

网络出版时间: 2018-1-8 11:43 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180104.1310.010.html>

丹皮酚逆转内质网应激诱导的 HepG2 细胞凋亡抵抗

范璐璐¹, 孙国平¹, 查丽霞², 马 泰¹

摘要 目的 探讨丹皮酚逆转内质网应激诱导的 HepG2 肝癌细胞凋亡抵抗的作用机制。方法 采用 MTT 及末端双脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口标记技术 (TUNEL) 观察内质网应激诱导剂衣霉素对正常人肝细胞株 HL-7702 及人肝癌细胞株 HepG2 细胞的增殖抑制及凋亡作用; Western blot 法测定内质网应激诱导剂衣霉素对正常肝细胞 HL-7702 及肝癌细胞 HepG2 的环氧合酶-2 (COX-2) 表达的影响; 采用 Western blot 法及 TUNEL 法观察 COX-2 的选择性抑制剂塞来昔布对内质网应激下的肝癌细胞 HepG2 COX-2 的表达及凋亡的影响; 采用 MTT 及 TUNEL 法观察丹皮酚对内质网应激下的 HepG2 肝癌细胞的增殖抑制及凋亡作用; Western

blot 法观察丹皮酚对内质网应激诱导的 HepG2 肝癌细胞 COX-2 表达的影响。结果 与正常肝细胞 HL-7702 相比, 在 TM 诱导的内质网应激作用下肝癌细胞 HepG2 的增殖抑制率及凋亡率减少 ($P < 0.05$), 并且内质网应激可诱导肝癌细胞 HepG2 产生 COX-2 蛋白。而丹皮酚可下调内质网应激诱导的 HepG2 肝癌细胞中 COX-2 的表达, 并使内质网应激诱导的肝癌细胞的凋亡增加。结论 丹皮酚可通过下调 COX-2 的表达从而逆转内质网应激诱导的 HepG2 肝癌细胞凋亡抵抗。

关键词 肝癌; 内质网应激; 环氧合酶-2; 细胞凋亡; 丹皮酚
中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0045-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.010

2017-09-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81402040、81572430); 安徽省自然科学基金(编号: 1408085QH151)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科, 合肥 230022

² 安徽医科大学第四附属医院肿瘤内科, 合肥 230022

作者简介: 范璐璐, 女, 主治医师;

孙国平, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: sungp@ahmu.edu.cn

肝癌是临床上常见的恶性肿瘤, 据最新统计, 全世界新发肝癌患者每年约 60 万, 居恶性肿瘤的第 5 位, 肝癌因此被称为“肿瘤之王”^[1-2]。有文献^[3-4]报道内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 诱导的凋亡抵抗是肝癌化疗耐药的重要原因之一,

Expression and purification of multidrug resistance related membrane protein MmpL6 of *Mycobacterium tuberculosis*

Cui Kele¹, Li Jing², Sun Anyuan¹

(¹ Dept of Clinical Laboratories, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

² Dept of Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract **Objective** To construct the prokaryotic expression vector carrying *Mycobacterium tuberculosis* gene mmpL6 (rv1557), overexpress and purify the recombinant MmpL6 (Rv1557) protein in *Escherichia coli* (*E. coli*). **Methods** The DNA fragment of MmpL6 was amplified by polymerase chain reaction using the genomic DNA of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain as a template. The target gene was cloned into pET21b vector to construct the pET21b-MmpL6 expression plasmid, and then transformed into *E. coli* for protein expression. Recombinant protein expression was induced by isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) and detected by SDS-PAGE combined with Western blot. The overexpressed MmpL6 protein was purified by Ni-affinity chromatography and gel filtration chromatography. **Results** The recombinant pET21b-MmpL6 plasmid was successfully constructed and the highest expression level was obtained at 25 °C in Rosetta strain induced by IPTG. **Conclusion** The successful expression and purification of MmpL6 in *E. coli* lays the foundation for the further structure and function studies of the protein, and also provides clues to the design of anti-tuberculosis drugs targeting efflux pump proteins.

Key words *Mycobacterium tuberculosis*; efflux pump protein; prokaryotic expression; purification; affinity chromatography

因此阐明肝癌凋亡抵抗的机制,进而发现新的干预手段提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,最终达到延长患者生存期的作用。丹皮酚具有如解热、镇痛、抗炎等广泛的药理作用^[5-6]。许多文献^[7-9]报道了丹皮酚有抗肿瘤作用,其杀伤肿瘤细胞的主要机制是诱导凋亡,为了探讨丹皮酚在 ERS 诱导 HepG2 肝癌细胞凋亡抵抗中的作用及机制,该研究首先通过观察 ERS 诱导剂衣霉素(tunicamycin, TM)对人肝细胞(HL-7702)及肝癌细胞 HepG2 细胞的增殖抑制、凋亡差异及环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)蛋白表达的影响探讨 ERS 凋亡抵抗的机制,通过使用丹皮酚观察 ERS 下的 HepG2 肝癌细胞的增殖抑制、凋亡及 COX-2 蛋白表达影响,进而探讨丹皮酚逆转 ERS 诱导的 HepG2 肝癌细胞凋亡抵抗的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂及药物 塞来昔布、MTT 购自美国 Sigma 公司;丹皮酚注射剂购自上海第一制药厂;DMEM 培养基购自美国 Hyclone 生物公司;新生牛血清购自杭州四季青生物工程公司;原位末端凋亡检测试剂盒(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL) 试剂盒购自美国罗氏公司;兔抗人 COX-2、葡萄糖调节蛋白(78 kD glucose regulated protein, GRP78) 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;鼠抗人 β -actin 抗体、山羊抗兔、抗小鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 主要仪器 EL301 Strip reader 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);YJ-1450 型医学净化工作台(苏州净化设备公司);Image Quant™ LAS-4000 型发光成像系统(日本通用电气医疗集团生命科学部);DYY-10(ECP3000)电泳仪(北京六一仪器厂);倒置式显微镜(日本 Olympus 光学工业株式会社);Nacpo-6100 CO₂ 培养箱(美国杜邦公司)。

1.3 细胞系 HL-7702 人肝细胞株和 HepG2 人肝癌细胞株购自中国科学院细胞库。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养方法 使用含 10% 血清的 DMEM 培养基培养细胞,将细胞放置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

1.4.2 细胞增殖抑制实验 将 1×10^4 /L 细胞接种于 96 孔板上,设置空白对照组和细胞对照组、不同药物组,每组设 6 个复孔,每孔接种 200 μ l 细胞,置 96 孔板于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱 24 h 后,弃上清液,药物组中每个孔加入使用 200 μ l DMEM 稀释

的不同浓度的药物,空白对照组和细胞对照组只加入 200 μ l 的 DMEM 培养,在结束培养前 4 h 每孔加入 20 μ l MTT 5 g/L,继续培养 4 h 后弃上清液,每个孔加入 150 μ l 的 DMSO,使用 EL301 Strip reader 酶标仪设定 570 nm 测定吸光值。按以下公式计算药物对细胞的增殖抑制率:细胞的增殖抑制率(%) = (1-实验组吸光值/细胞组吸光值) \times 100%。

1.4.3 TUNEL 将 1×10^5 /L 细胞接种于含有盖玻片的 6 孔板中,置 6 孔板于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h,弃上清液,加入不同浓度的药物作用细胞 24 h,取出 6 孔板中的盖玻片,实验同时设置阳性对照组和阴性对照组,使用 4% 多聚甲醛固定 30 min 后,按照 TUNEL 试剂盒说明书操作,使用 DAB 显色及苏木精染色后封片。在普通光镜下观察 TUNEL 染色标本,随机选取 6 个高倍视野,计算凋亡细胞占肿瘤细胞的比例即为凋亡指数。

1.4.4 Western blot 法 将细胞加入裂解液裂解 30 min 后离心,吸取上清液并使用 Lorry 法定量后加入蛋白上样缓冲液,将样本放入沸水煮 10 min 后将标本置于 -20 °C 冰箱保存;实验经过电泳分离蛋白、转膜、封闭等步骤后将标本孵育一抗并放置于 4 °C 冰箱过夜。次日,将标本孵育二抗 2 h 再加入 ECL 化学发光试剂,利用发光成像系统显像,以目标蛋白/ β -actin 值反映目标蛋白的相对表达量。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计学软件对实验数据进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析或 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ERS 诱导剂 TM 对 HepG2 肝癌细胞和 HL-7702 肝细胞的增殖抑制及凋亡作用 使用 MTT 法观察不同浓度 TM(1.5、3、6、9、12 μ mol/L) 分别作用于 HepG2 肝癌细胞和 HL-7702 肝细胞 24 h 的增殖抑制率(图 1),结果显示在 TM 诱导的 ERS 作用下肝癌细胞 HepG2 的增殖抑制率并无明显增加,3 μ mol/L TM 作用 24 h 增殖抑制率仅达到(22.7 \pm 4.1)%,而 HL-7702 正常肝细胞在相同浓度 TM 的作用下抑制率为(61.1 \pm 3.5)%,差异有统计学意义($t = -12.444$, $P < 0.01$)。采用 TUNEL 染色法观察 3 μ mol/L TM 分别作用于 HepG2 和 HL-7702 细胞 24 h 后细胞形态学变化(图 2A、B),结果显示 HepG2 肝癌细胞组中,未使用 TM 处理的肝癌细胞组细胞增殖旺盛,仅见少许的凋亡细胞;而使用 TM

作用 24 h 的 HepG2 肝癌细胞, 仅见细胞密度稍减少和少量的凋亡细胞, 凋亡率 (15.2 ± 2.3)%; 而在 HL-7702 细胞组中, TM 处理组的 HL-7702 细胞密度增加, 胞凋亡细胞数明显增加, 凋亡率 (57.2 ± 5.6)%, 差异有

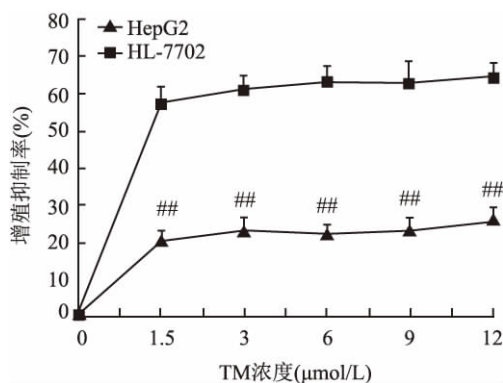


图1 TM 诱导的 ERS 对 HepG2 和 HL-7702 细胞的增殖抑制率的影响

与同等浓度的 TM 处理的 HL-7702 组比较: $^{##}P < 0.01$

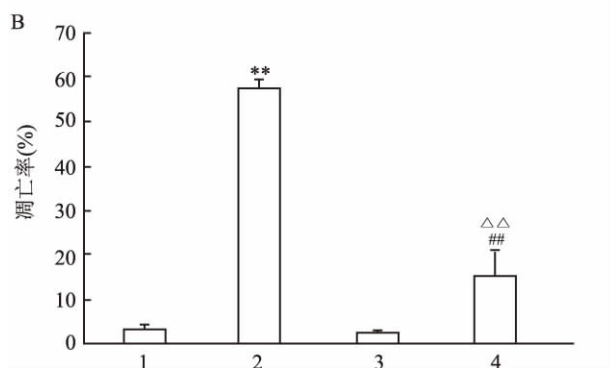
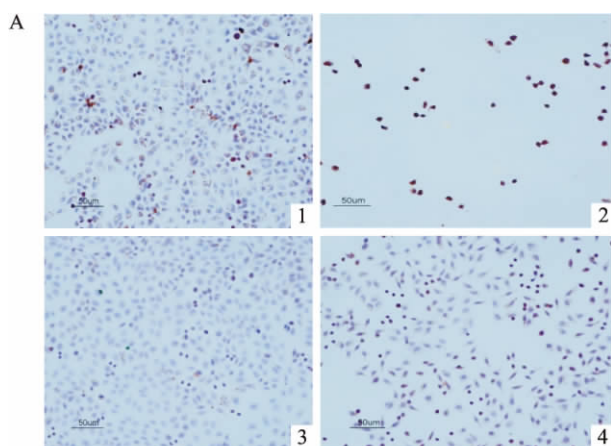


图2 TM 诱导的 ERS 对 HepG2 和 HL-7702 细胞凋亡的影响

A: TM 作用于 HepG2 和 HL-7702 细胞的凋亡的形态学变化 (TUNEL 法 $\times 400$); B: TM 作用于 HepG2 和 HL-7702 细胞的凋亡率; 1: 未处理 HL-7702 组; 2: TM 处理的 HL-7702 组; 3: 未处理 HepG2 组; 4: TM 处理的 HepG2 组; 与未处理组 HL-7702 组比较: $^{**}P < 0.01$; 与未处理 HepG2 组比较: $^{##}P < 0.01$; 与 TM 处理的 HL-7702 组比较: $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

统计学意义 ($t = -12.201, P < 0.01$), 提示与正常 HL-7702 肝细胞相比, 肝癌细胞 HepG2 对 ERS 诱导的细胞凋亡相对耐受。

2.2 ERS 诱导剂 TM 对 HL-7702 肝细胞和 HepG2 肝癌细胞的 COX-2 蛋白和 GRP78 蛋白表达的影响

使用 Western bolt 观察 $3 \mu\text{mol/L}$ TM 作用于 HL-7702 肝细胞和 HepG2 肝癌细胞 24 h 后 COX-2 蛋白和 GRP78 蛋白表达的影响 (图 3), 结果显示在 HL-7702 肝细胞和 HepG2 肝癌细胞中 ERS 标志性蛋白 GRP78 的表达均随着 TM 作用时间的延长而其表达逐渐增多, 表明 ERS 的产生。同时显示, 肝癌细胞 HepG2 在 TM 的作用下 COX-2 蛋白的表达随着时间的延长而表达逐渐增加 ($P < 0.05$), 而在 HL-7702 细胞中, COX-2 的表达并没有相应增多, 表明 ERS 可诱导 HepG2 肝癌细胞 COX-2 的表达, 而不诱导正常肝细胞 HL-7702 COX-2 的表达。

2.3 COX-2 选择性抑制剂塞来昔布对 TM 诱导的 HepG2 肝癌细胞的 COX-2 表达的及凋亡作用

Western bolt 法观察 $10 \mu\text{mol/L}$ COX-2 选择性抑制剂塞来昔布加入 TM 处理的 HepG2 细胞 24 h 后 COX-2 表达的变化 (图 4A), 结果显示 TM 诱导 HepG2 肝癌细胞产生的 COX-2 可被塞来昔布抑制, 采用 TUNEL 染色法观察 $10 \mu\text{mol/L}$ COX-2 选择性抑制剂塞来昔布加入 TM 处理的 HepG2 肝癌细胞 24 h 后细胞凋亡的变化 (图 4B、C), 结果显示, 与单独使用 TM 组相比, 塞来昔布加入 TM 处理的 HepG2 肝癌细胞后, 细胞密度明显减少, 细胞凋亡率为 (67.6 ± 7.6)% ($t = -11.418, P < 0.01$)。提示 COX-2 可能在 ERS 诱导的 HepG2 肝癌细胞凋亡抵抗中起重要作用。

2.4 丹皮酚对 ERS 下的 HepG2 肝癌细胞的凋亡作用

采用 TUNEL 染色法观察 31.25 mg/L 丹皮酚加入 TM 处理的 HepG2 肝癌细胞 24 h 后细胞凋亡的变化 (图 5A、B), 结果显示, 与单独使用 TM 组相比, 丹皮酚加入 TM 处理的 HepG2 肝癌细胞后, 细胞密度减少, 细胞凋亡率为 (41.6 ± 6.9)% ($t = -4.647, P < 0.01$), 表明了丹皮酚可以逆转 ERS 诱导的 HepG2 肝癌细胞的凋亡抵抗。

2.5 丹皮酚对 TM 诱导的 HepG2 肝癌细胞 COX-2 表达的影响

使用 Western blot 法检测丹皮酚对 TM 诱导的 HepG2 肝癌细胞 COX-2 蛋白表达变化的影响 (图 6)。结果显示与未处理组相比, TM 处理的肝癌细胞系 HepG2 COX-2 的表达明显增高 ($P < 0.01$), 与 TM 组相比, 使用丹皮酚明显下调了 ERS

诱导的 COX-2 的表达 ($P < 0.01$), 表明丹皮酚可通过抑制 COX-2 逆转 ERS 诱导的凋亡抵抗。

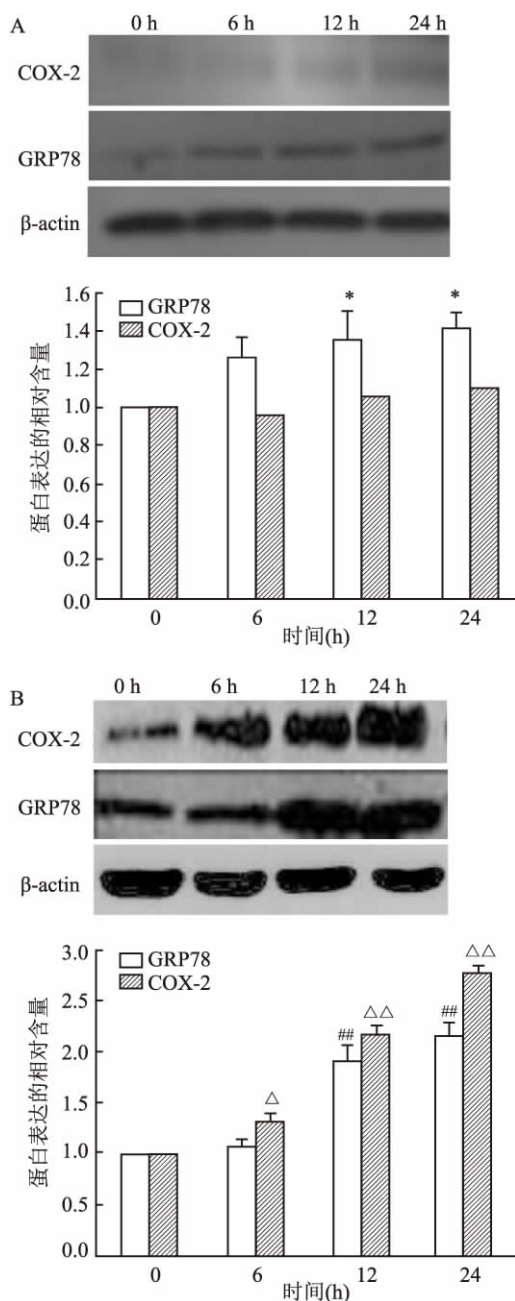


图3 TM 诱导的 ERS 对 HL-7702 肝细胞和 HepG2 肝癌细胞的 COX-2 蛋白和 GRP78 蛋白表达的影响

A: TM 对 HL-7702 肝细胞的 COX-2 蛋白和 GRP78 蛋白表达的影响; B: TM 对 HepG2 肝癌细胞的 COX-2 蛋白和 GRP78 蛋白表达的影响; 与未处理 HL-7702 GRP78 蛋白的比较: * $P < 0.05$; 与未处理 HepG2 组 GRP78 蛋白的比较: ^{##} $P < 0.01$; 与未处理 HepG2 组 COX-2 蛋白的比较: [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

3 讨论

内质网是真核细胞重要的膜性细胞器,其是细

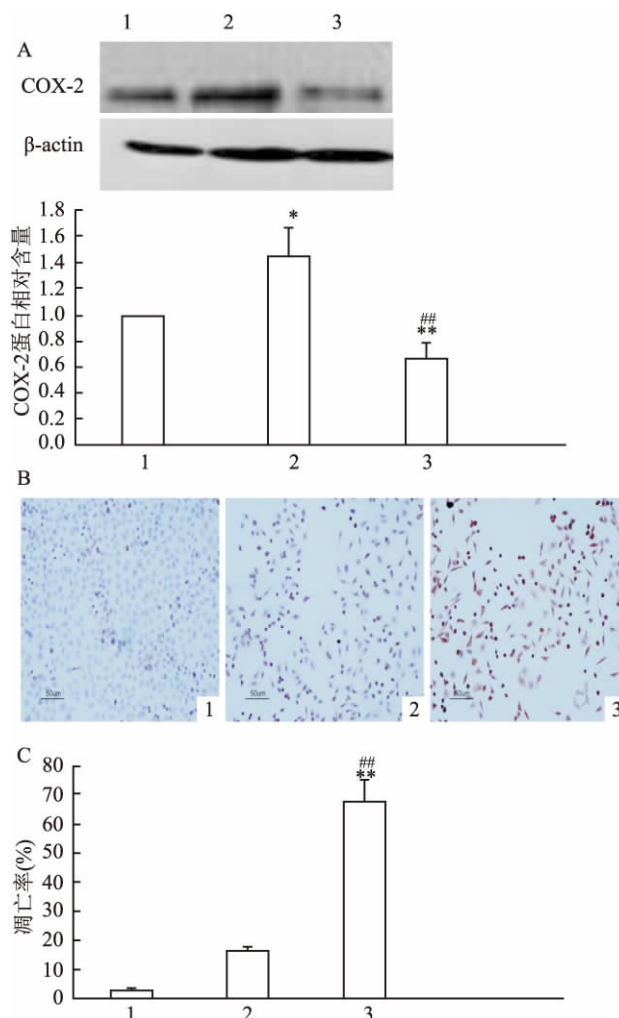


图4 塞来昔布对 TM 诱导的 HepG2 肝癌细胞的 COX-2 表达的影响及凋亡作用

A: 塞来昔布对 TM 诱导的 HepG2 细胞的 COX-2 表达的影响; B: 塞来昔布作用于 TM 诱导的 HepG2 细胞的凋亡形态学变化 (TUNEL 法 $\times 400$); C 塞来昔布作用于 TM 诱导的 HepG2 细胞的凋亡率; 1: 空白对照组; 2 TM 处理组; 3: TM 联合塞来昔布处理组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 TM 处理组比较: ^{##} $P < 0.01$

胞内糖类、脂类和蛋白质合成及修饰的场所。当各种生理和病理因素造成内质网稳态失衡,可使内质网腔内错误折叠蛋白和未折叠蛋白增加、钙离子浓度改变,从而诱导 ERS 的发生^[10]。对于实体瘤,由于营养条件和血液供应不足等因素的影响,可导致实体瘤内存在低糖及低氧等应激环境,从而损伤内质网的正常生理功能,继而诱发肿瘤细胞产生 ERS^[11]。ERS 可激活未折叠蛋白反应,未折叠蛋白反应一方面其在一定程度上能够缓解 ERS 带来的相关损害;另一方面如果 ERS 持续并且过度,那么未折叠蛋白反应也可以诱导细胞凋亡。如果这种

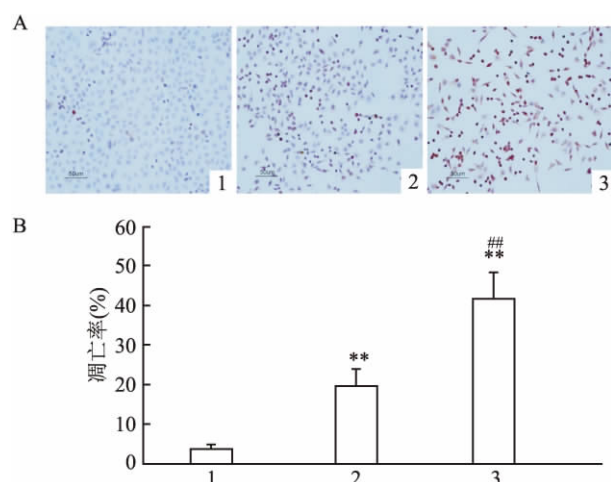


图5 丹皮酚对 ERS 下的 HepG2 肝癌细胞的增殖抑制及凋亡作用

A: 丹皮酚作用于 TM 诱导的 HepG2 肝癌细胞的凋亡形态学变化 (TUNEL 法 $\times 400$); B: 塞来昔布作用于 TM 诱导的 HepG2 肝癌细胞的凋亡率; 1: 空白对照组; 2: TM 处理组; 3: TM 联合 Paeonol 组; 与空白对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 TM 处理组比较: ## $P < 0.01$

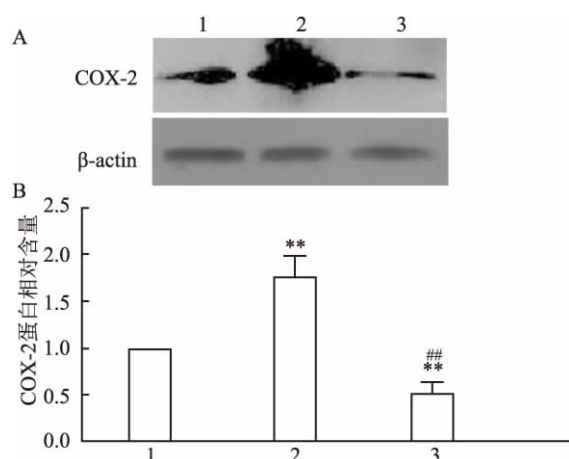


图6 丹皮酚对 TM 诱导的 HepG2 肝癌细胞 COX-2 表达的影响

1: 空白对照组; 2: TM 处理组; 3: TM 联合 Paeonol 组; 与空白对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 TM 处理组比较: ## $P < 0.01$

强 ERS 效应发生在肿瘤细胞身上,则可以诱导肿瘤细胞凋亡,进而达到抑制肿瘤的效应。因此,提高肿瘤细胞对 ERS 介导的凋亡的敏感性,是一种治疗肿瘤的新策略。但有研究^[12-13]指出,即使使用了 ERS 诱导剂,肿瘤细胞凋亡也并未有明显的增多,这表明肿瘤细胞可对 ERS 产生适应从而逃避凋亡。本研究也显示与正常人肝细胞株 HL-7702 相比,人肝癌细胞株 HepG2 在 TM 诱导的 ERS 作用下细胞的增殖抑制作用及凋亡作用并不明显,这一结果显示肝癌细胞 HepG2 对 ERS 诱导的细胞凋亡相对耐受。目前关于其机制尚不清楚,因此阐明肝癌细胞 ERS 性凋亡抵抗的机制,通过新的干预手段提高肝癌对

化疗药物的敏感性,最终达到延长患者生存时间的作用。

COX-2 是前列腺素合成中的重要限速酶,其在正常生理状态下的多数组织中并不表达,但在细胞内外刺激物(如内毒素、细胞因子等)广泛刺激下 COX-2 会迅速产生。研究^[14-15]显示 COX-2 可以促进肿瘤转移、参与血管形成以及抵抗肿瘤细胞凋亡等,在肝癌的发生发展中起着重要的作用。本研究显示使用 ERS 诱导剂 TM 作用于 HL-7702 正常肝细胞株和 HepG2 肝癌细胞株,分别于 0、6、12、24 h 观察 COX-2 的表达变化,表明 COX-2 蛋白在肝癌细胞中明显增多,而在正常肝细胞中未见 COX-2 的表达明显增加,当加入 COX-2 选择性抑制剂塞来昔布后肝癌细胞凋亡率上升,表明 ERS 可以诱导肝癌细胞 COX-2 的表达,进而逃避了 ERS 介导的凋亡,抑制 COX-2 蛋白的表达可提高肝癌细胞 HepG2 对 ERS 性凋亡的敏感性,提示 COX-2 可能在 ERS 诱导的 HepG2 肝癌细胞凋亡抵抗中扮演着重要角色。

丹皮酚又称为牡丹酚,是萝藦科植物徐长卿全草和中药芍药科植物牡丹根皮的主要成分^[5-6]。许多文献^[7-8]报道丹皮酚具有解热、镇痛、抗氧化、免疫调节等多种药理作用。不仅如此,不断有研究^[9]表明丹皮酚有诱导肿瘤细胞凋亡的作用。本研究显示丹皮酚加入 TM 处理的 HepG2 肝癌细胞后,增殖抑制及凋亡均明显增加,表明丹皮酚可逆转 ERS 诱导 HepG2 肝癌细胞凋亡抵抗。为明确丹皮酚是否通过抑制 COX-2 逆转肝癌细胞对 ERS 诱导的抵抗,利用 Western blot 技术显示丹皮酚可下调 ERS 诱导的 HepG2 肝癌细胞的 COX-2 的表达,其结果与使用塞来昔布结果相似,表明丹皮酚可通过抑制 COX-2 蛋白的表达继而逆转 ERS 诱导的肝癌细胞 HepG2 的凋亡抵抗。

综上所述,ERS 诱导 COX-2 的产生可能是肝癌细胞 HepG2 抵抗细胞凋亡的原因之一,而丹皮酚可通过下调 COX-2 逆转 ERS 诱导的 HepG2 肝癌细胞凋亡抵抗,从而深化了肝癌细胞对 ERS 性凋亡抵抗机制的认识,并为肝癌的治疗提供新思路。

参考文献

- [1] Waller L P, Deshpande V, Pyrsopoulos N. Hepatocellular carcinoma: a comprehensive review [J]. World J Hepatol, 2015, 7(26): 2648-63.
- [2] Waghray A, Murali A R, Menon K N. Hepatocellular carcinoma: from diagnosis to treatment [J]. World J Hepatol, 2015, 7(8): 1020-9.

- [3] Dicks N, Gutierrez K, Michalak M, et al. Endoplasmic reticulum stress, genome damage, and cancer [J]. *Front Oncol*, 2015, 5: 11.
- [4] Wang W A, Groenendyk J, Michalak M. Endoplasmic reticulum stress associated responses in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(10): 2143–9.
- [5] Sun G P, Wan X A, Xu S P, et al. Synergistic effect of paeonol and cisplatin on oesophageal cancer cell lines [J]. *Dig Liver Dis*, 2008, 40: 531–9.
- [6] Sun G P, Wan X, Xu S, et al. Antiproliferation and apoptosis induction of paeonol in human esophageal cancer cell lines [J]. *Dis Esophagus*, 2008, 21(8): 723–9.
- [7] 孙言才, 沈玉先, 孙国平. 丹皮酚的主要药理活性研究进展 [J]. *中成药*, 2004, 26(7): 579–82.
- [8] 孙国平, 沈玉先, 张玲玲, 等. 丹皮酚对 HepA 荷瘤小鼠免疫调节和抑瘤作用研究 [J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(2): 160–2.
- [9] Xu S P, Sun G P, Shen Y X, et al. Synergistic effect of combining paeonol and cisplatin on apoptotic induction of human hepatoma cell lines [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(6): 869–78.
- [10] Nagelkerke A, Bussink J, Sweep F C, et al. The unfolded protein response as a target for cancer therapy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1846(2): 277–84.
- [11] Urrea H, Dufey E, Lisbona F, et al. When ER stress reaches a dead end [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(12): 3507–17.
- [12] Rasheva V I, Domingos P M. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(8): 996–1007.
- [13] Zhang L J, Chen S, Wu P, et al. Inhibition of MEK blocks GRP78 up-regulation and enhances apoptosis induced by ER stress in gastric cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2009, 274(1): 40–6.
- [14] 范璐璐, 孙国平, 付卫争, 等. NS-398 诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡的作用机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2010, 45(5): 655–9.
- [15] Misra S, Sharma K. COX-2 signaling and cancer: new players in old arena [J]. *Curr Drug Targets*, 2014, 15(3): 347–59.

Paeonol increases HepG2 cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis resistance

Fan Lulu¹, Sun Guoping¹, Zha Lixia², et al

(¹*Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;*

²*Dept of Oncology, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)*

Abstract Objective To investigate the mechanism of paeonol reversing apoptosis resistance in HepG2 cells induced by endoplasmic reticulum stress. **Methods** MTT and TUNEL were used to observe the inhibitory effect of endoplasmic reticulum stress inducer – tunicamycin or plus paeonol on human hepatocyte cell line HL-7702 and human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. Changes in protein expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and GRP78 (a hallmark of ER stress) in both HepG2 and HL-7702 cells were observed through Western blot. **Results**

Growth inhibition of tunicamycin on HL-7702 was dose dependent. But the growth inhibition of tunicamycin on HepG2 cells reached maximum inhibition in cells. Similar results were observed in TUNEL staining ($P < 0.05$). Furthermore, the expression of COX-2 was increased in HepG2 cells but not in HL-7702 cells. Down-regulation of COX-2 expression using the COX-2 inhibitor, celecoxib, increased tunicamycin-induced apoptosis. However, co-treatment with tunicamycin and paeonol significantly increased the rate of apoptosis. Co-treatment with tunicamycin and paeonol also decreased the expression of COX-2. **Conclusion** Paeonol increases HepG2 cells to ER stress – induced apoptosis by down-regulating COX-2 expression.

Key words hepatocellular carcinoma; endoplasmic reticulum stress; cyclooxygenase-2; apoptosis; paeonol