

桦木脑通过SREBP1抑制靶基因PIK3R3抗肝癌

罗吉^{1#} 苗杜凌^{2#} 程竹君² 文雨松² 温和毅² 王藏² 傅芬¹ 汤晓丽³ 贺晓菊^{1*}
(¹南昌大学第二附属医院, 南昌 330006; ²南昌大学转化医学研究院, 南昌 330031; ³南昌大学基础医学院, 南昌 330031)

摘要 该文主要研究桦木脑通过固醇调节元件结合蛋白1(sterol-regulatory element binding proteins, SREBP1)抑制靶基因PIK3R3(phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3)抗肝癌的分子机制。采用MTT法检测细胞增殖; 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡; qRT-PCR检测细胞周期蛋白、周期蛋白激酶和凋亡相关基因mRNA水平; 采用RNA-seq并整合ChIP-Seq数据筛选SREBP1调控的凋亡相关基因; 双荧光素酶报告系统检测SREBP1对凋亡基因的调控作用。结果显示, 桦木脑能够显著抑制肝癌细胞增殖, 诱导其凋亡, 并且使肝癌细胞阻滞在G₂/M期; 桦木脑通过抑制SREBP1可直接下调凋亡基因PIK3R3的表达, 促进细胞凋亡, 进而抑制肝癌细胞增殖。

关键词 肝癌; 固醇调节元件结合蛋白; 桦木脑; 转录调控; 细胞凋亡

Betulin on Anti-Hepatocellular Carcinoma through SREBP1 Inhibits the Target Gene PIK3R3

LUO Ji^{1#}, MIAO Duling^{2#}, CHENG Zhujun², WEN Yusong², WEN Heyi², WANG Zang²,
FU Fen¹, TANG Xiaoli³, HE Xiaojun^{1*}

(¹The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; ²Institute of Translational Medicine of Nanchang University, Nanchang 330031, China; ³School of Basic Medical Science, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract This study focused on the molecular mechanism of betulin on Anti-hepatocellular carcinoma through SREBP1 inhibition of target gene PIK3R3. Cell proliferation was detected by MTT assay. Cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. mRNA expression levels of cyclins, cyclin dependent kinase and apoptosis-related genes were detected by qRT-PCR. SREBP1-regulated apoptosis-related genes were screened by integration of RNA-seq and ChIP-Seq data. The regulation of SREBP1 on the apoptotic gene was detected by Dual-Luciferase reporter system. The results showed that betulin can significantly inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells, induce apoptosis, and block hepatocellular carcinoma cells in G₂/M phase. Betulin can directly down-regulate the expression of apoptosis gene PIK3R3 to promote apoptosis and inhibit the proliferation of Hepatocellular Carcinoma cells.

Keywords hepatocellular carcinoma; sterol-regulatory element binding proteins; betulin; transcriptional regulation; apoptosis

收稿日期: 2019-05-08 接受日期: 2019-09-04

国家自然科学基金(批准号: 81760277、81200631)、江西省自然科学基金(批准号: 20171BAB205109)和南昌大学创新创业训练项目(批准号: 201702039)资助的课题

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 15270900868, E-mail: hexiaojun@163.com

Received: May 8, 2019 Accepted: September 4, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81760277, 81200631), the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (Grant No.20171BAB205109) and the Foundation of the Innovation and entrepreneurship training project of Nanchang University (Grant No.201702039)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-15270900868, E-mail: hexiaojun@163.com

网络出版时间: 2020-01-02 19:20:17 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.q.20200102.1013.002.html>

肝癌是一类异质性强、死亡率高的难治性恶性肿瘤^[1-2]。数据显示,目前全球的肝癌发病和死亡数将持续增加^[3],而我国是世界上肝癌高发国家之一,且发病年龄逐渐呈现年轻化趋势^[4]。在临床等方面,肝癌早期症状并不明显,而且病情发展迅猛;同时肝癌对常规放化疗等治疗措施不敏感,从而导致患者生存期短且死亡率高。因此加强肝癌的分子机制研究,开发抗肝癌的有效药物刻不容缓。

桦木脑是一种具有生物活性的五环三萜类天然小分子物质^[5],在植物中广泛存在,可运用有机溶剂提取法从桦木属植物的树皮中获得。研究发现,桦木脑及其衍生物可选择性抑制肿瘤细胞生长,同时其不良反应少且程度较轻,是潜在的抗肿瘤药物^[6-8]。文献报道,桦木脑具有广泛的抗肿瘤特性,包括对肝癌、宫颈癌、结肠癌、直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌和肺癌等肿瘤细胞都有抑制作用^[9-10]。另外,Li^[11]等的研究发现,桦木脑能诱导Bax和Bak从胞质转移至线粒体,进一步使线粒体膜电位消失,CYCS释放,随之激活caspase-9-3/-7导致细胞凋亡。该研究还提示,桦木脑诱导凋亡与细胞的类型有关,能强烈抑制肝癌细胞生长。总的来说,桦木脑对人类癌症的抗癌活性有广谱性,但其对肝癌的作用机制尚不明确。

固醇调节元件结合蛋白(sterol-regulatory element binding proteins, SREBP)属于碱性螺旋-环-螺旋-亮氨酸拉链家族,是调控脂质合成重要的核转录因子之一,并且在脂肪酸、胆固醇和甘油三酯等生物合成方面发挥重要作用^[12-14]。SREBPs前体嵌于内质网膜,与SREBP裂解激活蛋白(SREBP cleavage-activating protein, SCAP)紧密结合形成SCAP/SREBP复合物^[15]。研究认为,当细胞内胆固醇浓度较高时,胰岛素诱导基因(insulin induced gene, Insig)蛋白与SCAP相互作用^[16-17],使SREBP以无活性的形式与SCAP形成SREBP/SCAP复合体镶嵌在内质网膜上^[18-20]。反之,当胆固醇浓度较低时,Insig与SCAP的作用中断,SCAP将SREBP运送至高尔基体进行蛋白酶解加工活化^[21-22]。研究表明,桦木脑是SREBP1的特异性抑制剂,可与SCAP特异性结合,促进SCAP与Insig相互作用,抑制SREBPs转运至高尔基体活化为成熟的核型蛋白,从而抑制SREBP1的活化^[23-25]。但桦木脑是否可通过SREBP1直接调控肿瘤的表型尚不明确。

据此,本课题将以SREBP1为研究核心,阐释SREBP1在肝癌中的作用以及桦木脑通过SREBP1抗肝癌作用的

分子机制,为肝癌的临床治疗提供新的策略和理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

桦木脑购自美国MCE公司,用助溶剂二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解后于4 °C保存待用。人肝癌细胞HepG2(目录号: SCSP-510)购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/干细胞库。

1.2 仪器及试剂

逆转录试剂盒和Prime STAR Max购自TaKaRa公司; Dual-luciferase[®] Reporter Assay system购自Promega公司; SuperFectin Transfection购自上海普飞生物技术有限公司; PowerUp[™] SYBR[®] Green Master Mix购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; Trizol[™]试剂购自Invitrogen公司; DMEM、胰酶和胎牛血清购自Gibco公司; DMSO购自Biomol公司; DEPC和MTT购自Sigma公司; Lipo2000购自生工生物工程(上海)股份有限公司; EasyTaq mix和Easy See Western blot Kit购自北京全式金生物技术有限公司; 细胞凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司; RIPA蛋白裂解液购自Solarbio公司; EZ-Magna ChIP[™] A试剂盒购自Millipore公司; SREBP-1染色质免疫沉淀抗体购自Santa cruz(sc-8984)公司。

仪器包括: 细胞培养箱(Thermofisher)、荧光定量PCR仪(Thermofisher)、冷冻低温离心机(Thermofisher)、倒置荧光显微镜(Olympus)、流式细胞仪(BD Biosciences)和丙烯酰胺胶电泳仪(Bio-Rad)。

1.3 细胞培养

HepG2细胞培养于DMEM培养基中,内含有10%新鲜胎牛血清、100 μg/mL青霉素和100 μg/mL链霉素,置于37 °C、5.0% CO₂的饱和湿度培养箱中培养,待细胞汇合达到70%时进行传代培养。

1.4 MTT法检测细胞增殖

取对数生长期的细胞,按5 000细胞/孔接种于96孔板中,然后将桦木脑以5 μg/mL、8 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL的浓度分别加入每孔,培养48 h后再每孔加入20 μL浓度为5 mg/mL的MTT试剂,37 °C孵育4 h,吸掉孔中废液,每孔加入150 μL DMSO溶解,摇床摇15 min; 在酶标仪595 nm波长处测定各孔的吸光度(D)值,记录结果,统计数据绘制细胞生长曲线。

1.5 Guava检测细胞周期

取对数生长期的细胞,按1×10⁶细胞/孔接种于

6孔板中, 分别加入DMSO和桦木脑(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 培养48 h后收集细胞; 加500 μL PBS重悬, 于细胞沉淀中加入75%乙醇固定细胞, 冰上放置2 h; 离心去除乙醇, 用Guava细胞周期试剂400 μL 重悬, 避光, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min, 立即上流式细胞仪检测细胞周期变化。

1.6 Annexin V-FITC/PI检测细胞凋亡

取对数生长期的细胞, 按 1×10^6 细胞/孔接种于6孔板中, 分别加入DMSO和桦木脑(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 培养48 h后收集细胞; 用PBS洗涤细胞2次, 2 000 r/min离心5 min, 去上清; 用100 μL 结合缓冲液重悬细胞, 加入5 μL Annexin V-FITC和10 μL PI, 避光, 室温孵育15 min, 立即上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.7 RNA-seq表达数据库分析

提取并纯化各个培养条件下细胞的总RNA, rRNA去除、建库以及ABI SOLID测序, 每种条件完成10 Gb的测序, 利用ABI SOLID自带软件Lifescop™进行数据处理; 确定基因组中的所有转录单元(transcription units, TUs), 并计算TUs的表达丰度, 将TUs对应到相应基因, 计算基因的表达量(reads per kilobase per million mapped reads, RPKM), 并通过序列的比对, 确定转录单元剪切模式; 通过DEGseq软件比较各组基因的表达量, 确定差异表达基因, 利用分析软件对差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)进行生物学通路分析, 筛选出显著的生物学通路。

1.8 筛查差异表达基因及其功能分析

以DMSO组为对照, 通过DEGseq软件包确定DEGs, FDR(false discovery rate) <0.01 或 P 值 $<0.000\ 44$ 。筛选后的DEGs用Web-Gestalt软件进行通路分析和转录因子富集分析。

1.9 qRT-PCR验证

按照Trizol试剂说明书提取各组细胞的总RNA, 并用TaKaRa的逆转录试剂盒将RNA逆转录成cDNA, 以cDNA为模板扩增内参和目的基因。qRT-PCR反应体系: 10 μL SYBR Green、1 μL PCR引物、7 μL DEPC水和10 μL cDNA模版。循环条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s; PCR反应95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 重复40个循环。熔解曲线分析95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。

1.10 Western blot验证

吸掉培养皿中旧的培养基, 用PBS洗细胞3次, 向6孔板细胞中每孔加入200 μL RIPA裂解液, 摇床上裂解30 min, 然后将裂解的细胞蛋白液转移到预冷的EP管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心15 min, 收集上

清液, 利用Western blot实验进行分析。

1.11 ChIP-Seq数据分析

从Encode计划中(<https://www.encodeproject.org/>)下载SREBP1的HepG2细胞的ChIP-Seq实验数据, ENCODE编号: ENCSR000EEO。利用R语言的数据包(ChIP-seeker包)对ChIP-Seq实验数据进行整合分析, 对转录因子结合位点的临近基因进行预测。

1.12 ChIP-PCR验证

HepG2细胞以 10^6 个/mL细胞密度接种于10 cm培养皿, 按Magna ChIP A-17-408试剂盒说明书的步骤操作。甲醛交联组蛋白和DNA, 超声打断DNA, 加入SREBP-1染色质免疫沉淀抗体沉淀, 蛋白G琼脂糖珠收集抗体绑定的组蛋白-DNA复合物, 逆转组蛋白-DNA交联, 用蛋白酶K处理和纯化DNA。ChIP实验后, 用qRT-PCR方法检测目的抗体免疫沉淀下来的DNA。根据预测结果中TFBS序列信息, 选取6个位点进行ChIP-PCR验证(引物设计列表见表1)。扩增产物片段大小为80~120 bp, GC含量为40%~60%。用 β -action作为内参。

1.13 双荧光素酶报告系统

在24孔板中铺 1×10^5 个/mL细胞, 24 h贴壁后用Lipo 2000将转录因子表达质粒和报告基因质粒转染到HepG2细胞中, 转染48 h后用120 μL 细胞裂解液充分裂解细胞; 然后将样品按照30 μL 的体积加入测量管中, 另外加入100 μL 荧光素酶测定试剂充分混匀, 之后测定RLU (relative light unit), 同时设置细胞裂解液为对照孔。

1.14 数据统计

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示, 显著性差异分析用SPSS 11.5软件进行, 两组数据间比较采用两独立样本的 t 检验。 $*P < 0.05$ 具有显著性差异, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 具有极显著性差异。

2 结果

2.1 桦木脑抑制HepG2细胞的增殖

浓度分别为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的桦木脑处理HepG2细胞24~96 h后, 用MTT法检测细胞的增殖情况。结果表明, 相较于DMSO对照组, 桦木脑处理下HepG2细胞增殖受到显著抑制, 桦木脑浓度越大, 抑制越明显(图1A); 如图1B所示, 随着培养时间的延长抑制作用越显著, 桦木脑在浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下效果最好。

2.2 桦木脑诱导HepG2细胞周期阻滞及凋亡

用DMSO和桦木脑(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理HepG2细胞48 h后,用流式细胞仪测定细胞周期变化。相较于DMSO对照组,桦木脑处理后使肝癌细胞阻滞在G₂/M期(图2A和图2B),且周期蛋白和周期蛋白激酶,如CDK1(cyclin dependent kinase 1)、CDC25B(cell division cycle 25B)等mRNA水平呈下调趋势,而周期抑制蛋白,如P21(cyclin-dependent kinase inhibitor 1A)、P27(cyclin dependent kinase inhibitor 1B)等mRNA水平上调(图2C)。Western blot结果也表明,桦木脑处理组CDK1、CDC25A的蛋白表达量下降(图2D)。

用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒检测桦木脑诱导HepG2细胞凋亡的能力。相较于DMSO对照组,桦木脑处理HepG2细胞凋亡明显增加(图3A和图3B),促凋亡基因(如BAX等)mRNA表达量上调,

而抑凋亡基因(如BCL-XL、BCL-2等)mRNA表达量呈下调趋势(图3C)。综上所述表明,桦木脑能够诱导HepG2细胞凋亡,并且使肝癌细胞阻滞在G₂/M期。

2.3 桦木脑通过抑制SREBP1影响基因转录

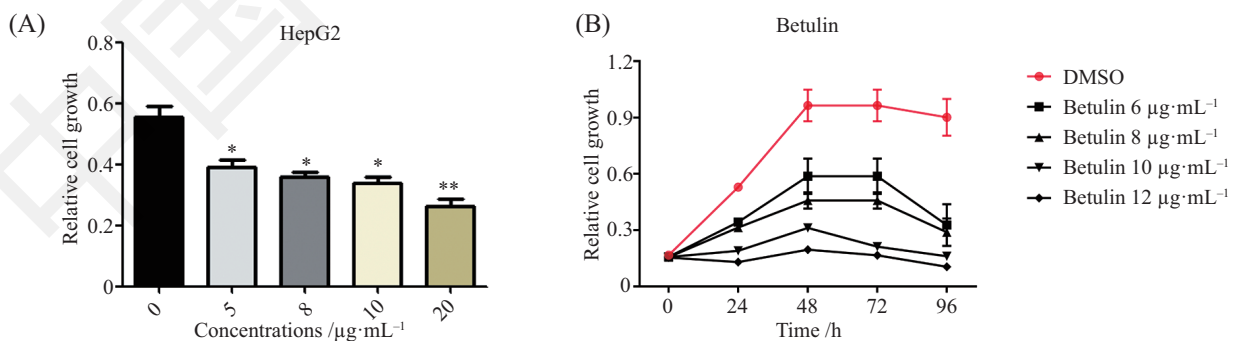
为了探讨桦木脑抑制肝癌的分子机制,本课题使用RNA-seq分析桦木脑对肝癌细胞转录的影响。在桦木脑和DMSO处理下HepG2细胞中共确定17 339个表达基因,任意一组的RPKM(reads per kilobase per million mapped reads) >0。如图4A所示,在基因组水平两组的基因表达量有很好的线性相关($r^2=0.499$),说明实验有很好的重复性。桦木脑和DMSO组间比较筛选到993个DEGs(FDR<0.01或P<0.000 44),占表达基因的5.73%,其中上调基因464个,下调基因529个。

为了证实桦木脑对SREBP1的潜在影响,我们

表1 6个靶基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of six target genes

基因 Gene	位点 Position	基因组大小 Genomic size	上游引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')	产物大小 Product size
PIK3R3	chr1:4659847046598839	370 bp	CTC TCC ATC TCG ACT TTC ACG	CCG GAT CGT ACC ATT CTG AT	104 bp
CYCS	chr7:2516485225165221	370 bp	TAC CGG TGT AAG TGC AAC CA	GAC TGG AGC CAA TGA GGT G	104 bp
ENDOG	chr9:131580744131581042	299 bp	CTT AAA TGC GCA AAG AAA GGA	GAC CTC CCT TCC ACT CAC AA	109 bp
FASN	chr17:8005603580056332	298 bp	CGT CTC TCT GGC TCC CTC TA	CCA AGC TGT CAG CCC ATG T	89 bp
LSS	chr21:4764872647648968	243 bp	AGG CGC TCA GGC TTA GGT	CAA GCG CTC CAC CAC TGT	100 bp
Gck	chr7:4419860344198928	326 bp	TGT AGC CTT GGA GCG TAA GG	GAG CCC TTT CAG TGC AGA AG	100 bp

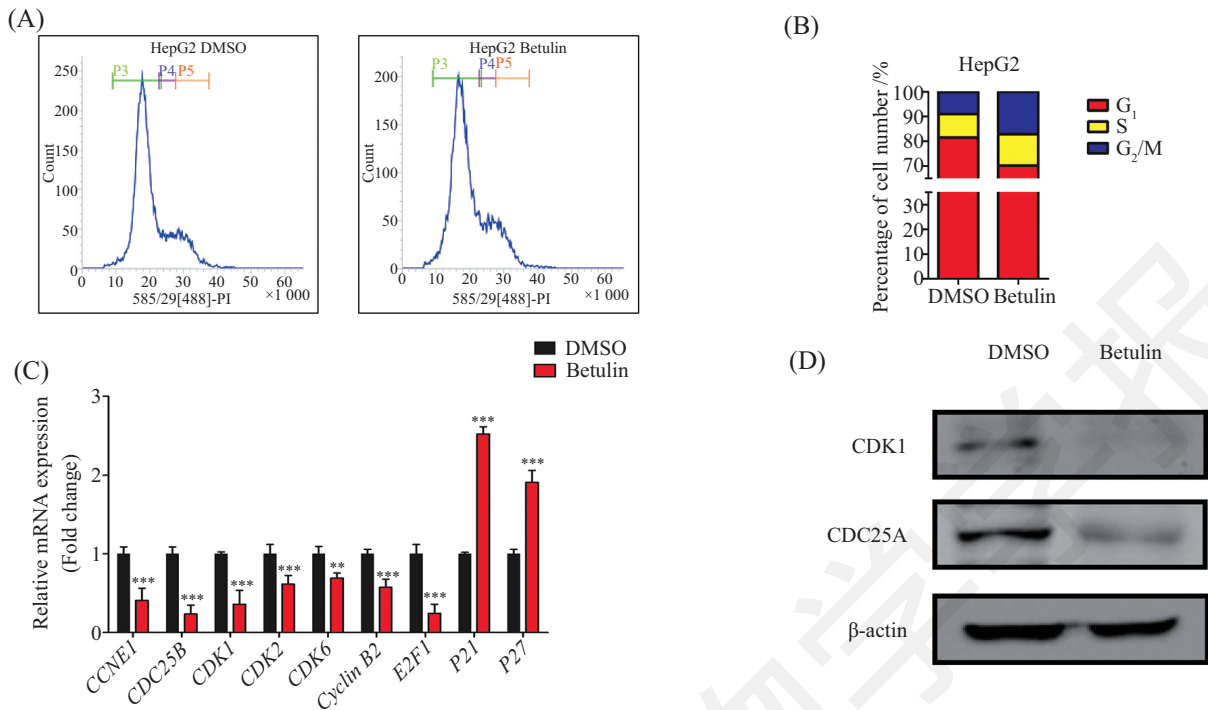


A: 桦木脑显著抑制HepG2细胞的增殖; B: 不同浓度桦木脑对细胞增殖的影响(浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理HepG2细胞24 h、48 h、72 h、96 h)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与DMSO对照组比较。

A: betulin can significantly inhibit the proliferation of HepG2 cells; B: effects of different concentrations of betulin on the proliferation of HepG2 cells (the concentrations of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ treated for 24 h, 48 h, 72 h, 96 h). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs DMSO group.

图1 桦木脑对HepG2细胞增殖的影响

Fig.1 Effects of betulin on the proliferation of HepG2 cells

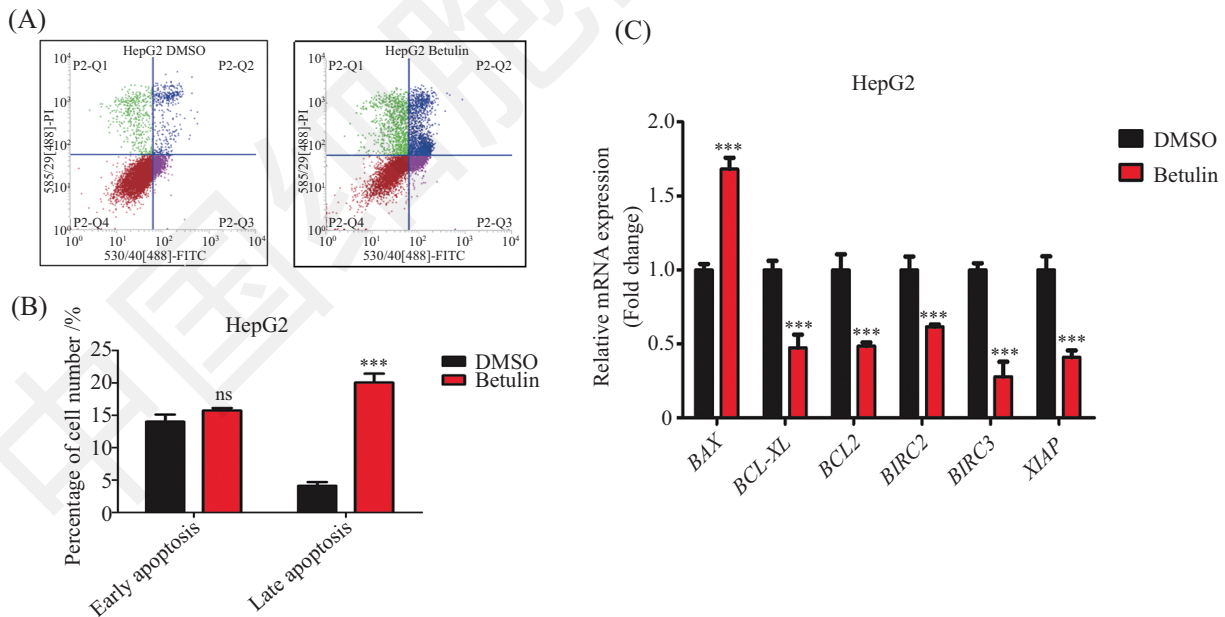


A: DMSO组和桦木脑组HepG2细胞周期分析; B: A的量化图; C: qRT-PCR检测周期相关蛋白和蛋白激酶mRNA表达水平; D: Western blot检测CDK1、CDC25A的蛋白表达量。*** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与DMSO对照组比较。

A: cell cycle analysis of HepG2 cells under DMSO and Betulin treatment; B: quantization map of Fig.A; C: qRT-PCR detection of mRNA expression levels of cycle-associated protein and protein kinase; D: Western blot analysis of protein expression levels of CDK1 and CDC25A. *** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs DMSO group.

图2 桦木脑对HepG2细胞周期的影响

Fig.2 Effects of Betulin on the cell cycle of HepG2 cells

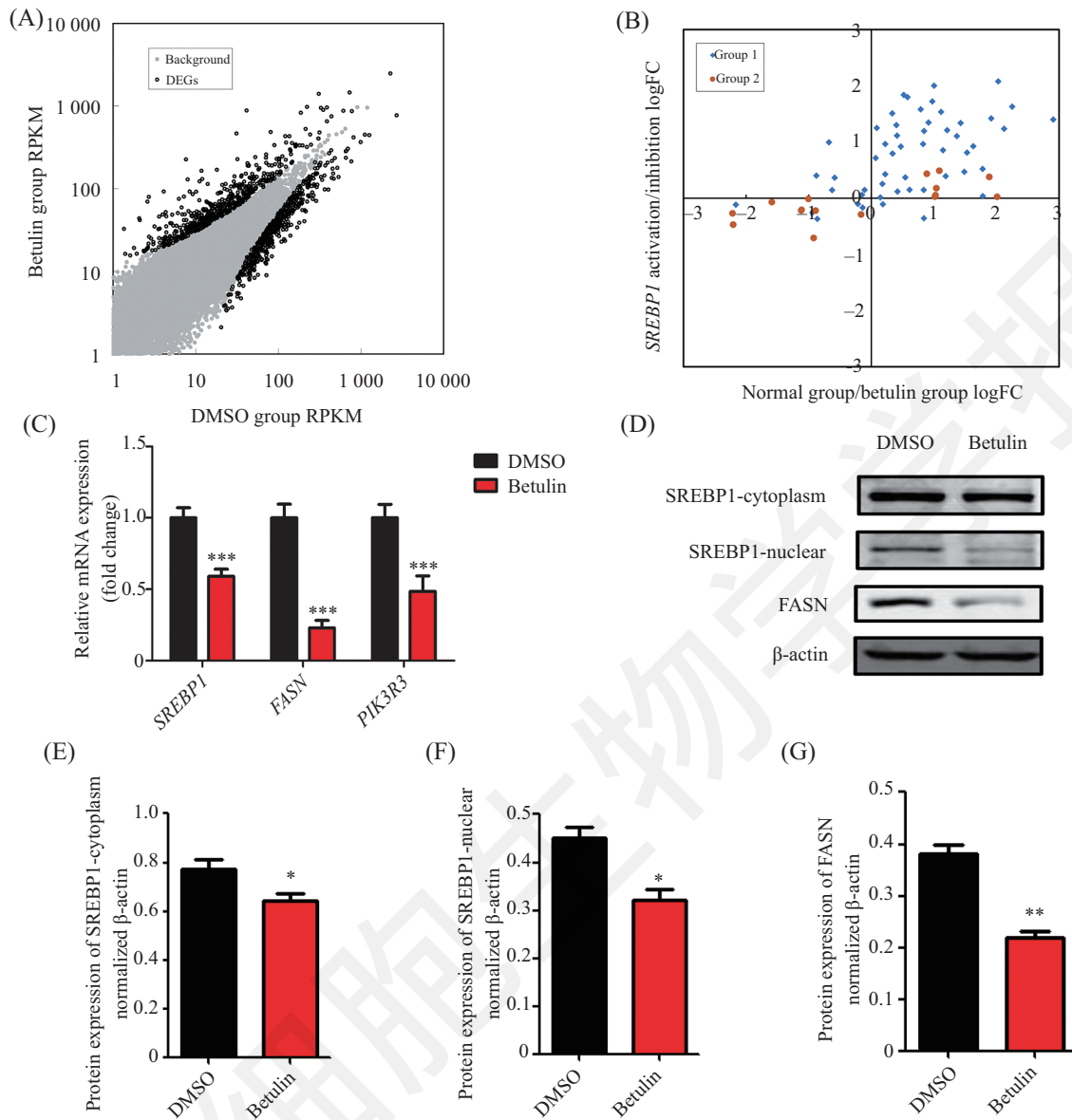


A: DMSO组和桦木脑组HepG2细胞凋亡分析; B: A的量化图; C: qRT-PCR检测凋亡基因mRNA表达水平。*** $P < 0.001$, 与DMSO对照组比较; ns代表无统计学意义差异。

A: apoptosis analysis of HepG2 cells under DMSO and Betulin treatment; B: quantization map of Fig.A; C: qRT-PCR detection of mRNA expression levels of apoptotic genes. *** $P < 0.001$ vs DMSO group. ns stands for no significance.

图3 桦木脑对HepG2细胞凋亡的影响

Fig.3 Effects of Betulin on the apoptotic of HepG2 cells



A: 桦木脑和DMSO处理下HepG2细胞的差异表达基因分析; B: 已知SREBP1靶基因在桦木脑处理及SREBP1激活下差异表达的分析; C: qRT-PCR检测SREBP1、FASN、PIK3R3的mRNA表达水平; D: Western blot分析核内SREBP1、FASN蛋白表达水平(β -actin做内参); E~G: D的量化图。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ 与DMSO对照组比较。

A: analysis of differentially expressed genes in HepG2 cells under Betulin and DMSO treatment; B: analysis of differential expression of the known SREBP1 target gene under Betulin treatment and SREBP1 activation; C: qRT-PCR detection of mRNA expression levels of SREBP1, FASN and PIK3R3; D: Western blot analysis of protein expression levels of nuclear SREBP1 and FASN (β -actin as internal reference); E-G: quantization map of Fig.D.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ vs DMSO group.

图4 桦木脑对肝癌细胞基因转录的影响

Fig.4 Effects of Betulin on gene transcription of Hepatocellular Carcinoma cell

分别整理了前期研究较多的19个SREBP1靶基因及Brian^[26]的文章中所报道的61个SREBP1直接调控的靶基因(在refed状态下高表达大于1.75倍)。分析表明,桦木脑处理后这些基因的表达变化与文献报道相同(图4B, group 1为61个与Reed等^[26]的文章报道的SREBP1靶基因, group 2为公认的研究较多的19个SREBP1靶基因),提示桦木脑通过抑制影响肝癌细胞

中基因转录过程。本研究选取了3个与脂质代谢相关的SREBP1靶基因进行qRT-PCR实验和Western blot实验验证:桦木脑处理下,SREBP1、FASN和PIK3R3的mRNA表达量相较于DMSO对照组呈明显下调趋势(图4C)。核内的SREBP1及其下游调控的靶基因FASN的蛋白表达量也下降(图4D~图4G)。综上所述,验证了桦木脑通过抑制SREBP1核型的激活,调

控*SREBP1*下游靶基因的表达,是*SREBP1*的抑制剂。

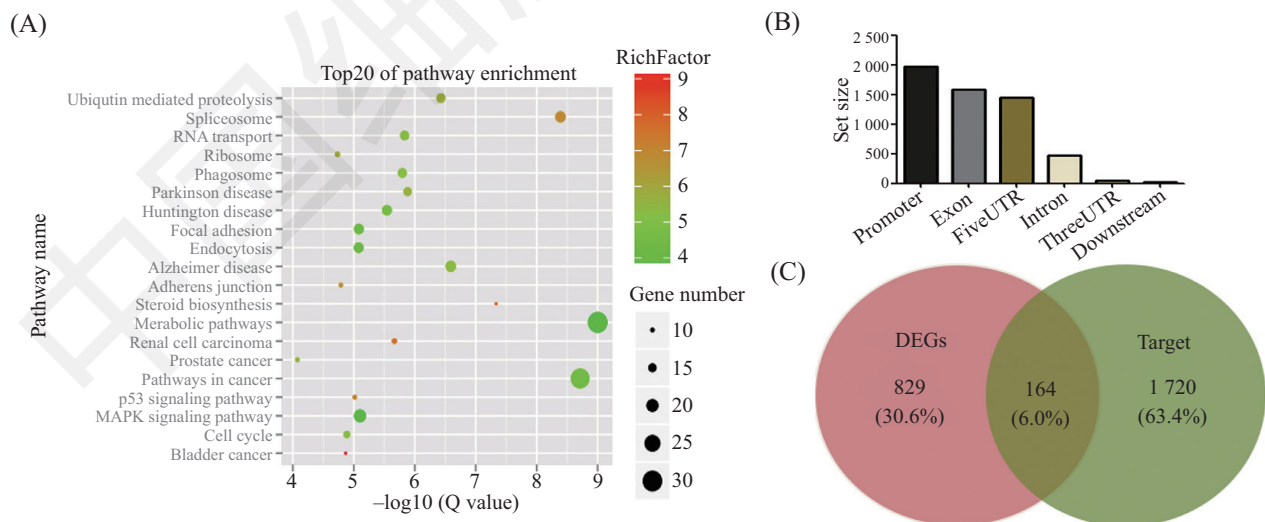
2.4 桦木脑通过*SREBP1*调控凋亡基因*PIK3R3*

为了深入了解桦木脑对HepG2细胞中基因表达调控的生物学意义,课题组基于993个DEGs进行了通路富集分析。分析显示,差异表达基因富集于33个功能学通路($P < 0.01$),结果如图5A所示,在前20个富集通路中,2个通路(steroid biosynthesis、metabolic pathways)与脂质代谢相关,再次印证了*SREBP1*可以调控脂质代谢。7个通路(renal cell carcinoma、prostate cancer、pathways in cancer、P53 signaling pathway、MAPK signaling pathway、cell cycle、bladder cancer)与肿瘤表型相关,其中包含调控细胞周期的通路($P = 1.3 \times 10^{-5}$, 基因13个,富集度为5.12)。结果提示,桦木脑可通过抑制*SREBP1*分别影响脂质代谢和肿瘤细胞的生存。

为了发现*SREBP1*直接调控的下游基因(桦木脑直接影响的基因),我们从Encode计划中的ChIP-Seq数据进行统计分析。使用R语言(ChIP-seeker包)进行分析后,发现*SREBP1*在全基因中共有2 585个结合位点。通过这些结合位点的物理信息(染色体号、起始位置、终止位置),并对其进行功能诠释(图1),我们发现76.5%(1 977/2 585)的结合位点位于基因的启动子区域(以TSS为中心 $\pm 3 000$ bp,图5B),涉及1 884个基因。这些结果均提示,*SREBP1*作为转录因子主要结合于下游基因的启动子区域发挥调控功能。进一步

整合DEGs和*SREBP1*下游基因数据,共有164个DEGs的启动子区有*SREBP1*的结合位点,即为*SREBP1*可调控基因(图5C)。细胞凋亡相关的基因*PIK3R3*(图6A)、细胞色素C(cytochrome C, *CYCS*)(图2)的启动子区域存在*SREBP1*的结合位点。其中*SREBP1*对*CYCS*的直接调控已有报道^[1]。我们对*SREBP1*在*PIK3R3*启动子上的结合位点进行预测。预测结果如图6B和图6C所示,*SREBP1*在*PIK3R3*启动子中有3个潜在的结合位点,分别是BS1(+183~+193)、BS2(+41~+51)和BS3(+7~+17)。同时我们选取6个靶基因设计引物,进行ChIP-PCR验证实验。结果如图6D所示,阴性抗体IgG的ChIP-PCR结果见图3,与阳性对照组(*FASN*、*LSS*)和阴性对照组(*Gck*)相比,细胞凋亡相关的3个靶基因(*endonuclease G*、*ENDOG*、*PIK3R3*和*CYCS*)成功扩出条带,其中*PIK3R3*扩增出的条带最亮。

为了验证桦木脑对*PIK3R3*直接调控,我们构建了*PIK3R3*-PGL3-BASIC质粒,转染HepG2细胞。用浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 的桦木脑处理HepG2细胞48 h后,通过双荧光素酶报告系统检测*SREBP1*对*PIK3R3*的直接调控作用。结果表明,*PIK3R3*启动子区域荧光素酶强度比转录因子区域和增强子区域的表达量高,说明*PIK3R3*的启动子上有*SREBP1*的结合位点,*SREBP1*可以直接结合到*PIK3R3*的启动子上。同时,桦木脑处理组的*PIK3R3*的表达明显下降,表明桦木脑可以抑制*PIK3R3*的表达(图6E)。另外桦木脑处理

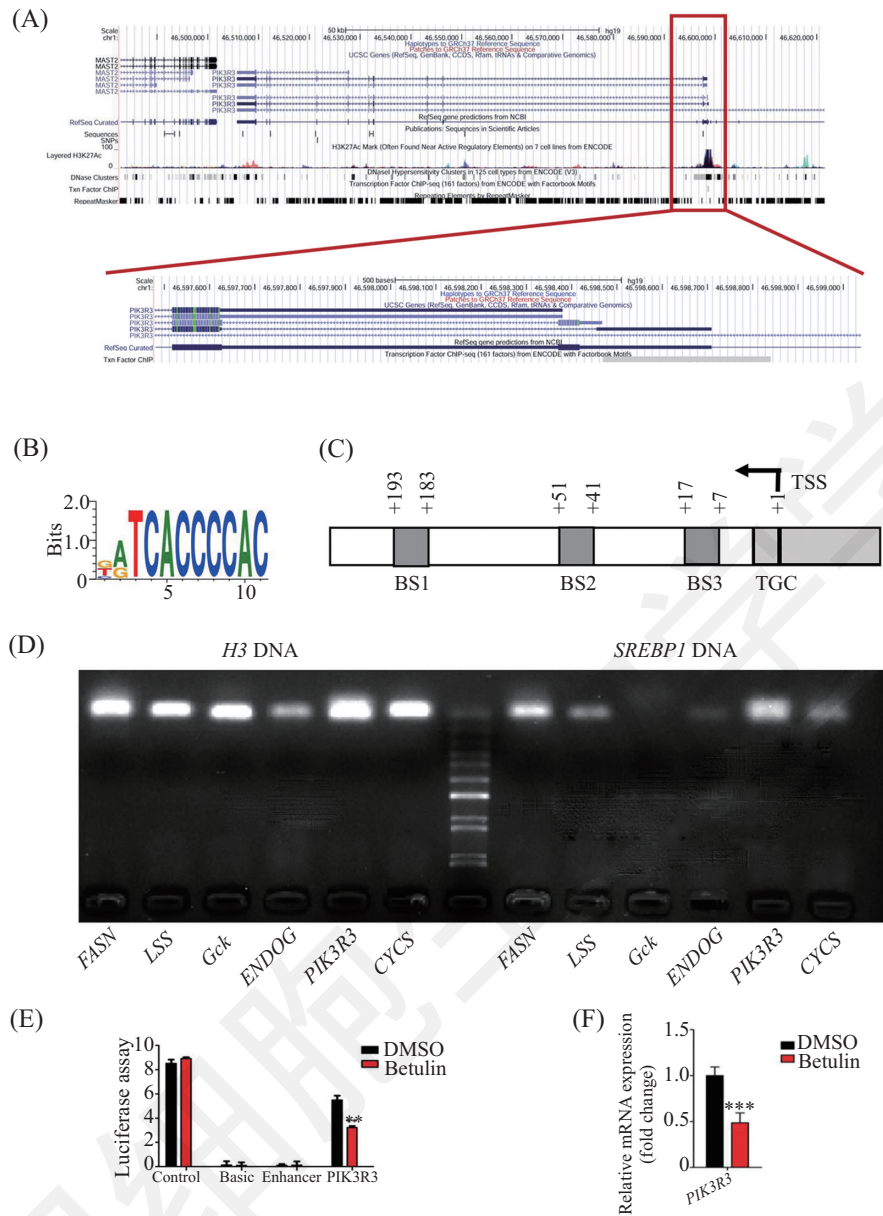


A: 前20个差异表达基因的通路富集分析; B: *SREBP1*结合位点在基因相关区域中的诠释; C: *SREBP1*转录组学及调控组学整合分析。

A: the first 20 pathway enrichment analysis of differentially expressed genes; B: interpretation of the *SREBP1* binding site in gene related regions; C: integration analysis of *SREBP1* transcriptomics and regulatory ensemble.

图5 转录因子靶基因的预测

Fig.5 Prediction of transcription factor target genes



A: *SREBP1* 结合在 *PIK3R3* 的启动子区, 红框代表 *SREBP1* 的结合位点区域, 下图为结合区域的放大模式图; B: *SREBP1* 结合位点序列图; C: *PIK3R3* 启动子中3个潜在的 *SREBP1* 结合位点示意图; D: *SREBP1* 靶基因ChIP-PCR结果; E: 双荧光素酶报告系统实验证明 *SREBP1* 对 *PIK3R3* 的直接调控作用; F: qRT-PCR实验验证桦木脑处理下 *PIK3R3* 的mRNA表达量。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ 与 DMSO 对照组比较。

A: *SREBP1* binds to the promoter region of *PIK3R3*, the red box represents the binding site area of *SREBP1*, and the following figure is an enlarged schematic diagram of the binding area; B: map of *SREBP1* binding site sequence; C: schematic illustration of three potential *SREBP1*-binding sites in the *PIK3R3* promoter; D: ChIP-PCR results of *SREBP1* target genes; E: demonstration of the direct regulation of *SREBP1* on *PIK3R3* by Dual-Luciferase Reporter System; F: verification of mRNA expression of *PIK3R3* on betulin treatment by qRT-PCR assay. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ vs DMSO group.

图6 转录因子靶基因的功能分析

Fig.6 Functional analysis of transcription factor target genes

下 *PIK3R3* 的 mRNA 表达量也下调(图 6F), 由此说明, 桦木脑通过抑制 *SREBP1* 的功能从而下调凋亡基因 *PIK3R3* 的表达。

3 讨论

研究提示, 脂类代谢与肝癌发生发展密切相关^[27-28],

癌细胞在脂代谢的不同方面都表现出特异改变。脂代谢酶活性的变化受致癌信号的直接调控。肿瘤细胞对脂代谢失调的依赖性提示我们, 脂代谢相关蛋白可作为抗癌靶标^[29]。已有许多研究以脂代谢为靶向的抗癌治疗, 开发出多种针对脂类合成酶的抑制剂(如针对 *FASN* 的小分子化合物等)^[30]。虽然这类

药物大多数还未进入临床实验,但细胞和动物水平的结果提示,其具有较好的抗肝癌潜能。目前研究的热点是参与脂肪酸合成的关键酶。更重要的是这些关键酶是SREBP1调控的靶基因所编码。研究发现,SREBP1在肿瘤细胞中高表达^[31-33],因此有学者提出SREBP1可以作为治疗癌症的候选分子,筛查SREBP1的特异性抑制剂可抑制肿瘤。

本课题组前期实验通过用桦木脑处理HepG2细胞,MTT细胞增殖实验发现,桦木脑可以抑制HepG2的增殖;细胞凋亡周期实验也表明,桦木脑能够诱导HepG2细胞凋亡,并且能够使肝癌细胞阻滞在G₂/M期。且桦木脑处理下SREBP1的蛋白表达水平明显降低,但暂时不能明确“桦木脑是否通过抑制SREBPs达到抗肝癌作用”。所以我们针对这个疑问进行了进一步的机制探究。

机制方面,使用RNA-seq实验技术筛选出HepG2细胞中的差异表达基因,然后通过KEGG通路富集分析验证了RNA-Seq分析结果的可靠性,且得出桦木脑处理下会影响脂质代谢通路的表达。再对脂质代谢相关转录因子进行通路分析,结果验证了桦木脑确实是通过SREBP1发挥作用,影响SREBP1的靶基因,是SREBP1的抑制剂。qRT-PCR实验和Western blot实验验证了这一结果:在桦木脑处理下,SREBP1及其下游调控的靶基因FASN、LSS的mRNA水平和蛋白表达量相较于DMSO对照组呈明显下调趋势。同时,在Li^[34]等的研究中,他们使用肝脏特异性gp78-或SCAP-缺陷小鼠和桦木脑处理的C57BL/6J小鼠来评估SREBP途径在肝癌发展中的作用。结果表明,脂质生物合成在调节肝癌起始和发展中起关键作用,并且桦木脑可通过靶向SREBP途径起调节肝癌作用。通过KEGG通路分析,发现SREBP1调控的差异表达基因中包含参与调控细胞凋亡的基因。通过ChIP-Seq技术和ChIP-seeker分析,确定以TSS为中心-3000 bp~+3000 bp为SREBP1靶基因的启动子区,筛选出SREBP1调控的与细胞凋亡相关的基因PIK3R3。通过双荧光素酶报告系统验证了SREBP1对PIK3R3的直接调控作用,且桦木脑可下调凋亡基因PIK3R3的表达。这个发现是本课题的一个创新点。通过上述结果,我们发现了以SREBP1为靶向新的抗肝癌的机制:桦木脑通过SREBP1直接下调凋亡基因PIK3R3的表达促进细胞凋亡,抑制肝癌细胞增殖,促进细胞凋亡从而达到抗肝癌的目的。

PIK3R3是磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, PI3K)家族的成员,通过其独特的N-端结构域特异性结合细胞生长关键蛋白,如Rb蛋白和PCNA(proliferating cell nuclear antigen),在细胞增殖、细胞分化、肿瘤血管形成和肿瘤生长中起关键性作用^[35-37]。据报道,PIK3R3是一种致癌基因,参与肝癌、卵巢癌和乳腺癌等多种癌症的发生发展^[38-40]。此外,有研究表明,PIK3R3可以调控AKT/mTOR信号通路,从而影响肿瘤细胞的生存、增殖和迁移^[41,38]。因此,我们从cBio癌症基因组学门户中收集了375个肝癌患者和50个非肝癌组织的TCGA转录数据。结果表明,肝癌组织中的PIK3R3表达程度较非肝癌患者程度高($P<0.001$)。综合以上结果得出,PIK3R3的高表达可能在肿瘤的发生发展中起到重要作用,并可能作为肿瘤预后的潜在生物标志物。

综上,本实验的研究结果显示,桦木脑能够显著抑制肝癌细胞HepG2的增殖,诱导其凋亡,并且使肝癌细胞阻滞在G₂/M期;桦木脑抑制肝癌新的作用机制是:通过SREBP1直接下调凋亡基因PIK3R3的表达促进细胞凋亡,抑制肝癌细胞增殖。

参考文献 (References)

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- 2 Guo J, Fu YC, Becerra CR. Dissecting role of regulatory factors in NF-kappaB pathway with siRNA. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26(7): 780-8.
- 3 Xu L, Li P, Lin XJ, Yuan YF, Zhang YQ, Chen MS. Clinical observation of sorafenib monotherapy in Chinese patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Chinese journal of oncology* 2009; 31(1): 58-61.
- 4 樊嘉,王征. 肝癌外科治疗的进展. *实用医院临床杂志(Fan Jia, Wang Zheng. Advancements in the surgical treatment of hepatocellular carcinoma. Practical Journal of Clinical Medicine)* 2011; 8(1): 16-9.
- 5 王石发,张明光,李艳苹. 桦木醇提取及纯化工艺的研究. *林产化学与工业(Wang Shifa, Zhang Mingguang, Li Yanping. Study on extraction and purification of betulin from birch bark. Chemistry and Industry of Forest Products)* 2007; 27(6): 22-6.
- 6 Yamashita T, Honda M, Takatori H, Nishino R, Minato H, Takamura H, et al. Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2009; 50(1): 100-10.
- 7 Swierczynski J, Hebanowska A, Sledzinski T. Role of abnormal lipid metabolism in development, progression, diagnosis and therapy of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20(9):

- 2279-303.
- 8 Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(10): 763-77.
- 9 Huang X, Ma J, Xu J, Su Q, Zhao J. Simvastatin induces growth inhibition and apoptosis in Hep G2 and Huh7 hepatocellular carcinoma cells via upregulation of Notch1 expression. *Mol Med Rep* 2015; 11(3): 2334-40.
- 10 Kuo HC, Chang LC, Chen TC, Lee KC, Lee KF, Chen CN. Sterol regulatory element-binding protein-1c regulates inflammasome activation in gingival fibroblasts infected with high-glucose-treated porphyromonas gingivalis. *Front Cell Infect Microbiol* 2016; 6: 195.
- 11 Li Y, Xu S, Jiang B, Cohen RA, Zang M. Activation of sterol regulatory element binding protein and NLRP3 inflammasome in atherosclerotic lesion development in diabetic pigs. *PLoS One* 2013; 8(6): e67532.
- 12 Shen Y, Volrath SL, Weatherly SC, Elich TD, Tong L. A mechanism for the potent inhibition of eukaryotic acetyl-coenzyme a carboxylase by soraphen A, a macrocyclic polyketide natural product. *Molecular Cell* 2004; 16(6): 881-91.
- 13 Tang JJ, Li JG, Qi W, Qiu WW, Li PS, Li BL, *et al.* Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metab* 2011; 13(1): 44-56.
- 14 Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002; 109(9): 1125-31.
- 15 Williams KJ, Argus JP, Zhu Y, Wilks MQ, Marbois BN, York AG, *et al.* An essential requirement for the SCAP/SREBP signaling axis to protect cancer cells from ipotoxicity. *Cancer Res* 2013; 73(9): 2850-62.
- 16 Liu FH, Song JY, Shang XR, Meng XR, Ma J, Wang HJ. The gene-gene interaction of INSIG-SCAP-SREBP pathway on the risk of obesity in Chinese children. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 538-64.
- 17 Yan C, Chen J, Chen N. Long noncoding RNA MALAT1 promotes hepatic steatosis and insulin resistance by increasing nuclear SREBP-1c protein stability. *Sci Rep* 2016; 6: 226-40.
- 18 Wu WJ, Tang SYY, Shi JF, Yin WW, Cao S, Bu RF, *et al.* Metformin attenuates palmitic acid-induced insulin resistance in L6 cells through the AMP-activated protein kinase/sterol regulatory element-binding protein-1c pathway. *Int J Mol Med* 2015; 35(6): 1734-40.
- 19 Tong X, Li P, Zhang D, VanDommelen K, Gupta N, Rui L, *et al.* E4BP4 is an insulin-induced stabilizer of nuclear SREBP-1c and promotes SREBP-1c-mediated lipogenesis. *J Lipid Res* 2016; 57(7): 1219-30.
- 20 Chu X, Liu L, Na L, Lu H, Li S, Li Y, *et al.* Sterol regulatory element-binding protein-1c mediates increase of postprandial stearic acid, a potential target for improving insulin resistance, in hyperlipidemia. *Diabetes* 2013; 62(2):561-71.
- 21 Krawczyk M, Grünhage F, Lammert F. Identification of combined genetic determinants of liver stiffness within the SREBP1c-PNPLA3 pathway. *Int J Mol Sci* 2013; (14): 21153-66.
- 22 Price NL, Holtrup B, Kwei SL, Wabitsch M, Rodeheffer M, Bianchini L, *et al.* SREBP-1c/MicroRNA 33b genomic loci control adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 2016; 36(7): 1180-93.
- 23 Zhang L, Huang D, Wang Q, Shen D, Wang Y, Chen B, *et al.* MiR-132 inhibits expression of SIRT1 and induces pro-inflammatory processes of vascular endothelial inflammation through blockade of the SREBP-1c metabolic pathway. *Cardiovasc Drugs Ther* 2014; 28(4): 303-11.
- 24 Zhai X, Yan K, Fan J, Niu M, Zhou Q, Zhou Y, *et al.* The beta-catenin pathway contributes to the effects of leptin on SREBP-1c expression in rat hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Br J Pharmacol* 2013; 169(1): 197-212.
- 25 Yu HL, Miao HT, Gao LF, Li L, Xi YD, Nie SP, *et al.* Adaptive responses by mouse fetus to a maternal HLE diet by downregulating SREBP1: a microarray- and bio-analytic-based study. *J Lipid Res* 2013; 54(12): 3269-80.
- 26 Reed Brian D, Charos Alexandra E, Szekely Anna M, Weissman Sherman M, Snyder Michael. Genome-wide occupancy of SREBP1 and its partners NFY and SP1 reveals novel functional roles and combinatorial regulation of distinct classes of genes. *PLoS Genet* 2008; 4: e1000133.
- 27 Xu T, Shen X, Seyfert HM. Stearoyl-CoA desaturase 1 expression is down regulated in liver and udder during E. coli mastitis through enhanced expression of repressive C/EBP factors and reduced expression of the inducer SREBP1A. *BMC Mol Biol* 2016; 17(1): 16.
- 28 Oishi Y, Spann NJ, Link VM, Muse ED, Strid T, Edillor C, *et al.* SREBP1 contributes to resolution of pro-inflammatory TLR4 signaling by reprogramming fatty acid metabolism. *Cell Metab* 2017; 25(2): 412-27.
- 29 Morioka S, Sai K, Omori E, Ikeda Y, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J. TAK1 regulates hepatic lipid homeostasis through SREBP. *Oncogene* 2016; 35(29): 3829-38.
- 30 Lee HJ, Jung YH, Choi GE, Ko SH, Lee SJ, Lee SH, *et al.* BNIP3 induction by hypoxia stimulates FASN-dependent free fatty acid production enhancing therapeutic potential of umbilical cord blood-derived human mesenchymal stem cells. *Redox Biol* 2017; 13: 426-43.
- 31 McRae S, Iqbal J, Sarkar-Dutta M, Lane S, Nagaraj A, Ali N, *et al.* The hepatitis C Virus-induced NLRP3 inflammasome activates the sterol regulatory element-binding protein (SREBP) and regulates lipid metabolism. *J Biol Chem* 2016; 291(7): 3254-67.
- 32 Li S, Oh YT, Yue P, Khuri FR, Sun SY. Inhibition of mTOR complex 2 induces GSK3/FBXW7-dependent degradation of sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) and suppresses lipogenesis in cancer cells. *Oncogene* 2016; 35(5): 642-50.
- 33 Li N, Zhou ZS, Shen Y, Xu J, Miao HH, Xiong Y, *et al.* Inhibition of the sterol regulatory element-binding protein pathway suppresses hepatocellular carcinoma by repressing inflammation in mice. *Hepatology* 2017; 65(6): 1936-47.
- 34 Li N, Zhou ZS, Shen Y, Xu J, Miao HH, Xiong Y, *et al.* Inhibition of the sterol regulatory element-binding protein pathway suppresses hepatocellular carcinoma by repressing inflammation in mice. *Hepatology* 2017; 65(6): 1936-47.
- 35 Wang G, Cao X, Lai S, Luo X, Feng Y, Xia X, *et al.* PI3K stimulates DNA synthesis and cell-cycle progression via its p55PIK

- regulatory subunit interaction with PCNA. *Mol Cancer Ther* 2013; 12(10): 2100-9.
- 36 Wang G, Chen C, Yang R, Cao X, Lai S, Luo X, *et al.* p53/PIK-PI3K stimulates angiogenesis in colorectal cancer cell by activating NF- κ B pathway. *Angiogenesis* 2013; 16(3): 561-73.
- 37 Cao G, Dong W, Meng X, Liu H, Liao H, Liu S. MiR-511 inhibits growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma cells by targeting PIK3R3. *Tumour Biol* 2015; 36(6): 4453-9.
- 38 Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Liang S, Hasegawa K, *et al.* Integrative genomic analysis of phosphatidylinositol 3'-kinase family identifies PIK3R3 as a potential therapeutic target in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13(18): 5314-21.
- 39 Klahan S, Wu MS, Hsi E, Huang CC, Hou MF, Chang WC. Computational analysis of mRNA expression profiles identifies the ITG family and PIK3R3 as crucial genes for regulating triple negative breast cancer cell migration. *BioMed Res Int* 2014; 2014: 536591.
- 40 Yu T, Li J, Yan M, Liu L, Lin H, Zhao F, *et al.* MicroRNA-193a-3p and -5p suppress the metastasis of human non-small-cell lung cancer by downregulating the ERBB4/PIK3R3/mTOR/S6K2 signaling pathway. *Oncogene* 2015; 34(4): 413-23.

中国细胞生物学学报