

NF- κ B 沉默联合苦参碱诱导人肝癌细胞 HepG2 凋亡和相关分子的表达

樊浩¹, 何松^{1*}, 汤为学²

1. 重庆医科大学附属第二医院消化内科, 重庆 400010

2. 重庆医科大学附属第一医院神经病学重点实验室, 重庆 400010

[摘要] **目的** 探讨 NF- κ B 沉默联合苦参碱(matrine, MT)诱导人肝癌细胞 HepG2 凋亡及相关分子的表达。**方法** 构建 NF- κ B/P65 siRNA 真核表达载体转染人肝癌细胞 HepG2, RT-PCR 检测 NF- κ B/P65 基因沉默效果, 并筛选出 NF- κ B/P65 基因沉默稳定转染细胞株。将实验分为对照组、苦参碱组(1.5 g/L)、稳转细胞组和联合组(稳转细胞+苦参碱), 流式细胞仪检测细胞凋亡率; 分别用 RT-PCR 法和蛋白质印迹法检测细胞 NF- κ B/P65、CD95(Fas)、Smac、Survivin 的 mRNA 和蛋白水平表达。**结果** 苦参碱组 NF- κ B/P65、CD95、Smac 和 Survivin 的表达上调, 与对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$); 稳转细胞组 CD95 和 Smac 的表达上调, 与对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$), NF- κ B/P65 和 Survivin 的表达下调, 与对照组、苦参碱组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$); 联合组 CD95 和 Smac 的表达上调, 与对照组、苦参碱组、稳转细胞组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$), NF- κ B/P65 和 Survivin 的表达下调, 与苦参碱组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。各组细胞凋亡率分别为 3.21%、6.25%、11.82%、21.06%, 组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** NF- κ B 沉默联合苦参碱诱导人肝癌细胞 HepG2 凋亡可能与 CD95 和 Smac 的表达上调及 NF- κ B/P65 和 Survivin 的表达下调有关。

[关键词] 苦参碱; NF- κ B; 细胞凋亡; CD95; Smac; Survivin**[中图分类号]** R 735.7**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2013)02-0148-07

NF- κ B silencing combined with matrine-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells and expression of related molecules

FAN Hao¹, HE Song^{1*}, TANG Wei-xue²

1. Department of Gastroenterology and Hepatology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

2. Key Laboratory of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

[Abstract] **Objective** To investigate the apoptosis in hepatocellular carcinoma cells induced by NF- κ B silencing combined with matrine (MT) and the expression of related molecules. **Methods** The recombinant eukaryotic expression plasmid NF- κ B/P65 siRNA was constructed and transfected into HepG2 cells. RT-PCR was used to detect the efficiency of the constructed RNAi in silencing NF- κ B/P65, and the steadily transfected clones of NF- κ B/P65 RNAi were selected. The cultured HepG2 cells was randomly divided into four groups: control group, MT group (1.5 g/L), steadily transfected group and combination group (steadily transfected cells+MT). The apoptosis of carcinoma cells was analyzed by flow cytometry; expression of NF- κ B/P65, CD95(Fas), Smac, and Survivin mRNA and protein in carcinoma cells was examined by RT-PCR and Western blotting analysis. **Results** The expression of NF- κ B/P65, CD95(Fas), Smac, and Survivin mRNA and protein in MT group was significantly increased compared with that in the control group ($P < 0.05$). The expression of CD95 and Smac in the steadily transfected group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$), and the expression of NF- κ B/P65 and Survivin was significantly suppressed compared with the control group and the MT group ($P < 0.05$). The expression of CD95 and Smac in the combination group was significantly increased compared with that in the other three groups ($P < 0.05$), and the expression of NF- κ B/P65 and Survivin was significantly lower than that in the MT group ($P < 0.05$). The apoptosis rates of the HepG2 cells in the control group, MT group, steadily transfected group, and combination group were 3.21%, 6.25%, 11.82%, and 21.06%, respectively, with significant difference found between different groups ($P < 0.05$). **Conclusion** The apoptosis in hepatocellular carcinoma cells induced by NF- κ B RNAi combined with matrine may be related to increased CD95 and

[收稿日期] 2012-09-30**[接受日期]** 2013-01-16**[作者简介]** 樊浩, 硕士生. E-mail: fanhao1986@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-63693326, E-mail: hedocto65@sina.com

Smac expression and decreased NF- κ B/P65 and Survivin expression.

[Key words] matrine; NF-kappa B; cell apoptosis; CD95; Smac; Survivin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(2):148-154]

核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是一类具有多向转录调节作用的核蛋白因子, 是抗凋亡基因表达的主要激活子^[1]。苦参碱(matrine, MT) 是传统中药苦参的主要活性成分, 用于肝纤维化及皮肤疾病等的治疗^[2-4]。近年来研究发现, 苦参碱能够诱导肿瘤细胞的分化和凋亡^[5-6]。我们前期的研究表明, 苦参碱在体外诱导人肝癌细胞 HepG2 凋亡的过程中, 能同时激活 NF- κ B, 利用二硫代氨基甲酸吡咯烷抑制 NF- κ B 活性可增强苦参碱诱导 HepG2 细胞凋亡的作用^[7-8], 但具体机制不明。本实验旨在利用基因干扰技术沉默 HepG2 细胞的 NF- κ B P65 基因表达, 采用流式细胞术、蛋白质印迹法和反转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 等方法, 探讨 NF- κ B 沉默表达联合苦参碱对人肝癌细胞 HepG2 的凋亡作用及凋亡相关基因表达的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞株 人肝癌细胞株 HepG2 由重庆医科大学附属第二医院肝炎研究所提供; DMEM 培养基为美国 Gibco 产品, 新生小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。

1.2 主要试剂及药品 苦参碱注射液(商品名: 斯巴德康, 批号: 110301) 10 g/L, 5 mL/支, 购自广州明兴制药厂; 总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、扩增试剂盒为日本 TaKaRa 公司产品; NF- κ B/P65、CD95、Smac、Survivin 多克隆抗体为美国 Epitomics 公司产品; PCR 引物由上海生工生物工程技术服务

有限公司设计并合成。

1.3 NF- κ B/P65 siRNA 表达质粒的构建及筛选 本实验用 siRNA 表达载体 pcDNATM6. 2-GW/EmGFP 由美国 Invitrogen 公司设计并合成。根据基因序列设计并合成 3 对 siRNA 寡聚单链 DNA 序列, 见表 1。

采用 RT-PCR 法筛选沉默效率最高质粒。分别设置对照组、siRNA-1 转染组、siRNA-2 转染组、siRNA-3 转染组和阴性对照转染组, 分别取对数生长期的 HepG2 肝癌细胞 3×10^5 个/孔, 接种于 6 孔板, 利用 PolyJet 转染试剂(美国 SignaGen 公司)及上述质粒进行基因转染。具体操作按说明书进行。转染后 48 h, 各组分别取 1×10^6 个细胞按总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 用紫外分光光度仪测定光密度(D_{260}/D_{280}) 值在 1.8~2.0, 经琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。引物序列: NF- κ B/P65 (GenBank, NM_021975), F: 5'-AGG CGA GAG GAG CAC AGA TAC-3', R: 5'-GCA CAG CAT TCA GGT CGT AGT-3', 产物长度 332 bp; 以 β actin 为内参照。按照反转录试剂盒说明书将总 RNA 反转录为 cDNA。PCR 反应体系 50 μ L, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 循环 30 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取最终反应产物 4 μ L 上样到 2% 琼脂糖水平板(含 Goldview) 电泳, 凝胶成像系统成像, Quantity One 分析各条带每平方毫米密度值, 以目的基因对 β -actin 的相对值记录结果, 筛选出沉默效率最高的质粒, 用于后续实验。

表 1 siRNA 寡聚单链 DNA 序列

Tab 1 Oligomeric single-stranded DNA sequences of siRNA

siRNA	Sequence (5'-3')
1	Forward: TGCTGATTCCATGGGCTCACTGAGCTGTTTTGGCCACTGACTGACAGCTCAGTGCCCATGGAAT Reverse: CCTGATTCCATGGGCACTGAGCTGTCAGTCAGTGGCCAAAACAGCTCAGTGAGCCCATGGAATC
2	Forward: TGCTGTACTCCATCAGCATGGGCTCAGTTTTGGCCACTGACTGACTGAGCCCACTGATGGAGTA Reverse: CCTGTACTCCATCAGTGGGCTCAGTCAGTCAGTGGCCAAAACAGCCCATGCTGATGGAGTAC
3	Forward: TGCTGTTAGGAGCTGATCTGACTCAGTTTTGGCCACTGACTGACCTGAGTCATCAGCTCCTAA Reverse: CCTGTTAGGAGCTGATGACTCAGTTCAGTCAGTGGCCAAAACCTGAGTCAGATCAGCTCCTAAC
Negative	Forward: TGCTGAAATGTACTGCGGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACGTCTCCACGCAGTACATTT Reverse: CCTGAAATGTACTGCGTGGAGACGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTCTCCACGCAGTACATTTT

1.4 基因稳定转染细胞株的筛选及平板克隆 按上述方法进行基因转染并分别于转染后 24、48、72 h

观察转染率,72 h后加入杀稻瘟菌素进行2周筛选,而后挑选克隆、扩大培养2周,大量培养出稳定转染细胞,用于后续实验。平板克隆设置对照组、稳转细胞组、转染试剂组和阴性对照转染组,以每孔500个细胞接种于24孔板,每组做3个复孔,37℃、5% CO₂培养箱培养14 d后,4%多聚甲醛固定,瑞氏染液染色后平板扫描,观察克隆数变化。

1.5 倍增时间的计算 按如上设置组别,各取5 000个细胞,接种于24孔板,每组做3个复孔,7 d后收集细胞并计数,根据公式 $Td = \Delta t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$ 计算倍增时间(*Td*为倍增时间,Δ*t*为培养时间,*N_t*为最后计算的细胞数,*N₀*为接种的细胞数)。

1.6 细胞周期的检测 按如上设置组别,各收集5×10⁵个细胞,75%乙醇4℃过夜固定后,PI染色,上流式细胞仪检测,实验重复3次。

1.7 细胞凋亡率的检测 分别设置对照(A)组、苦参碱(B)组、稳转细胞(C)组和联合(D)组。B组细胞加用苦参碱(质量浓度1.5 g/L)^[7]作用12 h; D组稳转细胞加用苦参碱(质量浓度1.5 g/L)作用12 h。细胞消化后各收集1×10⁶个细胞,冷PBS洗涤两遍,Annexin V-PE/7-AAD双染色后上流式细胞仪检测,结果用仪器自带软件分析。实验重复3次。

1.8 RT-PCR检测细胞*NF-κB/P65*、*CD95*、*Smac*、*Survivin* mRNA的表达 引物序列:*NF-κB/P65* (GenBank, NM_021975), F: 5'-AGG CGA GAG GAG CAC AGA TAC-3', R: 5'-GCA CAG CAT TCA GGT CGT AGT-3',产物长度332 bp;*CD95* (GenBank, NM_000043), F: 5'-GTG TTA ATG CCC AAG TGA CTG A-3', R: 5'-TAA GCC ATG TCC TTC ATC ACA C-3',产物长度275 bp;*Smac* (GenBank, NM_019887), F: 5'-CAT TGA TGA GGA GAG CAG TGT C-3', R: 5'-CCT TCC TCC TGT GTT TTC TGA C-3',产物长度457 bp;*Survivin* (GenBank, NM_001168), F: 5'-AGT CTG GCG TAA GAT GAT GGA T-3', R: 5'-GTG CAT TTT CAG TTG TTT CTG C-3',产物长度347 bp;内参照β*actin*, F: 5'-GAC CCA GAT CAT GTT TGA GAC C-3', R: 5'-ATC TCC TTC TGC ATC CTG TCG-3',产物长度594 bp。

产物电泳后经凝胶成像系统成像,Quantity One分析各条带每平方毫米密度值,以目的基因对β*actin*的相对值记录结果,实验重复3次。

1.9 蛋白质印迹法检测细胞*NF-κB/P65*、*CD95*、*Smac*和*Survivin*蛋白的表达 按上述设置分组并做相应处理,裂解各组细胞提取总蛋白,Bioford法测定蛋白浓度,每上样孔取50 μg总蛋白行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜,5%脱脂奶粉室温封闭后加一抗4℃过夜。弃去一抗后,室温孵育3 h,DAB显色。凝胶成像系统成像,Quantity One分析各条带每平方毫米密度值,以目的蛋白对GAPDH的相对值记录结果,实验重复3次。

1.10 统计学处理 采用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计分析,实验参数值均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 RT-PCR检测沉默效率 由图1可见,3条质粒转染后有2条可使*NF-κB/P65*的基因表达受到抑制。定量分析结果显示,对照组、siRNA-1转染组、siRNA-2转染组、siRNA-3转染组及阴性对照转染组*NF-κB/P65* mRNA相对表达水平分别为0.902±0.233、0.617±0.174、0.705±0.191、0.814±0.214、0.885±0.222,其中siRNA-1转染组及siRNA-2转染组*NF-κB/P65* mRNA表达水平较对照组、阴性对照转染组下降($P < 0.01, P < 0.05$); siRNA-3转染组及阴性对照转染组*NF-κB/P65* mRNA表达水平与对照组相比,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。提示siRNA-1转染组的表达质粒干扰效果最好,后续实验即用此质粒转染形成的稳定株进行。

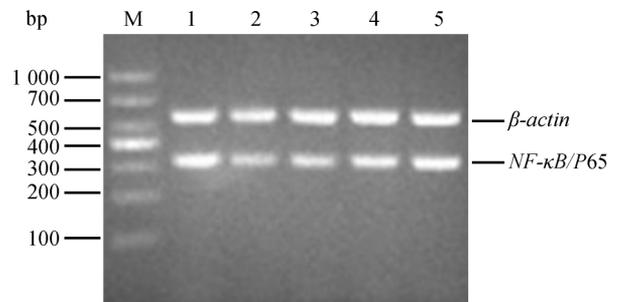


图1 RT-PCR检测细胞*NF-κB/P65* mRNA的表达

Fig 1 RT-PCR analysis of *NF-κB/P65* mRNA expression

M: Marker; 1: Control group; 2: siRNA-1 transfected group; 3: siRNA-2 transfected group; 4: siRNA-3 transfected group; 5: Negative control group

2.2 基因稳定转染细胞株的筛选及平板克隆结果 倒置荧光显微镜下观察 HepG2 细胞基因转染

率,24 h 转染率约 13%,48 h 转染率约 20%,72 h 转染率约 35%。挑选克隆筛选出稳转株,稳转株转染率约 95%。平板克隆形成实验结果见图 2,对照组、稳转细胞组、转染试剂组和阴性对照转染组克隆数分别为(224 \pm 56)、(117 \pm 21)、(219 \pm 50)和(235 \pm

65)个,稳转细胞组形成的克隆数少于对照组、转染试剂组和阴性对照转染组($P<0.05$);对照组、转染试剂组、阴性对照转染组之间差异无统计学意义($P>0.05$),说明转染试剂和阴性对照质粒对细胞的生长几乎无影响。

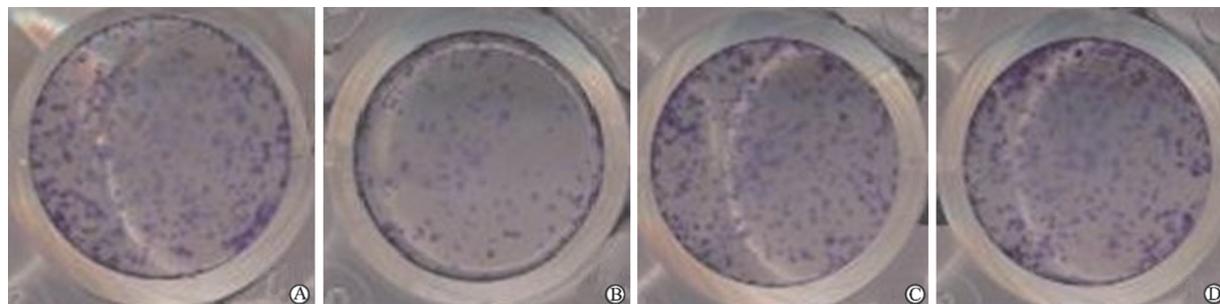


图 2 平板克隆形成实验

Fig 2 Clone-forming test

A: Control group; B: Steadily transfected group; C: Transfection reagent group; D: Negative siRNA control group

2.3 倍增时间 7 d 后收集细胞并计数,计算后得出对照组、稳转细胞组、转染试剂组和阴性对照转染组倍增时间分别为(20.6 \pm 2.8)、(32.5 \pm 3.3)、(20.8 \pm 2.2)和(20.5 \pm 2.6) h,稳转细胞组倍增时间大于对照组、转染试剂组和阴性对照转染组($P<0.05$);对照组、转染试剂组、阴性对照转染组之间倍增时间差异无统计学意义($P>0.05$),说明转染

试剂和阴性对照质粒对细胞的生长几乎没有影响。

2.4 细胞周期 *NF- κ B*/*P65* siRNA 稳转细胞组 S 期和 G_2 /M 期细胞比例增加, G_0 / G_1 期细胞比例减少,差异有统计学意义($P<0.05$);对照组、转染试剂组、阴性对照转染组之间细胞周期差异无统计学意义($P>0.05$),结果详见表 2。说明转染试剂和阴性对照质粒对细胞周期几乎无影响。

表 2 各组细胞周期

Tab 2 Cell cycle of HepG2 cells in each group

Group	n=3, $\bar{x}\pm s$, %		
	G_0 / G_1	G_2 /M	S
Control	75.48 \pm 5.35	9.02 \pm 1.37	14.80 \pm 2.93
Steadily transfected	61.33 \pm 5.21*	17.95 \pm 3.50*	20.72 \pm 3.56*
Transfection reagent	73.67 \pm 6.24	12.16 \pm 3.09	14.77 \pm 2.48
Negative siRNA control	76.21 \pm 6.37	12.07 \pm 2.82	10.92 \pm 1.99

* $P<0.05$ vs control, transfection reagent and negative siRNA control group

2.5 细胞凋亡率 对照组细胞凋亡率约 3.21%。1.5 g/L 苦参碱作用 12 h 即能诱导 HepG2 细胞凋亡,凋亡率达 6.25%。单纯 *NF- κ B* 沉默其凋亡率约 11.82%。*NF- κ B* 沉默后应用苦参碱可使其凋亡率增加至 21.06%。各组间差异均有统计学意义($P<0.05$)。*NF- κ B* 的沉默显著增强了苦参碱诱导 HepG2 凋亡的作用。

2.6 细胞 *NF- κ B*/*P65*、*CD95*、*Smac*、*Survivin* mRNA 的检测结果 与对照组比较,苦参碱组 *CD95*、

Smac、*NF- κ B*、*Survivin* mRNA 表达上调,差异有统计学意义($P<0.05$);稳转细胞组 *CD95*、*Smac* mRNA 表达上调,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),*NF- κ B*、*Survivin* mRNA 的表达降低,与苦参碱组比较差异有统计学意义($P<0.05$);联合组 *CD95* mRNA 的表达上调,与对照组、苦参碱组、稳转细胞组比较差异有统计学意义($P<0.05$),*NF- κ B*、*Survivin* mRNA 的表达降低,与苦参碱组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3、表 3。

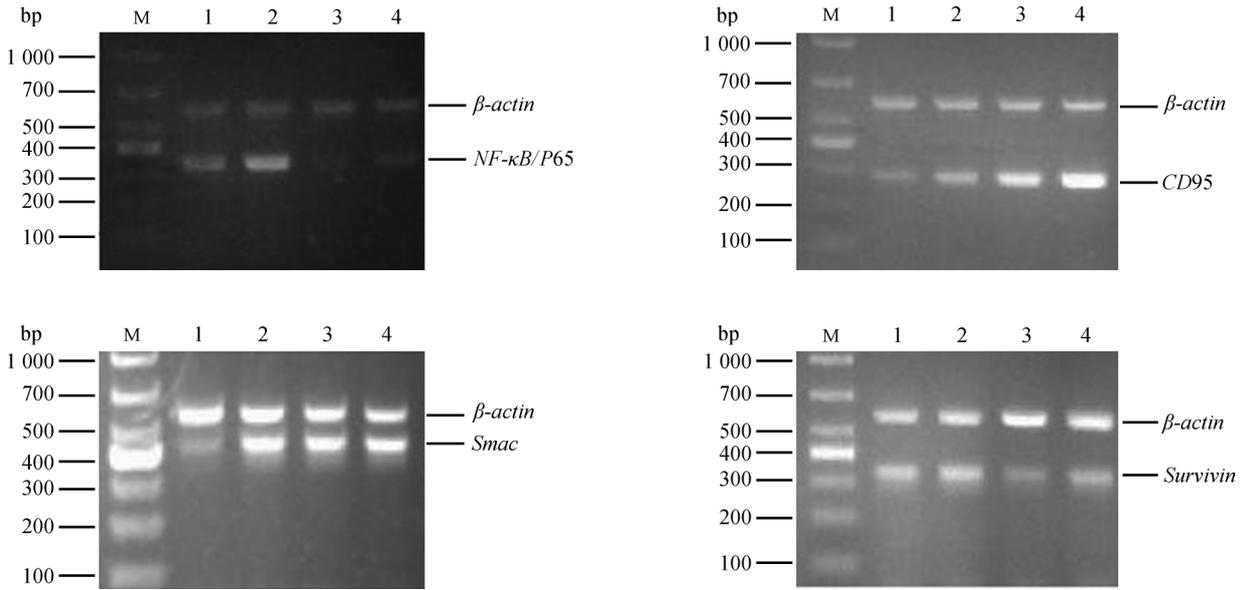


图 3 RT-PCR 检测细胞 *NF-κB/P65*、*CD95*、*Smac*、*Survivin* mRNA 的表达

Fig 3 RT-PCR analysis of *NF-κB/P65*, *CD95*, *Smac* and *Survivin* mRNA expression

M: Marker; 1: Control group; 2: Matrine group; 3: Steadily transfected group; 4: Combination group

表 3 各处理组 *NF-κB/P65*、*Survivin*、*CD95* 和 *Smac* mRNA 表达水平比较

Tab 3 Comparison of mRNA expression of *NF-κB/P65*, *CD95*, *Smac* and *Survivin* among different groups

Group	<i>NF-κB/P65</i>	<i>CD95</i>	<i>Smac</i>	<i>Survivin</i>
Control	0.827±0.213	0.482±0.154	0.237±0.144	0.754±0.182
Matrine	1.639±0.432*	1.327±0.264*	0.998±0.351*	1.259±0.345*
Steadily transfected	0.254±0.135*△	1.466±0.418*	0.934±0.311*	0.212±0.067*△
Combination	0.494±0.172*△	1.951±0.565*△▲	1.035±0.275*	0.407±0.147*△

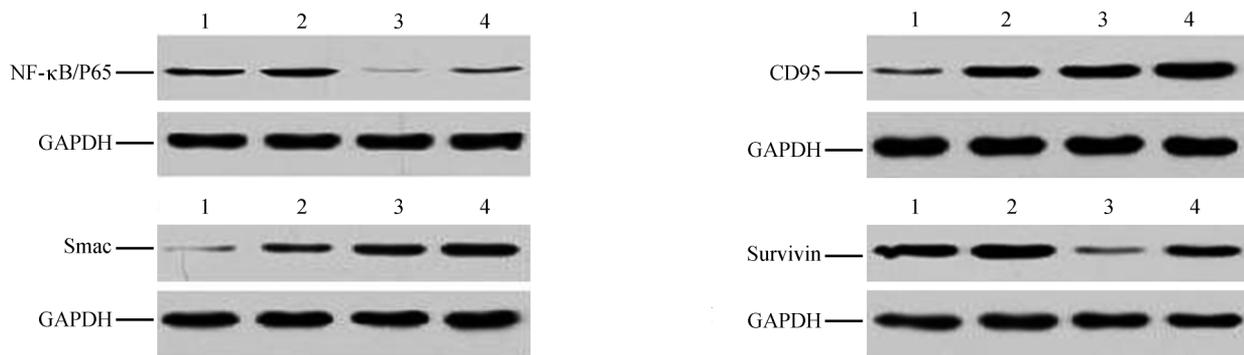
* $P < 0.05$ vs control group; △ $P < 0.05$ vs matrine group; ▲ $P < 0.05$ vs steadily transfected group

2.7 细胞 *NF-κB*、*CD95*、*Smac* 和 *Survivin* 的蛋白检测结果 与对照组比较,苦参碱组 *CD95*、*Smac*、*NF-κB*、*Survivin* 蛋白表达上调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 稳转细胞组 *CD95*、*Smac* 蛋白表达上调,与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), *NF-κB*、*Survivin* 蛋白的表达降低,与苦参碱组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 联合组 *CD95* 和 *Smac* 蛋白的表达明显上调,与对照组、苦参碱组、稳转细胞组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), *NF-κB*、*Survivin* 蛋白的表达降低,与苦参碱组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 4、表 4。

3 讨论

细胞凋亡的主要途径有细胞外的死亡受体途径及细胞内的线粒体途径,前者主要是刺激因素激活细胞内 *CD95*(*Fas*)、*P53*、*Bcl-2* 等蛋白,后者是通过

刺激因素影响细胞内线粒体的膜电位,使细胞色素 C 释放^[9-11]。两个途径最后都导致效应性 *Caspase-3* 活化,效应性 *Caspase-3*、*-6*、*-7* 激活核酸内切酶,使 DNA 链断裂,最终导致细胞结构的全面崩解^[12-14]。*CD95* 蛋白属于肿瘤坏死因子(TNF)受体家族成员,被认为与细胞凋亡密切相关。它与配体分子结合可向细胞内传递死亡信号并诱导细胞凋亡,其促凋亡路径属死亡受体途径。*Caspase* 的第二个线粒体激活因子 *Smac* 位于细胞线粒体间隙,主要在线粒体途径中发挥促凋亡作用。它与凋亡抑制蛋白(IAP)结合可参与线粒体及死亡受体两条凋亡调控通路,并将两条途径有机结合起来,通过消除 IAP 的凋亡抑制活性而发挥促凋亡作用。IAP 和 *Smac* 蛋白在细胞凋亡的调控过程中起着重要作用。*Survivin* 作为 IAP 中最具代表性的一员,其在肿瘤组织中的高表达能够极强地抑制肿瘤细胞的凋亡。

图4 蛋白质印迹法检测细胞 NF- κ B/P65、CD95、Smac 和 Survivin 蛋白的表达水平Fig 4 Western blotting analysis of NF- κ B/P65, CD95, Smac and Survivin protein expression

1: Control group; 2: Matrine group; 3: Steadily transfected group; 4: Combination group

表4 各处理组 NF- κ B、Survivin、CD95 和 Smac 的蛋白表达水平比较Tab 4 Comparison of protein expression of NF- κ B, CD95, Smac and Survivin among different groupsn=3, $\bar{x} \pm s$

Group	NF- κ B	CD95	Smac	Survivin
Control	0.163 \pm 0.047	0.417 \pm 0.115	0.269 \pm 0.048	0.893 \pm 0.261
Matrine	0.270 \pm 0.054*	0.751 \pm 0.233*	0.600 \pm 0.236*	1.248 \pm 0.316*
Steadily transfected	0.049 \pm 0.011* Δ	1.010 \pm 0.317*	0.935 \pm 0.304*	0.401 \pm 0.138* Δ
Combination	0.083 \pm 0.021* Δ	1.260 \pm 0.343* $\Delta\blacktriangle$	1.153 \pm 0.332* $\Delta\blacktriangle$	0.532 \pm 0.172* Δ

* $P < 0.05$ vs control group; Δ $P < 0.05$ vs matrine group; \blacktriangle $P < 0.05$ vs steadily transfected group

NF- κ B 作为一种在调控细胞的生存和凋亡中起关键作用的重要调控因子,其最重要功能之一就是抑制细胞凋亡的抑制[15]。它作为抗凋亡基因表达的主要激活子[1]构成了肿瘤耐药机制中极其重要的一环。因此抑制 NF- κ B 活性能增加肿瘤细胞对化疗药物和放疗的敏感性,提高治疗肿瘤的疗效[16-17]。

我们前期进行的实验已证实苦参碱诱导 HepG2 细胞凋亡的同时会激活 NF- κ B; 而二硫代氨基甲酸吡咯烷可降低 NF- κ B/P65 mRNA 的表达,降低核转位,抑制 NF- κ B 的活化,增强苦参碱诱导 HepG2 细胞凋亡的作用[7-8]。NF- κ B 除可调控 Bcl-2 家族、P53 蛋白及 IL-6 等细胞因子的表达外,还可调控 IAP,从而发挥抑制凋亡作用[18-19]。

本研究观察到,人肝癌细胞株 HepG2 经 1.5 g/L 苦参碱作用后,细胞凋亡率由 3.21% 升至 6.25%,这可能与苦参碱上调了 CD95 和 Smac 的 mRNA 及蛋白表达有关。CD95 的增加促进了细胞凋亡,提示苦参碱诱导肝癌细胞凋亡的作用可能和 CD95 介导的细胞死亡受体途径有关;苦参碱促使 Smac mRNA 及蛋白表达增多,提示苦参碱的促凋亡作用亦可能与细胞线粒体途径有关。同时,细胞接受苦参

碱刺激后,NF- κ B 和 Survivin 的 mRNA 及蛋白表达也上调了,此二者的表达对细胞的凋亡产生了一种“对抗”作用。

本实验利用基因干扰技术使 NF- κ B 沉默。可以看到,NF- κ B 路径沉默后,在不应用苦参碱的情况下,与对照组肿瘤细胞相比,CD95、Smac 的 mRNA 及蛋白表达增加,一方面可能是 NF- κ B 的下调直接促进了此二者的表达,另一方面也可能是 NF- κ B 介导抗凋亡基因表达的下调间接导致抗凋亡和促凋亡平衡被打破的结果。Pajak 等[20]研究认为 Fas (CD95)相关死亡区域蛋白样白介素 1 β 转化酶抑制蛋白 (FLIP) 主要通过抑制 Fas/FasL-FADD-Caspase-8 通路活化而发挥抗凋亡作用,而在 FLIP 基因编码序列中存在 κ B 位点,NF- κ B 蛋白的增加可以上调 FLIP 的转录表达而使 Fas 表达降低,使 Fas/FasL-FADD-Caspase-8 失活,这可能为本实验中 NF- κ B 沉默后,CD95 表达升高的机制。同时,随着 NF- κ B 的沉默,Survivin 的表达亦随之降低,这与 Takada 等[21]研究相符,另一方面可能是因为 Smac 表达的增加抑制了 IAP(Survivin)的表达。

NF- κ B 沉默后加用苦参碱,与单纯应用苦参碱

相比,CD95的 mRNA 和蛋白表达增加,Smac 的蛋白表达增加,Survivin 的 mRNA 及蛋白的表达降低,差异均有统计学意义;与单纯 NF- κ B 沉默相比,虽经苦参碱刺激后 NF- κ B/P65 mRNA 及蛋白的表达有轻度升高,但 CD95 及 Smac 的表达仍是增高的,NF- κ B 沉默联合应用苦参碱后既降低了 Survivin(抗凋亡)的表达,又同时使 CD95、Smac(促凋亡)的表达增加,故下调 NF- κ B/P65 的表达并联合苦参碱处理,可增强对 HepG2 细胞的凋亡促进作用,细胞凋亡率升高至 21.06%。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression[J]. *Nature*,2006,441: 431-436.
- [2] 梁建新,屈杏芬,曾文铤,朱科伦,张鹤,卫建筠. 氧化苦参碱在治疗慢性乙型肝炎中抗肝纤维化的作用机制[J]. *南方医科大学学报*,2010,30:1871-1873.
- [3] Liu J, Hu J, Zhu Q, Li F, Wang J, Sun H. Effect of matrine on the expression of substance P receptor and inflammatory cytokines production in human skin keratinocytes and fibroblasts [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007,7:816-823.
- [4] 刘太华,刘德芳,王骏,汪晓军,罗陈. 苦参碱、氧化苦参碱和槐定碱对巨噬细胞 RAW264.7 表达 CD91、CD13 和分泌 TNF- α 的抑制作用[J]. *第二军医大学学报*,2010,31:399-403.
- Liu T H, Liu D F, Wang J, Wang X J, Luo C. Matrine, oxymatrine and sophordine inhibit secretion of TNF- α and expression of CD91 and CD13 in macrophage RAW 264.7 [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*,2010,31:399-403.
- [5] Jiang H, Hou C, Zhang S, Xie H, Zhou W, Jin Q, et al. Matrine upregulates the cell cycle protein E2F-1 and triggers apoptosis via the mitochondrial pathway in K562 cells[J]. *Eur J Pharmacol*,2007,559:98-108.
- [6] Zhang S, Qi J, Sun L, Cheng B, Pan S, Zhou M, et al. Matrine induces programmed cell death and regulates expression of relevant genes based on PCR array analysis in C6 glioma cells[J]. *Mol Biol Rep*,2009,36:791-799.
- [7] 高航,何松,汤为学,王珏. 二硫代氨基甲酸吡咯烷对苦参碱诱导肝癌细胞凋亡的影响[J]. *中华肝脏病杂志*,2007,15:914-917.
- [8] 罗娜,何松,左国庆,汤为学,廖于. 二硫代氨基甲酸吡咯烷联合苦参碱对人肝癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用[J]. *中华肝脏病杂志*,2011,19:275-280.
- [9] Danial N N, Korsmeyer S J. Cell death: critical control points[J]. *Cell*,2004,116:205-219.
- [10] Peter M E, Krammer P H. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond[J]. *Cell Death Differ*,2003,10:26-35.
- [11] Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes[J]. *Cell*,2003,114:181-190.
- [12] Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis[J]. *Nature*,2000,407:770-776.
- [13] Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2001,2:589-598.
- [14] Jaattela M, Tschopp J. Caspase-independent cell death in T lymphocytes[J]. *Nat Immunol*,2003,4:416-423.
- [15] Basak S, Hoffmann A. Crosstalk via the NF-kappa B signaling system [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2008,19:187-197.
- [16] Ammann J U, Haag C, Kasperczyk H, Debatin K M, Fulda S. Sensitization of neuroblastoma cells for TRAIL-induced apoptosis by NF-kappaB inhibition[J]. *Int J Cancer*,2009,124:1301-1311.
- [17] Batsi C, Markopoulou S, Kontargiris E, Charalambous C, Thomas C, Christoforidis S, et al. Bel-2 blocks 2-methoxyestradiol induced leukemia cell apoptosis by a p27 (Kip1)-dependent G₁/S cell cycle arrest in conjunction with NF-kappaB activation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2009,78:33-44.
- [18] Lee S Y, Yuk D Y, Song H S, Yoon do Y, Jung J K, Moon D C, et al. Growth inhibitory effects of obovatol through induction of apoptotic cell death in prostate and colon cancer by blocking of NF-kappaB[J]. *Eur J Pharmacol*,2008,582:17-25.
- [19] Kucharczak J, Simmons M J, Fan Y, Gelinias C. To be or not to be: NF-kappaB is the answer-role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis[J]. *Oncogene*, 2003,22:8961-8982.
- [20] Pajak B, Orzechowski A. FLIP; an enemy which might lose the battle against the specific inhibitors of translation[J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*,2005,59:140-149.
- [21] Takada Y, Murakami A, Aggarwal B B. Zerumbone abolishes NF-kappa B and Ikappa B alpha kinase activation leading to suppression of antiapoptotic and metastatic gene expression, upregulation of apoptosis, and downregulation of invasion [J]. *Oncogene*, 2005, 24: 6957-6969.