

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.06.001

## · 基础研究 ·

## NAIF1 对肝癌细胞 HepG2 增殖与迁移能力的影响 \*

谷愉愉<sup>1</sup> 赵 玫<sup>1</sup> 杨 梅<sup>1</sup> 王 佳<sup>1</sup>彭 华<sup>1</sup> 黄声凯<sup>1</sup> 李 佳<sup>2</sup> 桑建利<sup>3</sup> 袁兴华<sup>4△</sup> 黄常志<sup>1△</sup>

(1 北京协和医学院 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所 病因及癌变研究室 癌发生及预防分子机理北京市重点实验室 分子肿瘤学国家重点实验室 北京 100021; 2 北京协和医学院 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所 检验科 北京 100021; 3 北京师范大学生命科学学院 北京 100875; 4 北京协和医学院 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所 腹部外科 北京 100021)

**摘要 目的:**在肝癌细胞 HepG2 中过表达外源 NAIF1(核凋亡诱导因子 1),探讨 NAIF1 的亚细胞定位以及对 HepG2 增殖和迁移能力的影响。**方法:**以真核表达质粒 pEGFP-N1 为对照组,pEGFP-N1-NAIF1 为实验组,瞬时转染肝癌细胞 HepG2,利用免疫印迹方法检测 NAIF1 蛋白表达效率;以 DAPI 染核,荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白定位,确定 NAIF1 的亚细胞定位;通过 MTT 方法绘制细胞增殖曲线;通过 transwell 小室法检测 NAIF1 对 HepG2 迁移能力的影响。**结果:**在肝癌细胞 HepG2 中,外源表达 NAIF1 主要定位于细胞核;与对照组 HepG2/pEGFP-N1 相比,HepG2/pEGFP-N1-NAIF1 的细胞增殖、迁移能力下降( $P < 0.05$ )。**结论:**外源表达 NAIF1 蛋白定位于 HepG2 细胞核,过表达 NAIF1 抑制 HepG2 的细胞增殖与迁移能力,NAIF1 可能作为肝癌治疗的潜在靶点。

**关键词:**NAIF1;HepG2;亚细胞定位;细胞增殖;细胞迁移

**中图分类号:**R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)06-1001-04

Effects of NAIF1 on Cell Proliferation and Migration  
in Hepatoma Cell HepG2\*GU Yu-yu<sup>1</sup>, ZHAO Mei<sup>1</sup>, YANG Mei<sup>1</sup>, WANG Jia<sup>1</sup>, PENG Hua<sup>1</sup>,HUANG Sheng-kai<sup>1</sup>, LI Jia<sup>2</sup>, SANG Jian-li<sup>3</sup>, YUAN Xing-hua<sup>4△</sup>, HUANG Chang-zhi<sup>1△</sup>

(1 Department of Etiology and Carcinogenesis, State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute and Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing, 100021, China; 2 Department of Clinical Laboratory, Cancer Institute and Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing, 100021, China; 3 Institute of Cell Biology, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing, 100875, China; 4 Department of Abdomen Surgery, Cancer Institute and Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing, 100021, China)

**ABSTRACT Objective:** Exogenous NAIF1 (nuclear apoptosis-inducing factor 1) was transfected and expressed in hepatoma cell HepG2, and the localization of NAIF1 as well as the effects of NAIF1 on cell proliferation and cell migration was investigated. **Methods:** HepG2 cell was transiently transfected with eukaryotic expression plasmid pEGFP-N1 as control group or pEGFP-N1-NAIF1 as test group. Western blot was performed to examine the NAIF1 protein expression levels. Nucleus was stained by DAPI, and the localization of NAIF1 was analyzed by monitoring the GFP using a fluorescence microscope. The ability of cell proliferation was determined by MTT assay. Transwell assay was performed to examine the ability of cell migration. **Results:** In hepatocma cell HepG2, exogenous expressed NAIF1 was mainly localized in nucleus. Compared with HepG2/pEGFP-N1, HepG2/pEGFP-N1-NAIF1 showed decreased ability of cell proliferation and migration ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** Exogenous expressed NAIF1 localizes in the nucleus of HepG2. Overexpressed NAIF1 inhibits the cell proliferation and migration of HepG2. NAIF1 may act as a potential target of hepatocarcinoma therapy.

**Key words:** NAIF1; HepG2; Subcellular distribution; Cell proliferation; Cell migration

**Chinese Library Classification (CLC):** R735.7 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2015)06-1001-04

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81472208);北京师范大学细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室开放课题资助(201301)

作者简介:谷愉愉(1988-),女,博士研究生,主要研究方向:生物化学与分子生物学,E-mail: gtgy2007@126.com

△通讯作者:黄常志(1956-),男,博士生导师,教授,主要研究方向:生物化学与分子生物学,

E-mail: huangpumc@163.com,电话:010-87788604;

袁兴华,男,硕士生导师,主要研究方向:腹部肿瘤外科,E-mail: haroldyuan@sohu.com

(收稿日期:2014-10-02 接受日期:2014-10-27)

## 前言

肝癌在全球男性常见肿瘤中,发病率位居第五,致死率第二,在全球女性常见肿瘤发病率排名第七,致死率第六。在2008年,估算全球有748,300例新增肝癌病例,695,900例肝癌死亡病例,其中一半的新增病例和死亡病例发生在我国<sup>[1-3]</sup>。我国作为肝癌大国,对于肝癌的研究不容忽视。

NAIF1(nuclear apoptosis-inducing factor 1,核凋亡诱导因子1)基因首次由Lv等人在2005年报道。已有文献表明,NAIF1的mRNA在人多组织均有表达,并且NAIF1可以通过线粒体途径诱导细胞凋亡,抑制细胞增殖<sup>[4]</sup>。目前关于NAIF1的研究较少,在肝癌细胞中的作用尚无报道。由于肝癌细胞HepG2的NAIF1蛋白表达量很少<sup>[5]</sup>,本研究通过在HepG2中过表达外源NAIF1,利用荧光显微镜观察蛋白定位,以及利用MTT实验、Transwell小室法,初步探讨NAIF1对肝癌细胞的生物学作用,为肝癌的治疗提供新的潜在靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

肝癌细胞HepG2由本实验室保藏。真核表达质粒pEGFP-N1、pEGFP-N1-NAIF1由本实验室保存。转染试剂X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent购于Roche。鼠单抗 $\beta$ -actin购于CST,羊抗人NAIF1多克隆抗体购于Santa Cruz公司。山羊抗鼠、兔抗山羊辣根过氧化物酶标记二抗购于北京中杉金桥。BRADFORD蛋白定量试剂盒购自TIANGEN公司。Western blot chemiluminescence luminal kit购于北京普利莱。MTT购自Sigma公司。Transwell小室购自Millipore公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与转染** HepG2以含10%胎牛血清FBS的DMEM完全培养基,5%CO<sub>2</sub>、37℃恒温培养箱培养。转染前一天以80%密度于六孔板内接种细胞,次日以0.9%NaCl清洗细胞,更换新鲜完全培养基。转染体系为每孔(六孔板):200 $\mu$ L无血清DMEM+2 $\mu$ g质粒+4 $\mu$ L转染试剂,混匀静置15min后,滴加入相应细胞内。对照组转染真核表达质粒pEGFP-N1,实验组转染pEGFP-N1-NAIF1。

**1.2.2 Western Blot方法检测NAIF1表达** 转染48h后收取细胞,0.9%NaCl洗涤三遍,以蛋白裂解液TNET裂解30min,13000r/min、4℃离心15min,吸取上清获得细胞总蛋白,BRADFORD试剂盒进行蛋白定量。加入5 $\times$ 上样缓冲液,100℃水浴10min变性蛋白样品。每孔道上样等量蛋白(10~30 $\mu$ g),经SDS PAGE凝胶电泳(5%浓缩胶80V、30min,10%分离胶120V、90min)分离蛋白。电泳结束,甲醇激活PVDF膜10s,按照阴极到阳极的顺序依次放置滤纸、分离胶、PVDF膜、滤纸,250mA恒流转膜1.5h。5%BSA封闭PVDF膜约1.5h,在杂交袋内加入一抗(羊抗人NAIF1,1:1000;鼠抗人 $\beta$ -actin,1:3000),4℃摇床孵育过夜。次日TBST清洗三次,室温孵育二抗(兔抗山羊辣根过氧化物酶标记二抗,1:5000;山羊抗鼠辣根过氧化物酶标记二抗,1:5000)1h,TBST清洗三次。将ECLA液和B液等量混合,将PVDF膜放入ECL混合液中孵育10

s,取出后置于化学发光成像分析系统检测目的条带。

**1.2.3 蛋白定位** 细胞转染24h后爬片,待贴壁牢固后,以PBS清洗3次,每次5min;4%甲醛溶液室温固定15min,PBS清洗,0.5%TritonX-100通透细胞15min,PBS清洗,1%BSA溶液室温封闭30min,加DAPI染液避光孵育15min。PBS清洗后以70%甘油封片,荧光显微镜下镜检观察。

**1.2.4 MTT细胞增殖实验** 细胞转染24h后,胰蛋白酶消化计数,用完全培养基稀释为合适浓度的细胞悬液,将细胞接种到96孔板,每孔3000个/200 $\mu$ L,设5个平行孔,常规培养。分别在1、2、3、4、5天以MTT法检测波长492nm光密度值,方法:弃上清,每孔加新鲜配制110 $\mu$ L MTT染液(20 $\mu$ L 5mg/mL MTT+90 $\mu$ L无血清DMEM),培养4h后取出,小心吸走上清,加入150 $\mu$ L DMSO溶解MTT甲臞沉淀15min,酶标仪测波长492nm处OD值。

**1.2.5 Transwell细胞迁移实验** 细胞转染48h后,胰蛋白酶消化计数,用无血清DMEM培养基重悬细胞悬液。在Transwell小室下室加入600 $\mu$ L含10%FBS的DMEM完全培养液,上室加入200 $\mu$ L DMEM重悬的细胞悬液(8 $\times$ 10<sup>4</sup>个/well),37℃,5%CO<sub>2</sub>培养17h。取出上室,棉签蘸取PBS擦拭上室5次,预冷甲醇室温固定20min后,0.1%结晶紫染色5min,水洗3次后风干,显微镜观察,镜下随机选取5个视野拍照并计数。

**1.2.6 统计学方法** 统计分析采用IBM SPSS Statistics 20软件。数据以平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组检验结果间采用Student's two-tailed t-test。P<0.05被认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 在肝癌细胞HepG2中过表达NAIF1

本研究以空载质粒pEGFP-N1作为对照,以真核表达质粒pEGFP-N1-NAIF1作为实验组,瞬时转染入肝癌细胞HepG2,过表达NAIF1蛋白。转染48h后收取蛋白样品,利用免疫印迹方法检测蛋白表达效率。NAIF1-GFP融合蛋白大小约为72kDa,结果显示,HepG2/pEGFP-N1-NAIF1在72kDa处显示有清晰的目的条带(图1),NAIF1在HepG2中获得明确表达。

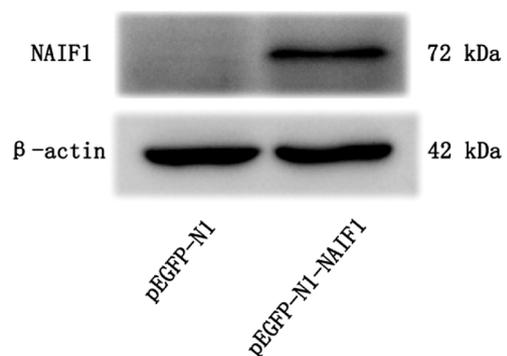


图1 在肝癌细胞HepG2中过表达外源NAIF1

Fig.1 Overexpression of exogenous NAIF1 in HepG2 cells

### 2.2 NAIF1在HepG2的亚细胞定位

为了研究NAIF1在HepG2的亚细胞定位,瞬时转染48h后,利用荧光显微镜观察绿色荧光蛋白GFP的定位情况。在对

对照组 HepG2/pEGFP-N1 中,GFP 均匀分布于胞浆与胞核; 实验组 HepG2/pEGFP-N1-NAIF1 表达融合蛋白 NAIF1-GFP, 通过绿色荧光判断 NAIF1 主要定位于细胞核,少量表达于胞浆(图 2)。

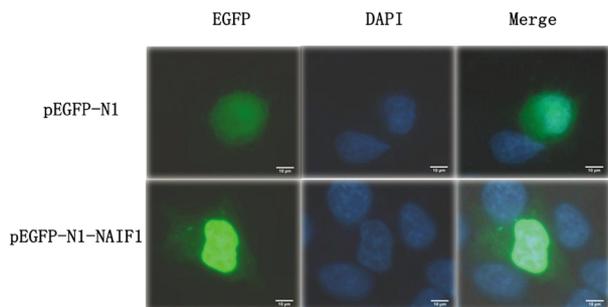


图 2 NAIF1 在 HepG2 的亚细胞定位 (Bar = 10 μm)

Fig.2 Subcellular distribution of NAIF1 in HepG2 cells (Bar = 10 μm)

### 2.3 NAIF1 对肝癌细胞 HepG2 增殖能力的影响

利用 MTT 实验研究 NAIF1 对 HepG2 细胞增殖能力的影响。结果显示, 从第三天开始, 与对照组相比, HepG2/pEGFP-N1-NAIF1 细胞增殖能力开始下降,并且在第四天、第五天该差异更加明显(P < 0.05, 图 3),提示过表达 NAIF1 抑制 HepG2 细胞增殖。

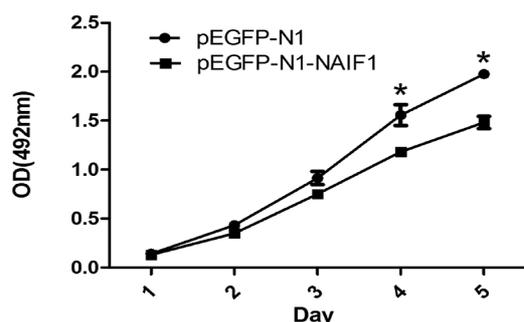


图 3 MTT 实验检测 NAIF1 对 HepG2 细胞增殖能力的影响

Fig.3 Effect of NAIF1 on HepG2 cell proliferation by MTT assay

Note: \*P < 0.05, compared with control group. Overexpression of NAIF1 inhibited HepG2 cell proliferation.

### 2.4 NAIF1 对肝癌细胞 HepG2 迁移能力的影响

细胞由上室穿过 8 μm 微孔进入下室的能力反应细胞的体

外迁移能力。本实验利用 transwell 小室法检测 NAIF1 对肝癌细胞迁移能力的影响。实验结果显示,HepG2/ pEGFP-N1 由上室迁移至下室的细胞个数为 1127.6 ± 142.6 个,HepG2/ pEGFP-N1-NAIF1 由上室迁移至下室的细胞个数为 446.6 ± 34.1 个。在 NAIF1 过表达的情况下,HepG2 细胞的迁移能力降低 2.5 倍,t 检验显示该差异具有统计学意义(P < 0.05)。该结果表明过表达 NAIF1 降低 HepG2 细胞迁移能力(图 4)。

### 3 讨论

人 NAIF1 定位于染色体 9q34.11, 编码由 327 个氨基酸组成的蛋白质,是一个核凋亡诱导因子,该蛋白 N 端包含两个核定位序列<sup>[46]</sup>。由于真核表达质粒 pEGFP-N1 表达绿色荧光蛋白 GFP,同时利用 DAPI 染液结合细胞核双链 DNA 的特性,通过在荧光显微镜下观察 GFP 定位, 确定 NAIF1 主要定位于 HepG2 细胞核。该结果表明,与其含有核定位序列的特点相符, NAIF1 是一个核蛋白。由于蛋白质的亚细胞定位往往与蛋白功能相关<sup>[7]</sup>,这说明 NAIF1 可能通过与染色体 DNA、蛋白相互作用,调节基因表达,进一步发挥生物功能。

细胞增殖与细胞凋亡失调是肿瘤发生、发展的特点之一。细胞凋亡减弱往往促使肿瘤向高度恶性发展,并具有抵抗化疗的特性<sup>[8-10]</sup>。细胞周期受代谢相关酶、ROS (reactive oxygen species, 活性氧)、CDK (cyclin-dependent kinase, 细胞周期蛋白依赖性激酶)等一系列因素调控,与细胞增殖、凋亡密切相关<sup>[11]</sup>。我们的实验结果显示过表达 NAIF1 抑制 HepG2 细胞增殖。已有研究表明,NAIF1 可以通过调节 cyclinD1、cdc2、p21 的表达,诱导胃癌细胞 MKN45 和 BGC823 在细胞周期 G1/S 期发生阻滞,并且 NAIF1 可通过 caspase-9 通路诱导 MKN45 发生细胞凋亡<sup>[12,13]</sup>。因此,NAIF1 可能通过上述两种方式影响 HepG2 的细胞增殖能力。

具有浸润和转移能力是癌症的另一大特征,肝癌转移极大地促进了肝癌的发展过程,并且造成高致死率<sup>[14-16]</sup>。在细胞水平上,这一特征表现为肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。在外源转染 NAIF1 48 h 后,接种相同数目的细胞到 transwell 小杯上室,17 h 后终止细胞培养并染色。由 MTT 结果显示,在 17 h 时细胞数目不受增殖影响,因此下室细胞个数即反映 HepG2 细胞迁移能力的变化情况。结果显示过表达 NAIF1 显著降低了 HepG2

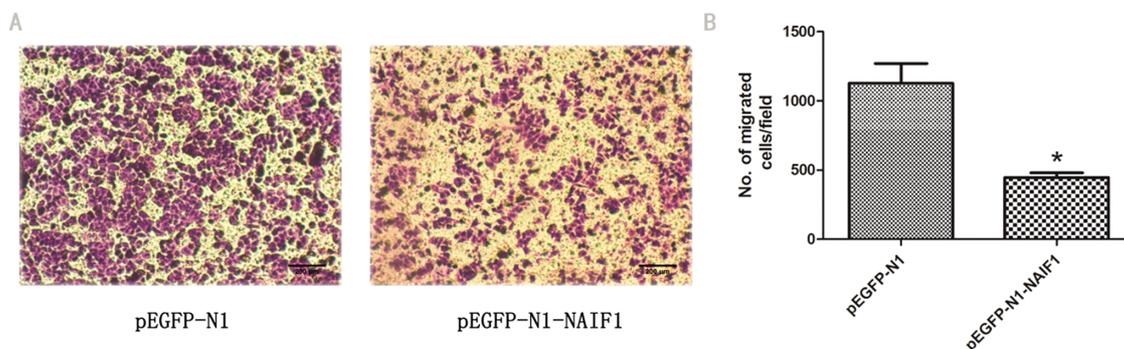


图 4 Transwell 实验检测 NAIF1 对 HepG2 细胞迁移能力的影响

Fig.4 Effect of NAIF1 on HepG2 cell migration by transwell assay

Note: A: Results of transwell migration assay(Bar = 200 μm).

B: Statistical histogram of the cell number in the transwell migration assay. \*P < 0.05, compared with control group.

的迁移能力,提示NAIF1可能在抑制肝癌转移的过程中发挥重要作用。MMPs(matrix metalloproteinases,基质金属蛋白酶)是一类锌离子依赖性蛋白酶家族,通过水解方式调节细胞外基质,与肿瘤转移密切相关<sup>[17-19]</sup>。FAK(focal adhesion kinase,黏着斑激酶)是黏着斑复合物家族的一员,是生长因子受体和整合素介导信号的重要调节因子,通过其激酶活性参与正常或肿瘤细胞的基本过程。在多种肿瘤原发或转移器官中,往往伴随FAK蛋白表达量以及活性的增加<sup>[20]</sup>。Yang M研究证实NAIF1抑制胃癌细胞中MMP2、MMP9的表达,并且降低FAK的磷酸化水平<sup>[5]</sup>,NAIF1可能通过相同方式调节HepG2的运动能力。

综上所述,本研究初步证实了NAIF1定位于肝癌细胞HepG2胞核,过表达NAIF1抑制HepG2的细胞增殖和迁移能力,表明NAIF1可能是肝癌的潜在抑癌基因,可能作为肝癌治疗的潜在靶点。NAIF1作为核蛋白,由其调控的靶基因以及通路尚需进一步阐明,为肝癌的临床诊断与治疗提供新的标记物。

#### 参考文献(References)

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global Cancer Statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90
- [2] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(2): 1118-1127
- [3] Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: A global view[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7(8): 448-458
- [4] Lv B, Shi T, Wang X, et al. Overexpression of the novel human gene, nuclear apoptosis-inducing factor 1, induces apoptosis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38(4): 671-683
- [5] 杨梅. NAIF1基因在胃癌细胞中的功能与机理研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2013  
Yang Mei. Studies on the functions and mechanisms of NAIF1 in gastric cancer cell[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2013
- [6] Sinzelle L, Kapitonov VV, Grzela DP, et al. Transposition of a reconstructed Harbinger element in human cells and functional homology with two transposon-derived cellular genes [J]. *PNAS*, 2007, 105(12): 4715-4720
- [7] Hung MC, Link W. Protein localization in disease and therapy[J]. *Journal of cell science*, 2011, 124(20): 3381-3392
- [8] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674
- [9] Adam JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy[J]. *Oncogene*, 2007, 26(9): 1324-1337
- [10] Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression [J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 307-315
- [11] Diaz-Moralli S, Tarrado-Castellarnau M, Miranda A, et al. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy [J]. *Pharmacology and Therapeutics*, 2013, 138(2): 255-271
- [12] Yang M, Zhong JL, Zhao M, et al. Overexpression of nuclear apoptosis-inducing factor 1 altered the proteomic profile of human gastric cancer cell MKN45 and induced cell cycle arrest at G1/S phase [J]. *PLOS ONE*, 2014, 9(6): e100216
- [13] Luo Q, Zhao M, Zhong JL, et al. NAIF1 is down-regulated in gastric cancer and promotes apoptosis through the caspase-9 pathway in human MKN45 cells[J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(4): 1117-1123
- [14] Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework[J]. *Cell*, 2006, 127(4): 679-695
- [15] Talmadge JE, Fidler IJ. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(14): 5649-5669
- [16] Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited[J]. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, 3(6): 453-458
- [17] Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases[J]. *Amino Acids*, 2011, 41(2): 271-290
- [18] Hadler-Olsen E, Winberg JO, Uhlén-Hansen L. Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(4): 2041-2051
- [19] Dufour A, Overall CM. Missing the target: matrix metalloproteinase antitargets in inflammation and cancer [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2013, 34(4): 233-242
- [20] Lee BY, Timpson P, Horvath LG, et al. FAK signaling in human cancer as a target for therapeutics[J]. *Pharmacology and therapeutics*, 2014 [Epub ahead of print]