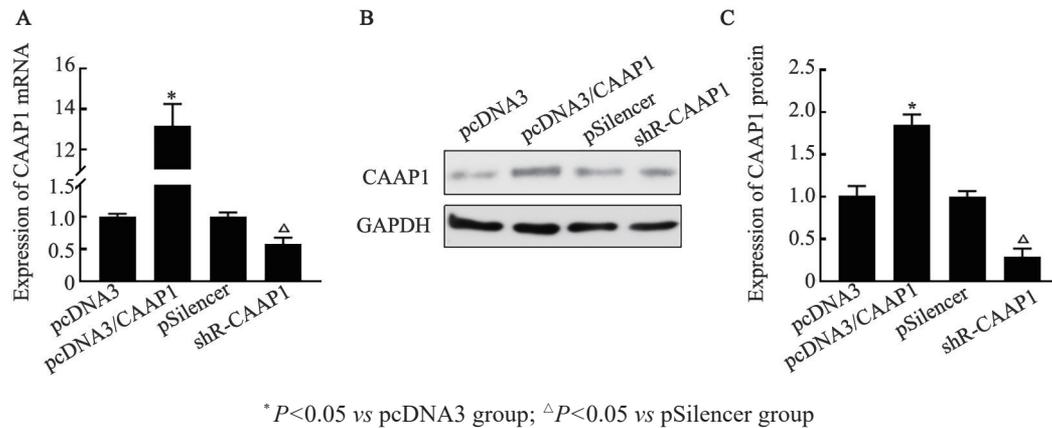
### 2.2 CAAP1 在转染后 HepG2 细胞中表达的变化

为了确定 pcDNA3/CAAP1 和 shR-CAAP1 质粒在 HepG2 细胞中的转染效率,将两种质粒分别转染到 HepG2 细胞中,实验分为 4 组:过表达对照组为 pcDNA3,过表

达组为 pcDNA3/CAAP1,敲降对照组为 pSilencer,敲降组为 shR-CAAP1。转染 48 h 后收集细胞,利用 qPCR 和 WB 技术分别检测细胞中 CAAP1 的 mRNA 和蛋白质表达水平。结果(图 2)显示 CAAP1 过表达和敲降效果明显,与对照组相比,转染 pcDNA3/CAAP1 后 HepG2 细胞中 CAAP1 mRNA 和蛋白的表达水平显著升高(均  $P < 0.05$ ),而转染 shR-CAAP1 后,CAAP1 mRNA 和蛋白的表达水平显著下降(均  $P < 0.05$ )。

### 2.3 CAAP1 能够抑制肝癌细胞 HepG2 的凋亡

流式细胞术检测 CAAP1 对肝癌细胞凋亡的影响,结果(图 3)显示过表达 CAAP1 可降低 HepG2 细胞的凋亡率( $P < 0.05$ ),而敲降 CAAP1 可增加细胞的凋亡率( $P < 0.05$ )。Caspase 3 的激活在凋亡信号中发挥关键作用,利用 WB 检测 CAAP1 对肝癌细胞 HepG2 中 cleaved caspase 3 蛋白表达水平的影响,细胞中过表达 CAAP1 后 cleaved caspase 3 蛋白水平显著减少( $P < 0.05$ ),敲降 CAAP1 后 cleaved caspase 3 蛋白水平显著增加( $P < 0.05$ )。结果提示 CAAP1 能够抑制肝癌细胞的凋亡。



\* $P < 0.05$  vs pcDNA3 group; <sup>Δ</sup> $P < 0.05$  vs pSilencer group  
A: Relative expression of CAAP1 mRNA was detected by qPCR; B, C: Relative expression of CAAP1 protein was detected by WB

图2 CAAP1 在转染后 HepG2 细胞中表达的变化  
Fig. 2 Expression changes of CAAP1 in HepG2 cells after transfection

### 2.4 CAAP1 能够促进肝癌细胞 HepG2 的增殖能力

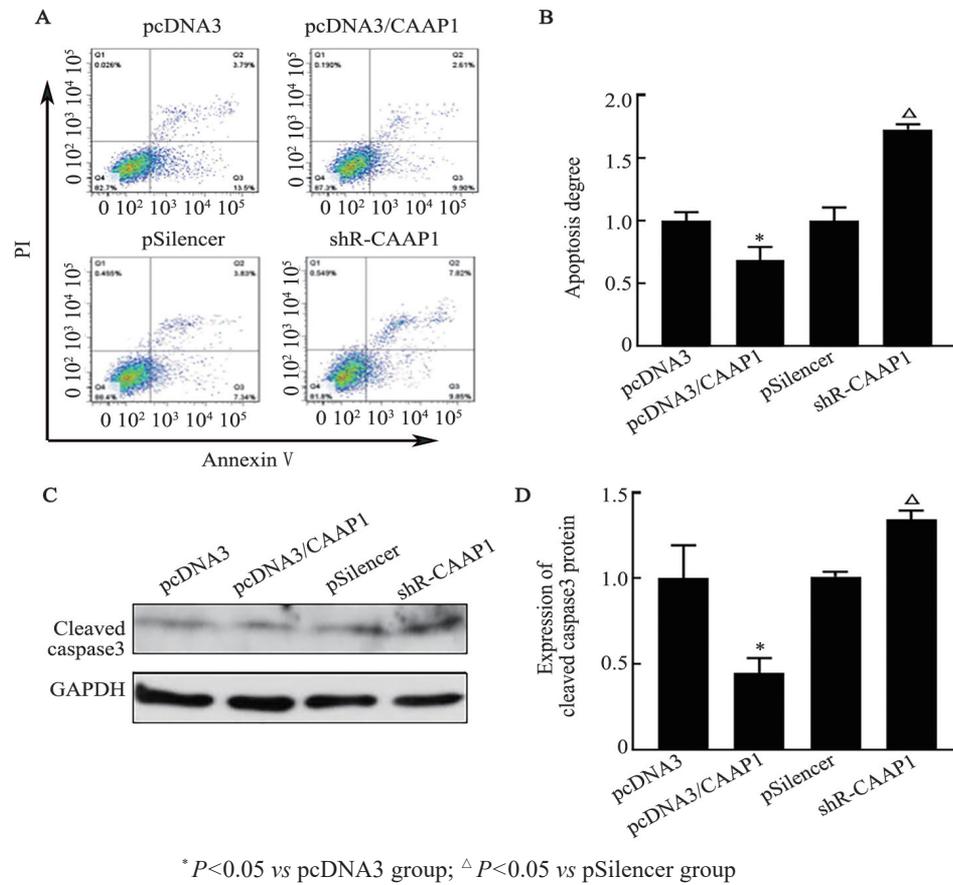
CCK-8 实验结果(图 4A、B)显示,在 HepG2 细胞中转染 pcDNA3/CAAP1 或其对照 pcDNA3 以及 shR-CAAP1 或其对照 pSilencer 后,前者细胞增殖能力明显增强( $P < 0.05$ ),后者细胞的增殖能力显著减弱( $P < 0.05$ )。细胞集落形成实验结果(图 4C、5D)显示,与对照组相比,HepG2 细胞 CAAP1 过表达后其集落形成能力明显增强( $P < 0.05$ ),而敲降 CAAP1 后细胞的集落形成能力明显减弱( $P < 0.05$ )。以上结果提示,CAAP1 能够促进肝癌细胞 HepG2 的增殖能力。

### 2.5 CAAP1 能够促进肝癌细胞 HepG2 的迁移能力

通过划痕实验、Transwell 实验检测 CAAP1 对肝癌细胞迁移能力的影响。结果(图 5)显示,过表达 CAAP1 后 HepG2 细胞的迁移距离和迁移细胞数量增加(均  $P < 0.05$ );而敲降 CAAP1 后,HepG2 细胞的迁移距离和迁移数量减少(均  $P < 0.05$ )。结果提示,CAAP1 能够促进肝癌细胞 HepG2 的迁移能力。

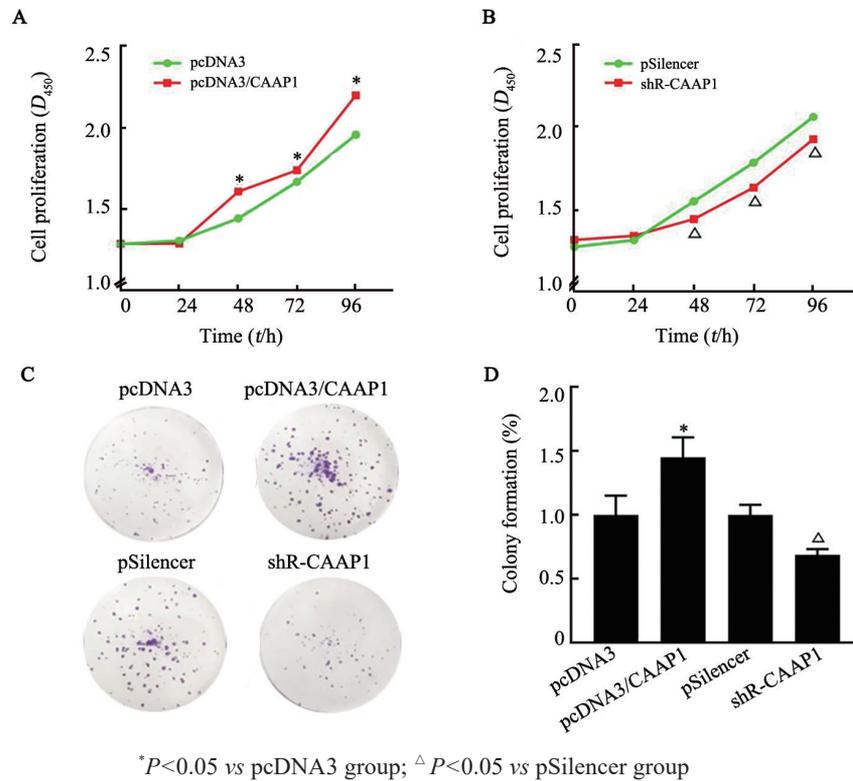
### 2.6 CAAP1 能够促进肝癌细胞 HepG2 的侵袭能力

通过 Transwell 实验检测 CAAP1 对肝癌细胞侵袭能力的影响,结果(图 6)显示,过表达 CAAP1 后 HepG2 侵袭细胞的数量增加( $P < 0.05$ ),而敲降 CAAP1 后 HepG2 侵袭细胞的数量减少( $P < 0.05$ ),结果提示 CAAP1 能够促进肝癌细胞 HepG2 的侵袭能力。



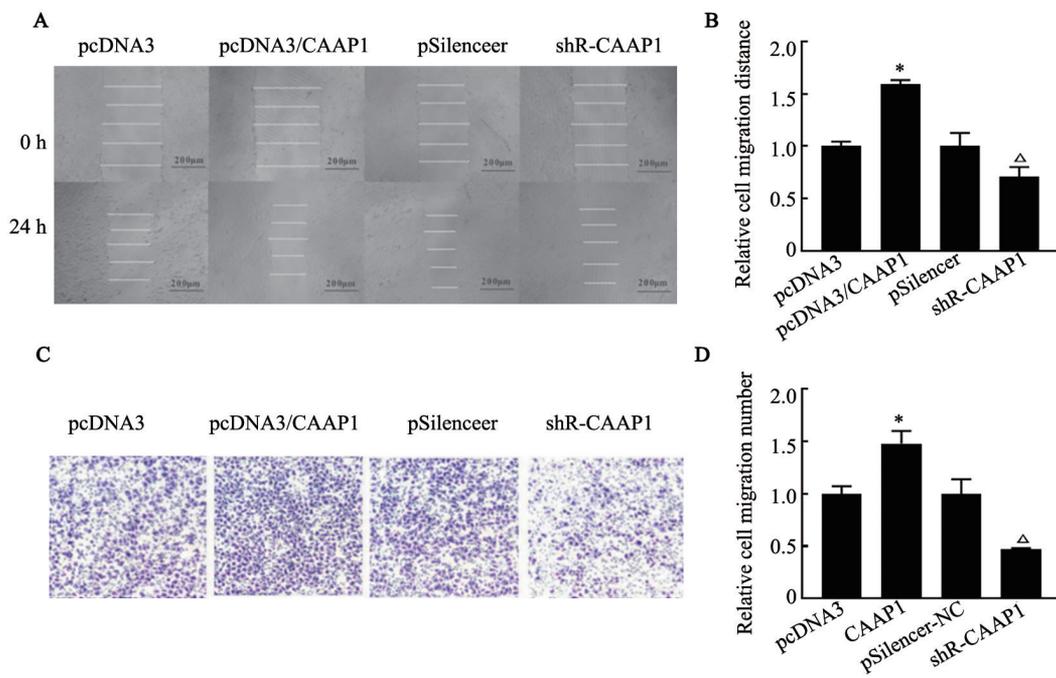
A, B: Apoptosis was detected by flow cytometry; C, D: Relative expression of cleaved caspase 3 protein was detected by WB  
图3 CAAP1对HepG2细胞凋亡的影响

Fig.3 The effect of CAAP1 on apoptosis of HepG2 cells



A, B: Proliferation activity was detected by CCK-8 assay; C, D: Cell colony formation activity was detected by colony formation assay  
图4 CAAP1对HepG2细胞增殖的影响

Fig.4 The effect of CAAP1 on the proliferation of HepG2 cells

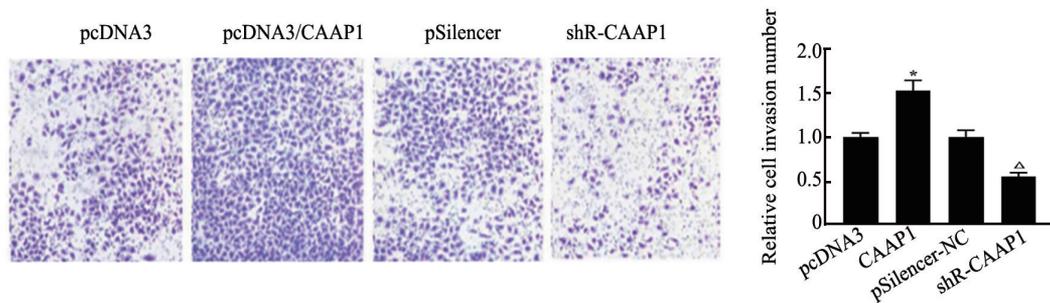


\*  $P < 0.05$  vs pcDNA3 group; <sup>△</sup>  $P < 0.05$  vs pSilencer group

A, B: Migration activity was detected by scratch assay; C, D: Migration activity was detected by Transwell assay

图5 CAAP1 对 HepG2 细胞迁移能力的影响(×100)

Fig.5 The effect of CAAP1 on the migration of HepG2 cells(×100)



\*  $P < 0.05$  vs pcDNA3 group; <sup>△</sup>  $P < 0.05$  vs pSilencer group

图6 CAAP1 对 HepG2 细胞侵袭能力的影响(×100)

Fig.6 The effect of CAAP1 on the invasion of HepG2 cells(×100)

### 2.7 CAAP1 对肝癌患者 OS 的影响

通过TCGA数据库获取肝癌患者的基因表达数据,分析肝癌患者组织中CAAP1与患者OS的相关性,结果(图7)表明CAAP1高表达时OS较短( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

CAAP1在肿瘤组织中都有不同程度的表达失调,其有几个保守的结构域,在物种间保守性较高。CAAP1是一种核蛋白,是一个潜在的凋亡相关信号转导因子,具有强大的抗凋亡功能<sup>[14-15]</sup>。研究<sup>[16]</sup>表明敲低肺癌细胞和乳腺癌细胞中CAAP1表达后细胞的凋亡增加。CAAP1发挥作用需要相互依赖的caspase激活网络,caspase 3属于caspase家族,是促进细胞凋亡的蛋白,与真核细胞凋亡密切相关,并参与细胞的生长

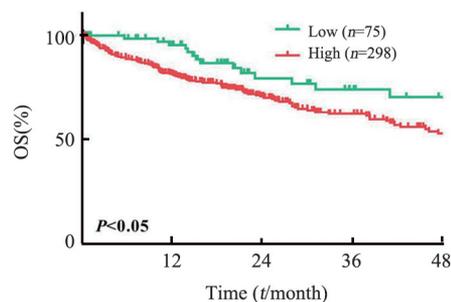


图7 CAAP1 差异表达的肝癌患者的 OS 曲线

Fig.7 OS curve of HCC patients with differential CAAP1 expression level

和分化<sup>[17-19]</sup>。CHEN等<sup>[20]</sup>研究表明lncRNA OGD-1006可能通过靶向miR-184-5p/CAAP1途径作为ceRNA

抑制原发性脑微血管内皮细胞凋亡。ZHANG等<sup>[11]</sup>研究表明,miR-5100可通过靶向CAAP1增强胃癌细胞凋亡水平,抑制自噬的发生。因此抑制CAAP1的表达可能通过促进肿瘤细胞凋亡而抑制肿瘤细胞的增殖,但CAAP1在肝肿瘤中的相关研究还未见报道。

本研究采用肝癌细胞系HepG2为研究对象,成功构建了CAAP1的过表达载体pcDNA3/CAAP1和敲降载体shR-CAAP1,首先通过脂质体将载体转染肝癌细胞HepG2,应用qPCR和WB检测载体的转染效率。然后通过流式细胞术、CCK-8实验、划痕实验、克隆形成实验和Transwell实验检测细胞的凋亡、增殖、迁移和侵袭。当HepG2细胞中CAAP1表达增加时,肝癌细胞的凋亡受到抑制,细胞增殖、迁移和侵袭能力显著增强;而当利用shRNA敲降细胞中CAAP1的表达时,肝癌细胞凋亡受到促进,细胞增殖、迁移和侵袭能力受到抑制。结果提示CAAP1可能通过抑制肝癌细胞凋亡而促进肝癌细胞增殖、迁移和侵袭,但CAAP1是否也对肝癌细胞的自噬有影响还需进一步的深入研究。总之,CAAP1在HCC中可能作为癌基因和潜在的生物标志物,本研究为临床肝癌的治疗提供新的治疗靶点和实验依据。

#### [参考文献]

- 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. DOI: 10.3322/caac.21492.
- QU Z, WU J H, WU J Y, et al. Exosomes derived from HCC cells induce sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma both in vivo and in vitro[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35(1): 159-170. DOI: 10.1186/s13046-016-0430-z.
- CHEN R, XU X, TAO Y Q, et al. Exosomes in hepatocellular carcinoma: a new horizon[J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1): 1-13. DOI: 10.1186/s12964-018-0315-1.
- KUDO M. Recent advances in systemic therapy for hepatocellular carcinoma in an aging society: 2020 update[J]. *Liver Cancer*, 2020, 9(6): 640-662. DOI: 10.1159/000511001.
- SHI M, LI Z Y, ZHANG L M, et al. Hsa\_circ\_0007456 regulates the natural killer cell-mediated cytotoxicity toward hepatocellular carcinoma via the miR-6852-3p/ICAM-1 axis[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 94-106. DOI: 10.1038/s41419-020-03334-8.
- EL-SERAG H B, RUDOLPH K L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7): 2557-2576. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.04.061.
- YANG J D, HAINAUT P, GORES G J, et al. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(10): 589-604. DOI: 10.1038/s41575-019-0186-y.
- ZHANG H, YE Y, LI W. Perspectives of molecular therapy-targeted mitochondrial fission in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2020: 1039312[2020-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7785342/>. DOI: 10.1155/2020/1039312.
- CHOI C, YOO G S, CHO W K, et al. Optimizing radiotherapy with immune checkpoint blockade in hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(20): 2416-2429. DOI: 10.3748/wjg.v25.i20.2416.
- WIJDEVEN R H, PANG B, ZANDEN S Y, et al. Genome-wide identification and characterization of novel factors conferring resistance to topoisomerase II poisons in cancer[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(19): 4176-4187. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0380.
- ZHANG H M, LI H, WANG G X, et al. MKL1/miR-5100/CAAP1 loop regulates autophagy and apoptosis in gastric cancer cells[J]. *Neoplasia*, 2020, 22(5): 220-230. DOI: 10.1016/j.neo.2020.03.001.
- YANG Q, WU M F, ZHU L H, et al. Long non-coding RNA Snhg3 protects against hypoxia/ischemia-induced neonatal brain injury[J/OL]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 112: 104343[2020-06-05]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014480019306689?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.yexmp.2019.104343.
- ZENG A, YIN J X, LI Y, et al. miR-129-5p targets Wnt5a to block PKC/ERK/NF-κB and JNK pathways in glioblastoma[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 394-409. DOI: 10.1038/s41419-018-0343-1.
- ZHANG Y, JOHANSSON E, MILLER M L, et al. Identification of a conserved anti-apoptotic protein that modulates the mitochondrial apoptosis pathway[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25284[2020-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3184134/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0025284.
- WANG X, HAN Y, HU G, et al. Endoplasmic reticulum stress induces miR-706, a pro-cell death microRNA, in a protein kinase RNA-like ER kinase (PERK) and activating transcription factor 4 (ATF4) dependent manner[J]. *Cell J*, 2020, 22(3): 394-400. DOI: 10.22074/cellj.2020.6873.
- ASLAM M A, ALEMDEHY M F, PRITCHARD C E, et al. Towards an understanding of C9orf82 protein/CAAP1 function[J/OL]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0210526[2020-08-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6328148/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0210526.
- WENG C Y, CHEN Y, WU Y, et al. Silencing UBE4B induces nasopharyngeal carcinoma apoptosis through the activation of caspase 3 and p53[J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 2553-2561 [2020-06-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6459139/>. DOI: 10.2147/OTT.S196132.
- ZHENG Z D, BIAN Y, ZHANG Y, et al. Metformin activates AMPK/SIRT1/NF-κB pathway and induces mitochondrial dysfunction to drive caspase 3/GSDME-mediated cancer cell pyroptosis[J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(10): 1089-1104. DOI: 10.1080/15384101.2020.1743911
- LIU P F, HU Y C, KANG B H, et al. Expression levels of cleaved caspase-3 and caspase-3 in tumorigenesis and prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0180620[2020-08-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5503265/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0180620.
- CHEN J Y, CHEN H, LI T, et al. lncRNA OGD-1006 alleviates OGD-induced ischemic brain injury regulating apoptosis through miR-184-5p/CAAP1 axis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(23): 12324-12333. DOI: 10.26355/eurrev\_202012\_24025.

[收稿日期] 2020-10-20

[修回日期] 2021-02-03

[本文编辑] 沈志超