

siRNA抑制NF-κB p65对Bcl-2及肝癌细胞凋亡的影响

赵心恺, 宁巧明, 孙晓宁, 田德安

■背景资料

肝癌的发生、发展过程均与肝癌细胞的增殖与凋亡失衡有关, 其中较为重要的是核因子-κB(NF-κB)基因和细胞凋亡相关基因*bcl-2*表达的改变。NF-κB是重要的转录调节因子, NF-κB的活化在肿瘤的抗凋亡机制中起了关键作用。*bcl-2*是最早发现的参与细胞凋亡的癌基因之一, 其表达产物具有抗凋亡的重要作用。

赵心恺, 宁巧明, 孙晓宁, 海南省人民医院 海南省海口市 570311

赵心恺, 田德安, 华中科技大学同济医学院同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

海南省卫生厅科研立项课题, No. 琼卫2010-8

作者贡献分布: 赵心恺、宁巧明及孙晓宁对此文所作贡献均等; 此课题由赵心恺、宁巧明及田德安设计; 研究过程由赵心恺与宁巧明操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由田德安提供; 数据分析由赵心恺、宁巧明及孙晓宁完成; 本论文写作由赵心恺、宁巧明及孙晓宁完成。

通讯作者: 田德安, 博士, 主任医师, 博士生导师, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院同济医院消化科。tianda1971@163.com

收稿日期: 2011-06-19 修回日期: 2011-08-04

接受日期: 2011-08-06 在线出版日期: 2011-08-08

SiRNA-mediated inhibition of NF-κB p65 down-regulations Bcl-2 expression and promotes apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines

Xin-Kai Zhao, Qiao-Ming Ning, Xiao-Ning Sun, De-An Tian

Xin-Kai Zhao, Qiao-Ming Ning, Xiao-Ning Sun, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Xin-Kai Zhao, De-An Tian, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, Hainan Province, China

Supported by: the Scientific Research Project of Hainan Provincial Department of Health, No. Qiong Wei 2010-8

Correspondence to: De-An Tian, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Avenue, Wuhan 430030, Hubei Province, China. xinkaizhao@163.com

Received: 2011-06-19 Revised: 2011-08-04

Accepted: 2011-08-06 Published online: 2011-08-08

Abstract

AIM: To investigate the impact of small interfering RNA (siRNA)-mediated inhibition of nuclear factor-κB P65 (NF-κB p65) on Bcl-2 expression and apoptosis in human hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines.

METHODS: HCC cell lines HepG2, SMMC7721 and human fetal liver cell line LO2 were used in the study. The expression of NF-κB p65 and Bcl-2 in the above three cell lines was detected by Western blot. SiRNA technology was then

used to inhibit NF-κB p65 to observe the effect of NF-κB p65 knockdown on Bcl-2 expression and cell apoptosis.

RESULTS: The expression levels of NF-κB p65 and Bcl-2 in HepG2 and SMMC7721 cells were significantly higher than those in LO2 cells (2.14 ± 0.19 , 2.09 ± 0.27 vs 0.54 ± 0.11 ; 1.42 ± 0.15 , 1.47 ± 0.14 vs 0.60 ± 0.08 , all $P < 0.05$). No significant difference was detected in the expression levels of NF-κB p65 and Bcl-2 between HepG2 and SMMC7721 cells. SiRNA transfection significantly down-regulated NF-κB p65 expression in HepG2 and SMMC7721 cells compared to non-transfected cells (2.08 ± 0.19 vs 0.99 ± 0.12 ; 2.03 ± 0.17 vs 0.94 ± 0.14 , both $P < 0.05$). SiRNA-mediated NF-κB p65 knockdown significantly down-regulated Bcl-2 expression (1.37 ± 0.05 vs 0.72 ± 0.02 ; 1.44 ± 0.03 vs 0.69 ± 0.03 , both $P < 0.05$) and increased apoptosis ($5.12\% \pm 0.61\%$ vs $37.87\% \pm 4.10\%$; $5.80\% \pm 0.71\%$ vs $40.19\% \pm 3.78\%$, both $P < 0.05$) in HepG2 and SMMC7721 cells compared to non-transfected cells.

CONCLUSION: SiRNA-mediated NF-κB p65 knockdown significantly down-regulates Bcl-2 expression and promotes apoptosis in HepG2 and SMMC7721 cells.

Key Words: Nuclear factor-κB P65; Bcl-2; Hepatocellular carcinoma

Zhao XK, Ning QM, Sun XN, Tian DA. SiRNA-mediated inhibition of NF-κB p65 down-regulates Bcl-2 expression and promotes apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(22): 2358-2362

摘要

目的: 研究siRNA抑制NF-κB p65后Bcl-2在肝癌细胞中的变化及对肝癌细胞凋亡的影响。

方法: 选择肝癌细胞HepG2、SMMC7721和人胚胎肝细胞LO2细胞株, 应用Western blot法分别检测NF-κB p65、Bcl-2在不同细胞中的表达; 应用siRNA方法抑制NF-κB p65在肝癌细胞中的表达, 观察NF-κB p65、Bcl-2在肝癌细

■同行评议者

沈柏用, 副教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院肝胆胰外科中心; 党双锁, 教授, 西安交通大学第二医院感染科

胞中的变化及应用流式细胞仪观察肝癌细胞的凋亡情况。

结果: Western blot法检测显示NF- κ B p65、Bcl-2在肝癌细胞HepG2、SMMC7721中的表达明显高于人胚胎肝细胞LO2(2.14 ± 0.19 , 2.09 ± 0.27 vs 0.54 ± 0.11 ; 1.42 ± 0.15 , 1.47 ± 0.14 vs 0.60 ± 0.08 , 均 $P < 0.05$), 而NF- κ B p65、Bcl-2在肝癌细胞HepG2、SMMC7721中的表达差异无统计学意义; 应用siRNA抑制NF- κ B p65的表达后, 应用Western blot法检测显示NF- κ B p65在肝癌细胞HepG2、SMMC7721中的表达较未转染组明显下降(2.08 ± 0.19 vs 0.99 ± 0.12 ; 2.03 ± 0.17 vs 0.94 ± 0.14 , 均 $P < 0.05$), 说明转染成功。随后应用Western blot法检测显示Bcl-2在肝癌细胞HepG2、SMMC7721中的表达较未转染组明显下降(1.37 ± 0.05 vs 0.72 ± 0.02 ; 1.44 ± 0.03 vs 0.69 ± 0.03 , 均 $P < 0.05$), 且肝癌细胞凋亡较未转染组明显增加($5.12\% \pm 0.61\%$ vs $37.87\% \pm 4.10\%$; $5.80\% \pm 0.71\%$ vs $40.19\% \pm 3.78\%$, 均 $P < 0.05$)。

结论: siRNA可以成功抑制NF- κ B p65在肝癌细胞中的活性, 进一步证实NF- κ B p65对Bcl-2具有调控作用, 他们共同参与了肝癌的发生发展过程。

关键词: 核因子 κ B p65; Bcl-2; 肝癌细胞癌

赵心恺, 宁巧明, 孙晓宁, 田德安. siRNA抑制NF- κ B p65对Bcl-2及肝癌细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(22): 2358-2362
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2358.asp>

0 引言

肝癌的发生、发展过程均与肝癌细胞的增殖与凋亡失衡有关, 其中较为重要的是核因子- κ B(nuclearfactor- κ B, NF- κ B)基因和细胞凋亡相关基因**bcl-2**表达的改变。NF- κ B是重要的转录调节因子, NF- κ B的活化在肿瘤的抗凋亡机制中起了关键作用。bcl-2是最早发现的参与细胞凋亡的癌基因之一, 其表达产物具有抗凋亡的重要作用。我们通过以下实验深入研究NF- κ B p65与Bcl-2信号通路间的联系, 了解二者在肝癌发生发展中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司; RIPA裂解液购自美国Pierce公司; 鼠抗人

p65(sc-8008)购自美国Santa Cruz公司; 鼠抗人Bcl-2(sc-7382)购自美国Santa Cruz公司; 羊抗兔IgG-HRP购自美国Fermentas公司; Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司; NF- κ B p65小分子干扰核糖核酸购自美国Thermo Scientific Dharmacon公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人肝癌细胞株HepG2、SMMC 7721、人胚胎肝细胞株LO2购自中国科学院上海生物所细胞库。细胞培养在RPMI 1640培养基中, 常规加入100 mL/L胎牛血清(FBS), 在50 mL/L CO₂培养箱中37 °C培养, 每3 d传代1次。

1.2.2 核蛋白提取及Western blot: NE-PER[®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (PIERCE)参照说明书进行操作。Western blot采用化学发光法(PIERCE Biotecnology)和放射自显影进行检测。

1.2.3 NF- κ B p65的RNA干扰: NF- κ B p65小分子干扰核糖核酸(siRNA: 5'GCCCCU-AUCCCUUUACGUCA3')转染入肝癌细胞HepG2、SMMC7721中^[1], 首先将处于对数生长期的细胞以 3.0×10^6 个/孔铺于6孔板中, 待到细胞融合至80%-90%时进行转染。转染时取10 μ L的Lipofectamine 2000与4 μ g siRNA寡聚物分别加入到250 μ L的OPTI-MEM中, 混匀后室温孵育30 min, 再将混合液加入每个孔中, 37 °C、50 mL/L CO₂孵育4 h后换用含有100 mL/L胎牛血清的培养基培养。转染后24 h提取细胞核蛋白, Western blot的方法检测NF- κ B p65的表达。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡: 取对数生长期的细胞以 3×10^5 个/孔接种6孔板, 待细胞汇合率达到80%-90%时, 胰酶消化收集细胞。进行细胞凋亡检测时, PBS细胞洗3次, 加入10 μ L的Annexin V混匀后避光保存30 min, 再加入5 μ L的PI, 立即上机检测。

统计学处理 用SPSS11.0进行数据处理, 采用mean \pm SD表示, 同一组变量比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 组间两两比较采用SNK法, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 NF- κ B p65、Bcl-2在3种细胞中的表达

2.1.1 NF- κ B p65在3种细胞中的表达: NF- κ B p65在HepG2和SMMC7721细胞核中的蛋白表达水平明显高于LO2细胞(2.14 ± 0.19 , 2.09 ± 0.27 vs 0.54 ± 0.11 , 均 $P < 0.05$), 在HepG2、SMMC7721细胞中表达无明显差异(2.14 ± 0.19 vs $2.09 \pm$

■研发前沿

RNA干扰(RNAi), 即用20多个核苷酸组成的短的双链RNA(siRNA)代替传统反义核酸进行转录后基因沉默, 已经迅速而广泛地应用到基因功能、基因表达调控机制研究等热门领域, 并为基因治疗开辟了新的途径。

■应用要点

本文通过研究 siRNA 成功抑制 NF- κ B p65 在肝癌细胞中的表达及引起肝癌细胞凋亡明显增加, 进一步证实 NF- κ B p65 对 Bcl-2 具有调控作用, 为肝癌的靶向治疗提供更好的理论依据。

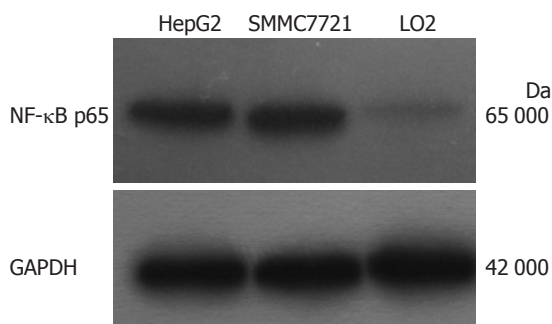


图 1 HepG2、SMMC7721和LO2细胞中NF- κ B亚单位p65的表达。

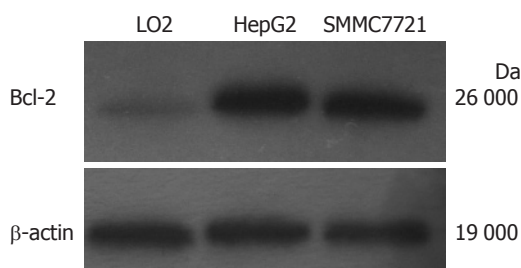


图 2 HepG2、SMMC7721和LO2细胞中Bcl-2的表达。

0.27, $P>0.05$, 图1)。

2.1.2 Bcl-2蛋白在3种细胞中的表达: Bcl-2蛋白在 HepG2、SMMC7721细胞中表达明显高于LO2 细胞(1.42 ± 0.15 , 1.47 ± 0.14 vs 0.60 ± 0.08 , 均 $P<0.05$), 在 HepG2、SMMC7721细胞中表达无明显差异(1.42 ± 0.15 vs 1.47 ± 0.14 , $P>0.05$, 图2)。

2.2 siRNA抑制NF- κ B p65后, Bcl-2在肝癌细胞中的表达及细胞的凋亡状况

2.2.1 Western blot检测NF- κ B p65蛋白的表达: SiRNA转染HepG2和SMMC7721细胞24 h后NF- κ B p65蛋白的表达明显下调(2.08 ± 0.19 vs 0.99 ± 0.12 ; 2.03 ± 0.17 vs 0.94 ± 0.14 , 均 $P<0.05$, 图3)。

2.2.2 Western blot检测HepG2、SMMC7721细胞核中蛋白的表达: 沉默NF- κ B p65后, Bcl-2在肝癌细胞HepG2、SMMC7721细胞核中蛋白的表达水平明显降低(1.37 ± 0.05 vs 0.72 ± 0.02 ; 1.44 ± 0.03 vs 0.69 ± 0.03 , 均 $P<0.05$, 图4)。

2.3 siRNA NF- κ B p65对HepG2、SMMC7721细胞凋亡的影响 siRNA转染HepG2、SMMC7721细胞后24 h, SiRNA转染组细胞凋亡率显著增加, 明显高于未转染组细胞的凋亡率($5.12\% \pm 0.61\%$ vs $37.87\% \pm 4.10\%$; $5.80\% \pm 0.71\%$ vs $40.19\% \pm 3.78\%$, 均 $P<0.05$)。未转染组细胞之间的凋亡率差异无统计学意义($5.12\% \pm 0.61\%$ vs $5.80\% \pm 0.71\%$, $P>0.05$, 图5)。

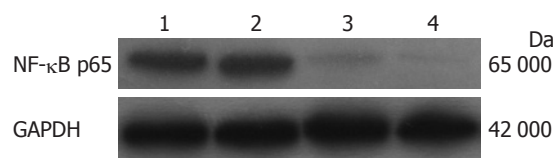


图 3 siRNA对HepG2、SMMC7721细胞NF- κ B p65表达的抑制作用。1: HepG2未转染组; 2: SMMC7721未转染组; 3: HepG2转染组; 4: SMMC7721转染组。

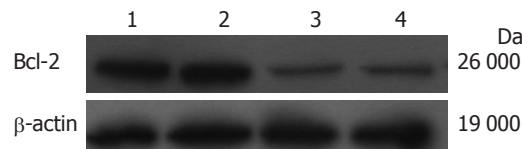


图 4 Bcl-2蛋白在HepG2、SMMC7721细胞及转染组中的表达。1: HepG2未转染组; 2: SMMC7721未转染组; 3: HepG2转染组; 4: SMMC7721转染组。

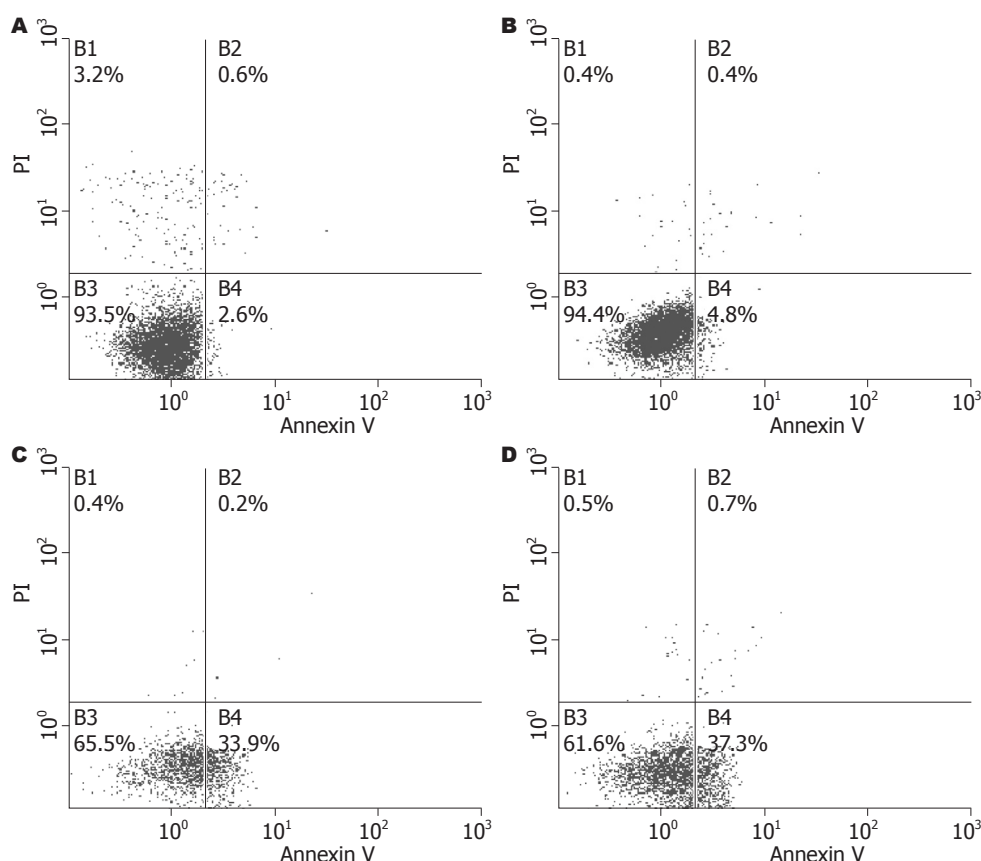
3 讨论

细胞凋亡相关基因**bcl-2**和NF- κ B基因表达的改变是肝癌的发生、发展过程中重要的调节因素^[2]。

NF- κ B是一种广泛存在于体内多种细胞的核转录因子, 在细胞的癌变及凋亡调控等方面发挥着重要作用, 目前有研究表明, NF- κ B信号转导途径参与了肝脏中原癌基因和抑癌基因的转录表达可通过抑制细胞凋亡参与肝癌的发生发展^[3-6]。bcl-2也是一种原癌基因, 由其编码的蛋白产物Bcl-2蛋白, 定位于细胞线粒体外膜、核膜及内质网膜上, 是一种膜定位蛋白, 促进细胞由G₁期向S期转化并修复染色体损伤, 与肿瘤的早期形成有关^[7]。

首先, 我们检测了肝癌细胞和人胚胎肝细胞中NF- κ B p65、Bcl-2的表达, 结果显示在肝癌细胞系(HepG2、SMMC7721)中二者均高表达, 明显高于正常人胚胎肝细胞中的表达。这同国内外的研究结果相符^[8,9]。为了进一步揭示二者是否存在调控关系, 我们应用基因沉默的方法下调NF- κ B p65的表达, 本实验显示转染p65 siRNA阻断NF- κ B信号通路后, 可使肝癌细胞凋亡明显增加, 同时Bcl-2的表达受到影响, 在实验组中Bcl-2的表达明显降低。这些结果表明: 在肝癌的发生发展中可能存在NF- κ B调控Bcl-2的表达, 通过抑制各种凋亡刺激信号从而抑制细胞凋亡, 在肝癌的发生中具有重要的作用。

大量研究^[10,11]提示, NF- κ B与Bcl-2可能在促进肝癌形成中具有协同作用, 可能的机制为NF- κ B基因的持续存在激活了原癌基因bcl-2, 进一步合成Bcl-2蛋白, 后者又反馈性刺激NF- κ B基



同行评价

本文方法得当, 结论可靠, 对于了解NF- κ B p65与Bcl-2在肝癌细胞发生相互关系及作用机制有研究意义。

图5 siRNA NF- κ B p65对HepG2、SMMC7721细胞凋亡的影响. A: HepG2未转染组; B: SMMC7721未转染组; C: HepG2转染组; D: SMMC7721转染组。

因的增殖, 形成环路状的级联放大, 使增殖信号不断加强。这与我们的实验结果相符^[12,13], 当使用p65 siRNA阻断肝癌细胞中NF- κ B信号通路时, Bcl-2的表达下调, 细胞凋亡数增加, 可以得出Bcl-2位于NF- κ B基因下游的结论。NF- κ B作为一种抑制凋亡的转录因子, 通过对**bcl-2**等下游抗凋亡基因的表达, 对癌细胞的正常程序化死亡产生抑制作用^[14,15]。我们的研究揭示NF- κ B是Bcl-2的上游调控基因。siRNA可以成功抑制NF- κ B p65在肝癌细胞中的活性, 进一步证实NF- κ B p65对Bcl-2具有调控作用, 他们共同参与了肝癌的发生发展过程。他们之间是直接调控还是间接调控及其具体调控机制还有待于进一步研究。

4 参考文献

- 1 Pinkenburg O, Platz J, Beisswenger C, Vogelmeier C, Bals R. Inhibition of NF-kappaB mediated inflammation by siRNA expressed by recombinant adeno-associated virus. *J Virol Methods* 2004; 120: 119-122
- 2 Elsharkawy AM, Mann DA. Nuclear factor-kappaB and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis. *Hepatology* 2007; 46: 590-597
- 3 Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004; 431: 461-466
- 4 Wang T, Wang Y, Wu MC, Guan XY, Yin ZF. Activating mechanism of transcription NF-kappaB regulated by hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 356-360
- 5 Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, Besançon F, Bauvy C, Souquère S, Pierron G, Codogno P. NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J Biol Chem* 2006; 281: 30373-30382
- 6 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 340-344
- 7 Beerheide W, Tan YJ, Teng E, Ting AE, Jedpiya-wongse A, Srivatanakul P. Downregulation of pro-apoptotic proteins Bax and Bcl-X(S) in p53 overexpressing hepatocellular carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273: 54-61
- 8 Chen Y, Li R, Wang R, Liu Z. [The significance of nuclear factor kappa Bp65 (NF kappa Bp65) expression on the vascular endothelial cells of rectum adenocarcinoma of human]. *Huaxi Yike Daxue Xuebao* 2001; 32: 196-199
- 9 O'Neil BH, Bůzková P, Farrah H, Kashatus D, Sanoff H, Goldberg RM, Baldwin AS, Funkhouser WK. Expression of nuclear factor-kappaB family proteins in hepatocellular carcinomas. *Oncology* 2007; 72: 97-104
- 10 Pereira SG, Oakley F. Nuclear factor-kappaB1: regulation and function. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;

- 40: 1425-1430
- 11 Yu Y, Wan Y, Huang C. The biological functions of NF-kappaB1 (p50) and its potential as an anti-cancer target. *Curr Cancer Drug Targets* 2009; 9: 566-571
- 12 Wu LF, Li GP, Su JD, Pu ZJ, Feng JL, Ye YQ, Wei BL. Involvement of NF-kappaB activation in the apoptosis induced by extracellular adenosine in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Biochem Cell Biol* 2010; 88: 705-714
- 13 Huang C, Yao JY, Li ZF, Liu LY, Ni L, Song TS. [Small interfering RNA-mediated nuclear factor-kappaB P65 suppression induces apoptosis of hepatic carcinoma SMMC-7721 cells]. *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 2007; 27: 1841-1844
- 14 Arsura M, Cavin LG. Nuclear factor-kappaB and liver carcinogenesis. *Cancer Lett* 2005; 229: 157-169
- 15 Herman MD, Nyman T, Welin M, Lehtiö L, Flodin S, Trésaugues L, Kotenyova T, Flores A, Nordlund P. Completing the family portrait of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: crystal structure of human Bfl-1 in complex with Bim. *FEBS Lett* 2008; 582: 3590-3594

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

招聘生物医学编辑部主任

本刊讯 百世登出版集团(Baishideng Publishing Group Co., Limited, BPG)已经为各位编辑部主任搭建好整体架构, 希望培养出对编辑与出版行业真正感兴趣甚至愿意将其作为终身事业的专业人才, 成为BPG的核心人物. 欢迎应届毕业生加盟BPG团队, 请将您的简历E-mail发至: j.l.li@wjgnet.com

■ 工作职责

- 1 贯彻执行员工手册、编辑手册、编委手册和作者手册.
- 2 根据作者指南及学科发展动向和读者的需求, 制订期刊的总体发展规划, 负责编辑、出版、发行和经营管理.
- 3 策划年度编委会成员的社论和专题亮点等栏目约稿, 并按照计划负责监督落实.
- 4 负责期刊同行评议和定稿会, 按期编排、加工, 发排稿件, 发排后参与校对或审核校样、核红、签字付印.
- 5 组织期刊印刷版或网络版出版后审读, 发现问题及时修改.

■ 职位要求

硕士及以上学历, 具有生物医学专业学科背景及丰富的写作和发表生物医学文章者优先录用.

■ 薪资待遇面议

■ 培训流程

第一步学习手册; 第二步编务; 第三步排版制作; 第四步编辑; 第五步投稿办公系统操作; 第六步期刊网络系统学习; 第七步期刊管理培训; 第八步BPG管理委员会考核; 第九步考核通过后正式签订劳动合同, 并颁发编辑部主任聘任书.