

INF-Gamma Induces HepG2 Apoptosis via Down-Regulating the Level of ATGL Protein

Honghai Hong*, Xiaohua Tang, Zheng Wang, Xuejiao Fan#

Department of Clinical Laboratory, Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Guangdong

Email: gaolaosao@126.com, #499836598@qq.com

Received: Jan. 2nd, 2018; accepted: Jan. 16th, 2018; published: Jan. 23rd, 2018

Abstract

Objective: To investigate the role and molecular mechanism of INF-gamma induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells (HepG2). **Methods:** ELISA method was used to detect the level of INF-gamma in serum. MTT assay was used to detect HepG2 proliferation, Caspase-3 enzyme activity kit was used to detect Caspase-3 enzyme activity. Overexpression of ATGL to investigate the molecular mechanism of INF-gamma induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. **Results:** The level of INF-gamma in serum of liver cancer patients was significantly reduced. INF-gamma induced apoptosis of HepG2 cells, promoted the activity of Caspase-3 enzyme and down-regulated the proportion of Bcl-2/Bax through ATGL. **Conclusion:** The level of serum INF-gamma in liver cancer patients decreased and caused the apoptosis of HepG2 cells by down-regulating ATGL level.

Keywords

Liver Cancer, INF-Gamma, ATGL, Apoptosis

INF- γ 通过下调ATGL蛋白水平诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡

洪宏海*, 唐晓华, 王 征, 范雪娇#

广州医科大学附属第三医院检验科, 广东 广州

Email: gaolaosao@126.com, #499836598@qq.com

*第一作者。

#通讯作者。

收稿日期: 2018年1月2日; 录用日期: 2018年1月16日; 发布日期: 2018年1月23日

摘要

目的: 研究INF- γ 通过ATGL诱导肝癌细胞HepG2凋亡的作用及分子机制。**方法:** ELISA法检测血清中INF- γ 水平; MTT法检测肝癌细胞HepG2活力; Caspase-3酶活性试剂盒检测Caspase-3酶活性; 过表达ATGL, 研究INF- γ 通过ATGL诱导肝癌细胞HepG2凋亡作用。**结果:** 肝癌病人血清中INF- γ 水平明显降低($P < 0.001$); INF- γ 通过ATGL诱导肝癌细胞HepG2凋亡、促进Caspase-3酶活性升高和下调Bcl-2/Bax比例。**结论:** 肝癌病人血清INF- γ 水平降低, 其通过下调ATGL蛋白诱导肝癌细胞HepG2凋亡。

关键词

肝癌, INF- γ , ATGL, 凋亡

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肝癌是最常见的恶性肿瘤, 其致死率在肿瘤中排第三[1] [2]。随着医疗技术和水平升高, 肝癌病人生存期得到一定延长。但是, 大多数患者在诊断时已经处于肝癌晚期, 其生存期一般小于1年[3] [4]。诱导肿瘤凋亡是治疗肿瘤的重要策略。因此, 寻找有效诱导肝癌细胞凋亡的因子尤为重要。

干扰素- γ (Interferon- γ , INF- γ)是II型干扰素。大量研究表明, INF- γ 除具有广谱抗病毒功能外, 对免疫系统也起着调节作用[5]。进一步研究发现 INF- γ 能够干扰细胞周期, 抑制细胞增殖[6]。在肿瘤方面, INF- γ 增强神经母细胞瘤细胞对 TRIAL 的敏感性[7]。INF- γ 主要通过调控免疫系统抑制肿瘤生长[8]。INF- γ 在肝癌病人血清中表达各异, 有升高, 也有下调[9] [10]。但是, INF- γ 对肝癌作用及分子机制方面研究尚少。

在这篇论文中, 首先用 ELISA 方法检测肝癌病人血清中 INF- γ 水平, 同时研究 INF- γ 对肝癌作用。此外, 构建 ATGL 过表达质粒, 进一步研究 INF- γ 通过 ATGL 诱导肝癌细胞株 HepG2 凋亡作用及分子机制。

2. 材料与方法

标本收集

健康人和肝癌病人血清来自广州医科大学附属第三医院。血清采集时间为2017年1月到2017年12月。健康人和肝癌病人相关临床信息见表1。所有病人资料和标本收集都严格按照广州医科大学伦理委员会相关规定。伦理批准时间为2017年1月。

试剂和耗材

INF- γ ELISA 检测试剂盒购自 Genestar 生物科技公司(货号 C608)。MTT 试剂购自北京鼎国公司。Caspase-3 活性试剂盒购自碧云天公司(货号 C115)。Bax 和 Bcl-2 抗体购自 CST 公司。ATGL 抗体购自 Abcam 公司。DNA maker 购自 Bio-Rad 公司。ATGL 引物由 Invitrogen 公司合成。RNA 提取试剂盒购自康为世纪公司。DNA 聚合酶购自 Takara 公司。INF- γ 蛋白购自 Sigma 公司。

Table 1. Clinical information related to health and liver cancer patients**表 1.** 健康人和肝癌病人相关临床信息

项目	健康人(n = 30)	肝癌病人(n = 30)
性别(男/女)	20/10	22/8
年龄(岁, Mean ± SD)	55.57 ± 10.77	58.12 ± 12.34
饮酒(阳性率%)	18 (60.00%)	22 (73.33%)
HBV 感染(阳性率%)	17 (56.67%)	23 (76.67%)

ATGL 过表达质粒构建

在 Pubmed 上面调出 ATGL 基因 CDS 序列, 根据 ATGL 基因 CDS 序列设计克隆引物(引物 1F:5'-CCCAAGCTTATGTTTCCCCGCGAGAAGACG-3'; 引物 1R:5'-CCGGAATTCCAGCCCCAGGGCC CCGATCACGG-3'), 以 HepG2 细胞 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增 ATGL 基因, 酶切、连接到 pcDNA3.1+ 载体上, 经公司测序确定 ATGL 过表达质粒构建成功。

MTT 法检测肝癌细胞 HepG2 增殖能力

MTT 法, 即噻唑兰颜色反应法, 是反映细胞增殖活力的测定方法[11]。活细胞里面线粒体琥珀酸脱氢酶能使 MTT 还原为不溶于水的蓝紫色晶体——甲瓊, 并沉淀在细胞里面, 而死细胞则并不能使细胞里面的甲瓊沉淀。取对数生长期肝癌细胞, 接种到 96 孔细胞培养板中, 每孔加入 100 μ l 细胞悬液, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养; 细胞贴壁后其融合度达到 80% 左右, 用 INF- γ 蛋白处理, 不同时间点 (24 h, 48 h, 72 h) 加入 10 μ l 的 MTT 工作液(浓度为 5 mg/ml), 继续培养 4 小时; 去掉上清后每孔加入 200 μ l dimethyl sulfoxide (二甲基亚砷, DMSO), 37 $^{\circ}$, 150 转/min 震荡摇匀 10 分钟, 以使蓝色结晶颗粒甲瓊完全溶解, 用酶标仪测定 OD₄₉₀ 的光密度值。实验中每个实验组设置 6 个重复的培养孔, 重复进行 3 次。

Caspase-3 活性试剂盒检测肝癌细胞 HepG2 的 Caspase-3 活性

收集处理好的肝癌细胞 HepG2, 600 g 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟收集细胞, 小心吸除上清, 同时确保没有细胞被吸除, PBS 洗涤一次。离心吸尽上清后, 按照每 200 万细胞加入 100 μ l 裂解液的比例加入裂解液, 重悬沉淀, 冰上裂解 15 分钟。4 $^{\circ}$ C 16,000~20,000 g 离心 10~15 分钟。把上清转移到预冷的离心管中, 立即测定 caspase-3 的酶活性。

统计学分析

采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理。计量资料以均数 \pm 标准差表示。血清中 INF- γ 水平和 MTT 水平采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

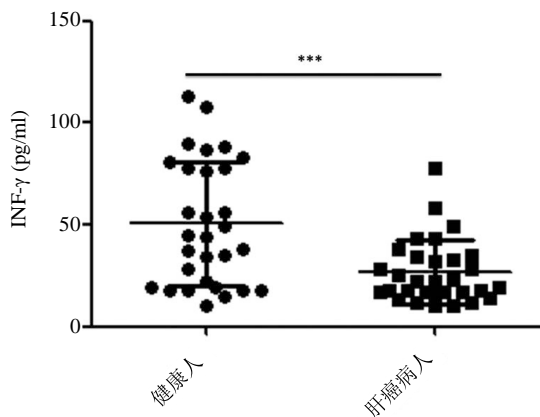
3. 实验结果

肝癌病人血清 INF- γ 水平下调

为了检测 INF- γ 在肝癌病人血清中水平, 收集了 30 例健康人和肝癌病人的血清, 用 ELISA 试剂盒检测血清中 INF- γ 水平。30 例健康人和肝癌病人临床信息见表 1。结果显示, 与对照组相比, 肝癌病人血清中 INF- γ 水平明显低于健康人(图 1)。

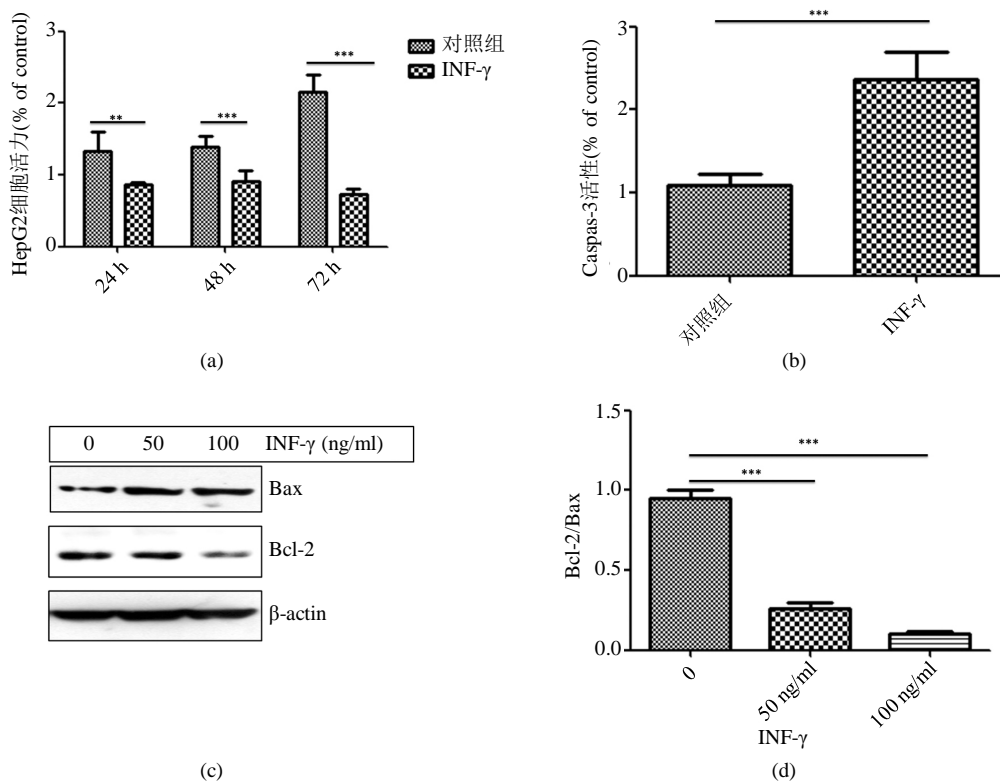
INF- γ 升高 Caspase-3 酶活性、下调 Bcl-2/Bax 比例、诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡

为了进一步研究血清 INF- γ 对肝癌细胞作用, MTT 法检测 INF- γ 处理 HepG2 细胞后细胞活力。结果显示, 在不同时间点(24 h, 48 h 和 72 h), INF- γ 都明显抑制 HepG2 细胞生长(图 2(a))。为了研究 INF- γ 对肝癌细胞凋亡作用, Caspase-3 酶活性试剂盒检测 INF- γ 处理肝癌细胞后 Caspase-3 酶活性。结果显示, INF- γ 明显升高肝癌细胞 HepG2 的 Caspase-3 酶活性(图 2(b)); 同时, Western blot 结果显示 INF- γ 明显升



ELISA 法检测肝癌病人血清中 INF- γ 水平(n=30)。***<0.001。

Figure 1. The level of INF- γ in HCC patients' serum
图 1. INF- γ 在肝癌病人血清中水平



(a) MTT 检测肝癌细胞 HepG2 活力。50 ng/ml INF- γ 处理 HepG2 细胞 24 h, 48 h 和 72 h, MTT 法检测细胞活力。**<0.01, ***<0.001。(b) HepG2 细胞 Caspase-3 酶活性检测。50 ng/ml INF- γ 处理 HepG2 细胞 48 h, 检测细胞 Caspase-3 酶活性。***<0.001。(c) Western blot 检测 HepG2 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白水平。50 ng/ml 和 100 ng/ml INF- γ 处理 HepG2 细胞 48 h, Western blot 检测细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白水平。 β -actin 为上样对照。(d) Bcl-2/Bax 比例。***<0.001。

Figure 2. INF- γ increases the activity of Caspase-3 enzyme, reduces the proportion of Bcl-2/Bax and induces HepG2 apoptosis

图 2. INF- γ 升高 Caspase-3 酶活性、下调 Bcl-2/Bax 比例、诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡

高 HepG2 细胞 Bax 蛋白水平, 下调 Bcl-2 蛋白水平, 下调 Bcl-2/Bax 比例(图 2(c) and 图 2(d)), 表明 INF- γ 升高 caspase-3 酶活性、下调 Bcl-2/Bax 比例、诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡。

INF- γ 下调肝癌细胞株 HepG2 中 ATGL 蛋白水平

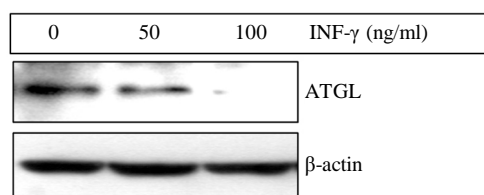
上面结果提示 INF- γ 诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡, 但是其具体分子机制尚未清楚。文献报道 ATGL 促进肿瘤细胞增殖、生长[12]。为了研究 ATGL 在 INF- γ 诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡中作用, 我们首先检测 INF- γ 对 HepG2 细胞 ATGL 影响。结果显示, 50 ng/ml 和 100 ng/ml INF- γ 明显下调 HepG2 细胞 ATGL 蛋白水平, 提示 ATGL 可能参与 INF- γ 诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡过程(图 3(a))。

ATGL 参与 INF- γ 诱导肝癌细胞株 HepG2 凋亡过程

为了研究 ATGL 在 INF- γ 诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡中作用, 我们首先构建 ATGL 过表达质粒。INF- γ 处理肝癌细胞 HepG2 的同时过表达 ATGL, 观察 ATGL 是否参与 INF- γ 诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡过程。MTT 结果显示, 过表达 ATGL 后, INF- γ 诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡被抵消(图 4(a))。此外, Caspase-3 酶活性实验也表明, ATGL 能阻止 INF- γ 升高 HepG2 细胞的 Caspase-3 酶活性(图 4(b)), 表明 ATGL 参与 INF- γ 诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡过程。

4. 讨论

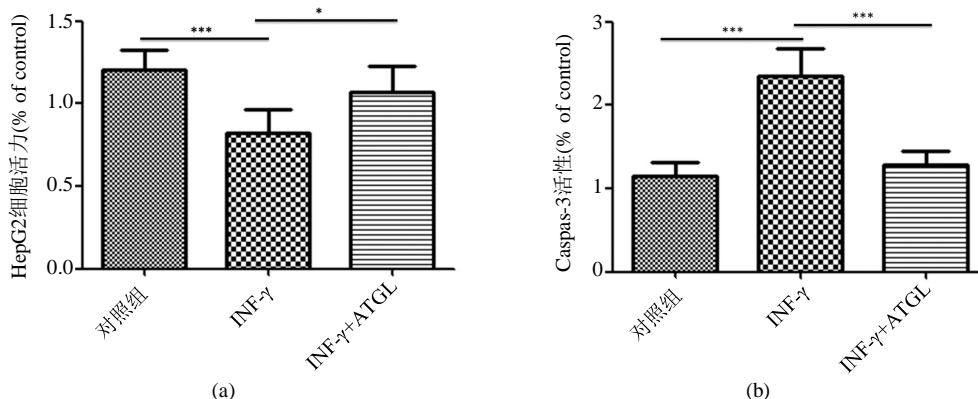
肝癌是最常见的恶性肿瘤, 其死亡率在恶性肿瘤中排名前列[1]。诱导肝癌细胞凋亡是治疗肝癌重大策略之一[13]。INF- γ 主要由活化的 T 淋巴细胞和 NK 细胞分泌, 具有抗病毒、调控细胞周期、抗肿瘤作用[14]。本论中, 我们发现肝癌病人血清 INF- γ 明显低于健康人, 进一步研究发现 INF- γ 通过调控 ATGL 蛋白水平, 升高 Caspase-3 酶活性、下调 Bcl-2/Bax 比例、诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡。



Western blot 检测 HepG2 细胞 ATGL 蛋白水平。50 ng/ml 和 100 ng/ml INF- γ 处理 HepG2 细胞 48 h, Western blot 检测细胞 ATGL 蛋白水平。 β -actin 为上样对照。

Figure 3. INF- γ down-regulates the level of ATGL protein in HepG2 cells

图 3. INF- γ 下调肝癌细胞株 HepG2 中 ATGL 蛋白水平



(a) MTT 法检测肝癌细胞株 HepG2 生长情况。50 ng/ml INF- γ 处理 HepG2 细胞的同时过表达 ATGL, 48 h 后行 MTT 检测。* <0.05 , *** <0.001 。(b) HepG2 细胞 Caspase-3 酶活性检测。50 ng/ml INF- γ 处理 HepG2 细胞的同时过表达 ATGL, 48 h 后检测细胞 Caspase-3 酶活性。*** <0.001 。

Figure 4. ATGL participates in the process of INF- γ induced HepG2 apoptosis

图 4. ATGL 参与 INF- γ 诱导肝癌细胞株 HepG2 凋亡过程

干扰素家族主要包括类3干扰素，第一类包括 IFN- α 、IFN- β 、IFN- ω 、IFN- κ 和 IFN- ϵ ；第二类只有 IFN- γ ，第三类主要是 IFN- λ 。IFN- γ 为免疫调控因子，具有抗增殖、抗病毒、抗肿瘤等功能[15]。不同研究表明肝癌血清中 IFN- γ 水平各异[9] [10]，我们实验发现 IFN- γ 在肝癌病人血清中下调，不同实验结果的差异可能和肿瘤治疗、大小有关。文献报道 IFN- γ 可引起肝细胞的细胞周期阻滞和细胞凋亡，诱导肝癌凋亡[16]，但是其具体分子机制尚未清楚。我们研究发现 INF- γ 升高 Caspase-3 酶活性、下调凋亡家族蛋白 Bcl-2/Bax 比例、诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡，此外，进一步研究发现 INF- γ 下调 ATGL 蛋白水平，进而诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡。

ATGL，脂肪甘油三酯脂肪酶，是脂肪降解的第一个酶，使脂肪降解为甘油二酯，启动脂肪动员[17]。最近研究发现 ATGL 与肿瘤增殖有关[12]。为了验证 ATGL 蛋白参与 INF- γ 诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡过程，我们构建 ATGL 过表达质粒。在 INF- γ 处理肝癌细胞 HepG2 的同时过表达 ATGL，结果表明 ATGL 参与 INF- γ 诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡过程。文献报道 INF- γ 发挥生物学功能时并不是直接作用于靶细胞，而是与细胞表面受体 IFNGR1 或 IFNGR2 结合，从而利用 INF- γ 信号传导机制激活细胞内多种效应因子来发挥功能[18]。INF- γ 下调 ATGL 蛋白水平，进而诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡是否也是通过与细胞表面受体 IFNGR1 或 IFNGR2 结合起作用尚未清楚，是我们本论文的局限地方，还值得我们进一步研究。

总之，在这篇论文中，我们实验结果证明 INF- γ 在肝癌病人血清中下调，INF- γ 下调 ATGL 蛋白水平，升高 Caspase-3 酶活性，下调凋亡家族蛋白 Bcl-2/Bax 比例，进而诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡。

基金项目

本论文由广州市卫生局(2017A011312)和广州医科大学科学科研项目博士启动(2015C24)支持。

参考文献 (References)

- [1] Ferlay, J., *et al.* (2010) Estimates of Worldwide Burden of Cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, **127**, 2893-2917. <https://doi.org/10.1002/ijc.25516>
- [2] Venook, A.P., *et al.* (2010) The Incidence and Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: A Global and Regional Perspective. *Oncologist*, **15**, 5-13. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-S4-05>
- [3] Altekruse, S.F., McGlynn, K.A. and Reichman, M.E. (2009) Hepatocellular Carcinoma Incidence, Mortality, and Survival Trends in the United States from 1975 to 2005. *Journal of Clinical Oncology*, **27**, 1485-1491. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.7753>
- [4] Llovet, J.M., *et al.* (1999) Natural History of Untreated Nonsurgical Hepatocellular Carcinoma: Rationale for the Design and Evaluation of Therapeutic Trials. *Hepatology (Baltimore, MD)*, **29**, 62-67. <https://doi.org/10.1002/hep.510290145>
- [5] Hu, H., *et al.* (2017) Effects of Arsenic Trioxide on INF-gamma Gene Expression in MRL/lpr Mice and Human Lupus. *Biological Trace Element Research*, 1-7. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1206-9>
- [6] Takami, K., *et al.* (2002) Interferon-Gamma Inhibits Hepatocyte Growth Factor-Stimulated Cell Proliferation of Human Bronchial Epithelial Cells: Upregulation of p27^{kip1} Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **26**, 231-238. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.26.2.4643>
- [7] Yu, R., *et al.* (2014) DR4 Specific TRAIL Variants Are More Efficacious than Wild-Type TRAIL in Pancreatic Cancer. *Cancer Biology & Therapy*, **15**, 1658-1666. <https://doi.org/10.4161/15384047.2014.972183>
- [8] Willimsky, G., *et al.* (2008) Immunogenicity of Premalignant Lesions Is the Primary Cause of General Cytotoxic T Lymphocyte Unresponsiveness. *Journal of Experimental Medicine*, **205**, 1687-1700. <https://doi.org/10.1084/jem.20072016>
- [9] Lee, I., *et al.* (2013) Serum Interferon Gamma Level Predicts Recurrence in Hepatocellular Carcinoma Patients after Curative Treatments. *International Journal of Cancer*, **133**, 2895-2902. <https://doi.org/10.1002/ijc.28311>
- [10] 程广霞, 等. 原发性肝癌血清细胞因子检测的临床意义[J]. 中国现代普通外科进展, 2016, **19**(12): 990-991+995.
- [11] Tibaldi, L., *et al.* (2013) New Blocking Antibodies Impede Adhesion, Migration and Survival of Ovarian Cancer Cells, Highlighting MFG8 as a Potential Therapeutic Target of Human Ovarian Carcinoma. *PLoS ONE*, **8**, e727088.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072708>

- [12] Grace, S.A., *et al.* (2017) Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) Expression Is Associated with Adiposity and Tumor Stromal Proliferation in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Anticancer Research*, **37**, 699-703. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11366>
- [13] Bie, B., *et al.* (2017) Baicalein: A Review of Its Anti-Cancer Effects and Mechanisms in Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **93**, 1285-1291. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.068>
- [14] Bletry, O. and Papo, T. (1993) Interferons. Interferons Alpha and Gamma: Indications in Systemic Diseases. *Annales de Medecine Interne*, **144**, 557-562.
- [15] Stark, G.R. (2007) How Cells Respond to Interferons Revisited: From Early History to Current Complexity. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **18**, 419-423. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.06.013>
- [16] 李世朋, 等. 干扰素 γ 抑制自噬诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡的作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, **33**(4): 343-346.
- [17] Sunny, N.E., *et al.* (2011) Excessive Hepatic Mitochondrial TCA Cycle and Gluconeogenesis in Humans with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metabolism*, **14**, 804-810. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.11.004>
- [18] Savan, R. (2014) Post-Transcriptional Regulation of Interferons and Their Signaling Pathways. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, **34**, 318-329. <https://doi.org/10.1089/jir.2013.0117>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-9049, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: wjcr@hanspub.org