

本文引用:郝兰香,潘超,唐志腾,等.核因子- κ B对肝癌细胞多药耐药性的影响[J].新乡医学院学报,2020,37(10):916-920. DOI:10.7683/xyxyxb.2020.10.004.

【基础研究】

核因子- κ B对肝癌细胞多药耐药性的影响

郝兰香,潘超,唐志腾,廖洪锋

(厦门大学附属中山医院病理科,福建 厦门 361004)

摘要: **目的** 检测核因子- κ B(NF- κ B)在肝癌亲本株细胞及其耐药株细胞中的表达,探讨NF- κ B对肝癌细胞多药耐药性的影响及其作用机制。**方法** 取对数生长期人肝癌亲本株细胞(Bel-7402和SMMC-7721),使用 $5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 阿霉素(ADM)反复间歇冲击诱导,建立人肝癌细胞耐药株细胞(Bel-7402/ADM和SMMC-7721/ADM)。将对数生长期Bel-7402、SMMC-7721、Bel-7402/ADM和SMMC-7721/ADM细胞分别随机分为阴性对照组和ADM、紫杉醇(PTX)、5-氟尿嘧啶(5-Fu)、长春新碱(VCR)、顺铂(CDDP)加药组,每组设15个复孔。加药组分别加入 $30\text{ }\mu\text{L}$ 各浓度梯度的化学治疗药物ADM($0.004, 0.040, 0.400, 4.000, 40.000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、PTX($0.045, 0.450, 4.500, 45.000, 450.000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、5-Fu($0.500, 5.000, 50.000, 500.000, 5\,000.000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、VCR($0.005, 0.050, 0.500, 5.000, 50.000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、CDDP($0.025, 0.250, 2.500, 25.000, 250.000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)处理,各浓度设3个复孔。阴性对照组加入等体积的磷酸盐缓冲溶液。同时设无细胞的空白组,只加入细胞培养基。另将对数生长期的耐药株细胞Bel-7402/ADM和SMMC-7721/ADM分别随机分为ADM组、VCR组、CDDP组、ADM+吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(PDTC)组、VCR+PDTC组、CDDP+PDTC组。ADM组、VCR组、CDDP组细胞分别加入 $30\text{ }\mu\text{L}$ 各浓度梯度的ADM、VCR、CDDP。ADM+PDTC组、VCR+PDTC组、CDDP+PDTC组细胞先加 $50\text{ }\mu\text{L}$ PDTC($10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)预处理1h,再加入 $30\text{ }\mu\text{L}$ 各浓度梯度的ADM、VCR、CDDP。药物处理48h后,采用腺苷三磷酸生物发光法检测各组细胞对化学治疗药物的半数抑制浓度。采用链霉菌亲和素-过氧化物酶连结免疫细胞化学染色法检测NF- κ B在肿瘤细胞Bel-7402、SMMC-7721、Bel-7402/ADM和SMMC-7721/ADM的表达位置及表达量。提取Bel-7402、SMMC-7721、Bel-7402/ADM和SMMC-7721/ADM细胞蛋白,采用酶联免疫吸附试验检测NF- κ B p65蛋白表达量。**结果** Bel-7402/ADM和SMMC-7721/ADM细胞对ADM的耐药指数分别为 21.2 ± 1.4 、 16.2 ± 1.0 ,符合中度耐药。Bel-7402/ADM和SMMC-7721/ADM细胞对PTX、5-Fu、VCR、CDDP均产生不同程度的耐药。ADM、PTX、5-Fu、VCR、CDDP加药组Bel-7402/ADM和SMMC-7721/ADM细胞的耐药指数均明显高于其亲本株细胞($P < 0.05$)。ADM+PDTC组、VCR+PDTC组、CDDP+PDTC组Bel-7402/ADM和SMMC-7721/ADM细胞半数抑制浓度均显著低于相应ADM组、VCR组、CDDP组($P < 0.05$)。NF- κ B在Bel-7402、SMMC-7721、Bel-7402/ADM和SMMC-7721/ADM细胞的细胞质和细胞核中均有表达,其中亲本株细胞以细胞质表达为主,而耐药株细胞以细胞核表达为主,且Bel-7402/ADM和SMMC-7721/ADM细胞中NF- κ B表达量均显著高于其亲本株细胞($P < 0.05$)。Bel-7402/ADM和SMMC-7721/ADM细胞中NF- κ B p65蛋白表达量显著高于亲本株细胞($P < 0.05$)。**结论** NF- κ B对肝癌细胞多药耐药起促进作用,PDTC可在一定程度减少肝癌细胞的多药耐药性,NF- κ B是调控肝癌细胞多药耐药的重要靶点。

关键词: 核因子- κ B;肝癌;多药耐药性

中图分类号: R735.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2020)10-0916-05

Effect of nuclear factor- κ B on multidrug resistance of hepatocellular carcinoma cells

HAO Lanxiang, PAN Chao, TANG Zhiteng, LIAO Hongfeng

(Department of Pathology, Xiamen University Affiliated Zhong Shan Hospital, Xiamen 361004, Fujian Province, China)

Abstract: **Objective** To detect the content of nuclear factor- κ B (NF- κ B) in hepatocarcinoma parental cells and their drug-resistant cells, in order to explore the effect and mechanism of NF- κ B on multidrug resistance of hepatocellular carcinoma cells. **Methods** Parental strains of human hepatocarcinoma cells Bel-7402 and SMMC-7721 in logarithmic growth phase were induced with adriamycin (ADM) at a final concentration of $5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ to establish drug-resistant human hepatocarcinoma cell lines Bel-7402/ADM and SMMC-7721/ADM. The Bel-7402, SMMC-7721, Bel-7402/ADM and SMMC-7721/ADM cells in the logarithmic growth phase were randomly divided into the negative control group and ADM, paclitaxel (PTX), 5-fluorouracil (5-Fu), vincristine (VCR) and cisplatin (CDDP) dosing groups, with 15 multiple holes in each group. The cells in the dosing

DOI:10.7683/xyxyxb.2020.10.004

收稿日期:2019-09-18

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(编号:2015J01539)。

作者简介:郝兰香(1978-),女,山东德州人,硕士,副主任医师,研究方向:肿瘤细胞信号转导及肿瘤耐药性研究。

通信作者:潘超(1963-),男,江苏徐州人,博士,主任医师,研究方向:肿瘤细胞信号转导及肿瘤耐药性研究;E-mail:panchao@xmu.edu.cn。

group were added with 30 μL of the chemotherapeutic drugs of each concentration gradient ADM (0.004,0.040,0.400,4.000,40.000 mg · L⁻¹), PTX (0.045,0.450,4.500,45.000,450.000 mg · L⁻¹), 5-Fu (0.500,5.000,50.000,500.000,5 000.000 mg · L⁻¹), VCR (0.005,0.050,0.500,5.000,50.000 mg · L⁻¹), CDDP (0.025,0.250,2.500,25.000,250.000 mg · L⁻¹), 3 replicate holes for each concentration. An equal volume of phosphate buffer solution was added to the cells in the negative control group. At the same time, the blank control group without cells was set up, and only cell culture medium was added. The resistant cells Bel-7402/ADM and SMMC-7721/ADM in logarithmic growth phase were randomly divided into ADM group, VCR group, CDDP group, ADM + pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) group, VCR + PDTC group, and CDDP + PDTC group. Cells in the ADM group, VCR group, and CDDP group were added with 30 μL of ADM, VCR, and CDDP in each concentration gradient. Cells in the ADM + PDTC group, VCR + PDTC group, and CDDP + PDTC group were pretreated with 50 μL PDTC (10 μmol · L⁻¹) for 1 h, and then 30 μL of ADM, VCR, and CDDP of various concentration gradients were added. After 48 hours of drug treatment, adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence method was used to detect the half inhibitory concentration of chemotherapeutic drugs in each group. Streptavidin-peroxidase link immunocytochemical staining method was used to detect the expression position and expression level of NF-κB in tumor cells Bel-7402, SMMC-7721, Bel-7402/ADM and SMMC-7721/ADM. The Bel-7402, SMMC-7721, Bel-7402/ADM and SMMC-7721/ADM cell proteins were extracted, and the enzyme linked immunosorbent assay was used to detect the expression of NF-κB p65 protein. **Results** The resistance indexes of Bel-7402/ADM and SMMC-7721/ADM cells to ADM were 21.2 ± 1.4 and 16.2 ± 1.0, respectively, which was consistent with moderate resistance. Bel-7402/ADM and SMMC-7721/ADM cells were resistant to PTX, 5-Fu, VCR, and CDDP to varying degrees. The drug resistance indexes of Bel-7402/ADM and SMMC-7721/ADM cells in the ADM, PTX, 5-Fu, VCR, and CDDP dosing groups were significantly higher than those of their parental cell lines ($P < 0.05$). The half inhibitory concentrations of Bel-7402/ADM and SMMC-7721/ADM cells in the ADM + PDTC group, VCR + PDTC group, and CDDP + PDTC group were significantly lower than those in the corresponding ADM, VCR, and CDDP groups ($P < 0.05$). NF-κB was expressed in the cytoplasm and nucleus of Bel-7402, SMMC-7721, Bel-7402/ADM and SMMC-7721/ADM cells. The parental strain was mainly expressed in the cytoplasm, while the drug-resistant strain was expressed in the nucleus. The expression of NF-κB in Bel-7402/ADM and SMMC-7721/ADM cells was significantly higher than that of their parent cell lines ($P < 0.05$). The concentration of NF-κB p65 protein in Bel-7402/ADM and SMMC-7721/ADM cells was significantly higher than that of the parental strain ($P < 0.05$). **Conclusion** NF-κB promotes multidrug resistance of hepatocellular carcinoma cells. PDTC can reduce the multidrug resistance of hepatocellular carcinoma cells to a certain extent. NF-κB is an important target for regulating multidrug resistance of hepatocellular carcinoma cells.

Key words: nuclear factor-κB; hepatocellular carcinoma; multidrug resistance

肝癌是临床常见的恶性肿瘤,就诊时多为进展期,多需综合治疗。化学治疗作为肝癌综合治疗的方法之一,疗效不佳,其中多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 是导致疗效不佳的重要原因^[1]。明确肝癌 MDR 的发生机制,逆转肿瘤耐药,是目前亟待解决的问题。核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 是人体重要的核转录调控元件,是由 2 种 Rel 家族蛋白构成的二聚体,其中 p65/p50 二聚体是 NF-κB 重要的存在形式。静息状态下 NF-κB 与 NF-κB 的抑制性蛋白 kappa B (inhibitor-kappa B, IκB) 结合,以无活性的 NF-κB/IκB 复合物形式存在于细胞质中。当细胞受到激活物刺激后, NF-κB 转入细胞核活化,参与体内基因转录调控。NF-κB 特异性抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸酯 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC) 能够通过抑制 NF-κB p65 亚单位的表达或抑制 IκB 的降解,减少 NF-κB 核转位,起到抑制 NF-κB 活化的作用。文献报道 NF-κB 蛋白激活与胰腺癌、胃癌、结肠癌等多种肿瘤 MDR 相关,提示 NF-κB 参与肿瘤 MDR 调控^[2-4]。本研究旨在研究 NF-κB 激活在肝癌细胞 MDR 中的意义,

为进一步揭示肝癌细胞的 MDR 调控机制及临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器 肝癌细胞株 Bel-7402 和 SMMC-7721 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; RPMI-1640 细胞培养液购自美国 Hyclone 公司,阿霉素 (adriamycin, ADM)、长春新碱 (vincristine, VCR) 购自浙江海正药业有限公司,紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 购自上海华谊制药厂,5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-Fu) 购自上海旭东海普药业有限公司,顺铂 (cisplatin, CDDP) 购自南京制药有限公司,PDTC 购自美国 Sigma 公司,腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 细胞活力检测试剂盒购自美国 Biovision 公司,兔抗 NF-κB p65 抗体购自美国 Invitrogen 公司, NF-κB p65 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自美国 Active Motif 公司; GloMax[®]-Multi 多功能检测仪购自美国 Promega 公司,全自动酶标读数仪购自美国 Bio Tek 公司。

1.2 细胞培养与耐药细胞株诱导 肝癌亲本株细胞 Bel-7402 和 SMMC-7721 培养于 RPMI-1640 完全培养液(含体积分数 10% 胎牛血清、 $100\text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素、 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素)中,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 培养箱中培养。取对数生长期 Bel-7402 和 SMMC-7721 细胞分别接种于 250 mL 细胞培养瓶,待细胞密度达到 70% ~ 80% 时,加入 $5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ADM,作用 2 h 后弃去培养基,收集细胞并接种于新培养瓶。待细胞恢复活力且细胞密度达到 70% ~ 80% 时重复上述步骤,如此反复冲击诱导,诱导过程中观察细胞生长状态,共冲击筛选 6 次,将获得的耐药细胞株细胞分别命名为 Bel-7402/ADM 和 SMMC-7721/ADM。

1.3 细胞分组 耐药株细胞 Bel-7402/ADM 和 SMMC-7721/ADM 脱药培养 2 周,收集对数生长期的 Bel-7402、SMMC-7721、Bel-7402/ADM 和 SMMC-7721/ADM 细胞,调整活细胞密度为 $1 \times 10^8\text{ L}^{-1}$,按每孔 2×10^4 个细胞接种于 96 孔荧光酶标板。将细胞分为阴性对照组和 ADM、PTX、5-Fu、VCR、CDDP 加药组,每组设 15 个复孔。待细胞长满孔底后,加药组分别加入 $30\text{ }\mu\text{L}$ 各浓度梯度的化学治疗药物 ADM(0.004 、 0.040 、 0.400 、 4.000 、 $40.000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、PTX(0.045 、 0.450 、 4.500 、 45.000 、 $450.000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、5-Fu(0.500 、 5.000 、 50.000 、 500.000 、 $5\,000.000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、VCR(0.005 、 0.050 、 0.500 、 5.000 、 $50.000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、CDDP(0.025 、 0.250 、 2.500 、 25.000 、 $250.000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),各孔总体积为 $230\text{ }\mu\text{L}$,每个浓度设 3 个复孔。阴性对照组加入等体积的磷酸盐缓冲溶液。同时设无细胞的空白组,只加入细胞培养基。另收集脱药培养 2 周的对数生长期耐药株细胞 Bel-7402/ADM 和 SMMC-7721/ADM,调整活细胞密度为 $1 \times 10^8\text{ L}^{-1}$,按每孔 2×10^4 个细胞接种于 96 孔荧光酶标板。分为 ADM 组、VCR 组、CDDP 组、ADM + PDTC 组、VCR + PDTC 组、CDDP + PDTC 组。ADM 组、VCR 组、CDDP 组细胞分别加入 $30\text{ }\mu\text{L}$ 上述各浓度梯度的 ADM、VCR、CDDP。ADM + PDTC 组、VCR + PDTC 组、CDDP + PDTC 组细胞先加 $50\text{ }\mu\text{L}$ PDTC ($10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预处理 1 h,再加入 $30\text{ }\mu\text{L}$ 各浓度梯度的 ADM、VCR、CDDP。各孔总体积为 $230\text{ }\mu\text{L}$,每个浓度设 3 个复孔。同时设阴性对照组,加入等体积的磷酸盐缓冲溶液。无细胞的空白组只加入细胞培养基。

1.4 ATP 生物发光法检测细胞对化学治疗药物的敏感性 将 ATP 细胞活力检测试剂盒提供的 ATP 标准品倍比稀释,用 GloMax[®]-Multi 多功能检测仪检测波长 490 nm 处各孔吸光度值,用双对数夹心法绘制 ATP 标准曲线。各组细胞培养 48 h 后换液(新加入无药培养液体积调整至 $200\text{ }\mu\text{L}$),加入核酸释放剂,室温振荡 5 min,加入 $1\text{ }\mu\text{L}$ ATP 酶,室温静置 1 min 后用多功能检测仪检测各组吸光度值,将

吸光度值代入 ATP 标准曲线计算 ATP 值。细胞生长抑制率 = $[1 - (\text{加药组 ATP 值} - \text{空白组 ATP 值}) / (\text{阴性对照组 ATP 值} - \text{空白组 ATP 值})] \times 100\%$,实验重复 4 次。绘制浓度-生长抑制率曲线,用线性拟合法求得半数抑制浓度(half inhibition concentration, IC_{50})值,耐药指数(resistance index, RI) = 耐药株细胞 IC_{50} / 亲本株细胞 IC_{50} 。RI < 5 为低度耐药,5 ~ 25 为中度耐药, > 25 为高度耐药^[5]。

1.5 链霉菌亲和素-过氧化物酶连结(streptavidin-peroxidase link, SP)免疫细胞化学染色法检测肿瘤细胞中 NF- κ B 的表达位置和表达量 将 Bel-7402、SMMC-7721、Bel-7402/ADM 和 SMMC-7721/ADM 细胞分别接种于 6 孔板,制作细胞爬片,每种细胞制作 12 个细胞爬片。按照 SP 免疫细胞化学试剂盒说明书进行免疫细胞化学染色,光学显微镜下观察 NF- κ B 蛋白表达位置,并统计 NF- κ B 在各组细胞核中的表达量。细胞核染色强度:无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。随机观察 5 个高倍视野(10×40),每个视野计数 100 个肿瘤细胞,将各个视野中细胞核中阳性细胞数的平均百分比作为该细胞爬片的阳性百分比,阳性百分比: < 5% 为 0 分,5% ~ 25% 为 1 分,26% ~ 50% 为 2 分, > 50% 为 3 分。采用半定量计算方法将上述 2 项结果相加得到每张细胞爬片中 NF- κ B 在肿瘤细胞核表达量的得分,每组细胞的得分为 12 个细胞爬片的平均值。

1.6 ELISA 法检测肿瘤细胞中 NF- κ B p65 蛋白表达量 提取 Bel-7402、SMMC-7721、Bel-7402/ADM 和 SMMC-7721/ADM 的细胞核蛋白,将 4 株细胞的核蛋白抽提物分别加入预先包被有能与 NF- κ B p65 蛋白结合的寡核苷酸双链探针的 96 孔板,每株细胞设 3 个复孔。细胞中的 NF- κ B p65 蛋白与 96 孔板上寡核苷酸链探针特异性的结合, NF- κ B p65 单抗识别与靶 DNA 连接的活化转录因子,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗和显色试剂,最后将 96 孔板置于全自动酶标读数仪内读取波长 450 nm 处吸光度,以吸光度值大小表示被测样品中 NF- κ B p65 蛋白表达量。具体操作按照 ELISA 试剂盒说明书进行,实验重复 4 次。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,2 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌细胞对化学治疗药物的 IC_{50} 及 RI 结果 见表 1。各加药组耐药株细胞 Bel-7402/ADM 和 SMMC-7721/ADM 细胞对 ADM、PTX、5-Fu、VCR、CDDP 的 IC_{50} 值均显著高于其亲本株细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 不同化学治疗药物对人肝癌亲本株细胞和耐药株细胞的 IC₅₀ 和 RI

Tab.1 IC₅₀ and RI of different chemotherapeutic drugs on the parent cell line and drug-resistant cell line of human liver cancer

组别	n	Bel-7402			SMMC-7721		
		亲本株 IC ₅₀	耐药株 IC ₅₀	RI	亲本株 IC ₅₀	耐药株 IC ₅₀	RI
ADM 加药组	4	4.8 ± 0.5	107.2 ± 3.6 ^a	21.2 ± 1.4	2.3 ± 0.2	39.1 ± 1.3 ^a	16.2 ± 1.0
PTX 加药组	4	3.8 ± 0.2	10.2 ± 0.5 ^a	2.7 ± 0.0	1.8 ± 0.2	4.9 ± 0.3 ^a	2.7 ± 0.1
5-Fu 加药组	4	52.4 ± 4.5	805.5 ± 6.0 ^a	15.4 ± 0.2	44.5 ± 4.5	350.5 ± 3.0 ^a	8.8 ± 0.9
VCR 加药组	4	2.0 ± 0.2	37.5 ± 2.2 ^a	18.8 ± 0.2	0.2 ± 0.0	3.8 ± 0.2 ^a	19.0 ± 0.0
CDDP 加药组	4	1.8 ± 0.1	26.5 ± 2.0 ^a	14.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1	11.9 ± 1.0 ^a	13.2 ± 0.2

注:与相应亲本株比较^a*P* < 0.05。

2.2 PDTC 处理后耐药株细胞对化学治疗药物敏感性的变化 结果见表 2。ADM + PDTC 组、VCR + PDTC 组、CDDP + PDTC 组 Bel-7402/ADM 和 SMMC-7721/ADM 细胞的 IC₅₀ 值均显著低于 ADM 组、VCR 组和 CDDP 组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

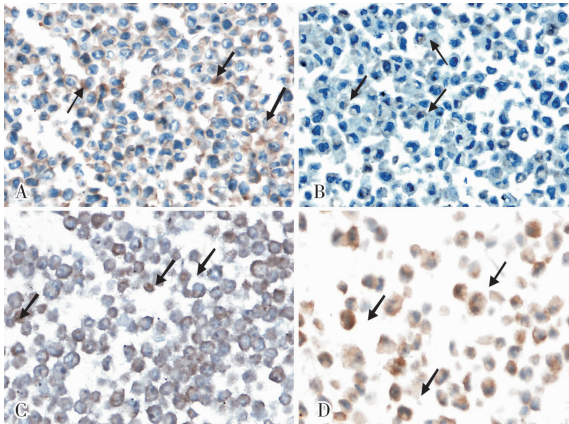
表 2 PDTC 处理组与未处理组耐药株细胞 IC₅₀ 的比较

Tab.2 Comparison of IC₅₀ in drug-resistant cells between PDTC treated group and untreated group

组别	n	IC ₅₀	
		Bel-7402/ADM	SMMC-7721/ADM
ADM 组	n	107.2 ± 3.6	39.1 ± 1.3
PDTC + ADM 组	3	24.1 ± 1.2 ^a	6.2 ± 0.4 ^a
VCR 组	3	37.5 ± 2.2	3.8 ± 0.2
VCR + PDTC 组	3	5.1 ± 0.5 ^b	0.6 ± 0.1 ^b
CDDP 组	3	26.5 ± 2.0	11.9 ± 1.0
CDDP + PDTC 组	3	4.8 ± 0.4 ^c	0.9 ± 0.3 ^c

注:与 ADM 组比较^a*P* < 0.05;与 VCR 组比较^b*P* < 0.05;与 CDDP 组比较^c*P* < 0.05。

2.3 NF-κB 在各肿瘤细胞株中的表达 结果见图 1 和表 3。NF-κB 在 Bel-7402、SMMC-7721、Bel-7402/ADM 和 SMMC-7721/ADM 细胞的细胞质和细胞核中均有表达,其中亲本株细胞以细胞质表达为主,而耐药株细胞以细胞核表达为主。Bel-7402/ADM 和 SMMC-7721/ADM 细胞中 NF-κB 表达量均显著高于其亲本株细胞,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。



A: Bel-7402 细胞; B: SMMC-7721 细胞; C: Bel-7402/ADM 细胞; D: SMMC-7721/ADM 细胞;箭头示阳性表达细胞。

图 1 NF-κB 在肝癌细胞中的表达 (SP, × 400)

Fig.1 Expression of NF-κB in hepatocellular carcinoma cells (SP, × 400)

表 3 人肝癌细胞核中 NF-κB 表达量

Tab.3 Expression of NF-κB in human hepatocellular carcinoma cell nucleus

细胞株	n	NF-κB
Bel-7402	12	1.750 ± 0.965
Bel-7402/ADM	12	3.917 ± 1.165 ^a
SMMC-7721	12	1.083 ± 0.997
SMMC-7721/ADM	12	4.083 ± 1.311 ^b

注:与 Bel-7402 细胞株比较^a*P* < 0.05;与 SMMC-7721 细胞株比较^b*P* < 0.05。

2.4 NF-κB p65 蛋白在亲本株细胞和耐药株细胞中的表达量 结果见表 4。Bel-7402/ADM 和 SMMC-7721/ADM 细胞中 NF-κB p65 蛋白表达均较其亲本株细胞高,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。

表 4 人肝癌亲本株细胞与其耐药株细胞中 NF-κB p65 蛋白比较

Tab.4 Comparison of the expression of NF-κB p65 protein between hepatocellular carcinoma parental cells and their drug-resistant cells

细胞株	n	NF-κB p65 蛋白
Bel-7402	4	1.039 ± 0.553
Bel-7402/ADM	4	1.838 ± 0.793 ^a
SMMC-7721	4	1.303 ± 0.574
SMMC-7721/ADM	4	2.551 ± 0.449 ^b

注:与 Bel-7402 细胞株比较^a*P* < 0.05;与 SMMC-7721 细胞株比较^b*P* < 0.05。

3 讨论

体外诱导建立耐药细胞模型是研究肿瘤耐药的重要方法。最常用的诱导细胞耐药方法有 2 种,即小剂量浓度递增法^[6]和高浓度药物间歇冲击法^[7]。其中高浓度药物间歇冲击诱导过程与临床周期性化学治疗用药相似,故本研究采用大剂量 ADM 间歇冲击诱导,成功建立了 2 株人肝癌耐药细胞模型 Bel-7402/ADM 和 SMMC-7721/ADM,为肝癌 MDR 机制的研究奠定基础,继而又进一步研究了 NF-κB 对肝癌细胞 MDR 的影响。本研究结果显示,2 株耐药株细胞中 NF-κB 蛋白在肿瘤细胞核的表达水平均较其亲本株细胞高,耐药株细胞 NF-κB p65 蛋白水平显著增强,这与 UM 等^[8]在鼠乳腺癌细胞的研究结果一致,提示 NF-κB 与肿瘤 MDR 密切相关。应用 NF-κB 特异性抑制剂 PDTC 抑制 NF-κB 活化,能够逆转肝癌细胞 MDR,表明 NF-κB 对肝癌细胞 MDR 起促进作用。

NF- κ B 是体内广泛存在的一种重要核转录因子,静止期以 p65/p50 蛋白二聚体形式与其特异性抑制蛋白 I κ B 结合形成非活化状态的多聚体存在于细胞质中,当细胞受到各种因素如病毒或细菌感染、化学治疗药物、射线照射等刺激后,I κ B 的 N 端调节区 Ser32/36 磷酸化,I κ B 与 p65/p50 解聚,活化的 p65 和 p50 进入细胞核,与细胞核内某些基因启动子/增强子中的特异性序列 (GGGACTTTCC) 结合,调控靶基因转录。本研究结果显示,肝癌耐药株细胞较其亲本株 NF- κ B 核转位增加,激活增多,肿瘤细胞不仅对诱导药物 ADM 产生了耐药性,同时对多种化学治疗药物 (PTX、5-Fu、VCR、CDDP) 交叉耐药,表现出 MDR。提示化学治疗药物刺激肝癌细胞使 NF- κ B 异常激活,进一步调控下游耐药相关靶基因转录,可能是 NF- κ B 促进肝癌细胞 MDR 形成的途径。

文献报道,NF- κ B 激活能够促进多药耐药蛋白 1 (multidrug resistance gene 1, MDR1) 的转录^[9]。姚敏等^[10]发现,利用 RNA 干扰技术干预肝癌细胞 NF- κ B 的转录,能够调控下游 MDR1 基因编码的 mRNA 下调 P-糖蛋白的表达。提示 NF- κ B 激活,促进 MDR1 转录,上调 MDR1 编码的跨膜转运蛋白 P-糖蛋白的表达,促进肿瘤细胞外排细胞质内的化学治疗药物,降低细胞内药物浓度,从而抵抗化学治疗,这可能是 NF- κ B 促进肝癌细胞 MDR 形成的一个重要下游分子机制。有文献报道,NF- κ B 能够促进抗凋亡基因 TRAF、Bcl-xL、IAPs 的表达,抑制细胞凋亡^[11-12]。NF- κ B 促进 IAPs 基因表达,可抑制凋亡信号途径中的半胱氨酸蛋白水解酶-8 活性,导致肿瘤细胞对凋亡耐受;NF- κ B 促进 Bcl-xL 基因表达,可抑制线粒体释放细胞色素 C 阻断半胱氨酸蛋白水解酶-3 的激活,抑制其诱导的细胞凋亡。抑制 NF- κ B 活化,可促进胰腺癌、口腔癌、白血病等多种肿瘤细胞凋亡^[13-15]。提示 NF- κ B 激活后通过细胞信号通路调控抗凋亡基因表达,抵抗化学治疗药物诱导的细胞凋亡,可能是 NF- κ B 促进肝癌细胞 MDR 形成的另一个重要的下游分子机制。肝癌细胞 MDR 的具体调控过程有待进一步研究。总之,NF- κ B 的激活促进肿瘤细胞 MDR,而抑制 NF- κ B 的活化将有助于提高肿瘤细胞对化学治疗药物的敏感性。

本研究结果显示,PDTC 通过抑制耐药株细胞 Bel-7402/ADM 和 SMMC-7721/ADM 中的 NF- κ B 活化,使耐药株细胞对多种化学治疗药物 (ADM、VCR 和 CDDP) 的敏感性明显增强,可有效逆转肝癌细胞 MDR。因此,NF- κ B 对逆转肝癌细胞 MDR 具有潜在临床价值。

参考文献:

- [1] WANG L, HAN H, LIU Y, *et al.* Cystathionine β -synthase induces multidrug resistance and metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. *Curr Mol Med*, 2018, 18(7): 496-506.
- [2] MÜERKÖSTER S, ARLT A, WITT M, *et al.* Usage of the NF- κ B inhibitor sulfasalazine as sensitizing agent in combinend chemotherapy of pancreatic cancer [J]. *Int J Cancer*, 2003, 104(4): 469-476.
- [3] CAMP E R, LI J, MINNICH D J, *et al.* Inducible nuclear factor- κ B activation contributes to chemotherapy resistance in gastric cancer [J]. *J Am Coll Surg*, 2004, 199(2): 249-258.
- [4] BENTIRE-ALJ M, BARBU V, FILLET M, *et al.* NF- κ B transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells [J]. *Oncogene*, 2003, 22: 90-97.
- [5] SNOW K, JUDD W. Characterisation of adriamycin-and amsacrine-resistant human leukaemic T cell lines. [J]. *Br J Cancer*, 1991, 63(1): 17-28.
- [6] 戢太阳, 刘娇, 王燕秋, 等. 人鼻咽癌多药耐药细胞株 CNE2/ADM 的建立及生物学特性研究 [J]. 成都医学院学报, 2016, 11(2): 155-159.
- [7] 张丹, 王红阳, 黄艳, 等. PTEN 及 mTOR 在人肺腺癌培美曲塞耐药株 A549/PEM 中的表达 [J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(3): 343-346.
- [8] UM J H, KANG C D, LEE B G, *et al.* Increased and correlated nuclear factor-kappa B and Ku autoantigen activities are associated with development of multidrug resistance [J]. *Oncogene*, 2001, 20: 6048-6056.
- [9] REQUENEZ-CONTRERAS J L, LOPEZ-CASTILLEJOS E S, HERNANDEZ-FLORES R, *et al.* MiR-138 indirectly regulates the MDR1 promoter by NF- κ B/p65 silencing [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484(3): 648-655.
- [10] 姚敏, 顾星, 王理, 等. 肝癌患者核因子- κ B 异常表达及转录干预对多药耐药的逆转效果 [J]. 中华医学杂志, 2016, 96(10): 761-766.
- [11] BARROSO-GONZALEZ J, AUCLAIR S, LUAN S, *et al.* PACS-2 mediates the ATM and NF- κ B-dependent induction of anti-apoptotic Bcl-xL in response to DNA damage [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(9): 1448-1457.
- [12] ABHARI B A, MCCARTHY N, AGOSTINIS P, *et al.* NF- κ B contributes to Smac mimetic-conferred protection from tunicamycin-induced apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2019, 24(3-4): 269-277.
- [13] HOLCOMB B, YIP-SCHNEIDER M, SCHMIDT C M. The role of nuclear factor kappa B in pancreatic cancer and the clinical applications of targeted therapy [J]. *Pancreas*, 2008, 36(3): 225-235.
- [14] 王婕, 张妙, 李改艳, 等. Salubrinol 抑制射线诱导 NF- κ B 活化增加口腔癌细胞凋亡 [J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2020, 29(2): 111-114.
- [15] CHEN C C, LIU T Y, HUANG S P, *et al.* Differentiation and apoptosis induction by lovastatin and γ -tocotrienol in HL-60 cells via Ras/ERK/NF- κ B and Ras/Akt/NF- κ B signaling dependent down-regulation of glyoxalase 1 and HMG-CoA reductase [J]. *Cellular Signal*, 2015, 27(11): 2182-2190.

(本文编辑:郭 潇)