# NF-kB 拮抗剂 PDTC 对 HepG2 细胞的抑制及对 caspase-3 表达的影响

石 炜 曾 斌△ 张 杰 谈 高 熊 丹

(南华大学附属第一医院消化内科 湖南 衡阳 421001)

**摘要** 目的:研究 NF-kB 拮抗剂 PDTC 诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡及其对凋亡相关基因 caspase-3 表达的影响,初步探讨其诱导凋亡的可能机制。方法:以不同浓度的 PDTC 处理人肝癌 HepG2 细胞,利用 MTT 法检测对人肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响;利用 RT-PCR 和 Western-blot 检测 caspase-3 mRNA 和蛋白的表达。结果:不同浓度 PDTC 作用人肝癌 HepG2 细胞不同时间后,能够显著抑制 HepG2 细胞的生长增殖,存在剂量和时间依赖性 ($P<0.05$);PDTC 能够上调 HepG2 细胞中 caspase-3 mRNA 和蛋白的表达。结论:NF-kB 拮抗剂 PDTC 对人肝癌 HepG2 细胞产生显著抑制,并能上调 HepG2 细胞中 caspase-3 mRNA 和蛋白的表达。

**关键词**:PDTC;人肝癌 HepG2 细胞;caspase-3

**中图分类号**:R735.7 **文献标识码**:A **文章编号**:1673-6273(2011)09-1651-04

# Effect of NF-kB Antagonist PDTC in Inhibition of Human Hepatic Carcinoma Cell HepG2

*SHI Wei, ZENG Bin△, ZHANG Jie, TAN Gao, XIONG Dan*

*(The First Affilliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001 Hunan China)*

ABSTRACT Objective: To investigate the role of apoptosis by PDTC,the selective inhibit of NF-kB on human hepatic carcinoma cell (HepG2). and the effect of expression of csaspase-3,principium disguisition the likely mechalism which induce HepG2 cells apoptosis. Methods: After treating human hepatic carcinoma cell (HepG2) by PDTC, MTT assay was used to observe the growth inhibition of cell-HepG2. The mRNA and protein expression of caspase-3 were detected by RT-PCR and Western-blot assay, respectively. Results: When PDTC was given, growth inhibition and elevated apoptosis of HepG2 cells were detected,which was showed in a dose- and time- - dependent manner, PDTC up-regulated the lever of mRNA and protein expression of caspase-3. Conclusion: PDTC can induce apoptosis of human hepatic carcinoma cell HepG2 cells,which may be performed by up-regulated of caspase-3 expression.

Key word: PDTC human hepatic carcinoma cell HepG2 caspase-3

Chinese Library Classification: R735.7 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2011)09-1651-04

## 前言

肝脏肿瘤的发生和发展与凋亡相关基因的缺失或过度表达有关。NF-kB 因子激活具有持续性刺激细胞正性生长信号及阻滞程序性死亡的双重作用,从而引起细胞发生恶性转化[I]。Caspase-3 是细胞凋亡的执行分子,其激活后导致细胞的不可逆性凋亡。它在肝癌细胞凋亡过程中,起着非常重要的作用[II]。目前尚未见报道能否通过抑制 NF-KB 活性来激活 caspase-3,从而达到促进肝癌细胞凋亡。本试验旨在研究 NF-KB 拮抗剂(PDTC)诱导肝癌细胞凋亡过程中,NF-KB 活性抑制与 caspase-3 表达水平之间的关系,为治疗肝癌提供理论基础和实验依据以及对肿瘤治疗及预后评估提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

人肝癌 HepG2 细胞株由中南大学湘雅细胞库提供,新生牛血清购自杭州四季青公司,DMEM 培养基购自美国 HyClone 公司,二氧化碳培养箱为美国 Harris 公司产品,PDTC、MTT 试剂及 RNA 提取试剂盒为上海生工生物工程公司产品,逆转录试剂盒购自加拿大 Fermentas 公司,RT-PCR 引物由上海生工生物工程公司合成,PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司产品,凝胶图像分析仪为美国 Alpha Innotech 公司产品。一抗兔抗人 caspase-3 抗体和二抗羊抗人抗体、兔抗人 β -actin 均购自武汉博士德公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 HepG2 细胞培养 将肝癌细胞 HepG2 置于 20%小牛血清的 RpMI1640 培养液中,于 37℃、5%$CO_2$ 培养箱中培养,传代采用 0.25%胰酶,每 3-5 天传代 1 次,长至对数生长期。

1.2.2 MTT 法测定 PDTC 对 HepG2 细胞生长的抑制作用 取对数生长期的 HepG2 细胞,将细胞以 $5\times 10^4$ 个 /ml 的浓度 200ul/ 孔接种于 96 孔板上,24h 后吸去上清,加人浓度为 50、100、150、200mmol/L 的 PDTC200ul,同时设空白对照和不含药物的正常对照孔(每组重复 4 孔),细胞继续培养 24、48、72h 后每孔加人 MTT(5mg/ml)20ul,继续培养 4h,弃上清,每孔加入 150u1DMso,振荡 10-20min 充分溶解结晶后用酶标仪于 490nm 下测定每孔的吸光度(A490)。不同浓度 PDTC 对 HepG2 细胞的抑制率 (P)= (1- 实验组 A490 值 / 对照组 A490 值)

作者简介:石炜,硕士研究生,研究方向:肝癌的发病机制及防治。Email:rmyysw@163.com 电话:18674789796

△通讯作者:曾斌,副教授,副主任医师,硕士生导师,研究方向:消化道肿瘤的发病机制及防治。Email:zbss1229@163.com.

(收稿日期:2011-01-08 接受日期:2011-01-31)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

× l00%。

1.2.3 RT-PCR 检测 caspase-3mRNA 的水平 收集上述处理（不同浓度 PDTC 加入后培养 48h）的肝癌细胞：①采用 TRIzal 试剂一步法提取细胞总 RNA，紫外分光光度计测定纯度并定量。②通过逆转录反应合成 cDNA。③PCR 反应中引物的设定：β -actin 引物序列 (378bp) 上游 5'-CGGTTGGC CTTGGGGTTCAGGGG-3' 下游 5'-ATCGTGGGGCGCC-CCAGGCACCA-3'。caspase3 引物序列（239bp）上游:5'-TGC-CTCTTCCCCCATTCTC-3' 下游 5'-GAGGTT TGCTGCATC-GACAT-3'④用 SYBRGreenPCR 试剂盒在定量 ABI7300PCR 仪上进行 PCR 检测，以 β -actin 作为内对照，反应参数为 95℃预变性 10min，94℃变性 15s，58℃退火 30s，72℃延伸 45s，循环 36 次，60℃ 1min。20ul 反应体系中包括：上下游引物各 lul (5pmol)，ZxMix7ul（包括反应缓液，sYBRGreenl, dNDP, Taq 酶），双蒸水 10ul，cDNA 标本 1ul。⑤对定量 PcR 产物作琼脂糖凝胶电泳，观察扩增产物。

1.2.4 凝胶图像的获取与分析 各 PCR 扩增产物各取 3μl，用 15g/L 琼脂糖凝胶电泳检测，采用 AlphaImager 2200 数字凝胶成像系统分析程序，以 β-actin 作为内参照，测定各组 caspase-3 mRNA 的相对表达量。

1.2.5 western- blot 检测 caspase-3 蛋白表达 收集上述处理的肝癌细胞，用细胞裂解液「10nmol/LHEpES (pH7.9) 15mmol/LMgC1$_2$,10mmol/LKCl,05nmol/LDTT,0.2mmoFLPMSF，0.1mmol/LEDTA」裂解肝癌细胞，得胞质蛋白。用 BcA 法测定蛋白浓度后，取 50ug 蛋白上样到 10%的 SDS 一聚丙酞胺凝胶，电泳、转移至 PvDF 膜，5%的 BSA(溶于 TBST 中)室温下封闭 2h，用抗 Caspase3 (1:l000) 4℃孵育过夜，设 β -actin 为内参照，再用相应辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2000)孵育 lh，TB-ST 洗膜 10minx3 次，配置新鲜发光液，将膜孵育 3min，暗室 x 光片曝光 1min-5min，显影 1min，定影 30s 成像.

1.3 统计学处理

各分组所得计量数据采用均数± 标准差 ($\bar{X}$± S) 表示，用 SPSS13.0 软件处理数据，两组间均数比较用 t 检验。检验水准 α =0.05，P<0.05 有统计学意义。

## 2 结果

2.1 PDTC 对 HepG2 细胞的抑制作用

50-200μmol/L 的 PDTC 分别作用 HepG2 细胞 24、48、72h 后，HepG2 细胞生长受抑制，且抑制作用与时间及剂量呈正相关，各浓度组作用不同时间后与对照组相比，差异具有显著性（P<0.05）。见表 1：

2.2 RT-PCR 检测 caspase3 mRNA

表 1 PDTC 对肝癌细胞 HepG2 的抑制作用

Table 1 The inhibition of HepG2 after the treatment by PDTC

| Group | Inhibition ratio | | |
|---|---|---|---|
| | 24h | 48h | 72h |
| Control group | 1.47± 0.76 | 2.55± 0.90 | 4.02± 1.00 |
| 50umol/L group | 42.02± 0.98 | 44.83± 1.30 | 48.89± 1.50 |
| 100umol/L group | 47.02± 1.05 | 51.14± 1.03 | 54.79± 1.75 |
| 150umol/L group | 51.42± 0.85 | 54.67± 1.30 | 64.83± 1.51 |
| 200umol/L group | 55.02± 1.15 | 61.82± 1.55 | 74.25± 1.35 |

Note:PDTC group compare with control group,P<0.01.

RT-PCR 法在不同浓度 (50-200μmol/L)PDTC 作用的 HepG2 细胞中扩增出长度为 239bp 的 caspase3 mRNA 片段，且与加入的 PDTC 浓度呈正相关，与对照组相比，差异具有显著性（P<0.05），见图 1：

2.3 Western-Blot 检测 caspase-3 蛋白

Western-Blot 检测不同浓度 PDTC 作用 48 小时后 caspase-3 蛋白表达，结果 caspase-3 蛋白表达与 PDTC 作用浓度呈正相关，且与对照组相比差异有显著性（P<0.05），结果见图 2:

## 3 讨论

肿瘤不仅可以看作是一种细胞生长较其来源组织生长更快的组织，也可以看作是一种细胞死亡率大大减少的组织，近年来的研究发现[8]，人类恶性肿瘤的发生、发展与细胞凋亡相关基因的改变密切相关。已经有研究表明[14]，肝脏肿瘤的发生和发展与凋亡相关基因的缺失或过度表达有关。

NF-kB 是一组广泛存在于哺乳动物细胞中的转录因子，它在核内是活化的，以 NF-kBp65/p50 二聚体方式存在，而在胞质中是无活性的。在刺激因子的作用下，NF-kB 被激活，转入核内，调节下游基因的表达。NF-kB 激活具有持续性刺激细胞正性生长信号及阻滞程序性死亡的双重作用，从而引起细胞发生恶性转化[3,9]。近些年来，很多研究发现，NF-KB 对肿瘤的起源、发展、血管新生和转移及肿瘤细胞凋亡具有重要作用，并与肿瘤细胞耐药性的产生关系密切[13]。有研究表明[6]，肝癌组织中 NF-kB 蛋白表达水平显著高于癌旁组织和正常肝组织，提示 NF-kB 参与了肝癌的发生和发展过程，主要通过抑制细胞凋亡的方式对 HCC 的发生发展起重要作用，因此，NF-kB 有望成为针对细胞凋亡的基因治疗的新靶点，NF-kB 选择性抑制剂的应用可能起到促进肝癌细胞凋亡，抑制肿瘤生长的作用[10]。另外，在化疗过程中，当 NF-KB 激活被抑制时，可以更有效的诱导细胞凋亡，引起肿瘤消退[4]。

PDTC 是 NF-kB 特异性拮抗剂 [10]，本实验通过不同浓度 PDTC 作用于 HepG2 细胞，发现 PDTC 对 HepG2 细胞的生长

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

起抑制作用，且与作用时间及剂量呈正相关，提示 PDTC 可通过抑制 NF-kB 活性来抑制 HepG2 细胞生长，其机制可能与 PDTC 阻断 NF-KB 介导的凋亡抑制途径有关。

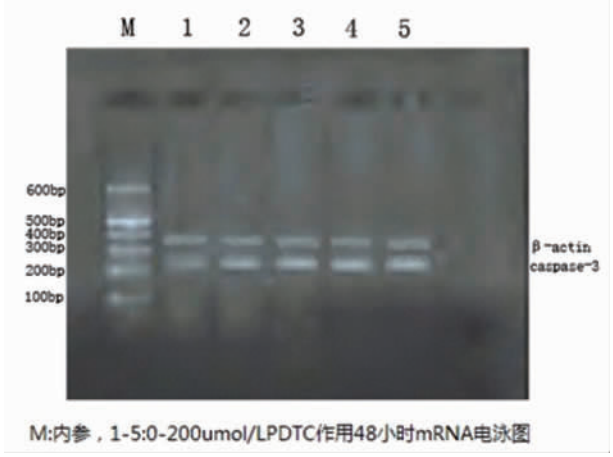


图 1 不同浓度 PDTC 处理 48h 后 caspase-3 mRNA 扩增电泳图

Fig.1 The amplification electrophoretogram of caspase-3 mRNA handled by different concentration PDTC for 48 hours

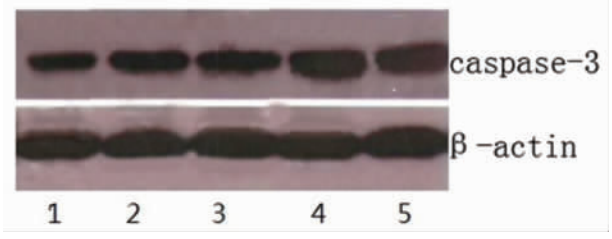


图 2 不同浓度 PDTC 作用 48 小时后 caspase-3 蛋白表达

Fig.2 The protein expression of caspase-3 handled by different concentration PDTC for 48 hours

Caspase-3 是介导细胞凋亡的一类蛋白水解酶，是凋亡执行的重要效应分子，它在肝癌细胞凋亡过程中，起着非常重要作用[2,5]。Caspase-3 在多种因素诱导的肝癌细胞凋亡中激活，抑制 caspase-3 活化和活性，能够抑制肝癌细胞凋亡。目前研究发现化疗药物治疗肿瘤的主要机制在于诱导肿瘤细胞凋亡，肿瘤对治疗的耐受原因是对凋亡诱导不敏感。鉴于目前肝癌化疗效果普遍不佳，根据 caspase-3 在肝癌细胞凋亡过程中的作用，可以考虑设计以 caspase-3 为靶标的肝癌治疗方案，以降低肝癌化疗的耐药性，提高治疗效果。NF-κ Bp65 是 NF-κ B 的一种活性形式，有实验提示 NF-κ Bp65 与 Caspase-3 表达呈负相关[7]。也有学者报道 NF-κ Bp65 对 Caspase-8 有直接阻断作用，抑制由此途径诱导的 Caspase-3 活化[12]。本实验通过 NF-kB 拮抗剂 PDTC 作用于 HepG2 细胞，用 RT-PCR 法检测 Caspase-3mRNA 水平，用 Western-Blot 检测 Caspase-3 蛋白表达，结果表明 csapase-3mRNA 和蛋白的表达量与 PDTC 的浓度呈正相关，提示可通过抑制 NF-kB 活性来上调 csapase-3 表达，促进肝癌细胞凋亡。

综上，NF-kB 有可能成为诱导肿瘤细胞凋亡的分子靶点，通过调控 NF-kB 的活性，诱导肿瘤细胞凋亡，有可能成为肿瘤治疗的一个较有前景的方向，为肿瘤临床治疗提供一条新的途径。

## 参 考 文 献 (References)

[1] Brummel kamp TR, Ni jman SM, Dirac AM, et al. Loss of the cylin dromatosis tumor suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappa B[J]. Nature,2003,424:738-739

[2] HuaZou.Ahuman. Protein homologous to C. Elegonsced-4, partici-Pates in cytochrome -c-dePendent，activation of caspase-3 Cell [J]. Med Pediatr Oncol, 2006,90:405-413

[3] Ilmore TD. The Rel / nf-kappa B / I kappa B signal transduction pathway and cancer[J]. Cancer Treat Res, 2006,115:241-265

[4] 周永芹，韩莉，NF -κ B 与肿瘤关系的研究进展[J]. 现代肿瘤医学，2008，16 (5) ：558-560
Zhou yong qin, Han li, The research progress about the relation of NF-κ B and tumour [J]. Journal of Modern oncology, 2008,16 (5) : 558-560

[5] 郑雪梅，张端莲，贺红旗等.Caspase-3 在肝癌组织中的表达及意义[J].数理医药学杂志，2005,18:428-429
Zhen xue-mei, Zhang Duan-lian, He hong-qi, et al. The expression and significance of caspase-3 in hepato carcinoma tissue[J]. Journal of Mathematical Medcine, 2005, 18: 428-429

[6] 邸海灵，孔丽，孙殿兴，核因子 KB 在肝癌组织中的表达及其与细胞增殖和凋亡关系[J], 临床荟萃，2008，23 (17) ：1230-1233
Di hai ling, kong li, Sun dian xing. The expression of NF-kB in hepato carcinoma tissue And the relation about cell proliferation and apoptosis[J].Clinic assemble, 2008,23 (17) :1230-1233

[7] Chaud hary, P.M, M.T. Eby, A. Jasmin, et al. Activation of the NF-kappaB pathway by caspase-3 and its homologs [J]. Oncogene, 2005,19:4451-4460

[8] Gruker BM. Trcmscription factor NF-kB: a new perspective in anti-cancer therapy[J]. Postepy Biochem, 2004.50(2):118-130

[9] Suh Rabson A.B.NF-kB activation in human prostate cancer:important mediator or epiphenomenon? [J]. J cell Biochem, 2004, 91 (1): 100-117

[10] Alexander Golks, Dirk Brenner, Peter H. Krammer, and Inna N. Lavrik, The selective inhibit of NF-kB (PDTC) induces NF-κ B activation[J].Cancer Res, 2006,15:245-248

[11] Jonsson G, Panlie S, Grandien A, et al. High level of caspase-3 correlates with resistance to death receptor induced apoptosis in bladder carcinoma cells [J]. Anticancer Res, 2005,23 (2):1213-1218

[12] Persad R, Liu C, Wu TT, et al. Over expression of caspase-3 in hepato cellular carcinomas[J]. Modern Pathology, 2004,17:861-867

[13] Bentires R, Aeed H, Schey R, et al. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells [J]. Oncogene, 2006,9(2):90-97

[14] 张百红，姜宁雨，肝癌组织 caspase-3 基因表达与细胞凋亡的关系[J]. 第四军医大学学报，2002,23(1):35238
Zhang bai hong, Jiang ning yu. The relation about gene expression of caspase-3 and apoptosis in hepato carcinoma tissue[J]. Journal of The Fourth Military Medical University, 2002,23(1):35238

[15] Kas of GM, Gomes BC. Livin, an over inhibitoro fapoptosis Protein Family member [J]. BiolChem, 2003, 276:3238-3246

[16] AshhabY, AlianA, PolliaekA, et al. Two Splicin gvariants of a new Inhibitoro fapoptosis gene with different biological Properties and

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

tissue Distribution Pattem[J]. FEBS Lett, 2005, 495:56-60

[17] YagihashiA, AsanumaK, et al. Detection of antilivin antibody in Gastronite stinaleaneer Patients l[J]. ClinChem, 2003, 49:1206-1208

[18] PerkinsND. The Rel NF-KappaB family end and foe[J]. Trends BioehemSci, 2005, 25:434-440

[19] 邢丽华,樊再雯,刘剑波等. PDTC 对人肺腺癌 A549 细胞 cox-2 和 vEGF 表达的影响及意义[J].山东医药,2005,45:24-25
Xing li hua, Fan zai wen, Liu jian bo, et al. The effection and meaning of PDTC on the expression of cox-2 and vEGF of human lung adeno Carcinoma A459 cells[J]. Shandong Med J, 2005, 45:24-25

[20] 李琦,于颖彦,朱正刚,等.NF-kB 组成性激活对胃癌细胞增殖的影响及机制研究[J].中华实验外科杂志,2005,21:957-960
Li yi, Yu yin yan, Zhu zheng gang, et al. The research of NF-kB constitutive activation on proliferation and mechanism of Gastric carcinoma cells [J]. Chinese Journal of experimental Surgery, 2005, 21: 957-960

[21] 徐进,文继舫,胡忠良等.caspase-3 蛋白在胃癌及非典型增生中的表达及其与细胞凋亡的关系 [J]. 湖南医科大学学报,2004,27: 181-182
Xu jin, Wen ji fang, Hu zhong liang, et al. The expression of caspase-3 protein on Gastric carcinoma and atypical hyperplasia and the relationship on cell apoptosis [J]. Journal of Science of Human Medical, 2004,27:181-182

# 封面说明

## 共同的画卷

## 封面设计说明

自 1997 年第一只克隆羊多利的诞生拉开了人造生命的序幕,2010 年,可谓是人造生命科学发展的一个新的里程碑。本刊 2011 年封面设计的灵感来自于人造生命技术的蓬勃发展:① 封面背景以第三代测序技术即基于纳米孔的单分子实时 DNA 测序技术的研制成功为契机(图中,偏下),这为人造生命及人类健康提供了强有力的技术支撑。② 封面图案以 2010 年诺贝尔生理与医学奖的体外受精技术(即试管婴儿),最强壮晶胚的筛选技术,人工卵巢及人类卵细胞的培育技术为主体(图上,右,中,左),这些不仅为不孕不育患者带来了福音,同时为社会的稳定与和谐贡献了力量。③ 封面图案同时也融合了人造生命的最新研究成果即首个能自我生长,繁殖的人造生命细胞 Synthia 的问世(六边形图,右),由干细胞培育出的肺脏(六边形图,左)等最新研究成果。④ 封面图案同时也展示了人造生命发展的伦理学争议与潜在的危机,关于艾滋病的研究取得了很多成就,但我们还没有攻克艾滋病,特别是 Superbug 耐药性超级细菌的出现,让无数人感到前所未有的恐慌(六边形,中)。⑤ 生命科学的一切研究成果,只不过是生物医学历史的长河中一朵浪花,因此图片采用波浪形设计,如河流奔涌向前,如画卷色彩缤纷,如电影胶片所有的成就与辉煌一闪而过,未来会更加让人期待。新技术新理论的发明与发展,需要有准备的大脑,也需要灵光突闪的思想火花。对于与人类密切相关的生物医学领域,我们如图中的小孩一样,睁大纯真的眼睛,好奇的观察、了解,我们也需要运用一系列的技术手段,面对未知的一个个"黑箱"问题,需要细心大胆的研究、推断;同时我们需要时刻警觉生命科学技术发展应用这把双刃剑潜伏的危机,应当科学探索并利用自然规律来更好的为人类服务。

我们坚信,《现代生物医学进展》正是为生物医学领域的科研工作者提供了这样一个可以充分挥洒展示的画卷的平台,不断记录着生物医学领域最新最成功的成果。这是我们共同的画卷,让我们与你们共同分享灵感与喜悦,成功与辉煌!

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net