

NF- κ B 沉默抑制鼻咽癌 5-8F 细胞增殖

潘红杰¹, 范才文¹, 易世江², 李璐¹, 刘建翔¹, 王建红¹, 罗琴¹, 向秋¹

摘要 目的 探讨核因子- κ B (NF- κ B) 沉默对鼻咽癌 5-8F 细胞的增殖抑制作用。方法 构建 NF- κ B p65 沉默重组质粒表达载体 pGenesil-1.2-NF- κ B 和阴性对照重组质粒载体 pGenesil-1.2-HK, 应用转染试剂将重组质粒表达载体转染人鼻咽癌 5-8F 细胞, 采用 Western blot 法检测 NF- κ B p65 的表达, 采用 MTT 及流式细胞仪分析细胞增殖和细胞周期。结果 NF- κ B p65 沉默抑制鼻咽癌 5-8F 细胞增殖, 抑制率为 (58.43 ± 1.24)%, 与对照组细胞抑制率 (0) 和阴性对照组细胞抑制率 (17.89 ± 4.13)% 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。NF- κ B 沉默组 S 期细胞为 (42.27 ± 0.39)%, 与空白对照组 (30.83 ± 1.36)% 和阴性对照组 (34.88 ± 0.85)% 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 NF- κ B p65 沉默抑制鼻咽癌 5-8F 细胞增殖, 其可能是通过 S 期细胞阻滞起作用。

关键词 NF- κ B; 鼻咽癌; siRNA

中图分类号 R 739.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)01-0016-04

核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是 Rel/NF- κ B 家族中的重要转录调节因子。烟草、饮食和环境等多种因素能激活 NF- κ B^[1]。研究^[2]显示, 在淋巴瘤、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌及卵巢癌等组织中均发现活化的 NF- κ B。沈斌等^[3]研究发现, 鼻咽癌中 NF- κ B p65 高表达与淋巴结转移、临床分期和不良预后有关。何晓松等^[4]发现表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin-3-gallate, EGCG) 下调 NF- κ B p65 表达后, 鼻咽癌移植瘤对放疗的敏感性增强。抑制 NF- κ B 活性, 阻止肿瘤细胞增殖, 诱导其凋亡。该研究选取 NF- κ B 基因作为研究靶点, 探讨 NF- κ B p65 基因沉默对鼻咽癌 5-8F 细胞生物学行为的影响, 为 NF- κ B 在鼻咽癌中的作用和功能研

究提供基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 鼻咽癌 5-8F 细胞系和大肠杆菌 JM109 均由桂林医学院科学实验中心保种; 质粒表达载体 pGenesil-1.2 购自武汉浙玛生物技术有限公司; 高纯度质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; 新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 1640 培养基购自 Gibco 公司; 转染试剂 Efectene Transfection Reagent 购自 Qiagen 公司; DM-SO、MTT 购自美国 Sigma 公司; 鼠抗人 NF- κ B p65 一抗购自 Bioworld 公司; 小鼠抗人 GAPDH 一抗、辣根过氧化物酶山羊抗小鼠 IgG 二抗和 BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; PVDF 膜购自 Millipore 公司; ECL 发光液购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 NF- κ B 特异性 SiRNA 质粒表达载体的构建

根据 GenBank 中人 NF- κ B p65 的表达序列, 设计、合成 2 条 NF- κ B 特异性干扰序列, 构建 NF- κ B 特异性沉默重组质粒表达载体 (pGenesil-1.2-NF- κ B), 正义链: 5'-ATGGACAGCACATGCGCTGACTGATAGC-CTGCCGGAAAGAGTGATCTC-3'; 反义链: 5'-CCC AAGCTTAAAAAGCAGGCTATCAGTCAGCCGATGGA CAGCACAT-3'。正义链: 5'-AATCTCTTGAATTT ACGTTTCTCCTCAATCCGGGTGTTTCGTCCTTTC-3'; 反义链: 5'-GCGGATCCAAAAACGGATTGAGGAGA AACGTAATCTCTTGAATT-3'。

同时设计 1 条阴性对照序列 (HK) 构建阴性对照重组质粒表达载体 (pGenesil-1.2-HK), 该序列与人的基因序列无同源性。正义链: 5'-CCTCGACT-TCATAAGGCGCATGCTTCAAGACGGCATGCCCTTA TGAAGTCTTTTTTTC-3', 反义链: 5'-AGCTCAAAA AAGACTTCATAAGGCGCATGCCGTCTTGAAGCATGC GCCTTATGAAGTC-3' 将合成的干扰序列正义链和反义链退火, 合成双链 DNA 干扰片段, 将干扰 DNA 片段亚克隆到 pGenesil-1.2 质粒表达载体上, 构建重组 NF- κ B p65 特异性抑制的质粒表达载体 pGenesil-1.2-NF- κ B 和重组阴性表达质粒载体 pGenesil-1.2-HK。

2014-09-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81260344); 广西研究生教育创新项目 (编号: YCSZ2012110); 广西高等学校优秀人才资助计划项目; 广西自然科学基金 (编号: 2013GXNSFAA019228); 桂林市科学研究与技术开发计划项目 (编号: 20130120-19)

作者单位: ¹ 桂林医学院病理学与病理生理学教研室 桂林 541004

² 桂林医学院附属医院耳鼻喉头颈外科, 桂林 541001

作者简介: 潘红杰, 女, 硕士研究生;

向秋, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: guilin996@163.com

1.3 实验分组及细胞转染

1.3.1 实验分组 实验设空白对照组(未转染载体的5-8F细胞)、阴性对照组(转入pGenesil-1.2-HK质粒表达载体的5-8F细胞)、实验组(转入pGenesil-1.2-NF- κ B质粒表达载体的5-8F细胞)。

1.3.2 细胞转染 人鼻咽癌5-8F细胞采用RPMI 1640培养液(含10%小牛血清,100 U/ml青霉素,100 μ g/ml链霉素)培养,0.25%胰酶消化细胞,将细胞接种于6孔板,接种密度为 5×10^4 /ml,每孔2 ml。细胞融合达60%~80%时,应用Effectene Transfection Reagent转染试剂将构建好的pGenesil-1.2-NF- κ B和pGenesil-1.2-HK重组质粒表达载体转入鼻咽癌5-8F细胞,重组质粒终浓度为0.25 μ g/ml,然后于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。由于pGenesil-1.2载体表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP),转染48 h后,于倒置荧光显微镜下观察细胞转染效果。

1.4 Western blot 法检测 NF- κ B p65 表达 细胞转染48 h后,去上清液,细胞用适量通用蛋白裂解液裂解,置冰上15 min,收集细胞裂解液,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心30 min,收集上清液。采用BCA法测定总蛋白浓度。蛋白上样后,采用100 V进行10% SDS-PAGE电泳分离,恒流260 mA,湿转1.5 h,将蛋白转移到PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭1 h,加入NF- κ B p65一抗(1:500),70 r/min,2 h;用TBST洗4次,每次8 min,加入辣根过氧化物酶山羊抗小鼠IgG二抗,70 r/min,1.5 h,TBST洗4次,每次8 min,采用ECL发光试剂进行发光,然后进行图

像分析。同样操作检测GAPDH表达。

1.5 MTT 法检测细胞增殖 0.25%胰酶消化细胞,调整细胞密度至 2.5×10^4 /ml,接种于96孔板,每孔接种5 000个。每组设3个复孔,细胞转染48 h后,每孔加入MTT(5 mg/ml)20 μ l,继续培养4 h。然后吸去上清液,每孔加入200 μ l DMSO,振荡10~15 min使结晶充分溶解,用酶标仪(490 nm波长)测定各孔的吸光度值(OD值)。计算细胞生长抑制率(IR) = [1 - (实验组OD值/对照组OD值)] \times 100%。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期 细胞转染48 h后,PBS洗涤细胞3次,0.25%胰蛋白酶消化,收集细胞,1 000 r/min离心5 min,PBS洗涤2次,加70%预冷的乙醇溶液,-20 $^{\circ}$ C固定过夜,1 000 r/min离心10 min,弃去乙醇,PBS洗涤2次,加入400 μ l RNase A 37 $^{\circ}$ C水浴30 min,加入PI染液,避光染色30 min,200~300目筛网过滤,采用流式细胞仪检测细胞周期。

1.7 统计学处理 实验数据采用SPSS 13.0统计软件进行分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 示。多组间均数比较采用(One-Way ANOVA)完全随机的单因素方差分析。

2 结果

2.1 重组表达质粒载体转染细胞判别 重组pGenesil-1.2-HK、pGenesil-1.2-NF- κ B质粒表达载体带有GFP,转入细胞后,在倒置荧光显微镜下观察呈现绿色荧光。见图1。

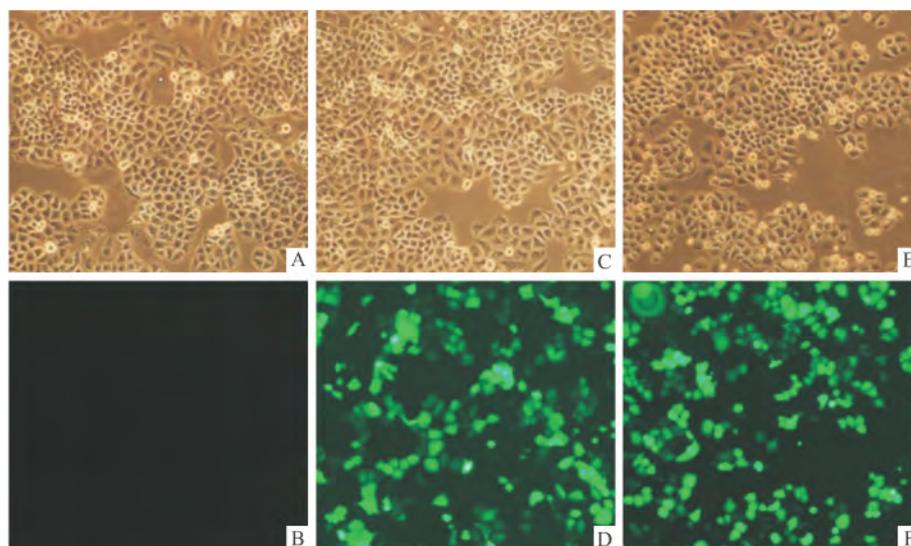


图1 显微镜下观察5-8F细胞转染效果 $\times 100$

A: 普通光源显微镜观察空白对照组; B: 倒置荧光显微镜下观察空白对照组; C: 普通光源显微镜观察阴性对照组; D: 倒置荧光显微镜下观察阴性对照组; E: 普通光源显微镜观察实验组; F: 倒置荧光显微镜下观察实验组

2.2 pGenesil-1.2-NF-κB 转染抑制 5-8F 细胞 NF-κB p65 表达 pGenesil-1.2-NF-κB 转染鼻咽癌 5-8F 细胞 ,NF-κB p65 蛋白表达抑制 ,与对照组和阴性对照组比较 ,蛋白表达抑制明显。见图 2。

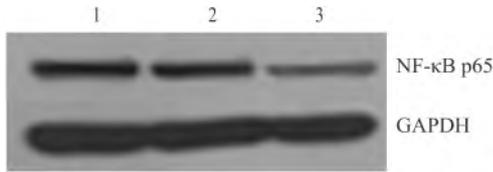


图 2 Western blot 检测 5-8F 细胞 NF-κB p65 表达

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 实验组

2.3 NF-κB 沉默对 5-8F 细胞增殖的影响 NF-κB 沉默抑制 5-8F 细胞增殖 ,抑制率为 (58.43 ± 1.24) % ,与空白对照组抑制率(0) 和阴性对照组抑制率(17.89 ± 4.13) % 比较 ,差异有统计学意义 ($F = 1971.46$, $P < 0.05$) 。

2.4 NF-κB 沉默对 5-8F 细胞周期的影响 NF-κB 沉默 ,5-8F 细胞呈现 S 期阻滞 ,S 期细胞为(42.27 ± 0.39) % 与对照组(30.83 ± 1.36) % 和阴性对照组(34.88 ± 0.85) % 比较 ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ,见表 1、图 3。

表 1 流式细胞仪分析细胞周期(48 h) (% $n = 3$ $\bar{x} \pm s$)

组别	G1 期	F 值	G2 期	F 值	S 期	F 值
空白对照	59.37 ± 1.30		9.80 ± 0.63		30.83 ± 1.36	
阴性对照	56.13 ± 1.30	33.83	9.00 ± 0.46	39.34	34.88 ± 0.85	110.97
实验	52.14 ± 0.36		5.59 ± 0.73		42.27 ± 0.39*	

与阴性对照组、空白对照组比较: * $P < 0.05$

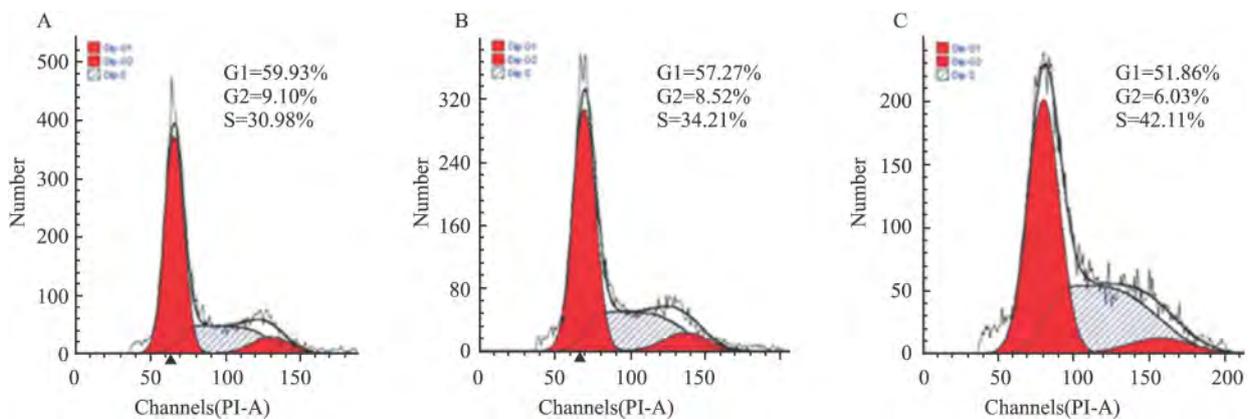


图 3 流式细胞仪分析细胞周期(48 h)

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 实验组

3 讨论

鼻咽癌是一种好发于鼻咽黏膜的恶性肿瘤。由于鼻咽癌发病十分隐匿 ,早期症状和体征不明显 ,缺乏有效的早期诊断方法 ,绝大多数病例在就诊时已属中晚期 ,治疗效果仍不佳 ,IV 期鼻咽癌患者 5 年生存率为 30% ~ 50% [5]。深入研究鼻咽癌发病的分子机制 ,寻找新的治疗方法是提高鼻咽癌整体疗效的关键。siRNA 技术是将一段与目的基因同源的双链 RNA(double-stranded RNA ,dsRNA) 导入细胞 ,使 mRNA 发生特异性的降解 ,从而实现序列特异性沉默[6]。方法简单易行、快速、有效、序列特异性强等优点 ,并且导入多种 dsRNA 可以同时敲除多个基因 ,细胞转染后几天就可观察到靶向基因沉默后的生物学现象。该研究所用的 pGenesil-1.2 载体带有 GFP ,在倒置荧光显微镜下 ,通过观察细胞绿色荧光蛋白表达情况 ,并分析细胞的转染效率 ,5-8F 细胞转染效率为 70% ~ 80%。

NF-κB 作为一类核转录因子 ,多以 P50/ p65 二聚体的形式存在 [7]。当细胞在非刺激状态下 ,NF-κB 与它的抑制物 IκB 结合 ,并以一种静息的形式存在于细胞质 ,当细胞受到损伤等刺激后 ,IκB 降解 ,活化的 NF-κB 释放并转移至细胞核 ,调节靶基因的转录[8]。许多癌症患者的癌组织中均发现活化的 NF-κB ,如白血病、淋巴瘤、前列腺癌、乳腺癌、肝癌等[9]。资料显示 ,在肿瘤发展的后期阶段 ,使用 IκB 的超级抑制物进行诱导 ,抑制 NF-κB 的活化 ,导致转化的肝细胞发生细胞凋亡 ,进而阻滞肝细胞癌的

进展^[10]。该研究通过构建 NF- κ B p65 沉默重组质粒表达载体 pGenesil-1.2-NF- κ B, 观察其转染鼻咽癌细胞后的生物学作用。Western blot 检测表明: pGenesil-1.2-NF- κ B 质粒表达载体转染抑制 5-8F 细胞 NF- κ B p65 表达, 与空白对照组和阴性对照组比较, NF- κ B p65 蛋白表达明显下降。说明 NF- κ B p65 siRNA 能抑制 5-8F 中 NF- κ B p65 蛋白的表达。干扰表达载体转染细胞 48 h, 实验组细胞增殖抑制率为 (58.43 \pm 1.24)%, 明显高于空白对照组抑制率 (0) 和阴性对照组抑制率 (17.89 \pm 4.13) %。NF- κ B 质粒表达干扰载体转染, 抑制 5-8F 细胞增殖, 呈现 S 期阻滞。作者构建的 NF- κ B 特异性干扰质粒表达载体能沉默 NF- κ B 基因, 抑制细胞增殖, 为鼻咽癌的靶向治疗提供了实验基础。

参考文献

- [1] Gupta S C, Sundaram C, Reuter S, et al. Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 29(3): 775-87.
- [2] Kannappan R, Gupta S C, Kim J H, et al. Tocotrienols fight cancer by targeting multiple cell signaling pathways [J]. *Genes Nutr*, 2011, 7(1): 43-52.
- [3] 沈斌, 董频, 英信江, 等. ABCG2 和 NF- κ B p65 在鼻咽癌中的表达及其意义 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2012, 17(5): 424-7.
- [4] 何晓松, 易世江, 凌月福, 等. 实 EGCG 抑制 NF- κ B 的表达增强鼻咽癌裸鼠移植瘤对放疗的敏感性 [J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(16): 2905-7.
- [5] 苏胜发. 鼻咽癌治疗进展 [J]. *肿瘤预防与治疗*, 2010, 23(1): 66-70.
- [6] 侯程浩, 陶蓉, 史立宏, 等. 稳定表达 siRNA-NUAK1 基因 95D 细胞系的建立 [J]. *青岛医药卫生*, 2012, 44(1): 1-4.
- [7] Gupta S C, Sundaram C, Reuter S, et al. Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799(10): 775-87.
- [8] Garg A, Aggarwal B B. Nuclear transcription factor- κ B as a target for cancer drug development [J]. *Leukemia*, 2002, 16(6): 1053-68.
- [9] Aggarwal B B, Gehlot P. Inflammation and cancer: How friendly is the relationship for cancer patients? [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9(4): 351-69.
- [10] Tergaonkar V, Pando M, Vafa O, et al. p53 stabilization is decreased upon NF- κ B activation: a role for NF- κ B in acquisition of resistance to chemotherapy [J]. *Cancer Cell*, 2002, 1(5): 493-503.

NF- κ B silencing inhibits the proliferation of nasopharyngeal carcinoma 5-8F cell

Pan Hongjie¹, Fan Caiwen¹, Yi Shijiang², et al

(¹Dept of Pathology and Pathophysiology, Guilin Medical College, Guilin 541004; ²Dept of Otorhinolaryngology, The Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001)

Abstract Objective To evaluate the inhibition effects of nuclear factor- κ B (NF- κ B) silencing in the nasopharyngeal carcinoma 5-8F cells. **Methods** Constructing the NF- κ B siRNA expression vector pGenesil-1.2-NF- κ B and empty pGenesil-1.2-HK, and then they were transfected into nasopharyngeal carcinoma 5-8F cells. Western blot was used to detect expression of NF- κ B p65 protein. MTT and flow cytometry were used to evaluate the proliferation inhibition and the cell cycle arrest in 5-8F cells respectively. **Results** NF- κ B p65 silencing could inhibit the proliferation of nasopharyngeal carcinoma 5-8F cells and the inhibition rate was (58.43 \pm 1.24) % 0% in the control group and (17.89 \pm 4.13) % in the empty vector control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The cell number of S phase was (42.27 \pm 0.39) % in NF- κ B silencing group, (30.83 \pm 1.36) % in the control group and (34.88 \pm 0.85) % in the empty vector control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The NF- κ B p65 knockdown decrease cell proliferation in nasopharyngeal carcinoma 5-8F cells, maybe due to cell cycle arresting in S phase.

Key words nuclear factor- κ B; nasopharyngeal cancer; siRNA