论著

文章编号:1000-5404(2008)22-2090-03

BC047440基因通过NF-κB调节HepG2细胞增殖的初步研究

黄小兵,梁 平,李 靖,郑 璐,刘世呈,韩克强,赵弘智 (第三军医大学新桥医院肝胆外科,重庆 400037)

摘 要:目的 观察BC047440基因能否通过增强NF-κB的活化而促进HepG2细胞的增殖。**方法** 设计针对BC047440基因的小干扰RNA(siRNA),构建pGenesil-1-BC047440-siRNA真核表达载体,用脂质体法将介导siRNA的真核绿色荧光表达载体pGenesil-1-BC047440-siRNA、pGenesil-1-HK-siRNA转染人肝癌HepG2细胞建立稳定细胞株;实验分为3组:转染siRNA表达载体组、无关质粒组和未处理的亲本HepG2细胞组。采用平板克隆形成实验分析细胞的增殖活性,通过Western blot检测细胞质p50含量,EMSA检测NF-κB的核转位,荧光素酶试验检测各组细胞的NF-κB活化情况。**结果** 细胞增殖实验显示转染siRNA组细胞增殖能力明显降低,BC047440基因沉默后的HepG2的细胞质p50含量低于野生株HepG2,NF-κB核转位低于野生株HepG2,其荧光素酶和海肾荧光素酶活性比值只有野生株的1/4。**结论** BC047440基因能促进肝癌细胞的增殖,其调节机制可通过NF-κB信号途径实现,提示BC047440基因可能成为抑制人肝癌细胞生长的有效靶点。

关键词:BC047440;HepG2;人肝癌细胞;siRNA

中图法分类号:R392.11;R730.23;R735.7 **文献标识码**:A

BC047440 gene promotes HepG2 proliferation through NF-κB

HUANG Xiao-bing, LIANG Ping, LI Jing, ZHENG Lu, LIU Shi-cheng, HAN Ke-qiang, ZHAO Hong-zhi (Department of Hepatobiliary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate whether BC047440 gene can induce HepG2 proliferation through enhancing NF-κB activity. **Methods** Small interfering RNAs for BC047440 gene were designed using Ambion software and constructed into pGenesil-1. The pGenesil-1-HK-shRNA and pGenesil-1-BC047440-shRNA vector were all transfected into HepG2 cells using Lipofectamine ™2000. The cell colony formation rate was measured by plate colony formation assay. The protien of NF-κB signal pathway was determined by Western blotting. Nuclear translocation and NF-κB activity were evaluated by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and luciferase reporter assay, respectively. **Results** When the cell colony formation rates were statistically decreased in siRNA treated groups, Western blot analysis revealed decreased expression of p50 in BC047440 gene-silencing HepG2 compared with that of wild HepG2. The levels of nuclear translocation of NF-κB in BC047440 gene-silencing HepG2 were also significantly suppressed compared with that of wild HepG2, and the ratio of luciferase/Renilla Luciferase in BC047440 gene-silencing HepG2 was only 25% of wild HepG2. **Conclusion** BC047440 can induce HepG2 proliferation through NF-κB signal pathway, and BC047440 might be a target of inhibiting the development of hepatocellular carcinoma.

Key words: BC047440; HepG2; nuclear factor κB; siRNA

我们在先前的研究中发现定位于染色体20q11.22上的BC047440基因在人肝癌中呈高表达[1],推测其可能与肝癌的增殖发展有关,但是,BC047440基因通过什么机制发挥调节作用并不明确。最近一些研究表明,炎症和肿瘤关系密切,特别是肝炎和肝癌的关系,而NF-κB的活化在肝炎演变为肝癌的过程中起到了举足轻重的中心作用。研究也表明,肝癌组织存在NF-κB的持续活化的现象[2-4]。因此,推测BC047440基因可能通过NF-κB途径促进肝癌细胞的增殖。本实验在前期通过siRNA沉默BC047440基因的基础上,观察BC047440基因表达抑制是否能通过抑制NF-κB的活化而抑制人肝癌细胞系HepG2细胞的增殖。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM培养基(HyClone公司)、标准胎牛血清(TBD公

基金项目:国家自然科学基金(30570843)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570843)
作者简介:黄小兵,男,四川省阆中市人,博士研究生,主治医师,主要从事肝胆外科方面的研究。电话:(023)68774606
通信作者:梁 平,电话:(023)68774606
收稿日期:2008-01-18;修回日期:2008-04-10

司)、Lipofectamine™2000(Invitrogen 公司)、核蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度检测试剂盒以及 EMSA/Gel-Shift 试剂盒均购自碧云天公司。荧光素酶检测试剂盒 Dual-Luciferase reporter assay 购自 Promega;NF-κB 报告质粒 pBⅡx-luc 来自 Iris Douglas (Dr. Sankar Ghosh's Lab,耶鲁大学),兔抗人 NF-κB/p50 多克隆抗体购自德国 IBL 公司,兔抗人 β-actin 购自北京联合博伟生物科技有限公司,化学发光试剂盒购自美国 Pierce 公司。人肝癌细胞系 HepG2 细胞由本校基础医学部微生物学教研室惠赠。

1.2　实验方法

1.2.1　实验分组及细胞克隆形成测定　　实验分为 3 组:转染 siRNA 表达载体组、无关质粒组和未处理的亲本 HepG2 细胞组。siRNA 的构建鉴定及干扰效率鉴定等具体步骤见我们前期研究报道[5],采用 Lipofectamine™2000 脂质体介导的转染技术,转染 pGenesil-1-BC047440-siRNA 后形成抗性克隆的细胞组简写为干扰组,将转染无关 siRNA 质粒 pGenesil-1-HK (GACTTCATAAGGCGCATGC)-siRNA 后形成抗性克隆细胞组命名为无关 siRNA 干扰组。取各组细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化制备单个细胞悬液体,调整细胞密度,接种到 6 孔板中,每组细胞接种 3 孔,300 个/孔,十字方向轻轻晃动 6 孔板使细胞分散均匀。于 37 ℃,5% CO_2 孵箱中,静置培养约 10 d,出现肉眼可见克隆,弃去培养液,PBS 小心冲洗细胞 2 次,加甲醇 10 ml 固定 15 min。弃去固定液,加适量姬姆萨液染色 30 min,然后用流水缓慢洗去染色液,室温空气干燥。普通光镜下计数各组大于 50 个细胞的克隆数,并按公式计算克隆形成率:克隆形成率(%) = (克隆数/接种细胞数) ×100%。

1.2.2　Western blot 检测细胞质 NF-κB p50　　按每孔 2×10^6 将 HepG2 和沉默了 BC047440 的 HepG2 铺 6 孔板,以 20 ng/ml TNF-α 刺激 30 min,常规胰酶/EDTA 消化细胞,PBS 离心洗涤 2 次,按照碧云天提取试剂盒的操作说明提取细胞质蛋白,取 20 μl 样本用 10% 的分离胶分离,8 V、1 h 半干转移到 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的封闭液缓慢摇动封闭,分别加入用含 5% BSA 抗体稀释液按 1∶1 000 稀释的兔抗人 NF-κB/p50 多克隆抗体和兔抗人 β-actin,4 ℃过夜。次日加入 HRP-山羊抗兔二抗作用 1 h。洗涤后用化学发光试剂盒,按试剂说明进行显色。

1.2.3　EMSA 检测 NF-κB 的核转位　　100 ng/ml 的 TNF-α 分别刺激野生株 HepG2 和沉默了 BC047440 的 HepG2,1 h 后收集细胞,根据试剂盒说明(碧云天)提取细胞核蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后,按照试剂盒要求,取等量的核蛋白(2 μl)与采用末端标记法标记的 ^{32}P 的 NF-κB 探针(5′-GTAGGGGACTTTCCGAGCTCGATCCTATG-3′)(1 μl)、Nuclease-Free Water (5 μl)和 EMSA / Gel-Shift 结合缓冲液(5×)(2 μl)混匀后,置常温孵育 20 min,最后加 1 μl×10 EMSA / Gel-Shift 上样缓冲液,非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后干胶,并放置显影盒内,-70 ℃放置 72 h 后,常规自显影并扫描。

1.2.4　荧光素酶试验检测 NF-κB 的活性　　用 Lipofectamine™ 2000 将萤火虫荧光素酶报告基因 pBⅡX luc 和海肾荧光素酶报告基因 RL-TK 分别转染到野生株 HepG2 和沉默了 BC047440 的 HepG2,转染 24 h 后更换培养液。鉴于 TNF-α (100 ng/ml)为常规活化 NF-κB 的细胞因子和浓度,因此,加入 100 ng/ml 的 TNF-α 刺激细胞。1 h 后弃培养液,裂解细胞,将裂解产物转入离心管,涡旋振荡 15 s,4 ℃、12 000 × g 离心 2 min 取上清液,用荧光测定仪分别测定萤火虫荧光素酶活性和海肾荧光素酶活性,获得萤火虫荧光和海肾荧光的比值活性,即 NF-κB 的活性 = 萤火虫荧光测值/海肾荧光测值。用比值来表达 NF-κB 的活性可以排除各孔之间的转染效率差异。

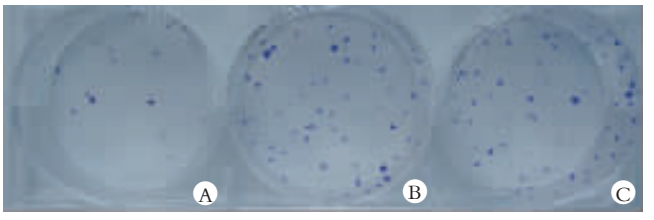
1.3　统计学分析

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,SPSS 11.0 统计软件进行方差分析和 q 检验。

2　结果

2.1　细胞平板克隆形成实验

取干扰组、无关 siRNA 转染组及亲本细胞组各 300 个细胞,分别接种于 6 孔板中。培养 10 d 后观察结果,亲本组、无关 siRNA 转染组克隆形成率分别为(42.58 ± 3.316)% 和(40.52 ± 5.407)%,干扰组克隆形成率为(9.021 ± 0.854)%,干扰组形成率明显低于对照组(图 1),差异显著($P<0.01$),提示 BC047440 基因沉默后,HepG2 单个细胞的增殖能力下降。

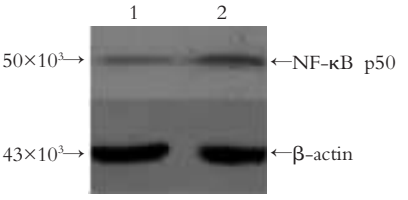


A:干扰组;B:无关 siRNA 转染组;C:亲本细胞组

图 1　实验各组平板克隆形成

2.2　Western blot 检测沉默 BC047440 基因后细胞质 NF-κB p50 下降

免疫印迹结果显示沉默了 BC047440 的 HepG2 细胞细胞质 NF-κB p50 的 Western blot 的表达量明显低于相对应的野生株的 HepG2 细胞的表达,提示沉默后细胞质内具有活性的 p50 的含量下降(图 2)。



1:沉默了 BC047440 的 HepG2;2:野生株 HepG2

图 2　各组 NF-κB p50 的 Western blot 结果

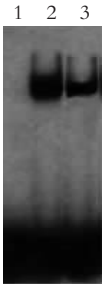
2.3　沉默了 BC047440 的 HepG2 的 NF-κB 核转位受到抑制

鉴于 NF-κB 与肿瘤细胞增殖之间的密切关系,推测沉默了 BC047440 的 HepG2 增殖能力下降可能与 NF-κB 活化受到抑制有关,EMSA 结果也初步证实了推测,用 100 ng/ml 的 TNF-α 刺激后,沉默了 BC047440 的 HepG2 的 NF-κB 核转位明显低于野生株 HepG2(图 3),提示其 NF-κB 活性受到抑制。

2.4　荧光素酶试验检测 NF-κB 活性

为了进一步验证沉默了 BC047440 的 HepG2 的 NF-κB 活化确实受到明显抑制,我们将 NF-κB 报告基因 pBⅡX luc 和海

肾荧光素酶报告基因 RL-TK 分别转染到野生株 HepG2 和沉默了 BC047440 的 HepG2，用 TNF-α 活化后分别测定萤火虫荧光素酶活性和海肾荧光素酶活性。结果显示沉默了 BC047440 的 HepG2 的荧光素酶和海肾荧光素酶活性比值只有野生株的 1/4，进一步证实了 NF-κB 活性受到明显的抑制（图 4）。



1：阴性对照（不含核蛋白）；2：野生株 HepG2 核蛋白 + 标记的 NF-κB 探针；3：沉默了 BC047440 的 HepG2 核蛋白 + 标记的 NF-κB 探针

图 3 EMSA 检测野生株 HepG2 和沉默了 BC047440 的 HepG2 的 NF-κB 的核转位情况

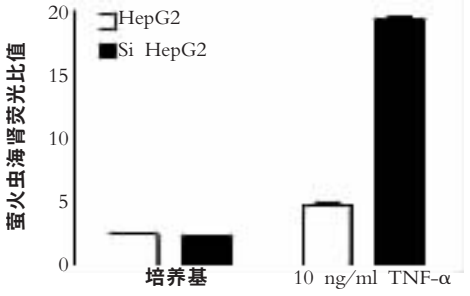


图 4 荧光素酶试验检测野生株 HepG2 和沉默了 BC047440 的 HepG2 的 NF-κB 的活化情况

3 讨论

在前期的研究中，我们发现 1 条新的但功能未知的基因（登录号 BC047440）同源，并已证明其在肝癌组织中表达强度明显高于与其相对应的正常组织[1,6]，从而推测 BC047440 基因产物可能与肝癌的发生、发展相关，但通过什么信号途径发挥调节肝癌增殖的机制并不清楚。

本实验采用了 RNA 干扰技术研究其对肝癌增殖的影响，利用前期工作构建的 BC047440 的干扰序列对 BC047440 进行基因沉默，利用平板克隆形成实验证实沉默后 HepG2 细胞生长明显受到抑制，HepG2 单个细胞的增殖能力下降，和前期实验结果一致，进一步证实了 BC047440 基因和肝癌的增殖密切相关。但是，由于 HepG2 细胞的增殖受多基因的调控，即使对 BC047440 基因进行有效沉默，也只能影响肝癌的增殖，并不能完全阻止肝癌细胞的增殖。那么，BC047440 基因是通过什么信号途径参与调节肝癌的增殖？

已知 NF-κB 是 1 个多功能的转录因子，与多种基因的转录有关，未活化的 NF-κB 常与抑制因子 IκB 相结合，主要以非活性异寡聚体的形式（如 p50、p65、IκB）存在于细胞质中。当细胞受到胞外信号刺激时，通过 1 个或多个信号转导途径，激活 IκB 激酶（IKK），使 NF-κB 迅速从细胞质易位到细胞核，发挥活性效应，启动相关基因的转录，参与肿瘤增殖的调节。大量的研究资料已经证实，在肝癌中 NF-κB 存在持续活化的现象[2]，在肝癌组织中其活性明显高于周围组织，提示肝癌的增殖和 NF-κB 转导通路有关，NF-κB 转导通路在肝癌的增殖调节中发挥非常重要的作用。进一步的研究还发现，将抑制性 IKKβ 基因导入 Mdr2 基因敲除小鼠的肝细胞，并特异诱导表达来抑制 IκB 的降解和 NF-κB 活化，可观察到其抑制肝癌细胞抗凋亡因子 A1/Bfl1、c-IAP1 和 GADD45β 的表达，促进肝癌细胞发生凋亡，最终抑制肝癌的增殖[7]，均证实 NF-κB 信号途径在肝癌增殖中的重要作用。

本实验结果显示沉默了 BC047440 的 HepG2 细胞株，其细胞质内活化 p50 的数量较野生株减少，其 NF-κB 核转位明显低于野生株 HepG2，NF-κB 活性只有野生株的 1/4，提示其调控部位应该在非活性异寡聚体（p50、p65、IκB）或者其上游。证实了我们的推测：BC047440 基因在肝癌中的高表达可能参与了肝癌增殖的调节，而其调节途径之一是通过活化 NF-κB 信号通路发挥作用，并启动相关基因，来发挥调节肝癌细胞的增殖，其调控可能是直接或者间接作用于 p50 非活性异寡聚体或者其上游部位。但是 BC047440 基因的蛋白产物直接作用于 NF-κB 信号通路的具体机制还需进一步研究。

参考文献：

[1] 郑 璐，李 靖，杨彤翰，等. BC047440 基因在肝细胞癌中的表达及其意义[J]. 中国普通外科杂志，2006，15(8)：582－585.

[2] 梁 帅，王志明，吕新生，等. NF-κB 在肝细胞癌组织中的表达及意义[J]. 中国普通外科杂志，2006，15(10)：749－751.

[3] Pikarsky E，Porat R M，Stein I，*et al*. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer[J]. Nature，2004，431(7007)：461－466.

[4] Clevers H. At the crossroads of inflammation and cancer[J]. Cell，2004，118(6)：671－674.

[5] 刘世呈，李 靖，黄小兵，等. BC047440-siRNA 对肝癌 HepG2 细胞增殖抑制及其分子机制的初步探讨[J]. 第三军医大学学报，2007，29(23)：2207－2211.

[6] 李 靖，韩本立，黄桂君，等. 应用抑制消减杂交技术构建肝癌差异表达基因消减 cDNA 文库[J]. 第三军医大学学报，2001，23(6)：698－701.

[7] Papa S，Zazzeroni F，Bubici C，*et al*. Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2[J]. Nat Cell Biol，2004，6(2)：146－153.

（编辑 王 红）