

网络出版时间: 2018-3-16 9:32 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180315.1708.013.html>

◇ 药学研究 ◇

佛手柑内酯抑制 p62/NF- κ B 信号轴增强顺铂对肝癌杀伤的影响

郑志明¹, 邹海鹏², 卢敏娟¹, 林碧华^{3,4}, 周克元^{3,4}

摘要 目的 观察佛手柑内酯与顺铂联用对肝癌细胞的凋亡及 p62/NF- κ B 信号轴的影响。方法 利用低浓度(1 mol/L)佛手柑内酯和 1 mol/L 顺铂联用或单用,处理体外培养的肝癌细胞 HepG2 和 Bel-7402,观察两肝癌细胞的凋亡核形态和 Annexin V 阳性的凋亡细胞群比例。进一步利用荧光定量聚合酶链反应检测两肝癌细胞的抗凋亡相关基因表达变化,利用荧光素酶报告基因检测 NF- κ B 转录因子的转录活性,利用 Western blot 法检测细胞内 p65 及 p62 的表达水平。结果 低浓度佛手柑内酯与顺铂联用能显著诱导 HepG2 和 Bel-7402 的凋亡核形态和凋亡细胞群比例,两肝癌细胞的凋亡核形态比单用顺铂组分别增加 1.99 倍和 2.00 倍($P < 0.05$),凋亡细胞群比例比单用顺铂组分别增加 1.86 倍和 2.00 倍($P < 0.05$)。低浓度佛手柑内酯与顺铂联用能不同程度降低抗凋亡基因 BCL2、BCL2L1、XIAP 和 BIRC5 的表达,并抑制 NF- κ B 转录因子的转录活性和细胞内 p65 及 p62 的表达水平。结论 低浓度佛手柑内酯能增强顺铂对肝癌细胞凋亡的诱导,其可能原因与抑制 p62/NF- κ B 信号轴相关。

关键词 佛手柑内酯; 肝癌; 顺铂; p62/NF- κ B 信号轴

中图分类号 R 966

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)03-0390-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.013

肝癌主要是临床上最常见的恶性肿瘤之一^[1]。2012 年统计显示,中国肝癌发生的病例数为 394 770(占总癌症发生病例的 12.9%),死亡病例数为 383 203(占总癌症死亡病例的 17.4%)^[2],显示出我国肝癌防治形势的严峻。由于肝癌起病隐匿,进展迅速,患者确诊时往往已有肝内转移甚至肝外远

处转移的发生^[3],因此,化疗在肝癌治疗中起着重要作用。常用的肝癌的化疗药有顺铂、阿霉素、丝裂霉素和氟尿嘧啶等,但肝癌是化疗药物敏感性较低,且极易产生耐药性,对肝癌患者的生存预后受益有限^[4]。因此,揭示肝癌耐药的分子机制并从中寻找逆转的方法,成为了近年来肝癌研究的热点。在此,该文将观察中药有效成分佛手柑内酯在低浓度下对肝癌细胞顺铂诱导凋亡的影响,并着重分析佛手柑内酯对 p62/NF- κ B 信号轴的影响。

1 材料与方法

1.1 关键试剂及仪器 RPMI-1640 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素混合液及 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;二甲基乙磺(DMSO, D119415)、佛手柑内酯(M101153)、Hoechst33258 染料(B113844)及普通化学试剂购自上海阿拉丁试剂公司;CCK-8 细胞增殖毒性检测试剂盒购自日本同仁化学研究所;p62 鼠单抗(66184-I-Ig)、p65 兔多抗(10745-I-AP)、 α -Tubulin(66031-I-Ig)鼠单抗购自美国 Proteintech 公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠及山羊抗兔二抗购自美国 Merck 公司;PVDF 膜、ECL 发光液购自美国 Millipore 公司;Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒、RIPA 裂解液、5×蛋白上样缓冲液、pNF- κ B-TA-luc 质粒、pGL6-TA-luc 质粒、pRL-SV40-C 质粒及双萤光素酶报告基因检测试剂盒购自上海碧云天生物研究所;反转录试剂盒及 SYBR Green 定量 PCR 试剂盒购自大连宝生物公司;实时定量 PCR 仪为 CFX96、垂直电泳系统、槽式转膜系统及凝胶 CCD 成像系统购自美国 Bio-Rad 公司;多功能酶标仪为 Synergy2 购自美国 BioTek 公司;流式细胞分析仪为 FACSCanto II 购自美国 BD 公司。

1.2 细胞传代培养及分组 人肝细胞癌细胞 HepG2 和 Bel-7402 为广东医学院生物化学与分子生物学教研室长期传代培养及规范冻存。HepG2 和 Bel-7402 的培养条件为,含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养基,37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。根据预

2018-01-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81272434); 广东省医学科学技术研究基金(编号: A2016395); 广东省中医药局科研项目(编号: 20172085); 中山市科技计划(编号: 2015B1061)

作者单位: ¹ 中山市小榄人民医院药剂科, 中山 528415

² 滨州医学院烟台附属医院药学部, 烟台 264100

³ 广东医科大学生物化学与分子生物学教研室, 东莞 523808

⁴ 广东省医学分子诊断重点实验室, 东莞 523808

作者简介: 郑志明, 男, 临床药师;

卢敏娟, 女, 药师, 责任作者, E-mail: zzm06224@yeah.net

实验,确定 1 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂对两肝癌细胞的 48 h 抑制率 $<50\%$, 1 $\mu\text{mol/L}$ 佛手柑内酯对两肝癌细胞的 48 h 抑制率 $<10\%$, 上述两浓度可以用于观察佛手柑内酯对顺铂的增敏作用。因此,实验组分三组,单用 1 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂(顺铂组),单用 1 $\mu\text{mol/L}$ 佛手柑内酯(佛手柑内酯组), 1 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂与 1 $\mu\text{mol/L}$ 佛手柑内酯联用处理(联合组),对照组为 1% DM-SO 处理,各组处理时间均为 48 h。

1.3 CCK-8 测定细胞活性 参考文献^[5],将细胞接种于 96 孔培养板中,加入终浓度分别在 0.1 $\mu\text{mol/L}$ ~ 1 mmol/L 间的含顺铂或佛手柑内酯培养液正常培养 48 h,当培养时间结束时,弃去原培养液,每孔加入含 10% CCK-8 的培养液,5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,酶标仪检测各孔吸光度,扣除背景值后以未加药孔为基准求算各药物浓度的抑制率,利用两点法求算半数抑制浓度。

1.4 凋亡核形态计数分析 参考文献^[6],按实验分组处理后,弃除培养液,用 PBS 缓冲液洗涤细胞,加入 0.5 mg/L Hoechst 33258 染液避光染色 20 min,利用倒置荧光显微镜观察拍照,每组细胞在 200 $\times$ 视野中随机选取 5 个视野,计数典型的凋亡细胞形态:荧光增强,细胞核缩小碎裂,呈大小不等的圆形、花瓣状或不规则块状。

1.5 Annexin V-FITC/PI 凋亡率检测 参考文献^[5],按实验分组处理后,胰酶消化细胞后收集,根据试剂盒提供的说明书操作:离心弃上清液并用 PBS 洗涤细胞 1 次,同前弃尽上清液后,按每 1×10^5 细胞加入 195 μl Annexin V-FITC 结合液重悬细胞后,加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀室温避光孵育 10 min。离心弃上清液后,加入 190 μl Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,加入 10 μl PI 染液混匀后冰浴。随即进行流式细胞分析仪检测,调整并收集每个样品的前散射光、侧散射光、Annexin V-FITC 和 PI 四个通道的信号,并以前散射光/侧散射光作散点图圈出主细胞群,再以 Annexin V-FITC/PI 对主细胞群作图分出 Annexin V-FITC 阳性、红光阴性或阳性的凋亡细胞群,得到每组细胞的凋亡率。

1.6 荧光定量 PCR 检测 参考文献^[5],按实验分组处理后,弃去原培养基, PBS 洗 2 次,加入 TRIzol 室温裂解,氯仿抽提,离心后吸取上清液至新离心管中,加入异丙醇 11 醇沉淀 RNA,用含 75% 乙醇的 DEPC 水溶解 RNA 沉淀 3 次,用 DEPC 水溶解 RNA。测得浓度后按 PrimeScript RT reagent Kit 说明书操作,进行反转录;按 SYBR Premix Ex Taq II

Kit 说明书操作(引物信息见表 1),在 CFX96 实时定量 PCR 系统上,选用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 相对定量法进行检测分析,其中选用 GAPDH 为内参基因,求算各目标基因的相对 mRNA 表达量。

表 1 荧光定量 PCR 检测所用引物

项目	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
BCI2	CTGGATGACTGACTACCTGAACC	AGACAGCCAGGAGAAATCAAAC
BCI2L1	CTGCTGCATTGTTCCCATAG	TTCAGTGACCTGACATCCCA
XIAP	CTGTTAAAAGTCATCTTCTCTTGAAA	GACCTCCCTTGAGACC
BIRC5	CTTTCTCCGACGTTTCCTCA	TGCTGAATTTTGAAACTGGA
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGCTGAAGACGCCAGTGGA

1.7 荧光素酶报告基因活性检测 参考文献^[6],将细胞接种于 24 孔板中,24 h 后换入 Opti-MEN 培养液。按 10 : 1 分别混合 pNF- κ B-TA-luc 或 pGL6-TA-luc 与 pRL-SV40-C,并用 Lipofectamine 2000 包装后转染细胞。正常培养 6 h 后,按实验分组替换为含药完全培养液,继续培养 48 h。去除培养液, PBS 洗涤,加入裂解液充分裂解细胞后,离心取上清液转于 96 孔板,利用 Synergy2 多功能酶标仪的自动加样装置,按检测顺序自动加入萤火虫荧光素酶检测试剂和肾荧光素酶检测试剂,并以空白孔为参照测定每孔的相对荧光信号,按下列公式计算相对实验组的相对荧光强度:

$$\frac{\text{萤火虫荧光素酶 RLU}_{(\text{实验组})} / \text{海肾荧光素酶 RLU}_{(\text{实验组})}}{\text{萤火虫荧光素酶 RLU}_{(\text{对照组})} / \text{海肾荧光素酶 RLU}_{(\text{对照组})}}$$

1.8 Western blot 检测 参考文献^[5],按实验分组处理后,弃去原培养基, PBS 洗 2 次,加入 RIPA 裂解液冰上裂解,离心收集上清液,按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白定量,向上清液加入 $5 \times$ 上样缓冲液,沸水浴变性蛋白。使用 SDS-PAGE 蛋白电泳系统,上样量为 50 μg 总蛋白,电泳参数为 10% 分离胶、5% 浓缩胶,100 V 电泳至溴酚蓝指示剂迁移至底部后,进行电转移,使用 0.2 μm 的 PVDF 膜,300 mA 冰浴电转 90 min。电转结束后,膜使用 5% 脱脂奶粉封闭, TBST 漂洗后,加入稀释的一抗工作液(按产品说明书稀释配制), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 漂洗后,加入稀释的二抗工作液(按产品说明书稀释配制),室温孵育 1 h, TBST 漂洗后,加入 ECL 发光液,置压片夹中用 X 光片感光,经显影定影后,得到相应的 Western blot 结果。

1.9 统计学处理 每次实验设 3 复孔,每组实验重复 3 次以上,所得数据用 Excel 2010 及 GraphPad Prism 5 软件进行统计分析;计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 ANOVA 分析及两两比较的 Tukey

检验,检验水平 $\alpha = 0.05$ 。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 佛手柑内酯对肝癌细胞的活性抑制 利用梯度佛手柑内酯处理肝癌 HepG2 和 Bel-7402 细胞 48 h 后,利用两点法求算半数抑制浓度分别为 $(194.0 \pm 146.7) \mu\text{mol/L}$ 和 $(331.7 \pm 209.7) \mu\text{mol/L}$ 。此外,利用 $1 \mu\text{mol/L}$ 顺铂处理肝癌 HepG2 和 Bel-7402 细胞 48 h 后,两细胞的抑制率分别为 $(69.0 \pm 1.5) \%$ 和 $(71.3 \pm 1.4) \%$,均高于 90%;利用 $1 \mu\text{mol/L}$ 佛手柑内酯处理肝癌 HepG2 和 Bel-7402 细胞 48 h 后,两细胞的抑制率分别为 $(93.4 \pm 1.6) \%$ 和 $(94.7 \pm 1.0) \%$,均高于 90%,故后续实验中顺铂与佛手柑内酯的浓度均选用 $1 \mu\text{mol/L}$ 。

2.2 佛手柑内酯对肝癌细胞凋亡核形态的影响

按实验分组处理肝癌 HepG2 和 Bel-7402 细胞 48 h 后,如图 1 所示,相对于对照组,顺铂组和佛手柑内酯组均能诱导肝癌细胞出现凋亡核形态,但顺铂组凋亡核形态明显多于佛手柑内酯组 ($P < 0.05$);联

合组中两肝癌细胞的凋亡核形态比顺铂组分别增加 1.99 倍和 2.00 倍,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 佛手柑内酯对凋亡细胞群的影响 按实验分组处理肝癌 HepG2 和 Bel-7402 细胞 48 h 后,如图 2 所示,相对于对照组,佛手柑内酯组和顺铂组中均有肝癌细胞出现凋亡,但顺铂组凋亡明显多于佛手柑内酯组 ($P < 0.05$);联合组中两肝癌细胞的凋亡细胞群比例比顺铂组分别增加 1.86 倍和 2.00 倍,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 佛手柑内酯对抗凋亡相关基因表达的影响

按实验分组处理肝癌 HepG2 和 Bel-7402 细胞 48 h 后,如图 3 所示,相对于对照组,佛手柑内酯组和顺铂组中, BCL2、BCL2L1、XIAP 和 BIRC5 均不同程度地降低,不同药物对不同基因的诱导降低效果不一;联合组中两肝癌细胞的抗凋亡相关基因的下调较佛手柑内酯组或顺铂组均更为显著,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.5 佛手柑内酯对 NF- κ B 转录活性的影响 按实验分组处理肝癌 HepG2 和 Bel-7402 细胞 48 h 后,如表 2 所示,相对于对照组,佛手柑内酯组与顺铂组

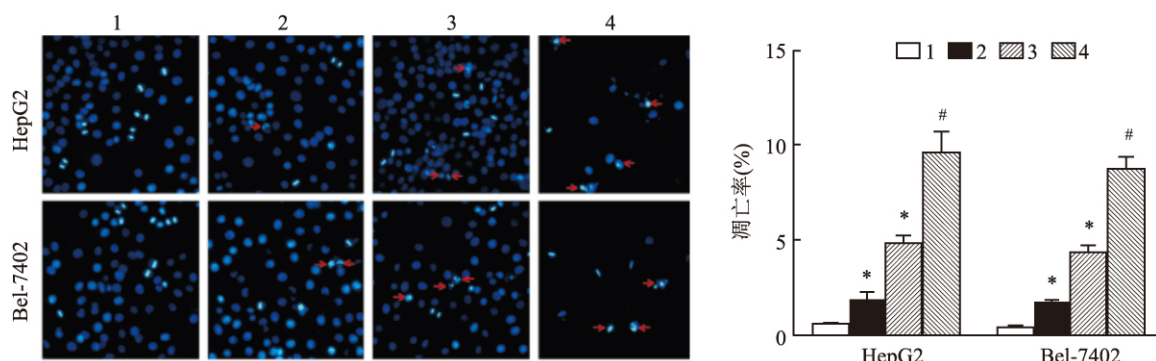


图1 佛手柑内酯对肝癌细胞凋亡核形态的影响 $\times 100$

1: 对照组; 2: 佛手柑内酯组; 3: 顺铂组; 4: 联合组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与顺铂组比较: # $P < 0.05$

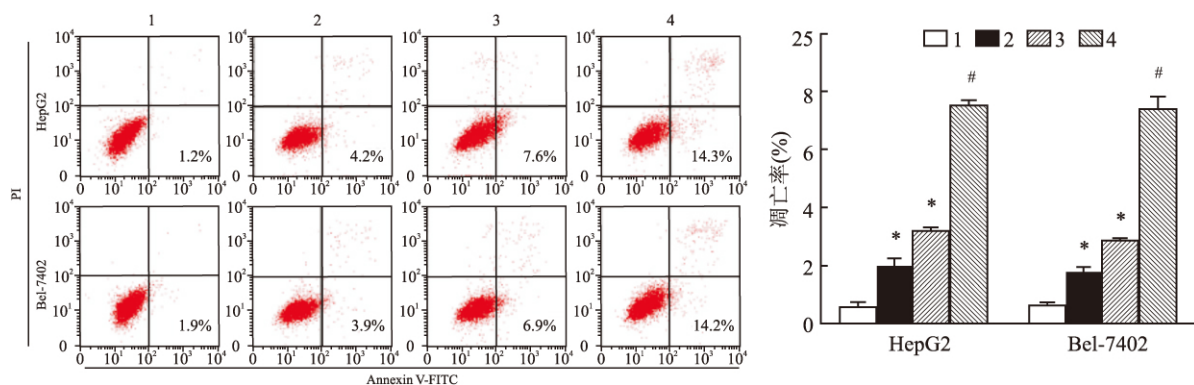


图2 佛手柑内酯对凋亡细胞群的影响

1: 对照组; 2: 佛手柑内酯组; 3: 顺铂组; 4: 联合组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与顺铂组比较: # $P < 0.05$

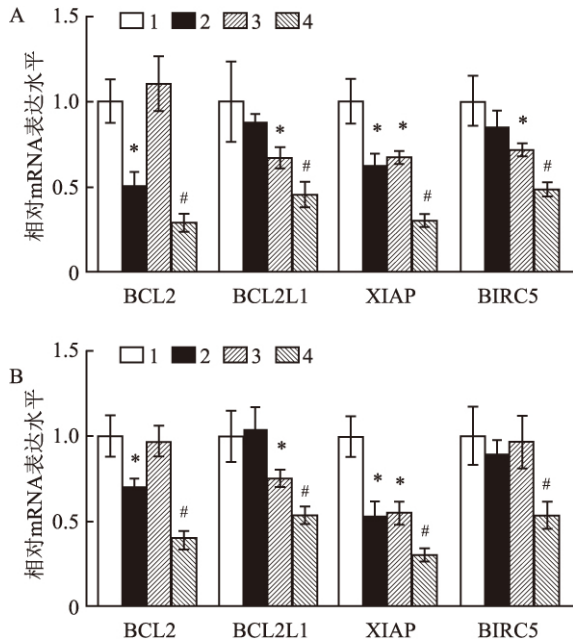


图3 佛手柑内酯对抗凋亡相关基因表达的影响

A: HepG2 细胞; B: Bel-7402 细胞; 1: 对照组; 2: 佛手柑内酯组; 3: 顺铂组; 4: 联合组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与顺铂组比较: # $P < 0.05$

表2 佛手柑内酯对 NF- κ B 转录活性的影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	相对萤火虫荧光素酶活性	
	HepG2	Bel-7402
对照	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.08
佛手柑内酯	0.37 $\pm$ 0.05*	0.32 $\pm$ 0.5*
顺铂	0.75 $\pm$ 0.06*	0.87 $\pm$ 0.8*
联合	0.21 $\pm$ 0.03#	0.20 $\pm$ 0.5#
F 值	116.4	107.3
P 值	<0.000 1	<0.001

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与顺铂组比较: # $P < 0.05$

中,肝癌细胞 NF- κ B 转录活性降低,且佛手柑内酯组 NF- κ B 转录活性较顺铂组更低 ($P < 0.05$); 联合组中两肝癌细胞 NF- κ B 转录活性仅为顺铂组的 0.28 倍和 0.25 倍,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.6 佛手柑内酯对 p62 及 p65 蛋白表达的影响

按实验分组处理肝癌 HepG2 和 Bel-7402 细胞 48 h 后,如图4所示,相对于对照组,佛手柑内酯组和顺

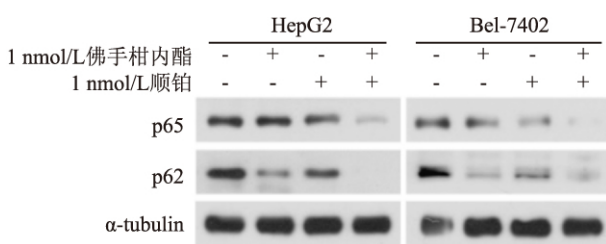


图4 佛手柑内酯对 p62 及 p65 蛋白表达的影响

铂组中,p62 及 p65 蛋白表达水平下调;联合组肝癌细胞中 p62 及 p65 蛋白的表达水平降低更为显著。

3 讨论

佛手柑内酯属于呋喃型香豆素类天然产物,为多种植物的次级代谢物,更是中药佛手^[7]和当归^[8]等的主要有效成分之一,具有抗炎、平喘、镇静及催眠等药理作用^[9]。最近的研究显示,佛手柑内酯对多种恶性肿瘤具有显著的抑制作用,如乳腺癌^[10]及白血病^[9]等。本课题组的前期研究^[11]也显示,佛手柑内酯对鼻咽癌细胞具有抑制增殖并诱导凋亡的作用,表明佛手柑内酯具有一定的抗肿瘤活性,然而佛手柑内酯对肿瘤细胞的有效抑制浓度较高,不宜作为单独的抗肿瘤药物开发。在此,本研究利用低浓度(1 nmol/L)的佛手柑内酯与 1 nmol/L 顺铂联用处理肝癌细胞,显示其能显著增强顺铂对肝癌细胞的杀伤能力,暗示了低浓度佛手柑内酯可以作为化疗药物增敏剂的作用。

大量的研究^[12]证实,炎症相关的 NF- κ B 在包括肝癌在内的多种恶性肿瘤组织及细胞中表达上调并维持异常激活状态,参与了肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移、复发和抗肿瘤治疗耐受等密切相关。静息状态时,NF- κ B 二聚体(p50, p65)与细胞质的抑制因子 I κ B α 结合,以无活性的状态存在于细胞质中;当细胞内外的各种信号通过级联传导,使 I κ B 激酶磷酸化 I κ B α 导致 I κ B α 降解而 NF- κ B 恢复活性的游离状态,激活的 NF- κ B 入核与 DNA 结合,促进下游靶基因转录^[13]。在肿瘤细胞抗化疗的机制中,癌细胞能通过持续激活的 NF- κ B,上调抗凋亡因子如 BCL2、BCL2L2、XIAP 和 BIRC5 等的过量表达,发挥促存活作用^[12]。本研究显示,低浓度(1 nmol/L)的佛手柑内酯与 1 nmol/L 顺铂联用处理肝癌细胞,能显著抑制 NF- κ B 的转录活性,并降低细胞中 BCL2、BCL2L2、XIAP 和 BIRC5 等的表达,表明了低浓度的佛手柑内酯是通过抑制 NF- κ B 的转录活性,降低了抵抗凋亡的多个基因表达水平,从而增强顺铂的杀伤作用。

研究^[14]显示,在肝癌组织与细胞中,NF- κ B 的持续性激活可能与多功能蛋白 p62 的异常高表达相关,敲除 p62 显著抑制 NF- κ B 的激活。p62 是一种多功能泛素结合蛋白,在细胞信号转导中起支架和适配的作用,p62 分子结构中的多个功能结构域可与其它蛋白质相互作用,参与泛素蛋白酶体系统和自噬-溶酶体系统两种蛋白降解过程^[15]。研究^[15]

显示 p62 调控 NF- κ B 主要方式,是通过 TB 结构域结合 TRAF,形成 p62-TRAF6-IKK β -aPKC 的信号复合物激活 NF- κ B 通路;在此通路中,p62 与 MAPK 激酶激酶前端基本区域 MEKK3 结合作为活动中心募集 TRAF6 及其他聚合物,进一步促进 TRAF6 的寡聚化及泛素化,最终诱导 NF- κ B 的激活。本研究显示,低浓度(1 nmol/L)的佛手柑内酯与 1 nmol/L 顺铂联用处理肝癌细胞,能显著抑制 p62 蛋白的表达水平,这可能是 NF- κ B 表达及转录活性受抑制的可能机制。后续的研究中将进一步通过实验揭示,佛手柑内酯下调 p62 的具体机制,并通过裸鼠模型,进一步探讨低浓度佛手柑内酯作为化疗药物增敏剂的可能性。

参考文献

- [1] Mazzanti R, Gramantieri L, Bolondi L. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and clinical aspects [J]. Mol Aspects Med, 2008, 29(1-2): 130-43.
- [2] Wang D, Li X, Liu J, et al. Effects of TRPC6 on invasibility of low-differentiated prostate cancer cells [J]. Asian Pac J Trop Med, 2014, 7(1): 44-7.
- [3] Shin J W, Chung Y H. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: current and future [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(37): 6144-55.
- [4] Lau C K, Yang Z F, Ho D W, et al. An Akt/Hypoxia-inducible factor-1 α /Platelet-derived growth factor-BB autocrine loop mediates hypoxia-induced chemoresistance in liver cancer cells and tumorigenic hepatic progenitor cells [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(10): 3462-71.
- [5] 张鑫,林永文,郑爱华,等.三七皂苷 R1 对过氧化氢诱导大鼠星形胶质细胞凋亡的影响 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(15): 7048-53.
- [6] Zhang X, Liu J, Zang D, et al. Upregulation of miR-572 transcriptionally suppresses SOCS1 and p21 and contributes to human ovarian cancer progression [J]. Oncotarget, 2015, 6(17): 15180-93.
- [7] 崔红花,高幼衡,蔡鸿飞,等.川佛手化学成分研究(II) [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(4): 344-7.
- [8] 杨秀伟,王继彦,严仲铠,等.四种长白山产当归药用植物的香豆精成分研究 [J]. 中药材, 1994, 17(4): 30-2,53.
- [9] Salvador A, Dall'Acqua S, Sardo M S, et al. Erythroid induction of chronic myelogenous leukemia K562 cells following treatment with a photoproduct derived from the UV-A irradiation of 5-methoxypsoralen [J]. Chem Med Chem, 2010, 5(9): 1506-12.
- [10] De Amicis F, Aquila S, Morelli C, et al. Bergapten drives autophagy through the up-regulation of PTEN expression in breast cancer cells [J]. Mol Cancer, 2015, 14: 130.
- [11] 林碧华,马晓娟,万树伟,等.佛手柑内酯对鼻咽癌细胞凋亡的影响 [J]. 肿瘤防治研究, 2014, 41(11): 1163-70.
- [12] Wang W, Nag S A, Zhang R. Targeting the NF κ B signaling pathways for breast cancer prevention and therapy [J]. Curr Med Chem, 2015, 22(2): 264-89.
- [13] Madonna G, Ullman C D, Gentilecore G, et al. NF- κ B as potential target in the treatment of melanoma [J]. J Transl Med, 2012, 10: 53.
- [14] Duran A, Hernandez E D, Reina-Campos M, et al. p62/SQSTM1 by binding to Vitamin D receptor inhibits hepatic stellate cell activity, fibrosis, and liver cancer [J]. Cancer Cell, 2016, 30(4): 595-609.
- [15] Moscat J, Karin M, Diaz-Meco M T. p62 in cancer: signaling adaptor beyond autophagy [J]. Cell, 2016, 167(3): 606-9.

Bergapten strengthens the anti-tumor activity of cisplatin by suppressing p62/NF- κ B pathway in hepatocellular carcinoma

Zheng Zhiming¹, Zou Haipeng², Lu Minjuan¹, et al

(¹Dept of Pharmacology, Xiaolan Peoples Hospital of Zhongshan, Zhongshan 528415;

²Dept of Pharmacology, Yantai Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Yantai 264100)

Abstract Objective To investigate the effect of bergapten strengthening the anti-tumor activity of cisplatin in hepatocellular carcinoma *in vitro*. **Methods** The hepatocellular carcinoma cells (HepG2 and Bel-7402) were treated with 1 mol/L bergapten and/or 1 mol/L cisplatin, and the apoptosis ratio was detected by Hoechst33258 staining and Annexin V-FITC/PI analysis. The expression of anti-apoptosis related genes were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction. The activity of NF- κ B transcription factors were detected by luciferase reporter gene analysis. The expression of p65 and p62 were detected by Western blot. **Results** Compared with cisplatin only treatment, the ratio of apoptosis nucleus and cells was remarkable increased by combination of bergapten and cisplatin both in HepG2 and Bel-7402 ($P < 0.05$ for each). The mRNA level of BCL2, BCL2L1, XIAP and BIRC5 was decreased by combination treatment with bergapten and cisplatin. The transcript ability of NF- κ B and

网络出版时间: 2018-3-16 9:32 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180315.1708.014.html>

桔梗总皂苷治疗大鼠佐剂性关节炎的作用及其对 GRP78/XBP1/CHOP 信号通路的影响

陈昭琳¹, 李俊^{2,3,4}, 马陶陶^{2,3,4}, 黄成^{2,3,4}, 沈爱宗¹, 唐丽琴¹, 张善堂¹, 朱鹏里¹

摘要 目的 探讨桔梗总皂苷(CKS)对佐剂性关节炎(AA)大鼠的作用及部分机制研究。方法 60只SD大鼠随机分为6组,每组10只,分别为正常组、模型组、CKS低、中、高剂量组(50、100、200 mg/kg)及阳性药来氟米特组(2 mg/kg)。采用弗氏完全佐剂注射左后足趾皮内建立AA大鼠模型,观察各组大鼠足肿胀度、多发性关节炎指数并进行组织病理学检查;ELISA试剂盒检测血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素1 β (IL-1 β)的水平;Real-time PCR和Western blot法检测各组大鼠滑膜组织中葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、X盒结合蛋白1(XBP1)、CCAAT增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)、TNF- α mRNA和蛋白表达的情况。结果 CKS(100、200 mg/kg)可显著抑制大鼠继发性足肿胀并减轻其膝关节的病理变化;可将大鼠血清中TNF- α 和IL-1 β 的水平明显降低($P < 0.05$);同时可以下调GRP78、XBP1、CHOP、TNF- α mRNA和蛋白的表达($P < 0.05$)。结论 CKS对AA大鼠具有一定的治疗作用,其机制可能是与抑制内质网应激GRP78/XBP1/CHOP信号通路,从而抑制滑膜细胞分泌和表达的TNF- α 有关。

关键词 桔梗总皂苷;佐剂性关节炎;TNF- α ;内质网应激

中图分类号 R 285; R 364.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)03-0395-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.014

2017-11-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81473268、81602344);安徽省高校自然科学基金(编号:KJ2016A365)

作者单位:¹安徽医科大学附属省立医院药剂科,合肥 230001

²安徽医科大学药学院,合肥 230032

³安徽医科大学重大自身免疫学疾病安徽省重点实验室,合肥 230032

⁴安徽省创新药物产业共性技术研究院,合肥 230032

作者简介:陈昭琳,女,博士,药师;

李俊,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: lj@ahmu.edu.cn

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以持续、反复发作、全身性关节肿痛等为主要特征的慢性自身免疫性疾病^[1]。目前临床上治疗RA的药物虽可有效缓解RA患者的症状,但普遍存在长期使用所伴随的毒副作用,因此寻找高效低毒的药物就成为临床迫在眉睫的需求。

桔梗为桔梗科植物桔梗[*Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC.]的干燥根,桔梗皂苷(*Platycodon grandiflorum* total saponins, CKS)是其主要的药理活性成分,具有抗炎、免疫调节等作用^[2-3]。近年大量研究^[4-5]显示,RA发病过程中有内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)的参与。目前关于ERS与CKS在RA中的实验研究尚未见报道。因此该课题利用弗氏完全佐剂诱导的AA大鼠模型,通过灌胃给予CKS干预后,观察其对AA大鼠的治疗作用并深入探讨其作用机制,为CKS在类风湿性关节炎临床治疗上的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 60只清洁级SD雄性大鼠,体质量(180 $\pm$ 20)g,实验动物均购自安徽医科大学实验动物中心。

1.1.2 药物与试剂 CKS由安徽医科大学药学院提取纯化,总皂苷含量>80%;弗氏完全佐剂购自美国sigma公司;来氟米特购自苏州长征-欣凯制药有限公司;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)和白介素1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)试剂盒均购自美国R & D公司;蛋白裂解液(RIPA)、一抗稀释液购自上海碧云天生物技术有限公司;GRP78抗体购自美国Abcam公司;CHOP抗体购自美国

the protein level of p65 and p62 was decreased by combination treatment with bergapten and cisplatin. **Conclusion**

Bergapten could strengthen the anti-tumor activity of cisplatin by suppressing p62/NF- κ B pathway in hepatocellular carcinoma *in vitro*.

Key words bergapten; hepatocellular carcinoma; cisplatin; p62/NF- κ B pathway