DOI: 10.16016/j.1000-5404.201512096

SCAP 重组腺病毒对 ATDC5 细胞增殖和凋亡的影响

邓 莉,伍志盟,胡 勤,郭风劲 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院细胞生物学与遗传学教研室)

[摘要] **目的** 构建固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白(SRREBP cleavage activating protein, SCAP)基因干扰(small interfering RNA,siRNA)和过表达重组腺病毒,观察其对 ATDC5 软骨干细胞增殖及凋亡的影响。**方法** 应用 pAdEasy™腺病毒载体系统构建重组腺病毒质粒 pAd-SCAPsiRNA 和 pAd-SCAP,在 HEK293 细胞中分别包装和扩增。RT-PCR 和 Western blot 检测 ATDC5 细胞中 SCAP 的表达,流式细胞仪检测 SCAP 腺病毒对 ATDC5 细胞周期和凋亡的影响,Western blot 检测凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3、p-JNK 的表达。**结果** 成功获腺病毒 siSCAP(滴度为 2.5×10^{10}PFU/mL)和 Ad-SCAP(滴度为 3.0×10^{11} PFU/mL)。RT-PCR 和 Western blot 结果表明:siSCAP 和 Ad-SCAP 能分别有效抑制和增强 ATDC5 细胞中 SCAP 的表达。流式细胞仪检测结果表明:与正常组和空病毒组比较,siSCAP 腺病毒处理组 S 期细胞比例升高 15.45% 和 16.07%($P<0.05$),Ad-SCAP 组比例降低 14.27% 和 13.45%($P<0.05$);siSCAP 组细胞凋亡率降低 13.10% 和 11.50%($P<0.05$),Ad-SCAP 组升高 10.51% 和 10.17%($P<0.05$)。Western blot 检测结果与流式细胞仪检测结果一致。**结论** 成功构建 SCAP 腺病毒;敲低 SCAP 能促进 ATDC5 细胞增殖并抑制凋亡;过表达 SCAP 则抑制增殖、促进凋亡。

[关键词] 固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白;重组腺病毒;ATDC5 细胞;细胞凋亡
[中图法分类号] R322.71;R329.28;R394.2 [文献标志码] A

Effects of SCAP recombinant adenoviruses on proliferation and apoptosis of ATDC5 cells

Deng Li, Wu Zhimeng, Hu Qin, Guo Fengjin (Department of Cell Biology and Genetics, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct recombinant adenoviral vectors containing small interfering RNA (siRNA) targeting human SREBP cleavage activating protein (SCAP) gene and recombinant adenoviral vector containing SCAP gene, and investigate their effects on proliferation and apoptosis of ATDC5 stem cells. **Methods** By using pAdEasy™ adenovirus vector system, recombinant shuttle vector containing siRNA sequence targeting SCAP gene (pSES-HUS-SCAP siRNA) and recombinant shuttle vector containing SCAP gene (pAdTrack-SCAP) were constructed, and then transferred with pAdEasy-1 to generate recombinant adenovirus plasmids pAd-SCAPsiRNA and pAd-SCAP with an electroporation method. Subsequently, the plasmids were transferred into HEK-293 cells by lipofectamine-mediated transfection to package and amplify the recombinant adenoviruses Ad-siSCAP and Ad-SCAP. The ATDC5 cells were infected with the recombinant adenoviruses Ad-siSCAP and Ad-SCAP, respectively, and the expressions of SCAP at mRNA and protein levels were detected by RT-PCR and Western blotting. The effects of Ad-siSCAP and Ad-SCAP adenoviruses on the proliferation and apoptosis of ATDC5 cells were detected by flow cytometry. The expressions of Cleaved Caspase-3 and p-JNK were detected by Western blotting. **Results** Recombinant adenoviruses Ad-SCAPsiRNA

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81371928,81171697);教育部新世纪优秀人才支持计划(NECT-12-1090)
[通信作者] 郭风劲,E-mail: guo.fengjin@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160329.0843.003.html(2016-03-29)

with high titer of 2.5×10^{10} PFU/mL and Ad-SCAP with 3.0×10^{11} PFU/mL were successfully obtained. Both the SCAP mRNA and protein levels were significantly decreased in the ATDC5 cells after infection with Ad-siSCAP, and increased after infection with Ad-SCAP. Flow cytometry showed that the ATDC5 cells infected with Ad-siSCAP had more cells at S phase than the normal control and Ad-RFP (increased by 15.45% and 16.07%, respectively, $P < 0.05$), and the apoptotic rate of the Ad-siSCAP group was decreased by 13.10% and 11.50% ($P < 0.05$) when compared with the 2 control groups. However, the ATDC5 cells infected with Ad-SCAP had less cells at S phase than the normal control and Ad-GFP (decreased by 14.27% and 13.45%, respectively, $P < 0.05$), and the apoptotic rate of the Ad-SCAP group was increased by 10.51% and 10.17% ($P < 0.05$) when compared with the 2 control groups. Western blotting results of Cleaved Caspase-3 and p-JNK were in accordance with the results shown by flow cytometry. **Conclusion** Infection of ATDC5 cells with Ad-SCAPsiRNA promotes the proliferation and suppresses the apoptosis, while infection of ATDC5 cells with Ad-SCAP suppresses the proliferation and promotes the apoptosis.

[**Key words**] SREBP cleavage activating protein; recombinant adenovirus; ATDC5 cells; apoptosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81371928, 81171697) and the New Century Excellent Talent Support Plan of Ministry of Education (NCET-12-10900). Corresponding author: Guo Fengjin, E-mail: guo.fengjin@gmail.com

固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白(SREBP cleavage activating protein,SCAP)位于内质网膜上,含固醇敏感区(sterol-sensing domain,SSD)和多个 WD40 区[1],是 SREBPs 裂解激活的分子伴侣。当内质网膜上胆固醇水平高于细胞内总胆固醇 5%,即高胆固醇水平时,胆固醇与 SCAP 结合并使其构象发生改变。此时,位于内质网膜上的胰岛素诱导基因蛋白(insulin inducible gene, Insig-1)就能与 SCAP 结合,从而使 SCAP-SREBPs 复合物滞留在内质网膜上,减少有活性的 SREBP 的产生,从而抑制脂质合成及吸收的相关基因及 INSIG 的表达;当内质网膜上胆固醇水平低于胞内总胆固醇 5% 时,即细胞处于低胆固醇水平[2],SCAP 蛋白以出芽的方式被运至高尔基体[3],在高尔基体内由 SIP 和 S2P 蛋白酶分别先后切割 SREBPs,产生具有转录活性的 N-SREBPs 进入细胞核,调控胆固醇、脂肪酸合成及吸收相关基因的表达,促进脂质的合成[4-5]。

ATDC5 细胞系起源于鼠畸胎瘤细胞,具软骨细胞系特征,已被广泛用于研究软骨发育、分化和相关疾病的细胞模型[6]。研究表明软骨细胞代谢紊乱会促进骨关节炎的发生,软骨细胞凋亡或死亡也会导致骨关节炎的产生[7]。本实验通过构建 Ad-SCAP 和 Ad-siSCAP 重组腺病毒,探讨其对 ATDC5 细胞增殖和凋亡的影响,为进一步研究 SCAP 基因的功能奠定基础,也为探讨 SCAP 介导的脂质代谢与骨关节炎的关系提供一定的实验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、细菌和细胞 穿梭质粒 pSES-HUS、pAdTrack-CMV、腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1、大肠杆菌 DH5α 和 BJ5183 感受态及 HEK293 细胞和 ATDC5 细胞株均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 限制性核酸内切酶 *Sfi* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ、*Eco*RV、T_4 DNA 连接酶、2 × Plus *Taq* 聚合酶、Exonuclease Ⅲ、DNA Standard Marker、RT-PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司;*Pac* Ⅰ、*Pme* Ⅰ限制性核酸内切酶购自 Thermo fisher 公司;质粒小提试剂盒和 DNA 胶回收纯化试剂盒购自 Omega 公司;lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司;TRIzol(总 RNA 抽提试剂)、RIPA 蛋白裂解液购自碧云天公司;SCAP、Cleaved Caspase-3 及 p-JNK 抗体均购自 Abcam 公司;鼠抗 β-actin 单克隆抗体、HRP 标记的抗兔和抗鼠 IgG 二抗均购自北京中杉金桥公司;SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒、ECL 化学发光液均购自碧云天生物技术研究所;DMEM 培养基购自 Gibco 公司、PAN™ 南美胎牛血清购自 PAN-Biotech GmbH 公司。siRNA 序列的合成及测序由 Invitrogen 公司完成。

1.2 靶向 SCAPsiRNA 重组干扰和过表达 SCAP 重组腺病毒载体的构建及鉴定

1.2.1 重组腺病毒穿梭质粒 pSES-HUS-SCAP siRNA1&2 和 pAdTrack-SCAP 的构建 Oligoengine 软件在线设计靶向 SCAP 的 2 条 siRNA 序列并送 Invitro-

gen 公司合成(正义链:5′-AGAGCTAGCAGACCTGAACATTTT-3′,反义链:5′-ATGTTCAGGTCTGCTAGCTCTTTT-3′;正义链:5′-AAGCTAGCAGACCTGAACAATTTT-3′,反义链:5′-ATTGTTCAGGTCTGCTAGCTTTTT-3′),退火后分别与 *Sfi* Ⅰ线性的 pSES-HUS 穿梭质粒行 T_4 连接,经 *Kpn* Ⅰ、*Eco*RV 双酶切鉴定后将候选阳性克隆送 Invitrogen 公司测序。PCR 法从质粒 pCMV-SCAP(重庆医科大学教育部感染性疾病分子生物学重点实验惠赠)上获得 SCAP 基因 cDNA 片段并与 *Hind* Ⅲ、*Bgl* Ⅱ双切且胶回收的穿梭载体 pAdTrack-CMV 行 LIC 连接,PCR 法和 *Eco*R Ⅰ酶切鉴定,候选阳性克隆送 Invitrogen 公司测序。扩增 SCAP 的 PCR 引物序列,正义链:5′-GATCCGCTAGAGATCATGACCCTGACTGAAAGGCTGC-3′,反义链:5′-GATATCTTATCTAGATCAGTCCAGTTTCTCCAGCACAG-3′(划线部分为与 *Hind* Ⅲ、*Bgl* Ⅱ酶双切线性载体 pAdTrack-CMV 对应的同源臂)。

1.2.2 电转法同源重组构建腺病毒质粒 pAdSES-HUS-SCAPsiRNA1&2 及 Ad-SCAP 此部分实验方法参照文献[8]。

1.2.3 腺病毒 Ad-SCAP 和 Ad-SCAPsiRNA 的包装扩增及滴度测定 此部分实验方法见参考文献[8-10]。

1.2.4 重组腺病毒感染 ATDC5 细胞 接种ATDC5 细胞至 24 孔板中,10% 胎牛血清的 DMEM 培养,待细胞融合度达 70% 左右时,分别加入不同滴度的携带红色荧光(Ad-RFP 作对照病毒)的腺病毒 Ad-siSCAP 和绿色荧光(Ad-GFP 作对照病毒)的 Ad-SCAP 腺病毒。48 h 后观察荧光,确定最佳感染复数(MOI)。将重组腺病毒 Ad-siSCAP 和 Ad-SCAP 以最适的 MOI 感染 ATDC5 细胞,并设 Ad-RFP、Ad-GFP 和 NC 对照组。48 h 后,检测 SCAP 基因的表达[8]。

1.2.5 RT-PCR 检测 ATDC5 细胞 SCAP mRNA 水平的变化 将对数生长期的 ATDC5 细胞接种于 6 孔板,分别加入 MOI 为 100、100、150、150 的腺病毒 Ad-siSCAP、Ad-RFP、Ad-SCAP、Ad-GFP 病毒液感染 48 h 后,提对照组和实验组细胞总 RNA。紫外分光光度计测总 RNA 浓度,按逆转录说明书及时逆转录为cDNA。PCR 反应扩增 SCAP 基因和内参 GAPDH,以逆转录得到的 cDNA 为模板,SCAP 的上下游引物分别是:5′-ATGACCCTGACTGAAAGGCTGC-3′ 和 5′-CATCTACTGCCAGGAGGTTCTTGTG-3′,产物大小为 340 bp。内参 GAPDH 的上下游引物分别是 5′-GAGCCAA-AAGGGTCATCATCTC-3′ 和 5′-AAAGGTGGAGGAGTGGGTGTC-3′,扩增片段长度为 542 bp。反应条件为:94 ℃预变性 1 min 30 s;94 ℃变性 40 s,60 ℃退火1 min,72 ℃延伸 1 min,30 个循环;72 ℃延伸 5 min。PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.6 细胞内外源 SCAP 蛋白的检测 此部分实验分组及处理情况同 1.2.5,待感染 ATDC5 细胞 48 h 后,用细胞裂解液 RIPA 提 NC 组及处理组细胞的总蛋白,随后进行 Western blot 检测,具体步骤见参考文献[8],其中,SCAP 抗体与一抗稀释液的比例为1∶1 000。

1.3 Ad-siSCAP 和 Ad-SCAP 对 ATDC5 细胞增殖和凋亡的影响

1.3.1 流式细胞仪(FCM)检测 Ad-siSCAP 和 Ad-SCAP 对 ATDC5 细胞增殖和凋亡的影响 此部分实验步骤中细胞分组及病毒处理情况同 1.2.5,待各病毒分别感染 ATDC5 细胞 48 h 后收集细胞,送重庆医科大学生命科学院流式检测中心,检测各组 ATDC5 细胞增殖和凋亡的情况。

1.3.2 Western blot 检测 Ad-siSCAP 和 Ad-SCAP 对 ATDC5 细胞凋亡的影响 与 FCM 检测时的实验设计一致,各组细胞在感染 48 h 之后分别提总蛋白,Western blot 检测与凋亡相关基因 Cleaved Caspase-3 和 p-JNK 蛋白的表达。

1.4 统计学分析

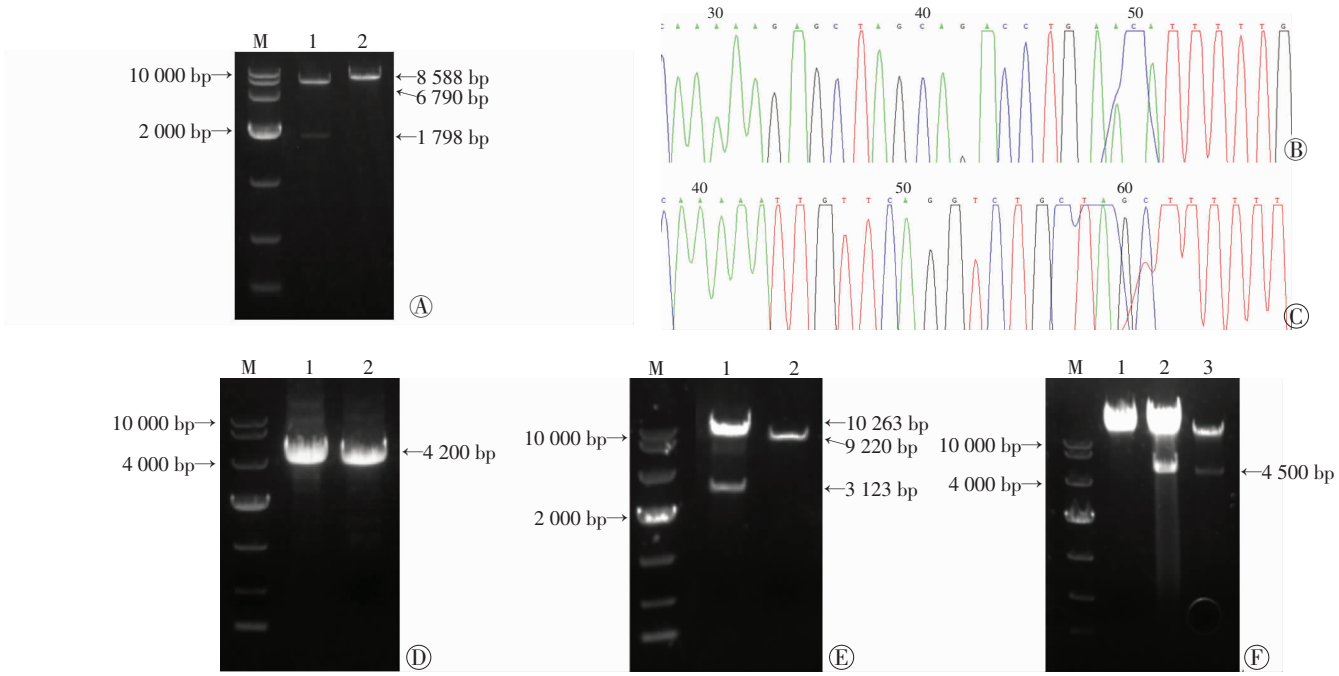
采用 SPSS 13.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用多因数方差分析。

2 结果

2.1 Ad-siSCAP 和 Ad-SCAP 腺病毒载体的构建

2.1.1 重组腺病毒载体的鉴定 pSES-HUS 空载被 *Eco*RV 和 *Kpn* Ⅰ酶双切,产生大小约 6.8 kb 和 1.8 kb 的 2 个片段(图 1A),而阳性克隆只被 *Kpn* Ⅰ单切产生 1 个条带,大小约为 8.6 kb 且测序结果正确(图 1B、C);PCR 扩增产生的 SCAP 片段大小和 *Eco*R Ⅰ酶切产生的片段数目和大小均与预期相符(图 1D、E)且测序结果比对正确,表明重组腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-SCAP 构建成功。*Pac* Ⅰ酶切 pAd-siSCAP 和 pAd-SCAP 后,均得到 1 条约 30 kb 的大片段和 1 条约 4.5 kb 的特征性小片段(图 1F),表明穿梭质粒和骨架质粒同源重组成功。

2.1.2 重组腺病毒颗粒 pAd-siSCAP 和 pAd-SCAP 的包装 重组腺病毒质粒 pAd-siSCAP、pAd-SCAP 分别转染 HEK-293 细胞后第 2 天,荧光显微镜下分别可见部分细胞呈红色、绿色荧光,随着时间延长,表达 RFP、GFP 的细胞增多,荧光加强,表明 HEK-293 细胞中存在病毒的包装和扩增。转染 7 d 左右,细胞呈彗星状的腺病毒病灶,10 d 后可观察到细胞病变(CPE),大部分包装细胞变圆脱落(图 2)。



A:*Eco*RV、*Kpn*Ⅰ双酶切鉴定 pSES-HUS-SCAPsiRNA　M:DL 10 000 标准;1:pSES-HUS;2:pSES-HUS-SCAPsiRNA;B: pSES-HUS-SCAPsiRNA1 测序结果;C: pSES-HUS-SCAPsiRNA2 测序结果;D: pAdTrack-SCAP 的 PCR 鉴定　M: DL 10 000 标准; 1: pCMV-SCAP; 2: pAdTrack-SCAP;E: *Eco*RⅠ酶切鉴定 AdTrack-SCAP　M:DL 10 000 标准; 1: AdTrack-SCAP; 2:AdTrack-CMV; F: *Pac*Ⅰ酶切鉴定 pAd-siSCAP 和 pAd-SCAP 重组腺病毒质粒　M: DL 10 000 标准; 1:pAdEasy-1; 2: Ad-SCAP; 3: Ad-siSCAP

图 1　Ad-siSCAP 和 Ad-SCAP 腺病毒质粒的构建与鉴定

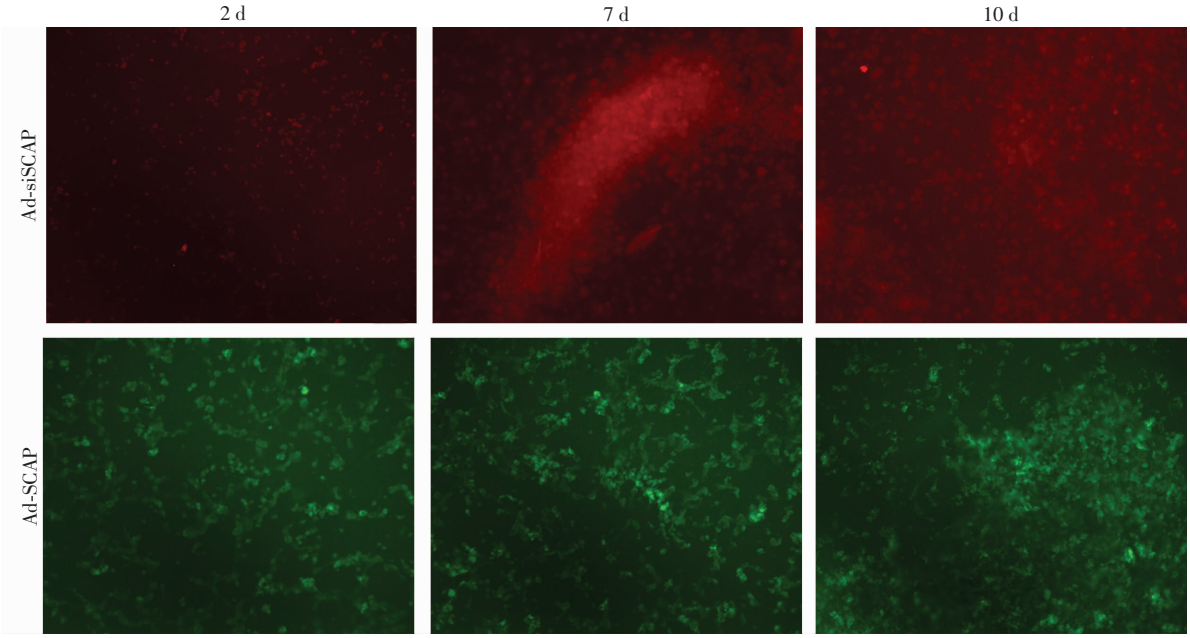


图 2　重组腺病毒颗粒的包装　(荧光显微镜×200)

2.1.3　ATDC5 细胞 MOI 的测定　　重组腺病毒 Ad-siSCAP、Ad-SCAP 扩增 3 代以后,测得滴度分别是 2.5×10^{10}、3.0×10^{11} PFU/mL。按 MOI 为 0、10、20、50、100、150、250 分别感染 ATDC5 细胞,48 h 后荧光显微镜下分别观察 RFP、GFP 的表达,结果显示 Ad-siSCAP、Ad-SCAP 在 ATDC5 细胞中的最佳 MOI 分别为 100 和 150。

2.1.4　Ad-siSCAP 和 Ad-SCAP 在 ATDC5 细胞中的表达　　RT-PCR 检测结果显示:ATDC5 细胞中感染 Ad-siSCAP 组的 SCAP mRNA 水平明显降低(图 3A),

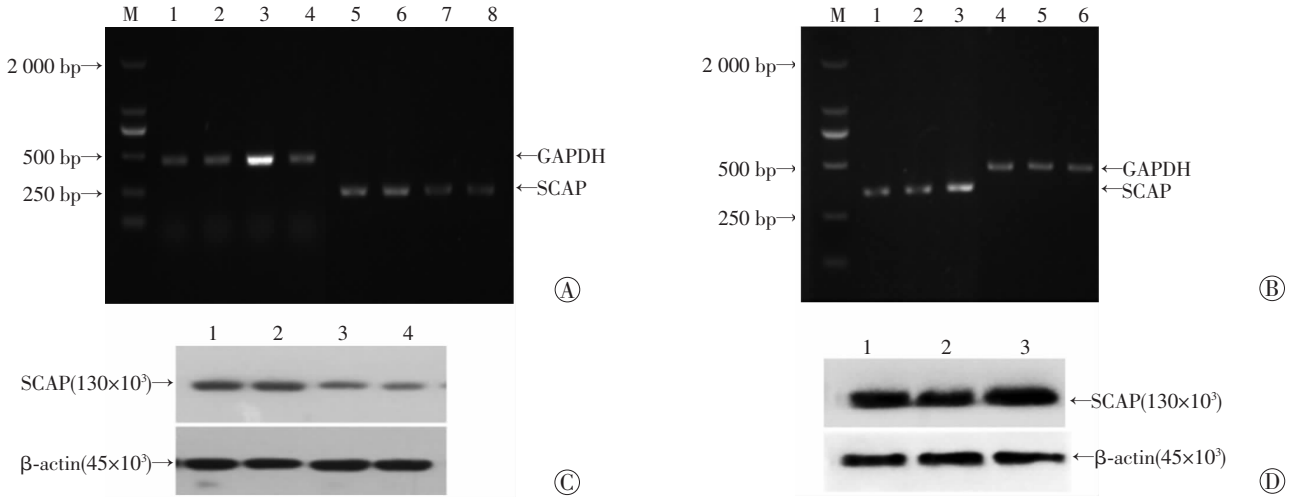
而感染了 Ad-SCAP 组的 SCAP mRNA 水平则明显上升(图 3B)。Western blot 检测结果与 mRNA 检测结果一致(图 3C、D)。

2.2　Ad-siSCAP 和 Ad-SCAP 重组腺病毒对 ATDC5 细胞增殖和凋亡的影响

2.2.1　Ad-siSCAP 和 Ad-SCAP 重组腺病毒对 ATDC5 细胞增殖的影响　流式细胞仪检测结果显示:与 NC 组和 RFP 组比较,Ad-siSCAP2 组 G_1 期细胞比例分别降低 12.12% 和 12.64%($P<0.05$),S 期的细胞比例则分别升高 15.45% 和 16.07%($P<0.05$);而 Ad-SCAP 组与 NC 组和 GFP 组相比,G_1 期细胞比例分别升高 9.34% 和 8.72%($P<0.05$),S 期细胞比例则分别降低 14.27% 和 13.45%($P<0.05$,图 4)。结果表明:Ad-siSCAP 可促进细胞的增殖,Ad-SCAP 则抑制细胞增殖。

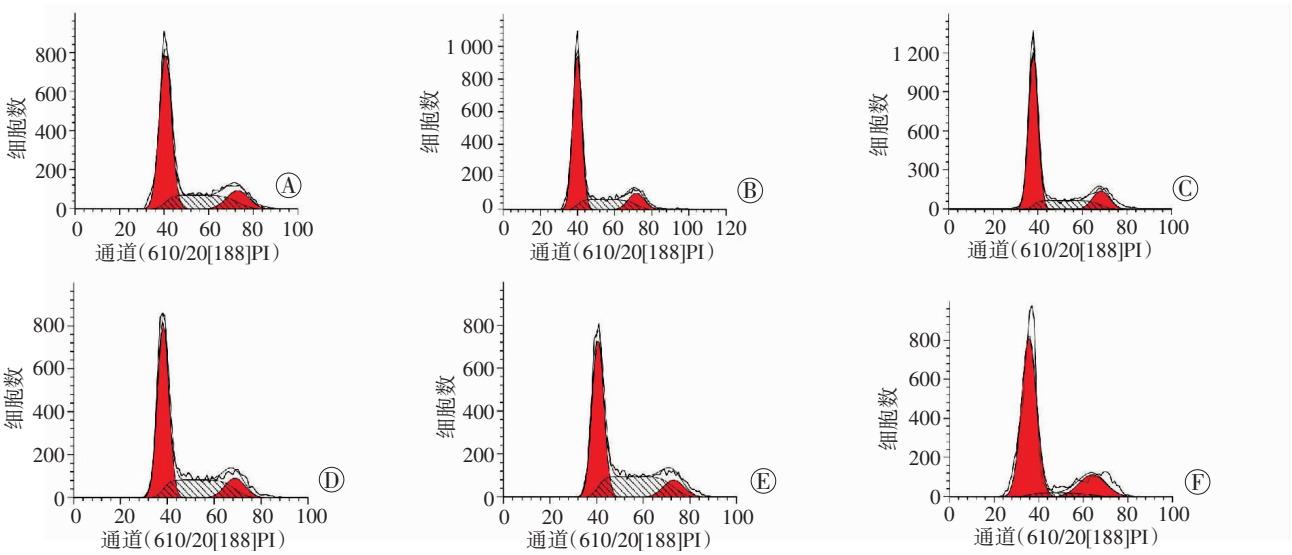
2.2.2　SCAP 重组腺病毒对 ATDC5 细胞凋亡的影响

2.2.2.1　流式细胞仪检测　Ad-SCAP siRNA2 组凋亡率与 NC 组和 Ad-RFP 组比较分别降低 13.10% 和 11.50%($P<0.05$);Ad-SCAP 组与 NC 组和 Ad-GFP 组比较,凋亡率则分别升高 10.51% 和 10.17%($P<0.05$,图 5)。结果表明:Ad-siSCAP 抑制 ATDC5 细胞的凋亡,Ad-SCAP 则促进细胞凋亡。



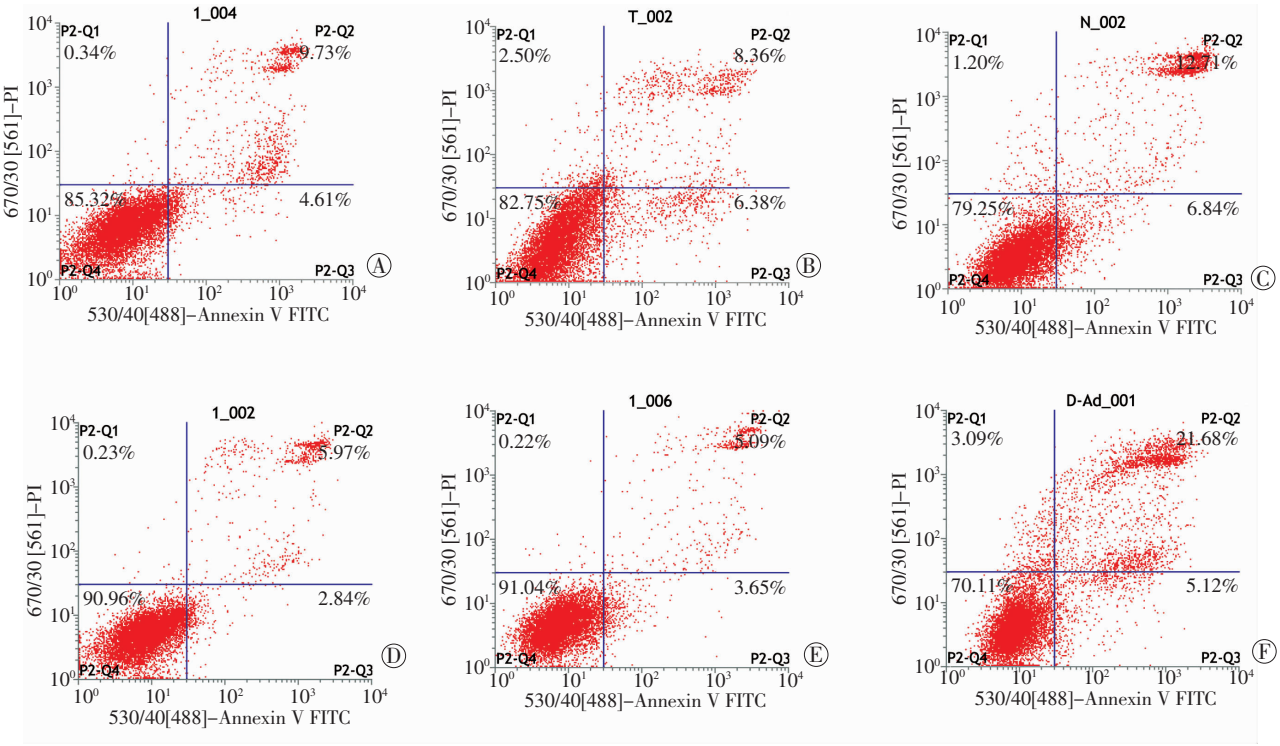
A:RT-PCR 检测　M:DL 2 000 标准;1、5:NC 组;2、6:Ad-RFP 组;3、7:Ad-SCAPsiRNA2 组;4、8:Ad-SCAPsiRNA1 组;B:RT-PCR 检测　M:DL 2 000 标准;1、4:NC 组;2、5:Ad-GFP 组;3、6:Ad-SCAP 组;C:Western blot 检测　1:NC 组;2:Ad-RFP 组;3:Ad-SCAPsiRNA1 组;4:Ad-SCAPsiRNA2 组;D:Western blot 检测　1:NC 组;2:Ad-GFP 组;3:Ad-SCAP 组

图 3　Ad-siSCAP 和 Ad-SCAP 重组腺病毒分别感染 ATDC5 细胞 48 h 后 SCAP mRNA 和蛋白的表达



A:NC 组;B:Ad-RFP 组;C:Ad-GFP 组;D:Ad-SCAPsiRNA1 组;E:Ad-SCAPsiRNA2 组;F:Ad-SCAP 组

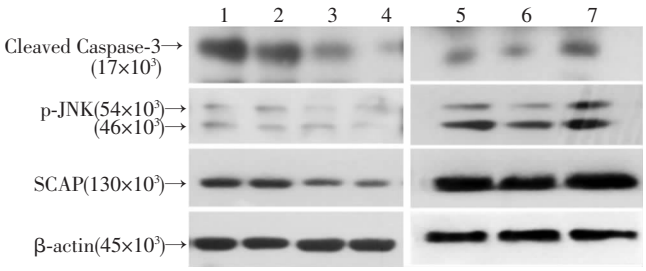
图 4　流式细胞仪检测重组腺病毒感染 ATDC5 细胞 48 h 后各组细胞周期的分布



A:NC 组;B: Ad-GFP 组;C: Ad-RFP 组;D: Ad-SCAPsiRNA1 组; E:Ad-SCAPsiRNA2 组;F:Ad-SCAP 组

图 5 流式细胞仪检测 SCAP 腺病毒感染 ATDC5 细胞 48 h 后各组细胞凋亡

2.2.2.2 Western blot 检测 分别检测 ATDC5 细胞中 SCAP 蛋白水平和过表达对 Cleaved Caspase-3 和 p-JNK 蛋白表达的影响。结果表明:与 NC 组和 Ad-RFP 组比较,Ad-siSCAP 处理组中 Cleaved Caspase-3 和 p-JNK 的表达均明显下降,表明 Ad-siSCAP 对 ATDC5 细胞的凋亡有抑制作用;与 NC 组和 Ad-GFP 组比较,Ad-SCAP 感染 ATDC5 细胞后,Cleaved Caspase-3 和 p-JNK 的表达均明显增加(图 6),表明 ATDC5 细胞中过表达 SCAP 可促进其凋亡。



1、5: NC 组; 2: Ad-RFP 组; 3: Ad-SCAPsiRNA1 组; 4:Ad-SCAPsiRNA2组;6:Ad-GFP 组;7:Ad-SCAP 组

图 6 Western blot 检测各组细胞凋亡相关蛋白的表达

3 讨论

SCAP 位于内质网膜上,是 SREBP 形成复合物并从内质网到高尔基运输过程中的分子伴侣。SCAP-SREBPs 的运输过程受固醇调控,是胆固醇负反馈调控的重要步骤[11]。SREBPs 包括 SREBP-1a、1c 和 SREBP2。SREBP-1a 和 SREBP-1c 在不同组织器官中表达。SREBP1a 在正在生长的正常细胞和癌细胞中呈现高表达,其合成的胆固醇和脂肪酸是细胞膜中脂质的重要成分;而 SREBP1c 则主要在肝脏中表达,当胰岛素水平异常升高时,其合成的过量的脂肪酸则会导致 2 型糖尿病患者发生脂肪肝[12-13]。SREBP-2 则主要影响 LDL 受体形成和胆固醇合成途径中相关酶的表达。SREBPs 的 3 种异构体均以无活性的前体形式以发夹结构位于内质网膜上,其发挥相应的功能都需在高尔基体内经剪切形成有活性的 N-SREBPs 入核后,作为转录因子参与相关基因的表达调控。然而,SCAP 具有感觉胆固醇的水平,有条件地把 SREBPs 从内质网运送到高尔基体,通过调控 SREBPs 的水解反应控制细胞内脂质合成。研究表明 SCAP 的固醇传感结构域是 SCAP 的调节位点,胆固醇可以与这一结构域相结合完成其功能[13]。

本研究分别构建 Ad-siSCAP 和 Ad-SCAP 重组腺病毒,探讨 SCAP 对 ATDC5 软骨干细胞增殖和凋亡的影响。ATDC5 细胞系是从小鼠畸胎瘤细胞分化培养中分离出来的,是一个具有软骨细胞典型特点的细胞

株,是研究软骨细胞分化不同阶段的一个良好的细胞模型。结果显示:重组腺病毒 Ad-SCAP 感染软骨干细胞 ATDC5 以后,SCAP 在 ATDC5 细胞中过表达,ATDC5 细胞 S 期细胞减少,G_1期细胞增多,抑制ATDC5 细胞的增殖,促进其凋亡;而重组腺病毒Ad-siSCAP 感染软骨干细胞 ATDC5 以后,抑制了ATDC5 细胞中 SCAP 的表达,S 期细胞增加,G_1期细胞减少,促进了 ATDC5 细胞的增殖,抑制其凋亡。Western blot 检测凋亡相关蛋白表达结果显示:与 Ad-RFP 组和 NC 组相比,Ad-siSCAP 组凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3 和 p-JNK 表达明显下调;Ad-SCAP 组凋亡相关蛋白表达较 NC 组和 Ad-GFP 对照组明显上调,说明在 ATDC5 细胞中,过表达 SCAP 可以抑制增殖、促进凋亡;抑制 SCAP 的表达则促进增殖抑制其凋亡。

综上所述,本实验成功构建了 Ad-SCAP 和 Ad-siSCAP 的重组腺病毒,在 ATDC5 细胞中研究了 SCAP 敲低和过表达分别对 ATDC5 软骨干细胞增殖和凋亡的作用。为后续研究 SCAP 的生物学功能,探讨骨关节炎与脂代谢的关系奠定了实验基础。

参考文献:

[1] 柳童斐, 宋保亮. 胆固醇合成途径的负反馈调控机制[J]. 中国细胞生物学学报, 2013,35(4): 401 - 409.

[2] Radhakrishnan A, Goldstein J L, McDonald J G, *et al*. Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance[J]. Cell Metab, 2008, 8(6): 512 - 521. DOI: 10.1016/j.cmet.2008.10.008

[3] Sun L P, Li L, Goldstein J L, *et al*. Insig required for sterol - mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins *in vitro*[J]. J Biol Chem, 2005, 280(28): 26483 - 26490.

[4] Xu D, Wang Z, Zhang Y, *et al*. PAQR3 modulates cholesterol homeostasis by anchoring Scap/SREBP complex to the Golgi apparatus[J]. Nat Commun, 2015, 6:8100. DOI: 10.1038/ncomms9100

[5] Lee J N, Song B, DeBose-Boyd R A, *et al*. Sterol-regulated degradation of Insig-1 mediated by the membrane-bound ubiquitin ligase gp78[J]. J Biol Chem, 2006, 281(51): 39308 - 39315. DOI: 10.1074/jbc.M608999200

[6] Newton P T, Staines K A, Spevak L, *et al*. Chondrogenic ATDC5 cells: an optimised model for rapid and physiological matrix mineralisation[J]. Int J Mol Med, 2012, 30(5): 1187 - 1193. DOI: 10.3892/ijmm.2012.1114

[7] Kim J H, Jeon J, Shin M, *et al*. Regulation of the catabolic cascade in osteoarthritis by the zinc-ZIP8-MTF1 axis[J]. Cell, 2014,156(4): 730 - 743. DOI: 10.1016/j.cell.2014.01.007

[8] 韩晓凤, 李美玲, 张鹏, 等. siIRE1α 重组腺病毒对内质网应激介导凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(11): 1147 - 1152. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2014.11.008

[9] 李祥柱, 张鹏, 韩晓凤, 等. IRE1α 重组腺病毒载体对 ATDC5 软骨干细胞增殖及凋亡的影响[J]. 解放军医学杂志, 2013, 38(8): 639 - 643.

[10] 韩晓凤, 张鹏, 李美玲, 等. 携人 ATF6 重组腺病毒载体的构建及对 C28I2 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 医学分子生物学杂志, 2013,10(4): 187 - 192. DOI: 10.3870/j.issn.1672-8009.2013.04.001

[11] Radhakrishnan A, Sun L H, Kwon H J, *et al*. Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain[J]. Mol Cell, 2004, 15(2): 259 - 268.

[12] Goldstein J L, Brown M S. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins[J]. Cell, 2015, 161(1): 161 - 172. DOI: 10.1016/j.cell.2015.01.036

[13] Moon Y A, Liang G, Xie X, *et al*. The Scap/SREBP pathway is essential for developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals[J]. Cell Metab, 2012, 15(2): 240 - 246. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.12.017

(**收稿**:2015-12-16;**修回**:2016-02-21)

(编辑 张 维)