

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.06.004

siRNA 干扰 NF- κ B 家族成员表达抑制人肝癌 HepG2 细胞表达 NKG2DLs

黄宇贤¹, 陈心彤², 蔡宋浩³, 龙慧¹, 郭坤元¹, 吴秉毅¹, 宋朝阳¹, 贺艳杰¹, 李玉华¹(1. 南方医科大学珠江医院血液科, 广东广州 510282; 2. 纽约州立大学西奈山医学院伊坎基因组学与高维生物学研究所, 美国纽约 10029; 3. 中山大学附属汕头医院血液科, 广东汕头 525031)

[摘要] **目的:** 探讨舒尼替尼诱导人肝癌 HepG2 细胞表达的自然杀伤细胞 2 族成员 D 配体(natural killer group 2 member D ligands, NKG2DLs)与核因子 kappa B(nuclear factor B kappa, NF- κ B)信号通路之间的相互作用。**方法:** 常规体外培养 HepG2 细胞, 利用实时荧光定量 PCR 检测 1 μ mol/L 舒尼替尼处理 HepG2 细胞 24 h 前后 NF- κ B 基因家族成员 mRNA 的表达情况, 利用计算机辅助设计并合成 NF- κ B1、NF- κ B2 和 RelB siRNA 引物, 通过脂质体法将目的基因 siRNA 转染于 HepG2 细胞, 荧光显微镜观察转染情况, 实时荧光定量 PCR 检测干扰效率, Western blotting 检测 siRNA 转染前后 HepG2 细胞内 NF- κ B1、NF- κ B2 和 RelB 蛋白表达, 流式细胞术检测 siRNA 前后 HepG2 细胞 NKG2DLs 表达率。**结果:** 实时荧光定量 PCR 结果显示, 舒尼替尼处理 HepG2 细胞后, NF- κ B1、NF- κ B2 和 RelB mRNA 表达水平升高, 主要以 NF- κ B2 mRNA 和 RelB mRNA 升高为主。荧光显微镜观测 siRNA 转染后 HepG2 细胞红色荧光表达率约为 60%, 干扰效率达 95% 以上。siRNA 转染后 HepG2 细胞内 NF- κ B1、NF- κ B2 和 RelB 蛋白表达水平明显下降, siRNA 转染 + 药物组 NKG2DLs 表达率明显低于药物处理组 ($P < 0.05$)。**结论:** 首次揭示了舒尼替尼通过 NF- κ B 旁路途径诱导肿瘤细胞表达 NKG2DLs。

[关键词] 舒尼替尼; 肝细胞癌; 干扰 RNA; HepG2 细胞; NF- κ B 家族成员

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)06-0696-07

The inhibitory effect of siRNA silencing NF- κ B gene family members on the expressions of NKG2DLs on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells

Huang Yuxian¹, Chen Xintong², Cai Songhao³, Long Hui¹, Guo Kunyuan¹, Wu Bingyi¹, Song Chaoyang¹, He Yanjie¹, Li Yuhua¹(1. Department of Hematology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China; 2. Icahn Institute for Genomics and Multiscale Biology, Mount Sinai School of Medicine Levy Place New York, NY 10029, USA; 3. Department of Hematology, Shantou Hospital Affiliated to Sun Yat-sen University, Shantou 525031, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the interaction between the natural killer group 2 member D ligands (NKG2DLs) expressions and NF- κ B signaling pathway in HepG2 cells treated with sunitinib. **Methods:** HepG2 cells were cultivated by routine method. The mRNAs of NF- κ B gene family members in HepG2 cells were quantitated by RT-qPCR. The siRNAs specific for NF- κ B1, NF- κ B2 and RelB were designed using a computer soft and synthesized. They were transfected into HepG2 cells using liposome. The transfection and interference efficacy were evaluated by fluorescence microscopy, and real-time quantification PCR respectively. The expressions of NF- κ B1, NF- κ B2 and RelB were determined by immunoblotting, and the expressions of NKG2DLs were assessed by Flow cytometry. **Results:** The mRNAs of NF- κ B1, and especially NF- κ B2 and RelB were significantly increased in HepG2 cells treated with sunitinib. In siRNA transfection exper-

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金资助项目(No. 81302372, 81300431); 南方医科大学珠江医院优秀中青年人才项目资助(No. 201207008)。Project supported by the National Natural Science Foundation for Young Scientists of China(No. 81302372, 81300431), and the Excellent Middle and Young Aged Experts Project of Zhujiang Hospital Southern Medical University(No. 201207008)

[作者简介] 黄宇贤(1980 -), 男, 广东省揭阳市人, 博士, 副主任医师, 主要从事肿瘤生物治疗相关研究, E-mail: hyx6610@163.com

[通信作者] 李玉华(Li Yuhua, corresponding author), E-mail: liyuhua2011gz@163.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20151216.1243.008.html>

iments, the red fluorescence was present in about 60% of HepG2 cells under fluorescence microscope, and the interference efficiency was 95%. Immunoblotting revealed that NF- κ B1, NF- κ B2 and RelB were decreased significantly in HepG2 cells after the transfection. Flow cytometry analysis found that the expressions of NKG2DLs in the siRNA transfected group was significantly lower than that in drug treatment group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Sunitinib induces the expressions of NKG2DLs on hepatocellular carcinoma HepG2 cells by the activating the alternative NF- κ B pathway.

[**Key words**] sunitinib; hepatocellular carcinoma; interference RNA; HepG2 cell line; NF- κ B gene family member

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(6): 696-702]

晚期肝细胞癌常规治疗手段效果差,无标准可循的治疗方案,能延长患者生存期及减轻疾病痛苦就是理想的治疗方法^[1]。分子靶向药物联合 NK 细胞治疗晚期肝癌,能够延长患者生存期及治疗相关不良发应少,有望为这一类患者带来治疗的希望^[2]。本专题前几篇论文证实,舒尼替尼处理肝细胞癌 HepG2 细胞株,一方面阻断肝癌细胞特异性靶点,诱导肿瘤细胞凋亡;另一方面能够诱导肿瘤细胞表达自然杀伤细胞 2 族成员 D 配体 (natural killer group 2 member D ligands, NKG2DLs),促进 NK 细胞杀伤活性。但是,舒尼替尼通过哪些信号通路和关键基因诱导肿瘤细胞表达 NKG2DLs 的分子机制仍莫衷一是。文献 [3] 报道, NF- κ B 基因家族与药物介导的肿瘤细胞 NKG2DLs 表达上调有关。NF- κ B 基因家族成员包括 p105-p50 (NF- κ B1)、p100-p52 (NF- κ B2)、RelA (p65)、RelB 和 C-Rel, NF- κ B 基因家族具有多种转录功能调节作用,广泛参与了免疫细胞的调控、活化、增殖和凋亡,以及炎症、肿瘤的发生发展过程^[4-5]。NF- κ B 有两种激活途径,一种是由 NF- κ B1 与 RelA 形成二聚体组成的经典激活途径,另一种是由 NF- κ B2 和 RelB 形成二聚体组成的旁路激活途径,至于启动哪条激活途径与激活因素有关^[6]。静息状态下, NF- κ B 与其抑制分子 I κ B- α 结合存在于细胞质中,当受到外界激活因子活化时,其抑制分子 I κ B- α 发生磷酸化后与 NF- κ B 解离, NF- κ B 位移进入核内,与相应目的基因启动子结合位点结合发挥生物效应^[7]。而舒尼替尼具体通过 NF- κ B 哪条活化途径激活肿瘤细胞上调表达 NKG2DLs,目前国内外文献未见报道,本研究将对此进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

人肝癌细胞株 HepG2 由本实验室保存,用含双抗(青霉素+链霉素)及胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养。苹果酸舒尼替尼购自美国

辉瑞公司,抗 MICA/B 单抗、抗 ULBP1-3 单抗购自美国 BD 公司, PE 标记羊抗鼠 IgG₁ 购自上海远慕生物公司, Gibco 胎牛血清购自上海玉博生物科技有限公司, RPMI 1640 购自上海玉博生物医药科技有限公司, cDNA 合成和 PCR 试剂购自立陶宛 Fermentas 公司,引物由上海英骏生物公司合成, LipofectamineTM RNAiMAX 转染试剂购自 Invitrogen 公司 (Cat. No. 13778-075), HRP 标记的 GAPDH 内参抗体购自上海康成生物工程有限公司,一抗 NF- κ B1、NF- κ B2、RelB 兔单抗购自 BD 公司,羊抗兔二抗 IgG (H + L chain specific) 购自 Southern Biotech, Immobilon western chemilum HRP substrate 购自 MILLIPORE 公司, Opti-MEM 培养基购自 Gibco 公司 (Cat. No. 31985-070), Immobilon-P transfer membrane 购自 MILLIPORE 公司,流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司, Biophotometer 生物分光光度计购自美国 Eppendorf 公司, PE9700 PCR 仪购自美国 PE 公司,水平核酸电泳仪购自美国 One Lambda 公司,倒置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 实时荧光定量 PCR 检测舒尼替尼对 HepG2 细胞 NF- κ B 基因家族成员 mRNA 表达的影响

收集 1 μ mol/L 舒尼替尼孵育 24 h 前后的 HepG2 细胞,分为 HepG2 细胞未处理组和 HepG2 细胞药物处理组。用 RNA 试剂盒提取细胞总 RNA,电泳鉴定 RNA 纯度,反转录合成 cDNA。实时荧光定量 PCR SYBR 反应体系总体积为 100 μ l,反应条件如下:94 $^{\circ}$ C .5 min,94 $^{\circ}$ C .45 s,60 $^{\circ}$ C .1 min,30 个循环,同时设空白对照。PCR 反应前 3 ~ 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号,调节基线至适宜处,各荧光曲线与基线交叉点的循环数即为 Ct 值。根据公式 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\beta\text{-actin}}$ 和 $\Delta \Delta Ct = 2^{-\Delta Ct}$,计算检测基因的 mRNA 相对表达量,每组重复 3 次并取平均值。所检测的 NF- κ B 基因家族成员 PCR 引物序列见表 1。

表 1 NF-κB 基因家族成员 mRNA 引物序列
Tab. 1 Primers of NF-κB gene family members mRNA

Gene	Primer	Sequence	Size (bp)
NF-κB1	Sense	5'-ACTGGCTGAGCGGATGCATC-3'	165
	Antisense	5'-TGCTGTGGTCAGAAGGAATG-3'	
NF-κB2	Sense	5'-GAACAGCCTTGCATCTAGCC-3'	249
	Antisense	5'-CAGAGTCCGAGTCGCTATCA-3'	
RelA	Sense	5'-TAGAGACAGAAGCAGGCTGG-3'	191
	Antisense	5'-CAGAGACCTCTGTAGGGCAG-3'	
RelB	Sense	5'-CACAAACACATCAGAGCTGC-3'	223
	Antisense	5'-AATCTCCAGGTCTCTCGTAGG-3'	
C-Rel	Sense	5'-CAGAAACTGTGCCAGGATCA-3'	346
	Antisense	5'-CCACTGATGACCAGCTTGAA-3'	

1.3 利用 siRNA 技术阻断 NF-κB1、NF-κB2 和 RelB 基因表达

1.3.1 siRNA 制备及转染 从 Genbank 中获得已知的人 NF-κB1、NF-κB2 和 RelB 的序列(序列号: NM_021975.3、NM_001077493 和 NM_006509), 采用 Sigma 公司提供的软件和设计试剂盒设计合成 siRNA 的序列。以无关序列作为阴性对照, 各 siRNA 序列见表 2。

表 2 NF-κB1、NF-κB2 和 RelB siRNA 序列
Tab. 2 siRNA sequences of NF-κB1, NF-κB2 and RelB

Gene	siRNA sequence
NF-κB1	Sense 5'-GCCCUAUCUUUACGUCAdTdT-3'
	Antisense 5'-UGACGUAAAGGGAUAGGGCdTdT-3'
NF-κB2	Sense 5'-CAUUGAGGUUCGGUUCUAUdTdT-3'
	Antisense 5'-AUAGAACCGAACCUCAAUGdTdT-3'
RelB	Sense 5'-CCAUUGAGCGGAAGAUUCAdTdT-3'
	Antisense 5'-UGAAUCUCCGCUCAAUGGdTdT-3'

收集 HepG2 细胞, 按照 siPORT™ NeoFX™ 说明书操作: 靶细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液在 37 °C、5% CO₂ 及一定湿度下进行常规培养。转染前一天, 细胞按 2 × 10⁴ 个/孔接种于 24 孔板上, 转染当天, 细胞汇合度为 50% ~ 60%。转染

复合液的配制根据 Lipofectamine™ 2000 说明书, 每孔转染复合液中 miRNA mimics 的终浓度为 50 nmol/L, 质粒总量为 0.5 μg; 每孔加入 100 μl 转染复合液, 晃动 24 孔板稍加混匀; 在 5% CO₂、37 °C 培养箱中孵育 5 h, 用新鲜的完全培养基(含血清)替换含有转染复合物的培养基。用带有 Cy5 标记的寡核苷酸(浓度梯度为 25、50、100 nmol/L)和脂质体 Lipofectamine™ 2000 混合, 分成 3 组, 各设 3 个复孔, 室温孵育 20 min 后加入各孔中, 24 h 后用荧光显微镜观察细胞转染效率。

1.3.2 实时荧光定量检测目的基因 siRNA 抑制效率 收集各组转染 24 h 后细胞, 用 RNA 试剂盒提取细胞总 RNA, 电泳鉴定 RNA 纯度, 反转录合成 cDNA。扩增 NF-κB1、NF-κB2 和 RelB 基因引物的序列见表 3。实时荧光定量 PCR SYBR 反应体系总体积为 100 μl, 反应条件如下: 94 °C、5 min、94 °C、45 s、60 °C、1 min、30 个循环, 同时设空白对照。PCR 反应前 3 ~ 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号, 调节基线至适宜处, 各荧光曲线与基线交叉点的循环数即为 Ct 值。根据公式 $\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{\beta-actin}$ 和 $\Delta \Delta Ct = 2^{-\Delta Ct}$, 计算检测基因的 mRNA 相对表达量, 每组重复 3 次并取平均值。根据检测结果选择抑制率最高的 siRNA 开展后续实验。目的基因的 siRNA 抑制效率(%) = (1 - $\Delta \Delta Ct$) × 100%。

表 3 扩增 HepG2 细胞 NF-κB1、NF-κB2 和 RelB 基因引物序列

Tab. 3 Primers for amplification of NF-κB1, NF-κB2 and RelB in hepatocellular carcinoma HepG2 cells

Gene	Primer	Sequence	Size (bp)
NF-κB1	Sense	5'-TCCTTTTCGCAAGCTGATGT-3'	250
	Antisense	5'-GTCCGCTGAAAGGACTCTTC-3'	
NF-κB2	Sense	5'-GAACAGCCTTGCATCTAGCC-3'	249
	Antisense	5'-CAGAGTCCGAGTCGCTATCA-3'	
RelB	Sense	5'-CACAAACACATCAGAGCTGC-3'	223
	Antisense	5'-AATCTCCAGGTCTCTCGTAGG-3'	
18srRNA	Sense	5'-CCTGGATACCGCAGCTAGGA-3'	112
	Antisense	5'-GCGGCGCAATACGAATGCCCC-3'	

1.4 Western blotting 检测转染 siRNA 对 HepG2 细胞 NF-κB1、NF-κB2 和 RelB 蛋白表达的影响

收集 1 μmol/L 舒尼替尼处理 24 h 前后的

HepG2 细胞,分4组:空白细胞组(细胞未经药物处理)、药物处理组(靶细胞经苹果酸舒尼替尼 1 μ mol/L 共孵育 24 h)、空白质粒组(空白质粒+靶细胞)、siRNA 组(靶细胞+NF- κ B1 siRNA、靶细胞+NF- κ B2 siRNA、靶细胞+RelB siRNA)。用细胞裂解液处理后,加入适量 SDS-PAGE 上样缓冲液,沸水中加热 5 min,行 SDS-PAGE,用湿转法转膜至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上;以 5% 脱脂牛奶 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h;TBST 洗 10 min,重复 3 次,加入 NF- κ B 一抗(1:200)室温孵育 1 h;TBST 洗 10 min,重复 3 次,加羊抗兔二抗(1:10 000)室温孵育 1 h;TBST 洗 10 min,重复 3 次;暗室曝光拍照,检测转染 siRNA 前后 HepG2 细胞不同处理组 NF- κ B1、NF- κ B2、RelB 蛋白的表达情况,以上述蛋白与 GAPDH 比值确定蛋白相对表达量。

1.5 流式细胞术检测转染 siRNA 对 HepG2 细胞 NKG2DLs 表达率的影响

分别收集经舒尼替尼处理前后的 HepG2 细胞,实验分为 3 组:未处理组(未加药物处理)、药物处理组(舒尼替尼孵育 24 h)、siRNA 转染组(转染 NF- κ B2-siRNA 后,与舒尼替尼孵育 24 h,转染 siRNA 步骤同方法 1.3)。洗涤及计数各组细胞,分别加入 2 μ g 鼠抗人 NKG2DLs IgG 单抗,室温下避光孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次,加入 PE 标记羊抗鼠单抗,同型 IgG1 作为阴性对照抗体,室温下避光孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次,用四色荧光微球校准流式细胞仪后,分析样本中 1×10^4 个细胞中阳性细胞数,用 Cell Quest 软件分析数据。

1.6 统计学处理

采用 SPSS15.0 软件进行统计学处理。HepG2 细胞药物处理前后 NF- κ B 基因家族成员 mRNA 表达水平、siRNA 转染前后 NF- κ B1、NF- κ B2 和 RelB 蛋白表达及 siRNA 转染前后 HepG2 细胞 NKG2DLs 表达率均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 *t* 检验和单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 舒尼替尼促进 HepG2 细胞内 NF- κ B 基因家族成员 mRNA 的表达

实时荧光定量 PCR 检测结果(表 4)显示,在 NF- κ B 基因家族成员 mRNA 组中,未经舒尼替尼处理的 HepG2 细胞内 NF- κ B1、NF- κ B2、RelA、RelB、C-Rel mRNA 表达水平分别为(1.00 \pm 0.20)、(1.00 \pm 0.19)、(1.00 \pm 0.12)、(1.00 \pm 0.04)、(1.00 \pm 0.09);而经舒尼替尼处理后,主要是旁路激活途径的 NF- κ B2、RelB mRNA 表达水平明显升高,分别为(13.37 \pm 1.28)、(25.74 \pm 0.51),而经典激活途径介导的 NF- κ B1 mRNA 表达水平略有升高,为(2.03 \pm 1.26);不同处理组间 NF- κ B2、RelB mRNA 表达有显著差异(ANOVA for factorial analysis, $F = 455.668$, $P = 0.000$);而 NF- κ B1、RelA、C-Rel mRNA 表达水平无明显差异(ANOVA for factorial analysis, $F = 0.819$, $P = 0.236$)。可见,经舒尼替尼处理后,肿瘤细胞通过 NF- κ B 旁路激活途径起作用,从而诱导下一步分子生物学反应。

表 4 舒尼替尼处理前后 NF- κ B 家族成员 mRNA 表达水平

Tab. 4 mRNA expressions of NF- κ B gene family members on target cells before and after incubation with sunitinib ($\bar{x} \pm s$)

Group	NF- κ B1 mRNA	NF- κ B2 mRNA	RelA mRNA	RelB mRNA	C-Rel mRNA
Untreatment	1.00 \pm 0.20	1.00 \pm 0.19	1.00 \pm 0.12	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.09
Sunitinib	2.03 \pm 1.26	13.37 \pm 1.28*	1.35 \pm 0.23	25.74 \pm 0.51*	1.13 \pm 0.10

* $P < 0.05$ vs untreated group

2.2 siRNA 技术阻断 NF- κ B1、NF- κ B2 和 RelB 基因表达的效果

2.2.1 观察靶细胞转染率 荧光显微镜观察结果(图 1)显示,siRNA 转染的细胞中有红色荧光蛋白表达,HepG2 细胞红色荧光表达率约为 60%。

2.2.2 实时荧光定量 PCR 检测 siRNA 抑制效率 实时荧光定量 PCR 检测结果显示,对靶细胞内 NF- κ B1、NF- κ B2、RelB 目的基因干扰效率最高的

siRNA 序列,分别为 N-2-50-NFKB1、N-18-50-NFKB2、R-93-50-ReLB,其抑制效率分别为(96.80 \pm 2.56)%、(99.33 \pm 3.32)%和(99.92 \pm 3.86)%,符合实验要求。

2.3 siRNA 转染显著降低 HepG2 细胞内 NF- κ B1、NF- κ B2 和 RelB 蛋白的表达

Western blotting 检测结果(图 2)显示,siRNA 组中,HepG2 细胞中的 NF- κ B1、NF- κ B2、RelB 表达量

均最低,空白细胞组和空白质粒组次之,药物处理组的上述目的基因的蛋白表达量最高,但 NF-κB1 表达量明显低于 NF-κB2 和 RelB 的表达量;HepG2 细胞目的基因(NF-κB1、NF-κB2 和 RelB)的 siRNA 组与其他 3 组比较,蛋白表达水平有明显差异(ANOVA for factorial analysis, $F = 455.668, P = 0.000$);提示 siRNA 能明显降低 HepG2 细胞内 NF-κB1、NF-

κB2、RelB 的表达量,干扰效果明显;另外,HepG2 细胞经药物处理后 NF-κB2、RelB 目的基因的蛋白表达水平明显增高,与实时荧光定量 PCR 检测药物处理肿瘤细胞前后 NF-κB 基因家族成员 mRNA 的表达结果一致,说明肿瘤细胞主要通过 NF-κB 旁路激活途径起作用。

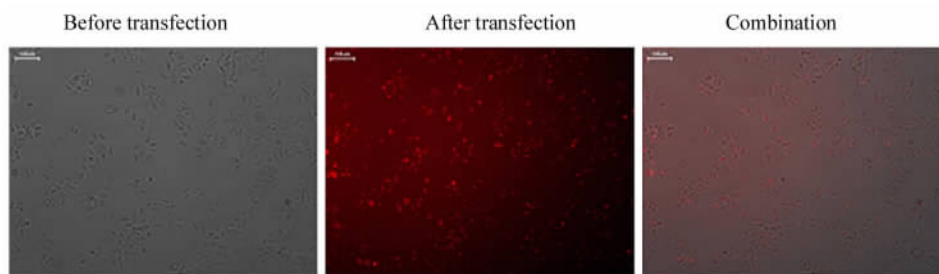


图 1 荧光显微镜观察 siRNA 转染效率(×100)

Fig.1 Efficiency of siRNA transfection determined by fluorescence microscopy(×100)

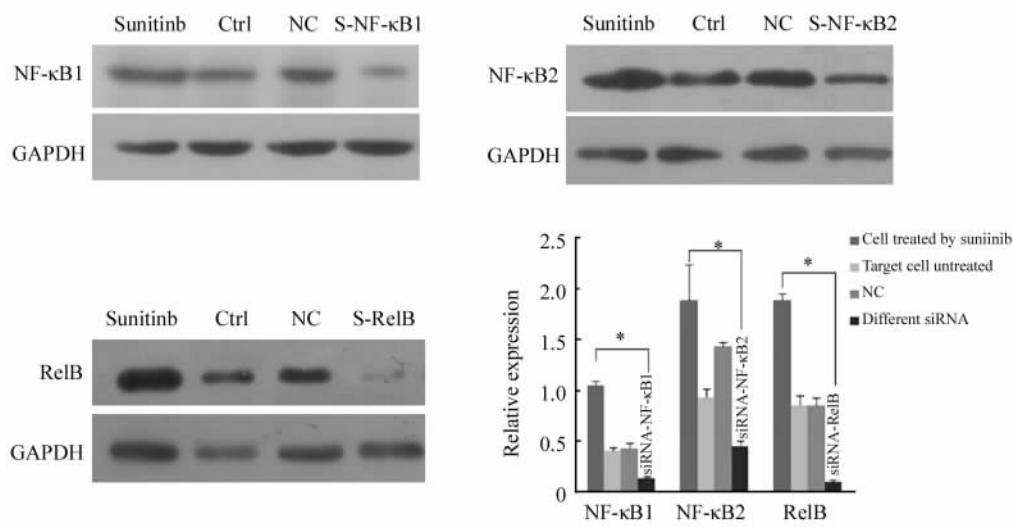


图 2 Western blotting 检测 HepG2 细胞转染 siRNA 前后 NF-κB1、NF-κB2 和 RelB 蛋白表达

Fig.2 Expressions of NF-κB1, NF-κB2 and RelB proteins in HepG2 cells before and after siRNA transfection determined by Western blotting

Ctrl: HepG2 untreated; NC: HepG2 cells + blank plasmid;

S-NF-KB1: siRNA- NF-KB1; S-NF-KB2: siRNA- NF-KB2; S-RelB: siRNA- RelB

2.4 流式细胞术检测经 siRNA 前后 HepG2 细胞 NKG2DLs 表达率

流式细胞术检测结果(表 5)显示:未处理组 HepG2 细胞 NKG2DLs 的 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 表达率分别为(1.46 ± 0.31)%、(5.28 ± 0.53)%、(1.19 ± 0.27)%、(3.32 ± 0.42)%和(1.17 ± 0.25)%,药物处理组 NKG2DLs

表达率明显升高,分别为(29.00 ± 3.32)%、(33.24 ± 2.87)%、(18.00 ± 4.56)%、(82.37 ± 5.85)%和(9.26 ± 1.16)%,同样以 MICA、MICB、ULBP2 升高为主(均 $P < 0.05$),而 siRNA 转染 + 药物处理组 NKG2DLs 表达率分别为(2.31 ± 0.23)%、(6.57 ± 0.34)%、(2.21 ± 0.21)%、(2.32 ± 0.51)%、(2.27 ± 0.27)%,明显低于药物处理组,

不同处理组间有显著差异(ANOVA for factorial analysis, $F = 35.76$, $P = 0.000$)。提示, siRNA 阻断了

NF- κ B2(旁途径)基因表达后, 舒尼替尼处理肿瘤细胞不能增加 NKG2DLs 表达。

表 5 siRNA 转染前后 HepG2 细胞 NKG2DLs 的表达(%)
Tab. 5 Expressions of NKG2DLs on HepG2 cells before and after transfection with siRNA(%)

Group	MICA	MICB	ULBP1	ULBP2	ULBP3
Untreatment	1.46 ± 0.31	5.28 ± 0.53	1.19 ± 0.27	3.32 ± 0.42	1.17 ± 0.25
Sunitinib	29.00 ± 3.32**	33.24 ± 2.87*	18.00 ± 4.56**	82.37 ± 5.85**	9.26 ± 1.16
siRNA + Sunitinib	2.31 ± 0.23 Δ	6.57 ± 0.34 Δ	2.21 ± 0.21 Δ	2.32 ± 0.51 $\Delta\Delta$	2.27 ± 0.27

* $P < 0.05$, ** $P < 0.05$ vs HepG2 untreated group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.05$ vs Sunitinib group

3 讨论

肿瘤细胞上的特异性靶点如 EGFR、EGF、TGF- α 及双调蛋白(amphiregulin, AR)等可以通过两条途径激活 NF- κ B 基因, 一条为 GRB2(growth factor receptor bound protein 2)/SHC(SRC homology domain-containing adaptor protein C)/PLC γ 1(phosphoinositide-specific phospholipase C γ 1)/DAG(diacylglycerol)/PKC ϵ (serine/threonine kinase protein kinase C)/NEMO 途径; 另一条为 GRB2/SHC/PKC/CARMA3/BCL-10/MALT1/TRAF6/NEMO 途径。前者是由 NF- κ B1 与 RelA 形成二聚体组成的经典激活途径, 介导肿瘤细胞增殖、血管生成和浸润转移相关基因的转录功能^[8,9]; 而后者是 NF- κ B 激活的旁途径, 主要由细胞因子例如 B 淋巴细胞刺激因子(B cell activating factor, BAFF)和淋巴毒素激活, 由 NF- κ B2 和 RelB 形成二聚体组成^[10]。NF- κ B 对 NK 细胞、T 细胞个体发育、分化及功能维护起着关键作用。Pascal 等^[11]证实, NF- κ B p50/p65 在启动小鼠 NK 细胞活化型受体 *Ly49* 基因的转录中起着重要作用; 相反, Guilard 等^[12]认为 NF- κ B 可以调控 NK 细胞抑制性配体 HLA-G 的表达而介导移植免疫耐受。因此, NF- κ B 活化后启动的是活化型受体还是抑制性配体主要决定于刺激因素和细胞内环境。

NF- κ B 信号通路与炎症、免疫调节、细胞增殖与凋亡、疾病发展及肿瘤生成密切相关, 可介导正向调节作用也可介导负向调节作用^[13]。在肝癌病理组织中, NF- κ B 是有非常高的阳性表达率, 提示 NF- κ B 信号通路在肝细胞癌的发生、发展中发挥关键性作用^[14]。也有文献^[15]报道, 活化 NF- κ B 信号通路可以促进肝癌细胞凋亡, 激活免疫效应细胞促进对肝癌细胞的杀伤。因此, NF- κ B 信号通路在人类疾病中发挥的作用是复杂的, 目前仍有疑虑和争议。本

研究主要探讨的是 NF- κ B 信号通路与免疫细胞活化性配受体调节的关系, 与 NF- κ B 介导肿瘤的发生、发展略有不同。NK 细胞活化性配体的表达是受多种因素和细胞内环境的影响, 刺激因素不同, 配体表达的种类和表达水平也不同, 只有“依境而变”才能适应复杂免疫调节网络的功能。迄今为止, 仍没有文献和报道能够清楚地解释调控免疫细胞活化性受配体的分子机制。NF- κ B 是一种多向调节功能的转录因子, 广泛参与了许多基因的转录调控, 依据刺激因素和细胞环境的不同, 能够与相应基因的启动子结合, 依据细胞内环境的需要发挥不同的生物功能, 这一点与免疫细胞活化性配受体调节的特点是相吻合的。

舒尼替尼作用于 HepG2 细胞后能否激活 NF- κ B 信号通路、通过哪条途径激活文献未见报道。本研究中, 舒尼替尼作用于 HepG2 细胞后 NF- κ B1、NF- κ B2 和 RelB mRNA 表达水平均升高, 主要以 NF- κ B2 和 RelB 升高为主, 表明激活 NF- κ B 的主要是由 NF- κ B2 和 RelB 组成的旁路激活途径。后续实验利用 siRNA 阻断 NF- κ B1、NF- κ B2 和 RelB 这 3 种目的基因, Western blotting 结果提示 HepG2 细胞经药物处理后 NF- κ B2、RelB 的蛋白表达水平明显高于 NF- κ B1, 流式结果显示阻断 NF- κ B2(旁途径)后舒尼替尼不能诱导肿瘤细胞表达 NKG2DLs。因此, 本文首次揭示了舒尼替尼通过 NF- κ B 旁途径诱导肿瘤细胞表达 NKG2DLs。至于 NF- κ B 信号通路与药物的关系、通过哪些活化因子发生作用及旁途径激活后肿瘤细胞 NKG2DLs 蛋白表达的差异有待下一步实验研究。

[参考文献]

- [1] Greten TF, Wang XW, Korangy F. Current concepts of immune based treatments for patients with HCC: from basic science to no-

- vel treatment approaches [J]. Gut, 2015, 64(5): 842-848.
- [2] Galuppo R, Ramaiah D, Ponte OM, et al. Molecular therapies in hepatocellular carcinoma: what can we target? [J]. Dig Dis Sci, 2014, 59(8): 1688-1697.
- [3] Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappa B transcription factors in the immune system [J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 693-733.
- [4] Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology [J]. Biochem J, 2004, 382(2): 393-409.
- [5] Miller SC, Huang R, Sakamuru S, et al. Identification of known drugs that act as inhibitors of NF-kappaB signaling and their mechanism of action [J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79(9): 1272-1780.
- [6] Brown KD, Claudio E, Siebenlist U. The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(4): 1-14.
- [7] Visekruna A, Volkov A, Steinhoff U. A key role for NF-κB transcription factor c-Rel in T-lymphocyte-differentiation and effector functions [J]. Clin Dev Immunol, 2012, 2012: 239368.
- [8] Shostak K, Chariot A. EGFR and NF-κB: partners in cancer [J]. Trends Mol Med, 2015, 21(6): 385-393.
- [9] Nottingham LK, Yan CH, Yang X, et al. Aberrant IKKα and IKKβ cooperatively activate NF-κB and induce EGFR/API signaling to promote survival and migration of head and neck cancer [J]. Oncogene, 2014, 33(9): 1135-1147.
- [10] Freudspurger C, Bian Y, Contag Wise S, et al. TGF-β and NF-κB signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers [J]. Oncogene, 2013, 32(12): 1549-1559.
- [11] Pascal V, Nathan NR, Claudio E, et al. NF-kappa B p50/p65 affects the frequency of Ly49 gene expression by NK cells [J]. J Immunol, 2007, 179(3): 1751-1759.
- [12] Guillard C, Zidi I, Marcou C, et al. Role of HLA-G in innate immunity through direct activation of NF-κB in natural killer cells [J]. Mol Immunol, 2008, 45(2): 419-427.
- [13] Spagnuolo C, Russo GL, Orhan IE, et al. Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions [J]. Adv Nutr, 2015, 6(4): 408-419.
- [14] Capece D, Fischietti M, Verzella D, et al. The inflammatory microenvironment in hepatocellular carcinoma: a pivotal role for tumor-associated macrophages [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 187204.
- [15] Nakagawa H, Maeda S. Inflammation-and stress-related signaling pathways in hepatocarcinogenesis [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(31): 4071-4081.
- [收稿日期] 2015 - 09 - 06 [修回日期] 2015 - 11 - 04
- [本文编辑] 黄静怡

· 简 讯 ·

坚决贯彻执行国家七部委联合发布的《发表学术论文“五不准”》的规定

为弘扬科学精神,加强科学道德和学风建设,抵制学术不端行为,端正学风,维护风清气正的良好学术生态环境,重申和明确科技人员在发表学术论文过程中的科学道德行为规范,中国科协、教育部、卫生计生委、中科院、工程院和自然科学基金委等七部委联合下发了《发表学术论文“五不准”》的通知。本刊坚决贯彻执行“五不准”规定,加强对学术论文学术不端行为的审查和处罚措施。希望广大科技工作者、读者和作者,以及本刊的编委专家、审稿专家和相关工作人员都应加强学术道德自律,共同努力,捍卫学术尊严,维护良好学风。现将发表学术论文“五不准”摘录如下:

1. 不准由“第三方”代写论文。科技工作者应自己完成论文撰写,坚决抵制“第三方”提供论文代写服务。
2. 不准由“第三方”代投论文。科技工作者应学习、掌握学术期刊投稿程序,亲自完成提交论文、回应评审意见的全过程,坚决抵制“第三方”提供论文代投服务。
3. 不准由“第三方”对论文内容进行修改。论文作者委托“第三方”进行论文语言润色,应基于作者完成的论文原稿,且仅限于对语言表达方式的完善,坚决抵制以语言润色的名义修改论文的实质内容。
4. 不准提供虚假同行评审人信息。科技工作者在学术期刊发表论文如需推荐同行评审人,应确保所提供的评审人姓名、联系方式等信息真实可靠,坚决抵制同行评审环节的任何弄虚作假行为。
5. 不准违反论文署名规范。所有论文署名作者应事先审阅并同意署名发表论文,并对论文内容负有知情同意的责任;论文起草人必须事先征求署名作者对论文全文的意见并征得其署名同意。论文署名的每一位作者都必须对论文有实质性学术贡献,坚决抵制无实质性学术贡献者在论文上署名。

(本刊编辑部)