

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.02.008
文章编号: 1005-8982 (2024) 02-0045-08

实验研究·论著

慢性丙型肝炎病毒对肝癌细胞静止的影响及其机制研究*

罗鸣, 杨晋, 秦蜀

(西南医科大学附属医院 肝胆外科, 四川 泸州 646000)

摘要: **目的** 探讨慢性丙型肝炎病毒(HCV)通过PCNA钳位相关因子(PCLAF)调控肝癌细胞静止的潜在机制。**方法** HCV感染后, 检测肝癌细胞HUH7的细胞周期分布。HCV感染或不感染后, 肝癌细胞进行RNA-seq, 使用siRNA敲低差异基因并检测细胞周期分布。过表达PCLAF后检测肝癌细胞的细胞周期分布。过表达HCV的非结构蛋白5A(NS5A)后, 检测肝癌细胞PCLAF的表达和细胞周期分布。PCLAF抑制剂 α -常春藤皂苷处理后, 检测HCV对肝癌细胞周期分布的影响。**结果** HCV感染后, 肝癌细胞G0期和G1期细胞分布减少($P < 0.05$), 而S期和G2/M期细胞分布增加($P < 0.05$)。敲低PCLAF后肝癌细胞G0期细胞分布增加($P < 0.05$)。HCV感染的情况下, 过表达PCLAF后肝癌细胞G0期细胞分布减少($P < 0.05$)。过表达NS5A后, 肝癌细胞PCLAF mRNA和蛋白相对表达量升高($P < 0.05$)。过表达NS5A后, 肝癌细胞G0期和G1期细胞分布减少($P < 0.05$), 而S期和G2/M期细胞分布增加($P < 0.05$)。但过表达NS5A的同时敲低PCLAF后, 肝癌细胞的细胞周期分布无显著变化。过表达NS5A同时 α -常春藤皂苷处理后, 肝癌细胞的细胞周期无显著变化。HCV感染同时 α -常春藤皂苷处理后, 肝癌细胞的细胞周期无显著变化。**结论** HCV诱导肝癌细胞跨越G0/G1期静止, 减少细胞分裂时间。HCV的NS5A蛋白通过提高PCLAF的表达而抑制肝癌细胞静止。PCLAF抑制剂 α -常春藤皂苷可以阻断HCV抑制的肝癌细胞静止。

关键词: 肝癌; 慢性丙型肝炎病毒; PCNA钳位相关因子; 细胞静止; 非结构蛋白5A; α -常春藤皂

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

Effect of HCV on hepatocellular carcinoma cell quiescence and its underlying mechanism*

Luo Ming, Yang Jin, Qin Shu

(Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University,
Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: **Objective** To explore the potential mechanism by which hepatitis C virus (HCV) regulates hepatocellular carcinoma (HCC) cell quiescence through PCNA clamp associated factor (PCLAF). **Methods** The cell cycle distribution of HCC cell line HUH7 was detected after HCV infection. RNA-seq was performed on HCC cells infected with HCV or not, and the cell cycle distribution was detected following knockdown of differential genes using siRNA or overexpression of PCLAF. After overexpression of HCV nonstructural protein 5A (NS5A), the expression of PCLAF in and the cell cycle distribution of HCC cells were determined. The effect of HCV on the cell cycle distribution of HCC cells was observed after treatment with the PCLAF inhibitor α -hederin. **Results** After HCV infection, the percentages of HCC cells in the G0 phase and the G1 phase were decreased ($P < 0.05$), while

收稿日期: 2023-06-30

* 基金项目: 四川省科技计划项目(No:2023YFQ0101)

[通信作者] 秦蜀, E-mail: 15883062343@163.com; Tel: 15883062343

those in the S phase and the G2/M phase were increased ($P < 0.05$). The percentage of HCC cells in the G0 phase was increased after knockdown of PCLAF ($P < 0.05$). In the case of HCV infection, the percentage of HCC cells in the G0 phase was decreased after overexpression of PCLAF ($P < 0.05$). Following overexpression of NS5A, the relative mRNA and protein expressions of PCLAF in HCC cells were increased ($P < 0.05$), the percentages of HCC cells in the G0 phase and the G1 phase were decreased ($P < 0.05$), and the percentages of HCC cells in the S phase and the G2/M phase were increased ($P < 0.05$). However, the cell cycle distribution was not significantly changed after overexpression of NS5A and knockdown of PCLAF. Combined overexpression of NS5A and treatment with α -hederin and combined HCV infection and treatment with α -hederin also did not alter the cell cycle distribution of HCC cells. **Conclusions** HCV induces HCC cells to skip the quiescence in the G0/G1 phase and to reduce the time for cell division. HCV NS5A protein inhibits HCC cell quiescence by increasing the expression of PCLAF, which could be blocked by the PCLAF inhibitor α -hederin.

Keywords: hepatocellular carcinoma; HCV; PCLAF; cell quiescence; NS5A; α -hederin

肝癌是世界第 7 大常见肿瘤,也是第 4 大癌症死亡原因^[1]。尽管癌症治疗已取得进展,但肝癌的治疗选择有限,患者存活率无显著提高。因此,确定驱动或抑制肿瘤发生的机制对于制订新的肝癌治疗策略至关重要。体细胞在终末分化时保持静止状态,这一过程的变化可导致细胞静止退出和过度增殖,并且参与癌症的发生、发展^[2]。多种基因在细胞周期中起至关重要的作用,其表达失调与多种癌症有关,其中 PCNA 钳位相关因子(PCNA clamp associated factor, PCLAF)基因表达失调与肝癌细胞周期失调并跨越细胞静止相关^[3]。慢性丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染与肝癌风险增加有关^[4]。尽管丙型肝炎能够治愈,但是 HCV 相关肝癌的死亡人数仍占总肝癌死亡人数的 29%^[5]。然而, HCV 感染是否会影响肝癌细胞静止尚不明确。基于此,本研究旨在探讨 HCV 通过 PCLAF 调控肝癌细胞静止的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系

人肝癌细胞 HUH7 购自浙江美森细胞科技有限公司(货号:CTCC-003-0019),人肝癌细胞 BEL-7404 购自深圳市优里生物科技有限公司(货号:yl-cl-0032)。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 主要试剂 α -常春藤皂苷(美国 MedChemExpress 公司,货号:HY-N0255),DMEM(北京军科弘创生物技术有限公司,货号:AC10003-500 mL),Lipofectamine 3000(广州群贤科技有限公司,货号:L3000015),pyronin Y(深圳市优里生物科技有限

公司,货号:C5496-10g),7-氨基放线菌素 D(7-aminoactinomycin, 7-ADD)(上海吉至生化科技有限公司,货号:A93190-1mg),RNA 提取试剂盒(上海机纯实业有限公司,货号:JLC2093),逆转录试剂盒(昆明云亨汇科技有限公司,货号:EZB-RT2GQ), β -actin 抗体(沈阳万类生物科技有限公司,货号:WL01372),PCLAF 抗体(深圳市优里生物科技有限公司,货号:E-AB-53019)。

本研究所有的 siRNA 和 PCLAF 过表达质粒均由北京擎科生物设计合成。对于过表达质粒,根据美国国立生物技术信息中心数据库中 PCLAF(序列识别号为 NP_055551.1)和 HCV 多聚蛋白(序列识别号为 NP_671491.1)的序列进行密码子优化及全基因合成,随后使用无缝克隆法连接至 PCDNA 3.1 载体(携带 Flag 标签)。其中,HCV 的多聚蛋白总共表达 10 个蛋白质,分别为核心蛋白(Capsid, C)、包膜蛋白 1(Envelop 1, E1)、包膜蛋白 2(Envelop 2, E2)、蛋白分子 7(Protein 7, p7)、非结构蛋白 2(non-structural protein 2, NS2)、非结构蛋白 3(non-structural protein 3, NS3)、非结构蛋白 4A(non-structural protein 4A, NS4A)、非结构蛋白 4B(non-structural protein 4B, NS4B)、非结构蛋白 5A(non-structural protein 5A, NS5A)、非结构蛋白 4B(non-structural protein 5B, NS5B)^[6]。根据蛋白质序列,PCLAF 蛋白大小约为 28.77 kD,HCV 蛋白 C、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B 大小分别约为 7.60、20.78、41.07、6.70、21.29、15.42、5.67、19.84、40.89 和 57.80 kD。siRNA 引物序列见表 1。

1.2.2 主要仪器 细胞培养箱(上海川宏实验仪器有限公司,型号:CH-180-SQ),流式细胞仪(德国赛多利斯集团,型号:iQue 3),StepOne Plus 实时 PCR 系

表 1 siRNA 引物序列

基因	引物序列	长度/bp
siTENM1	5'-CCTATGTGATTGCAGTGCATTTGTT-3'	25
siMAP3K9	5'-CCCAAAAGAAGAAGGACGGACGTGG-3'	25
siSESN3	5'-AGCTAGACATCAGTGTCTTACTTA-3'	25
siRAB7B	5'-GAAACTCATTATCGTCGGAGCCATT-3'	25
siGGA3	5'-AGACCAAGGTTATTGAGCTGCTGTA-3'	25
siCBL	5'-CAGCCACATGCTGGCAGAACT-3'	21
siZNF501	5'-GAATTCCAGCCAAATATCACTCAGA-3'	25
siMADD	5'-CTCTCAAGCGCCTGGTGGACTGCT-3'	22
siHADHB	5'-CCTGCTCACACTGTCACCATGG-3'	25
siPCLAF	5'-GGTGCGGACTAAAGCAGACAGTGTT-3'	25

统(美国赛默飞世尔科技公司,型号:4376600),化学发光仪(北京德泉兴业商贸有限公司,型号:AI800)。

1.3 方法

1.3.1 病毒感染与细胞培养 人肝癌细胞 HUH7 在高糖 Dulbecco's Modified Eagle's 培养基中培养,添加 10% 胎牛血清、100 nmol/L 非必需氨基酸、100 u/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素。细胞在 37 ℃、5% 二氧化碳加湿培养箱中培养。传染性 HCV JFH-1 是通过将体外转录的基因组 JFH-1 RNA 转染 HUH7 细胞产生的^[6]。HCV JFH-1 感染 HUH7 或 BEL-7404 细胞时,感染倍数为 0.1。将含有 PCLAF 的质粒(pCMV-PCLAF)或 siPCLAF 分别转染到 HUH7 细胞上进行过表达或沉默表达。使用 Lipofectamine 3000 将质粒或 siRNA 转染 HUH7 细胞。研究发现,α-常春藤皂苷可以抑制 PCLAF 的功能^[7]。因此使用 α-常春藤皂苷作为 PCLAF 的抑制剂,并且 α-常春藤皂苷处理细胞的终浓度为 20 μmol/L。

1.3.2 实验分组 HUH7 细胞行 HCV 感染实验,分为两组:Mock 组、HCV 组。HUH7 细胞行 HCV 感染或不感染后敲低实验,转染各个基因的 siRNA 后,分为 11 个亚组:siNC 亚组、siTENM1 亚组、siMAP3K9 亚组、siSESN3 亚组、siRAB7B 亚组、siGGA3 亚组、siCBL 亚组、siZNF501 亚组、siMADD 亚组、siHADHB 亚组、siPCLAF 亚组。HUH7 细胞行过表达 PCLAF 实验,分为两组:Vector 组、PCLAF 组。HUH7 细胞行过表达 HCV 多聚蛋白实验,转染各自过表达质粒,分为 11 组:Vector 组、C 组、E1 组、E2 组、p7 组、NS2 组、NS3 组、

NS4A 组、NS4B 组、NS5A 组、NS5B 组。HUH7 细胞行过表达 NS5A 的同时敲低 PCLAF 实验,分为 4 组:Vector + siNC 组、Vector + siPCLAF 组、NS5A + siNC 组、NS5A + siPCLAF 组。对过表达 NS5A 的同时 α-常春藤皂苷处理实验,分为 4 组:Vector + DMSO 组、Vector + α-Hederin 组、NS5A + DMSO 组、NS5A + α-Hederin 组。对 HCV 感染的同时 α-常春藤皂苷处理实验,分为 4 组:Mock + DMSO 组、Mock + α-Hederin 组、HCV + DMSO 组、HCV + α-Hederin 组。

1.3.3 细胞周期分布的检测 用 70% 乙醇在 -20 ℃ 条件下固定胰蛋白酶化细胞 2 h,磷酸盐缓冲盐水洗涤 2 次。然后将 1 × 10⁶ 个细胞重悬,用 20 μg/mL RNase A 和 50 μg/mL 碘化丙啶溶液孵育 30 min。采用流式细胞仪检测不同处理组 HUH7 细胞 G0/G1 期、S 期和 G2/期。对于 G0 期细胞的检测,使用同时期培养的 HUH7 细胞,用双胸苷阻断法将细胞阻滞在 G1/S 期。新鲜的乙醇固定细胞与 Pyronin Y 1 μg/mL 和 7-氨基放线菌素 D 5 μg/mL)在 37 ℃ 条件下作用 45 min,流式分选分析将低 RNA 含量的细胞(低 pyronin Y 信号)定义为 G0 细胞。G1 期细胞分布定义为 G0/G1 期细胞分布减去 G0 期细胞分布。

1.3.4 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测 PCLAF mRNA 的表达 使用通用 RNA 提取试剂盒从 HUH7 细胞中提取细胞总 RNA。对于 RNA-seq,将总 RNA 交于深圳华大基因科技有限公司进行测序,根据测序结果选取差异表达最大的 10 个基因进行后续筛选实验。按照逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,随后采用 SYBR Green PCR Master Mix 和 StepOne Plus 实时 PCR 系统。反应条件:95 ℃ 预变性 2 min,95 ℃ 变性 3 s,25 ℃ 退火 2 min,50 ℃ 延伸 15 min,共计 44 个循环,55 ℃ 继续延伸 30 s。以 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 PCLAF mRNA 相对表达量。qRT-PCR 引物序列见表 2。

表 2 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列	长度/bp
PCLAF	正向: 5'-CCAGGGTAAACAAGGAGACG-3'	1
	反向: 5'-CAGGAAGCAGTGGCTTAGGA-3'	1
GAPDH	正向: 5'-TGTGGGCATCAATGGATTTGG-3'	21
	反向: 5'-ACACCATGTATTCCGGGTCAAT-3'	21

1.3.5 Western blotting 检测 PCLAF 蛋白的表达
使用细胞裂解液对 HUH7 细胞进行裂解,提取总蛋白。蛋白定量变性后,通过 SDS-PAGE 电泳分离样品,然后转移到聚偏二氟乙烯膜上。用 5% 脱脂乳溶液在室温下阻断膜 1 h,与一抗在 4 ℃ 条件下孵育过夜,然后与酶标二抗在室温下反应 1.5 h。免疫反应条带通过 Super Signal West Pico 化学发光底物显示。用 Image J 软件测量条带密度。数值归一化为 GAPDH。一抗分别为抗 GAPDH(1:2 000)、抗 PCLAF(1:1 000)。二抗分别为辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG(1:10 000)和山羊抗小鼠 IgG(1:50 000)。

1.4 统计学方法

数据分析采用 PRISM 6.0 统计软件。计量资以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用 *t* 检验或方差分析,进一步两两比较用 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCV 感染抑制肝癌细胞静止

Mock 组与 HCV 组 G0 期、G1 期、S 期、G2/M 期细胞数量比较,经 *t* 检验,差异均有统计学意义(*P* < 0.05); Mock 组 G0 期、G1 期细胞数量均高于 HCV 组,Mock 组 S 期、G2/M 期细胞数量均低于 HCV 组。见表 3 和图 1。

表 3 HCV 感染后肝癌细胞的细胞周期分布 (个/HP, $\bar{x} \pm s$)

组别	G0 期	G1 期	S 期	G2/M 期
Mock 组	16.54 ± 1.5	46.52 ± 4.95	17.77 ± 1.5	19.17 ± 2.23
HCV 组	8.66 ± 0.72	35.28 ± 4.01	24.49 ± 2.24	31.57 ± 3.20
<i>t</i> 值	10.592	3.945	5.574	7.109
<i>P</i> 值	0.000	0.004	0.000	0.000

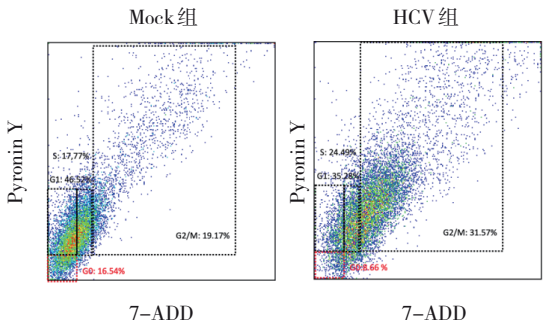


图 1 HCV 感染后肝癌细胞的细胞周期分布

2.2 HCV 通过 PCLAF 抑制肝癌细胞静止

Mock 组与 HCV 组 TENM1、MAP3K9、SESN3、RAB7B、GGA3、CBL、ZNF501、MADD、HADHB、PCLAF 相对表达量比较,经 *t* 检验,差异均有统计学意义(*P* < 0.05); Mock 组 TENM1、MAP3K9、SESN3、RAB7B、GGA3、CBL、ZNF501、MADD、HADHB、PCLAF 相对表达量均低于 HCV 组。见表 4 和图 2。

表 4 HCV 感染肝癌细胞后基因表达差异 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TENM1	MAP3K9	SESN3	RAB7B	GGA3
Mock 组	91.26 ± 9.61	15.04 ± 1.80	27.2 ± 2.41	42.75 ± 4.52	81.9 ± 9.71
HCV 组	599.58 ± 70.26	134.01 ± 12.15	247.19 ± 21.96	313.03 ± 26.02	637.4 ± 63.51
<i>t</i> 值	10.139	13.701	14.082	14.465	12.234
<i>P</i> 值	0.010	0.005	0.005	0.005	0.007

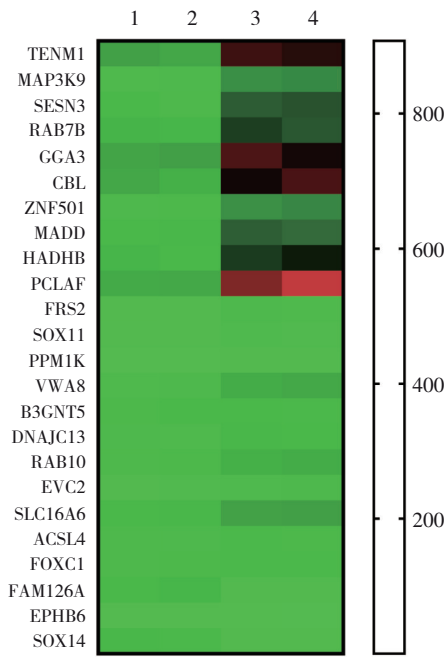
组别	CBL	ZNF501	MADD	HADHB	PCLAF
Mock 组	76.98 ± 7.91	15.75 ± 1.75	28.19 ± 2.79	41.07 ± 4.13	69.38 ± 8.13
HCV 组	494.14 ± 58.21	132.79 ± 15.13	242.44 ± 19.72	319.57 ± 28.77	757.6 ± 77.82
<i>t</i> 值	10.042	10.867	15.210	13.553	12.44
<i>P</i> 值	0.010	0.008	0.004	0.005	0.006

siNC 亚组与 siPCLAF 亚组 G0 期细胞数分别为 (8.75 ± 0.76)、(15.77 ± 1.60) 个/HP,经 *t* 检验,差异有统计学意义(*t* = 8.862, *P* = 0.000); siNC 亚组 G0 期细胞数低于 siPCLAF 亚组。见表 5。

人肝癌细胞 HUH7 中, Vector 组与 PCLAF 组 Mock 中 G0 期细胞数量分别为 (17.65 ± 1.79)、

(8.06 ± 0.95) 个/HP,经 *t* 检验,差异有统计学意义(*t* = 10.583, *P* = 0.000); Vector 组与 PCLAF 组 HCV 中 G0 期细胞数量分别为 (8.58 ± 0.90)、(4.90 ± 1.62) 个/HP,经 *t* 检验,差异有统计学意义(*t* = 4.440, *P* = 0.002); Vecotr 组 G0 期细胞数量高于 PCLAF 组。

人肝癌细胞 BEL-7404 中, Vector 组与 PCLAF 组



1:Mock1组; 2:Mock2组; 3:HCV1组; 4:HCV2组。

图2 HCV感染肝癌细胞后基因表达差异

Mock 中 G0 期细胞数量分别为 (18.68 ± 2.15) 、 (8.25 ± 0.93) 个/HP, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=9.956, P=0.000$); Vecotr 组 G0 期细胞数量高于

PCLAF 组。Vector 组与 PCLAF 组 HCV 中 G0 期细胞数量分别为 (9.03 ± 0.93) 、 (5.10 ± 0.59) 个/HP, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=7.979, P=0.000$); Vecotr 组 G0 期细胞数量高于 PCLAF 组。

2.3 HCV 的 NS5A 调控 PCLAF 表达影响肝癌细胞静止

11 组 PCLAF mRNA 和蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); Vector 组 PCLAF mRNA 和蛋白相对表达量均低于 NS5A 组 ($P<0.05$), 见表 6 和图 3。

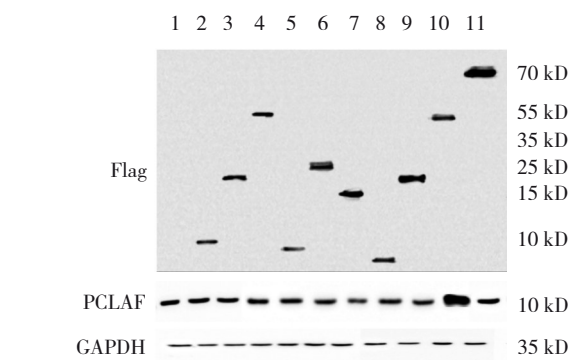
Vector + siNC 组、Vector + siPCLAF 组、NS5A + siNC 组、NS5A + siPCLAF 组的 G0 期、G1 期、S 期、G2/M 期细胞数量比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); Vector + siNC 组 G0 期、G1 期细胞数量均少于 Vector + siPCLAF 组 ($P<0.05$), Vector + siNC 组 G0 期、G1 期细胞数量均多于 NS5A + siNC 组 ($P<0.05$), Vector + siNC 组 S 期、G2/M 期细胞数量均多于 Vector + siPCLAF 组 ($P<0.05$), Vector + siNC 组的 S 期、G2/M 期细胞数量均少于 NS5A + siNC 组 ($P<0.05$)。见表 7 和图 4。

表 5 HCV 感染或不感染后敲低差异表达的基因肝癌细胞的 G0 期细胞分布 (个/HP, $\bar{x} \pm s$)

组别	siNC	siTENM1	siMAP3K9	siSESN3	siRAB7B	siGGA3	siCBL	siZNF501	siMADD	siHADHB	siPCLAF
Mock 组	16.29 ± 1.33	16.68 ± 1.58	16.8 ± 1.44	16.27 ± 1.87	15.14 ± 1.55	15.67 ± 1.84	16.9 ± 1.46	17.72 ± 1.95	16.71 ± 1.47	15.21 ± 1.5	22.89 ± 1.37
HCV 组	8.75 ± 0.76	8.35 ± 1.00	8.37 ± 0.83	9.1 ± 0.93	8.11 ± 0.95	9.32 ± 0.95	7.84 ± 0.67	7.91 ± 0.78	8.46 ± 0.85	9.02 ± 1.06	15.77 ± 1.60

表 6 过表达 HCV 各个蛋白肝癌细胞 PCLAF mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PCLAF mRNA	PCLAF 蛋白
Vector 组	0.04 ± 0.01	1.22 ± 0.14
C 组	0.02 ± 0.01	1.39 ± 0.12
E1 组	0.06 ± 0.02	1.50 ± 0.13
E2 组	0.04 ± 0.01	1.27 ± 0.14
p7 组	0.03 ± 0.01	1.17 ± 0.14
NS2 组	0.05 ± 0.01	1.22 ± 0.12
NS3 组	0.06 ± 0.01	1.27 ± 0.15
NS4A 组	0.04 ± 0.01	0.95 ± 0.11
NS4B 组	0.04 ± 0.01	1.30 ± 0.13
NS5A 组	0.24 ± 0.03	2.81 ± 0.41
NS5B 组	0.03 ± 0.01	1.35 ± 0.13
F 值	4.921	0.019
P 值	0.049	0.008



1:Vector组; 2:C组; 3:E1组; 4:E2组; 5:p7组; 6:NS2组; 7:NS3组; 8:NS4A组; 9:NS4B组; 10:NS5A组; 11:NS5B组。

图3 过表达HCV各个蛋白肝癌细胞PCLAF蛋白的表达

2.4 α -常春藤皂苷阻断 HCV 引起肝癌细胞静止

Vector + DMSO 组、Vector + α -Hederin 组、NS5A + DMSO 组、NS5A + α -Hederin 组的 G0 期、G1 期、S

表 7 过表达或不过表达 NS5A 与敲低或不敲低 PCLAF 后肝癌细胞的细胞周期分布 (个/HP, $\bar{x} \pm s$)

组别	G0期	G1期	S期	G2/M期
Vector + siNC组	15.29 ± 1.36	42.03 ± 3.69	16.10 ± 1.74	26.58 ± 2.84
Vector + siPCLAF组	21.54 ± 2.01 [†]	50.74 ± 5.93 [†]	12.08 ± 1.01 [†]	15.64 ± 1.72 [†]
NS5A + siNC组	7.92 ± 0.66 [†]	35.43 ± 3.45 [†]	23.39 ± 2.59 [†]	33.26 ± 2.66 [†]
NS5A + siPCLAF组	15.23 ± 1.41	44.76 ± 4.00	16.35 ± 1.82	23.67 ± 2.53
F值	74.608	10.522	31.403	43.521
P值	0.000	0.000	0.000	0.000

注：†与 Vector + siNC组比较, $P < 0.05$ 。

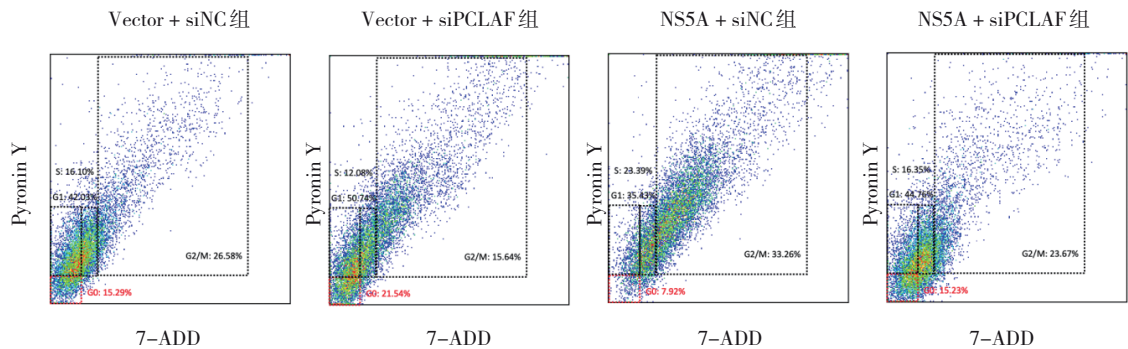


图 4 过表达或不过表达 NS5A 与敲低或不敲低 PCLAF 后肝癌细胞的细胞周期分布

期、G2/M 期细胞数量比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$); Vector + DMSO 组 G0 期、G1 期细胞数量均少于 Vector + α -Hederin 组($P < 0.05$), Vector + DMSO 组 S 期、G2/M 期细胞数量均少于 NS5A + DMSO 组($P < 0.05$)。见表 8 和图 5。

表 8 过表达或不过表达 NS5A 与 α -常春藤皂苷或不处理后肝癌细胞的细胞周期分布 (个/HP, $\bar{x} \pm s$)

组别	G0期	G1期	S期	G2/M期
Vector + DMSO组	14.96 ± 1.79	45.85 ± 4.95	16.73 ± 1.47	22.46 ± 2.26
Vector + α -Hederin组	21.65 ± 2.51 [†]	50.95 ± 4.08 [†]	14.29 ± 1.28 [†]	13.11 ± 1.36 [†]
NS5A + DMSO组	7.79 ± 0.63 [†]	32.23 ± 3.77 [†]	24.82 ± 2.23 [†]	35.15 ± 3.46 [†]
NS5A + α -Hederin组	16.01 ± 1.33	47.42 ± 5.40	16.86 ± 1.39	19.71 ± 2.24
F值	55.520	15.933	39.283	71.254
P值	0.000	0.000	0.000	0.000

注：†与 Vector + DMSO组比较, $P < 0.05$ 。

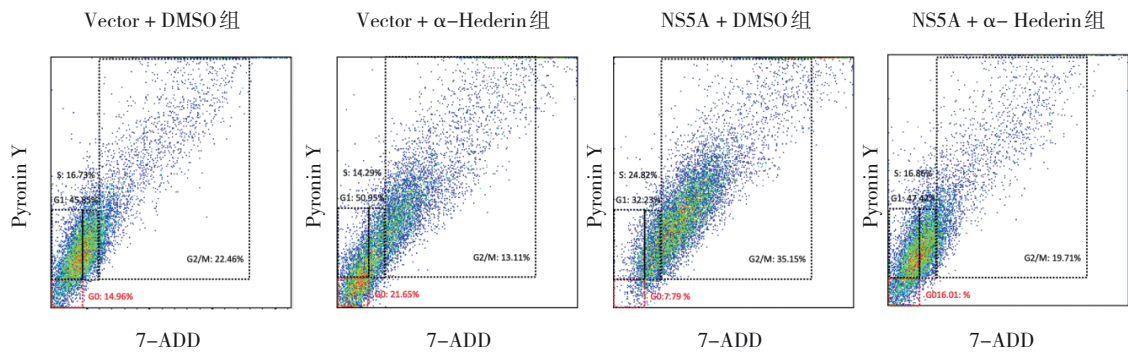


图 5 过表达或不过表达 NS5A 与 α -常春藤皂苷或不处理后肝癌细胞的细胞周期分布

Mock + DMSO 组、Mock + α -Hederin 组、HCV + DMSO 组、HCV + α -Hederin 组的 G0 期、G1 期、S 期、G2/M 期细胞数量比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); Mock + DMSO 组 G0 期、G1 期细胞数量均少于 Mock + α -Hederin 组 ($P < 0.05$), Mock +

DMSO 组 G0 期、G1 期细胞数量均多于 HCV + DMSO 组, Mock + DMSO 组 S 期、G2/M 期细胞数量均多于 Mock + α -Hederin 组 ($P < 0.05$), Mock + DMSO 组 S 期、G2/M 期细胞数量均少于 HCV + DMSO 组 ($P < 0.05$)。见表 9 和图 6。

表 9 HCV 感染或不感染与 α -常春藤皂苷或不处理后肝癌细胞的细胞周期分布 (个/HP, $\bar{x} \pm s$)

组别	G0 期	G1 期	S 期	G2/M 期
Mock + DMSO 组	16.31 $\pm$ 1.57	44.56 $\pm$ 1.66	17.30 $\pm$ 1.62	21.84 $\pm$ 2.04
Mock + α -Hederin 组	23.45 $\pm$ 2.34 [†]	47.68 $\pm$ 0.55 [†]	11.94 $\pm$ 0.99 [†]	16.93 $\pm$ 2.03 [†]
HCV + DMSO 组	9.06 $\pm$ 0.98 [†]	36.71 $\pm$ 4.02 [†]	23.24 $\pm$ 2.01 [†]	30.99 $\pm$ 3.39 [†]
HCV + α -Hederin 组	13.74 $\pm$ 1.55	42.61 $\pm$ 4.97	15.89 $\pm$ 1.86	27.76 $\pm$ 2.97
F 值	63.900	9.7152	39.522	27.291
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: [†]与 Mock + DMSO 组比较, $P < 0.05$ 。

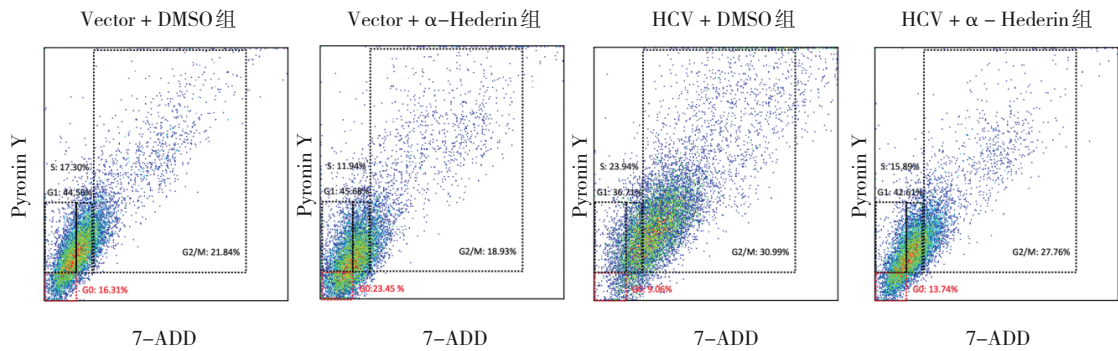


图 6 HCV 感染或不感染与 α -常春藤皂苷或不处理后肝癌细胞的细胞周期分布

3 讨论

肝细胞癌是全世界最常见的癌症之一, 也是病死率第 3 的癌症^[8]。HCV 感染是最常见的慢性感染之一, 影响着全世界超过 7 000 万人^[9]。慢性 HCV 感染对肝脏造成慢性损伤, 最终导致肝硬化和肝细胞癌^[10]。有趣的是, 有报道称 HCV 感染可能使患者易患某些肝外癌症, 如甲状腺癌、肾癌和肝癌^[11]。因此, 了解 HCV 在癌症发生、发展中的作用对制订新的肝癌治疗策略至关重要。在本研究中, HCV 感染后, 肝癌细胞 G0 期和 G1 期细胞分布减少, 而 S 期和 G2/M 期的细胞分布增加, 提示 HCV 诱导肝癌细胞跨越 G0 期静止, 减少细胞分裂时间。

本研究结果表明, HCV 的 NS5A 蛋白能够促进肝癌细胞 PCLAF mRNA 和蛋白表达升高; HCV 感染的情况下, 过表达 PCLAF 后肝癌细胞 G0 期细胞分布减少; 同时, 敲低 PCLAF 或 PCLAF 抑制剂 α -常春

藤皂苷处理后, HCV 诱导肝癌细胞跨越 G0 期静止的表型受到抑制。因此, HCV 通过 PCLAF 诱导肝癌细胞跨越 G0 期静止。有研究发现, PCLAF 能够使肝癌细胞绕过细胞静止期, 促进肺部肿瘤的发生^[4], 其促肿瘤作用与本研究结果一致。G0 期是细胞处于可逆细胞周期停滞的一种细胞状态^[12]。对多细胞来说, G0 状态是发育所必需的, 在发育谱系不同阶段的细胞, 包括干细胞、慢循环细胞和分化的成熟细胞, 在时间或空间上都有 G0 状态^[13]。癌细胞跨越 G0 状态后, 突破细胞静止状态, 进入快速增殖期是癌症发生、发展的关键^[14]。然而, 癌细胞也可以共享 G0 状态, 也称为休眠或静止癌细胞^[15]。静止的癌细胞是解释临床上观察到癌症休眠的一种机制。虽然停止增殖失控的癌细胞对多细胞生物体是有益的, 但处于休眠状态的同一癌细胞可以在大多数化疗和放疗中存活下来, 并且随着时间推移, 可能获

得更多突变,并在重新进入细胞周期时获得转移的潜力^[16]。因此,细胞静止稳态的失调是癌细胞发生、发展及规避治疗的关键。在肝癌中,HCV的NS5A蛋白引起PCLAF表达改变是造成肝正常细胞和肝癌细胞静止稳态失调的原因之一。

综上所述,HCV诱导肝癌细胞跨越G0/G1期静止,减少细胞分裂时间。HCV的NS5A蛋白通过提高PCLAF的表达而抑制肝癌细胞静止。PCLAF抑制剂 α -常春藤皂苷可以阻断HCV抑制的肝癌细胞静止。

参 考 文 献 :

- [1] XIA C F, DONG X S, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135(5): 584-590.
- [2] TOMASIN R, BRUNI-CARDOSO A. The role of cellular quiescence in cancer - beyond a quiet passenger[J]. *J Cell Sci*, 2022, 135(15): jcs259676.
- [3] KIM M J, CERVANTES C, JUNG Y S, et al. PAF remodels the DREAM complex to bypass cell quiescence and promote lung tumorigenesis[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(8): 1698-1714.e6.
- [4] TAGLIAMENTO M, CELLA E, SACCO G, et al. EP08.01-088 direct acting antivirals (DAA) and immune checkpoint inhibitors (ICIs) therapy in patients with lung cancer and hepatitis C[J]. *J Thorac Oncol*, 2022, 17(S9): S384-S385.
- [5] HUANG D Q, SINGAL A G, KONO Y, et al. Changing global epidemiology of liver cancer from 2010 to 2019: NASH is the fastest growing cause of liver cancer[J]. *Cell Metab*, 2022, 34(7): 969-977.e2.
- [6] WAKITA T, PIETSCHMANN T, KATO T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome[J]. *Nat Med*, 2005, 11(7): 791-796.
- [7] CAO L N, ZHANG Y W, MI J X, et al. α -Hederin inhibits the platelet activating factor-induced metastasis of HCC cells through disruption of PAF/PTAFR axis cascaded STAT3/MMP-2 expression[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 178: 106180.
- [8] HE B J, HU W B, ZHANG K, et al. Image segmentation algorithm of lung cancer based on neural network model[J]. *Expert Syst*, 2022, 39(3): e12822.
- [9] ALBERTS C J, CLIFFORD G M, GEORGES D, et al. Worldwide prevalence of hepatitis B virus and hepatitis C virus among patients with cirrhosis at country, region, and global levels: a systematic review[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2022, 7(8): 724-735.
- [10] ABDELMONEM M, WASIM H, ELHUSSENY A, et al. The association between serum hyaluronic acid levels and routine liver function tests in liver fibrotic HCV patients[J]. *Am J Clin Pathol*, 2022, 158(S1): S118-S119.
- [11] SHEN Y C, HSU H C, LIN T M, et al. H1-antihistamines reduce the risk of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus, hepatitis C virus, or dual hepatitis B virus-hepatitis C virus infection[J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(11): 1206-1219.
- [12] KADONOSONO T, MIYAMOTO K, SAKAI S, et al. AGE/RAGE axis regulates reversible transition to quiescent states of ALK-rearranged NSCLC and pancreatic cancer cells in monolayer cultures[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 9886.
- [13] CHAIPUTTANAPUN P, LIRDPRAPAMONGKOL K, THANAUSSAVADATE B, et al. Biphasic dose-dependent G0/G1 and G2/M cell-cycle arrest by synthetic 2,3-arylpipyridylindole derivatives in a549 lung cancer cells[J]. *ChemMedChem*, 2022, 17(14): e202200127.
- [14] PUSTOVALOVA M, BLOKHINA T, ALHADDAD L, et al. CD44⁺ and CD133⁺ non-small cell lung cancer cells exhibit DNA damage response pathways and dormant polyploid giant cancer cell enrichment relating to their p53 status[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 4922.
- [15] WIECEK A J, CUTTY S J, KORNAI D, et al. Genomic hallmarks and therapeutic implications of G0 cell cycle arrest in cancer[J]. *Genome Biol*, 2023, 24(1): 128.
- [16] BI L, XIE C L, JIAO L J, et al. CPF impedes cell cycle re-entry of quiescent lung cancer cells through transcriptional suppression of FACT and c-MYC[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(3): 2229-2239.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 罗鸣, 杨晋, 秦蜀. 慢性丙型肝炎病毒对肝癌细胞静止的影响及其机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(2): 45-52.

Cite this article as: LUO M, YANG J, QIN S. Effect of HCV on hepatocellular carcinoma cell quiescence and its underlying mechanism[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(2): 45-52.