

Aha1 基因过表达对黑色素瘤细胞凋亡的影响

蒋智文^{1,2,3}, 谢汶蓉^{1,2,3}, 王悦^{1,2,3}, 刘新光^{1,2,3,4}, 孙雪荣^{1,2,3*} (1.广东医科大学衰老研究所,广东东莞 523808; 2.广东省医学分子诊断重点实验室,广东东莞 523808; 3.广东医科大学东莞科研中心,广东东莞 523808; 4.广东医科大学生物化学与分子生物学研究所,广东湛江 524023)

摘要: 目的 研究 *Aha1* 基因在恶性黑色素瘤形成过程中的作用。方法 采用定量 PCR 和免疫印迹的方法检测并比较小鼠 B16F10 移植恶性黑色素瘤及瘤旁的组织中 *Aha1* 基因的表达。在恶性黑色素瘤 B16F10 细胞中转染真核表达载体过表达 *Aha1* 基因后,使用 CCK-8 法检测细胞的增殖,流式细胞术检测细胞的凋亡。结果 *Aha1* 在恶性黑色素瘤中的表达显著低于相应的瘤旁组织,过表达的 *Aha1* 基因导致黑色素瘤细胞的生长停滞,并促进黑色素瘤细胞 B16F10 的凋亡。结论 低表达的 *Aha1* 基因有利于恶性黑色素瘤的形成。

关键词: 恶性黑色素瘤; *Aha1* 基因; Hsp90; 细胞凋亡

中图分类号: R739.5

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2021)02-0129-04

Effect of *Aha1* overexpression on malignant melanocyte apoptosis

JIANG Zhi-wen^{1,2,3}, XIE Wen-rong^{1,2,3}, WANG Yue^{1,2,3}, LIU Xin-guang^{1,2,3,4}, SUN Xue-rong^{1,2,3*} (1. Institute of Aging Research, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Dongguan 523808, China; 3. Dongguan Scientific Research Center, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 4. Institute of Biochemistry & Molecular Biology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Objective To study the role of *Aha1* gene in the formation of malignant melanoma. Methods *Aha1* expression in B16F10 tumor xenograft and peritumoral tissues was determined by quantitative PCR and western blot assays. After *Aha1* was over-expressed in B16F10 cells by transfecting with eukaryotic expression vector, cell proliferation was detected by CCK-8 assay, and apoptosis was detected by flow cytometry. Results *Aha1* expression in malignant melanoma was significantly lower than that in peritumoral tissues. *Aha1* overexpression led to the stagnation of melanoma cell growth and promoted melanoma B16F10 cells apoptosis. Conclusion Low expression of *Aha1* is beneficial to the formation of malignant melanoma.

Key words: malignant melanoma; *Aha1* gene; Hsp90; apoptosis

AHA1(activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1) 为 Hsp90 的协调分子伴侣,对激活 Hsp90 的 ATPase 的活性至关重要^[1]。研究发现,Hsp90 在恶性黑色素瘤患者的血清及恶性黑色素瘤组织中的表达明显上调^[2-3],并且高表达的 Hsp90 已经成为黑色素瘤一种重要的分子标记^[4]。使用 Hsp90 蛋白的抑制剂抑制肿瘤细胞的增殖时,AHA1 的表达量却持续

上调^[5],表明 AHA1 的表达可能也与肿瘤的发生发展相关。有研究发现,AHA1 在骨肉瘤细胞中呈高表达^[6],并且 *Aha1* 基因的表达可以调节骨肉瘤细胞的增殖和细胞周期^[7]。我们前期的研究结果表明,*Aha1* 基因的表达参与调节恶性黑色素瘤细胞的增殖与细胞周期^[8],但是 *Aha1* 基因在黑色素瘤的形成过程中的作用尚未明了。本研究旨在研究 *Aha1* 基因是否参与黑色素瘤的形成以及对黑色素瘤细胞凋亡的影响。

基金项目: 国家自然科学基金(No.81671399),广东省自然科学基金(No.2020A1515010026),广东医科大学博士启动项目(No.B2019039)

收稿日期: 2020-10-09; **修订日期:** 2020-12-06

作者简介: 蒋智文(1982-),男,博士,助理研究员,E-mail:J_zhiwen@163.com

通信作者: 孙雪荣(1974-),男,博士,副教授,E-mail:xuerongsun@126.com

1 材料和方法

1.1 材料

B16F10 细胞购自中国科学院上海细胞库,无特定病原体(SPF)级 C57BL/6 小鼠购自中山大学实验中心。细胞培养基 DMEM 和血清 FBS 购自 Gibco 公司。pCMV-HA 与 pCMV-HA-AHA1 真核表达载体为本实

实验室前期自行构建的质粒。TRIzol 和 Lipofectamine™ 3000 购自 Invitrogen 公司, PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司, 荧光定量 PCR 试剂 TransStart Green qPCR SuperMix 购自北京全式金生物。RIPA 裂解液购自北京索莱宝公司, 蛋白酶抑制剂 Cocktail 购自 Thermo Scientific 公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司, 甲叉双丙烯酰胺购自 Bio-Rad 公司, TEMED、过硫酸铵、SDS 购自 Sigma 公司, 聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜购自 Millipore 公司, ECL 试剂盒购自 Pierce 公司。AHA1 抗体(sc-166065) 购自 Santa-Cruz 公司, α -Tubulin 抗体 (T5168) 购自 Sigma-Aldrich 公司。CCK8 试剂购自 Dojindo 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 使用含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 在体积分数为 5% CO₂、37 °C 的细胞培养箱中对 B16F10 细胞进行培养。

1.2.2 建立小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞移植瘤模型 以胰酶消化培养 B16F10 小鼠黑色素瘤细胞后, 使用 PBS 重悬 B16F10 细胞并进行计数, 制备 5×10^7 个细胞的悬液。然后在 SPF 级 C57BL/6 小鼠的皮下注射 0.1 mL 的 B16F10 细胞悬液(即 5×10^6 个细胞)。每次接种 5 只小鼠。观察并记录接种 B16F10 细胞后的 C57BL/6 小鼠身体质量、成瘤时间和肿瘤大小等信息。

1.2.3 小鼠黑色素瘤和瘤旁组织的收集 C57BL/6 小鼠成瘤 14 d 后, 脱颈处死小鼠后, 解剖取出小鼠黑色素瘤和瘤旁组织, 然后立即浸入液氮罐进行速冻。速冻后立即分别提取组织的 mRNA 和总蛋白质, 或将速冻后的黑色素瘤和瘤旁组织冻存于 -80 °C 冰箱中备用。

1.2.4 小鼠黑色素瘤和瘤旁组织中总 mRNA 和总蛋白质的提取 取液氮速冻的小鼠黑色素瘤和瘤旁组织, 以研磨机进行研磨后, 用 TRIzol 试剂提取组织中的总 RNA, 然后以 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂将 mRNA 逆转录成 cDNA, 置于 -20 °C 冰箱中保存备用; 使用 RIPA(添加蛋白酶抑制剂 Cocktail) 裂解研磨后的小鼠黑色素瘤和瘤旁组织, 再采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定提取组织中的总蛋白, 立即进行 SDS-PAGE, 或 -20 °C 冰箱中保存备用。

1.2.5 定量 PCR 使用 *Aha1* 的引物(上游 5'-CAG AGGACACTTTGCCACCA-3', 下游 5'-CTCGACCTT CCATGCACAGCT-3'), 内参 β -Actin 基因的引物(上游 5'-TGCCTGACATTAAGGAGAAGC, 下游 5'-AGGAAG GAAGGCTGGAAGAG-3'), 进行定量 PCR, 测定 *Aha1* 基因在小鼠黑色素瘤和瘤旁组织中的 mRNA 水平。

1.2.6 免疫印迹检测 配制 12% 分离胶后, 将测定浓度后并蛋白变性后的蛋白质加入浓缩胶中, 行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电泳结束后进行湿法转膜, 转膜后的 PVDF 膜使用 5% 脱脂奶粉在室温条件下进行封闭, 然后加入一抗于 4 °C 条件下孵育过夜, TBS+1% 吐温洗 3 次, 加入二抗并于室温条件下孵育 1 h, 再用 TBS+1% 吐温洗 3 次, 最后 ECL 化学发光液, 于 Azure Biosystems C400 凝胶成像系统曝光拍照。结果使用 mage J 进行灰度值分析, 实验至少重复 3 次。

1.2.7 细胞增殖检测 取对数生长期的 B16 细胞接种至 96 孔板, 每组设 4 个复孔。继续培养 24 h, 待细胞贴壁后, 使用 Lipofectamine™ 3000 试剂, 遵照操作说明分别转染空载体 pCMV-HA(对照组)和 AHA1 的过表达载体 pCMV-HA-AHA1(实验组)。继续培养 48 h 后, 每孔分别加入 10 μ L 的 CCK8 试剂, 然后转移至细胞培养箱继续培养 1 h 后, 使用多功能酶标仪测定细胞在 450 nm 处的吸光度。

1.2.8 AnnexinV-FITC/PI 双染检测细胞凋亡 取对数生长期的 B16 细胞制成 5×10^5 个/mL 单细胞悬液, 取 2 mL 接种于 6 孔板中。继续培养 24 h 后, 使用 Lipofectamine™ 3000 试剂分别转染空载体 pCMV-HA(对照组)和 AHA1 的过表达载体 pCMV-HA-AHA1(实验组)。转染 48 h, 使用胰酶消化细胞, 2 000 r/min 离心 10 min 后, 经 PBS 漂洗, 再用 $1 \times$ Binding Buffer, 重悬细胞至 1×10^6 个/mL。取细胞悬液 100 μ L 至流式管中, 按 AnnexinV-FITC/PI 试剂盒操作说明, 依次加入 FITC-Annexin V 和 PI 溶液, 室温避光孵育 30 min 后, 使用 BD FACS Canto II 流式细胞仪(BD, USA)进行检测。最后使用 FlowJo 7.6 软件对细胞凋亡的结果进行分析。

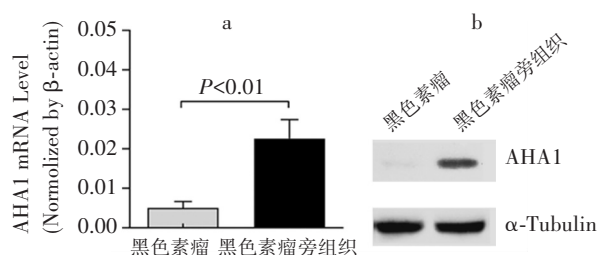
1.3 统计学处理

使用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *Aha1* 基因在黑色素瘤及瘤旁组织中的表达

提取小鼠黑色素瘤及瘤旁的组织后, 分别提取 RNA 后, 采用 qRT-PCR 的方法检测发现, 小鼠黑色素瘤旁的组织中 *Aha1* 基因的 mRNA 水平约为黑色素瘤中的 2 倍(图 1a); 提取小鼠黑色素瘤及瘤旁组织, 然后分别提取组织中的蛋白, 采用免疫印迹的方法检测发现, 黑色素瘤旁中的 AHA1 蛋白显著高于黑色素瘤组织(图 1b)。上述结果表明, 黑色素瘤中 *Aha1* 基因的表达显著低于黑色素瘤旁的组织中的表达。



a.黑色素瘤和瘤旁组织中 *Aha1* 基因的 mRNA 水平; b.黑色素瘤及瘤旁组织 *Aha1* 基因的蛋白水平

图1 *Aha1* 基因在黑色素瘤及瘤旁组织中的表达

2.2 AHA1 过表达对黑色素瘤 B16F10 细胞增殖的影响

在 B16F10 细胞中, AHA1 过表达 48 h 后, B16F10 细胞在 450 nm 处的吸光度为 0.44 ± 0.08 , 而转染 pCMV-HA 空载体的 B16F10 细胞(对照组)在 450 nm 处的吸光度为 0.26 ± 0.05 , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 AHA1 过表达对 B16F10 细胞凋亡的影响

在 B16 细胞中过表达 AHA1 蛋白后, 流式细胞术检测得到 AnnexinV-FITC/PI 双染双变量散点图。与对照组相比, AHA1 蛋白过表达导致早期凋亡率(Q3)和晚期凋亡率(Q2)明显上升(如图 2 所示)。AHA1 的过表达导致 B16F10 细胞的总凋亡率(Q2+Q3)显著增加 ($P < 0.05$), 见表 1。

表1 AHA1 过表达对 B16F10 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

细胞	Q2 期	Q3 期	Q2+Q3 期
对照组	0.50 ± 0.23	6.56 ± 1.12	7.16 ± 1.34
过表达 AHA1 蛋白	1.05 ± 0.56	17.80 ± 1.86^a	18.75 ± 2.45^a

与对照组比较: $^a P < 0.05$

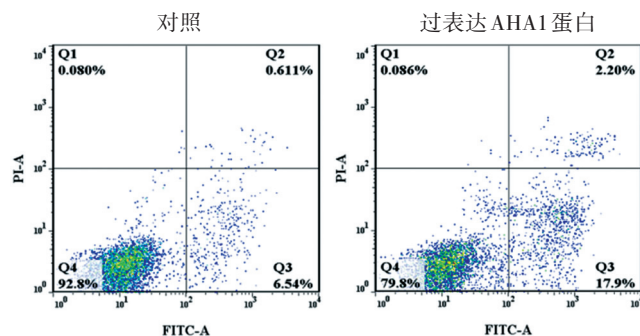


图2 AnnexinV-FITC/PI 双染法检测 AHA1 蛋白对黑色素瘤 B16F10 细胞凋亡的影响

3 讨论

恶性黑色素瘤是一种源于黑色素细胞的发病隐匿、侵袭性强、致死率高的高度恶性肿瘤^[9]。Hsp90 为黑色素瘤一个重要的分子标记物, 在恶性黑色素瘤及普通黑色素瘤细胞高表达^[10], 并且 Hsp90 蛋白在转移性黑色素瘤的表达量高于原发性黑色素瘤的表达量^[2-4]。AHA1 作为 Hsp90 的协同伴侣分子, 与 Hsp90 相互作用后促进 Hsp90 蛋白构象的变化进而激活 Hsp90 蛋白的 ATPase 活性^[11]。*Aha1* 表达是否与恶性黑色素瘤的发生相关, 目前尚未见文献报道。但基于 AHA1 对黑色素瘤其中一个标记物 Hsp90 蛋白的 ATPase 活性的激活作用, 推测 *Aha1* 可能也与黑色素的形成相关。通过比较小鼠黑色素瘤与瘤旁组织中 *Aha1* 基因的表达, 我们发现 *Aha1* 基因在黑色素瘤中的表达显著低于相应瘤旁组织。*Aha1* 基因在膀胱癌、结肠癌、肝癌和肺癌等肿瘤中的表达显著高于相应的正常组织; 然而 *Aha1* 基因在皮肤癌、卵巢癌和子宫癌中的表达明显低于相应的正常组织^[12]。另据相关文献报道, 抑癌基因 TP53 在恶性黑色素瘤中只有 10%~20% 存在突变, 而在肺癌和结肠癌等肿瘤中存在高达 80%~90% 的突变^[13]。这些研究结果表明, *Aha1* 基因在不同肿瘤细胞中的作用可能不尽相同, 并且 *Aha1* 基因在黑色素瘤中的作用可能与在皮肤癌、卵巢癌和子宫癌中的作用更相似, 即低表达的 *Aha1* 基因更有利于恶性黑色素瘤的形成。

在黑色素瘤细胞中过表达 *Aha1* 基因, 我们发现黑色素瘤细胞的生长受到抑制, 细胞周期被组织在 G1 期^[8], 并且促进黑色素瘤细胞的凋亡。我们注意到, *Aha1* 基因在骨肉瘤细胞中高表达, 抑制骨肉瘤细胞中 *Aha1* 基因的表达, 导致更多的骨肉瘤细胞进入细胞凋亡程序^[7]。表明 *Aha1* 在恶性黑色素瘤与骨肉瘤中的作用迥异。高表达的 *Aha1* 可能有利于骨肉瘤的形成; 而在恶性黑色素瘤中, 高表达的 *Aha1* 通过促进黑色素瘤的凋亡, 抑制黑色素瘤细胞的增殖, 进而抑制黑色素瘤的形成。总之, 本研究发现高表达的 *Aha1* 能够通过抑制黑色素瘤的生长, 促进黑色素细胞的凋亡, 进而抑制黑色素瘤的形成。然而 *Aha1* 在恶性黑色素瘤中的分子机理还有待更进一步的研究。

参考文献:

- [1] CHOUDHARY I, LEE H, PYO M J, et al. Proteomic investigation to identify anticancer targets of nemopilema nomurai jellyfish venom in human hepatocarcinoma HepG2 cells[J]. Toxins (Basel), 2018, 10(5): 194-216.

(下转第 150 页)

- ting the transmission rate of hand, foot and mouth disease in mainland China[J]. *Math Biosci Eng*, 2019, 16(4): 2305-2321.
- [6] BOXG E P, JENKINS G M. Time-Series analysis: forecasting and control[M]. San Francisco: Holden Day, 2007: 1-70.
- [7] 李晓松, 冯子健. 传染病时空聚集性探测与预测预警方法[M]. 北京: 高等教育出版社, 2014: 77-85.
- [8] 王丽萍, 曹务春. 实施传染病监测是预防控制传染病的有效途径[J]. *中华流行病学杂志*, 2017, 38(4): 417-418.
- [9] 李媛, 张振, 路滢, 等. 2005-2017年深圳市手足口病聚集性疫情流行特征及病原学分析[J]. *热带医学杂志*, 2019, 19(5): 660-663.
- [10] 潘浩, 胡家瑜, 吴寰宇, 等. GM (1, 1) 灰色模型和 ARIMA 模型在上海市手足口病发病率预测应用中的比较研究[J]. *中华疾病控制杂志*, 2011, 15(5): 445-448.
- [11] 孟凡东, 吴迪, 隋承光. 2004-2015 年中国狂犬病发病数据 ARIMA 乘积季节模型的建立及预测[J]. *中国卫生统计*, 2016, 33(3): 389-391, 395.
- [12] 陈玲, 程丽君, 赵向军. 恶性肿瘤住院量与住院费用的 ARIMA 乘积季节模型预测研究[J]. *中国卫生统计*, 2017, 34(4): 554-557.
- [13] 孙霞霞, 葛锦荣, 李巧方, 等. ARIMA 模型在宁波市北仑区手足口病发病率预测中的应用[J]. *现代预防医学*, 2018, 45(4): 582-586.
- [14] SATO R C. Disease management with ARIMA model in time series[J]. *Einstein(Sao Paulo)*, 2013, 11(1): 128-131.
- [15] 黄国, 朱宇平, 黄焕莺. 季节性 ARIMA 模型在江门市手足口病疫情预测中的应用[J]. *中国卫生统计*, 2019, 36(1): 65-67.
- [16] WANG C, CAO K, ZHANG Y, et al. Different effects of meteorological factors on hand, foot and mouth disease in various climates: a spatial panel data model analysis[J]. *BMC Infect Dis*, 2016(16): 233.
- [17] 汪鹏, 陈邦华, 孔德广, 等. 求和自回归移动平均模型在武汉市手足口病疫情预测预警中的应用[J]. *公共卫生与预防医学*, 2015, 26(1): 26-29.
- [18] 时振东, 王华义, 王加坤. 手足口病及聚集发病与气温关系[J]. *中国公共卫生*, 2014, 30(12): 1586-1588.
- [19] 王永斌, 许春杰, 尹素凤, 等. 中国手足口病发病率 ARIMA、RBF 及 ARIMA-RBF 组合模型拟合及预测效果比较[J]. *中国公共卫生*, 2017, 33(5): 760-763.

~~~~~  
(上接第 131 页)

- [2] MCCARTHY M M, PICK E, KLUGER Y, et al. HSP90 as a marker of progression in melanoma[J]. *Ann Oncol*, 2008, 19(3): 590-594.
- [3] TAS F, BILGIN E, ERTURK K, et al. clinical significance of circulating serum cellular heat shock protein 90(HSP90) level in patients with cutaneous malignant melanoma[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2017, 18(3): 599-601.
- [4] STRICKLER A G, VASQUEZ J G, YATES N, et al. Potential diagnostic significance of HSP90, ACS/TMS1, and L-plastin in the identification of melanoma[J]. *Melanoma Res*, 2014, 24(6): 535-544.
- [5] HOLMES J L, SHARP S Y, HOBBS S, et al. Silencing of HSP90 cochaperone AHA1 expression decreases client protein activation and increases cellular sensitivity to the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(4): 1188-1197.
- [6] GUO Q C, SHEN J N, JIN S, et al. Comparative proteomic analysis of human osteosarcoma and SV40-immortalized normal osteoblastic cell lines[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(6): 850-858.
- [7] SHAO J, WANG L, ZHONG C, et al. AHA1 regulates proliferation, apoptosis, migration, and invasion of osteosarcoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 77: 45-51.
- [8] 谢汶蓉, 梁桂丽. AHA1 蛋白对恶性黑色素瘤细胞增殖的影响[J]. *广东医科大学学报*, 2018, 36(1): 32-35.
- [9] RASTRELLI M, TROPEA S, ROSSI C R, et al. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification[J]. *In Vivo*, 2014, 28(6): 1005-1011.
- [10] BECKER B, MULTHOFF G, FARKAS B, et al. Induction of Hsp90 protein expression in malignant melanomas and melanoma metastases[J]. *Exp Dermatol*, 2004, 13(1): 27-32.
- [11] XU W, BEEBE K, CHAVEZ J D, et al. Hsp90 middle domain phosphorylation initiates a complex conformational program to recruit the ATPase-stimulating cochaperone Aha1[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2574.
- [12] MCDOWELL C L, BRYAN S R, OBERMANN W M. Expression of Hsp90 chaperone[corrected] proteins in human tumor tissue[J]. *Int J Biol Macromol*, 2009, 45(3): 310-314.
- [13] WORRALL C, SULEYMANOVA N, CRUDDEN C, et al. Unbalancing p53/Mdm2/IGF-1R axis by Mdm2 activation restrains the IGF-1-dependent invasive phenotype of skin melanoma[J]. *Oncogene*, 2017, 36(23): 3274-3286.