

基础研究

干扰Nrf2可增强Hirsutanols A对肿瘤细胞增殖的抑制作用

马建国¹,李厚金²,邓蓉¹,冯公侃¹,朱孝峰¹¹中山大学肿瘤防治中心,华南肿瘤学国家重点实验室,广东 广州 510060;²中山大学化学与化学工程学院有机化学研究所,广东 广州 510275

摘要:目的 探讨干扰Nrf2对Hirsutanols A抑制人结肠癌细胞SW480、肝癌细胞HepG2细胞增殖的影响。方法 采用四甲基偶氮唑蓝比色法检测不同浓度Hirsutanols A对细胞增殖抑制作用。流式细胞仪检测细胞内ROS的含量;Annexin V-FITC/PI双染检测细胞凋亡;Western blot检测siRNA干扰NRF2蛋白表达的效果。结果 Hirsutanols A(1.25、2.5、5、10、20和40 μmol/L)对SW480、HepG2细胞增殖有明显的抑制作用,并呈现剂量依赖关系;Hirsutanols A处理SW480(15 μmol/L)、HepG2(30 μmol/L)细胞后,诱导细胞中过氧化氢迅速增加,并引起细胞凋亡,用自由基清除剂N-乙酰半胱氨酸(5 mmol/L)预处理完全抑制Hirsutanols A诱导的ROS增加及细胞凋亡。siRNA有效地干扰Nrf2表达后可极大增强Hirsutanols A对肿瘤细胞的增殖抑制作用。结论 Hirsutanols A通过增加细胞内ROS诱导其凋亡同时激活Nrf2,Nrf2在维持细胞氧化还原稳态中起重要作用,干扰其表达可增强Hirsutanols A的凋亡诱导作用。

关键词:Nrf2;Hirsutanols A;活性氧;凋亡

中图分类号:R73 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)08-1093-05

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.08.05 http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1627.R.20120716.1056.015.html

Small interfering RNA-mediated Nrf2 gene knockdown enhances hirsutanols A-induced cytotoxicity in cancer cells

MA Jianguo¹, LI Houjin², DENG Rong¹, FENG Gongkan¹, ZHU Xiaofeng¹¹State Key Laboratory of Oncology in South China, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; ²Institute of Organic Chemistry, School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Nrf2 gene knockdown on hirsutanols A-induced cytotoxicity in cancer cells. **Methods** The changes in the cell viability following treatment with different concentrations of hirsutanols A was detected by MTT assay, and the generation of reactive oxygen species (ROS) was assayed using flow cytometry. AnnexinV-FITC apoptosis kit was used to detect the cell apoptosis. Nrf2 protein expression in HepG2 and SW480 cells transfected with the siRNA targeting Nrf2 was analyzed with Western blotting. **Results** At the concentrations of 1.25, 2.5, 5, 10, 20 and 40 μmol/L, hirsutanols A obviously inhibited the cell proliferation of human liver cancer HepG2 and colon cancer SW480 cells in a concentration-dependent manner. The levels of hydrogen peroxide increased rapidly after hirsutanols A treatment in both HepG2 (30 μmol/L) and SW480 (15 μmol/L) cells. Hirsutanols A also induced apoptosis of the two cells. Pretreatment with 5 mmol/L NAC totally inhibited apoptosis and ROS accumulation in the two cells induced by hirsutanols A. Transfection of HepG2 and SW480 cells with the siRNA caused a significant reduction in Nrf2 protein expression, which resulted in an increased sensitivity of the cells to hirsutanols A. **Conclusion** Hirsutanols A can induce apoptosis in HepG2 and SW480 cells by promoting ROS production and up-regulating Nrf2 expression. Nrf2 knockdown by siRNA can increase the sensitivity of the cancer cells to hirsutanols A *in vitro*.

Key words: Nrf2; hirsutanols A; reactive oxygen species; apoptosis

Nrf2是细胞内氧化还原状态的感受器,在参与抗氧化应激中起重要作用。与正常细胞相比,体内和体外的肿瘤细胞有更高水平的内源性ROS,例如从慢性淋巴细胞白血病或毛细胞性白血病病人中分离的白血病细胞与正常的淋巴细胞相比有更高的ROS^[1-2]。在实体肿瘤中,研究显示肿瘤标本中氧化性损伤标志如氧化性

DNA碱基8OHdG、脂质过氧化物等都有很高的水平^[3-4],而且ROS清除酶如SOD、GPX等在肿瘤细胞及肿瘤组织中都显示很大改变。这些都表明肿瘤细胞中存在氧化还原状态的异常调节。由于肿瘤细胞多存在ROS水平较高而抗氧化能力较低的现象^[5],此可通过提高肿瘤细胞ROS水平实现选择性杀伤肿瘤细胞。Hirsutanols A能通过诱导细胞产生ROS引起自身凋亡^[6-7]。鉴于Nrf2^[8]在清除ROS以及细胞耐药的重要地位^[9],我们通过瞬时干扰的方法研究干扰Nrf2是否能增强Hirsutanols A对肿瘤细胞的毒性作用。

收稿日期:2012-06-19

基金项目:国家自然科学基金(81001446)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81001446).

作者简介:马建国,在读硕士研究生,E-mail: promjg@163.com

通讯作者:朱孝峰,教授,博士生导师,Email: zhuxfeng@mail.sysu.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试剂 RPMI 1640培养基购自 Invitrogen 公司;胎牛血清购自 Hyclone 公司。

Hirsutanols A(中山大学化学与化学工程学院有机化学研究所提供);其他试剂二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑盐(MTT)、NAC购自 Sigma公司;细胞裂解液购自 Upstage 生物技术公司;BCA蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司;化学发光剂购自 Cell Signal 公司;Annexin V-FITC 凋亡试剂盒购自 Calbiochem 公司;Nrf2 抗体购自 nuvus 公司;HRP 标记的二抗均为 Santa Cruz 公司产品;2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) Trizol 购自 Invitrogen 公司 siNrf2 序列^[4](正向)5'-GCUUUUGGCGCAGACAUUCtt-3';(反向)5'-GAAUGUCUGCGCCAAAAGCtg-3'购自吉玛公司。

1.1.2 细胞株与细胞培养 人结肠癌细胞 SW480、肝癌细胞 HepG2 由本实验室保存提供,用含体积分数为 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养于 37 °C、5% CO₂ 条件下恒温恒湿培养箱中培养,选取对数生长期细胞进行实验。

1.1.3 实验仪器 CO₂细胞培养箱,德国 Heraeus 公司;紫外分光光度计(Beckman DU640)、流式细胞仪(Beckman-Coulter FC500),Beckman 公司产品等。

1.2 方 法

1.2.1 MTT 实验 将干扰 Nrf2、处于对数生长期的 SW480 和 HepG2 细胞用胰酶消化种于 96 孔板,每孔 195 μl,细胞总数 5×10³ 个。每组设五个复孔,贴壁过夜后加入不同浓度 Hirsutanols A 5 μl,使其终浓度分别为 5、10、20、40、80 μmol/L,对照组加入 5 μl 完全培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 72 h,每孔加入 5.0 g/L 的 MTT 20 μl,继续孵育 4 h 后,小心吸弃全部上清液,每孔加入 100 μl DMSO,振荡后,用酶标仪记录各孔的吸光度(D₅₇₀),细胞存活率%=处理组 OD/对照组 OD×100%,实验重复 3 次。

1.2.2 Annexin V -FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率 取对数生长期的 HepG2、SW480 细胞接种于 6 孔培养板,培养过夜后弃去原来培养基,药物作用不同时间后,用 0.25%胰酶消化细胞(不含 EDTA-Na),各组样本细胞用冷 PBS 洗涤二次并在染色缓冲液中以 1×10⁶ 细胞/ml 的浓度重悬。吸取 100 μl 的细胞(1×10⁵)至试管中,加入适量荧光标记的 Annexin-V 和 PI。按照说明书提示浓度操作。混匀后避光室温下孵育 15 min。孵育后加入 400 μl 染色缓冲液,立即上 FACS 流式细胞仪分析,实验重复 3 次。

1.2.3 Western blot 分析 取对数生长期的细胞,按试验要求处理后,收集细胞,PBS 洗涤 2 次,加入细胞裂解液

100 μl,14000 r/min 离心 10 min,定量蛋白,取 40 μg 蛋白加入上样缓冲液,95 °C 下变性 10 min。10%~1%的聚丙烯酰胺 SDS 凝胶电泳后转移至硝酸纤维膜上,5%脱脂牛奶封闭后依次加入第一、二抗体,室温下孵育 2 h,TBS-T 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, PH7.4, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween20)洗涤 3 次,10 min/次,加入化学发光剂,放入暗盒中并压片,2~5 min 后显影、定影。

1.2.4 siRNA 瞬时转染 细胞系 HepG2、SW480 在含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基(不含任何抗生素)中,37 °C 恒温培养。转染前 24 h 消化和计数,接种于 6 孔板,每孔细胞总数 1×10⁵~2×10⁵,待细胞达到 70%~80% 汇合进行转染;将 siRNA 稀释于 100 μl 无血清的基础培养基 opti-MEM 中,室温放置 5 min。取 2 μl Lipfectamin™2000 稀释于 100 μl 无血清的基础培养基 opti-MEM 中,室温放置 5 min;将稀释的 siRNA 溶液加入脂质体溶液中,轻缓混匀,室温放置 20 min;吸弃细胞培养物中的完全培养基,用基础培养基 opti-MEM 漂洗细胞 2 次,加入无血清基础培养基 opti-MEM 0.8 ml;将 siRNA-脂质体复合物加入细胞中,前后轻晃 6 孔板使混合液分散均匀。6 h 后吸弃转染复合物,换入含 10%胎牛血清的新鲜培养基。48 h 后,裂解细胞,收取蛋白。

1.2.5 过氧化氢水平检测 取对数生长期的细胞,稀释接种于 12 孔板中培养,细胞经过不同药物处理后,加入终浓度为 10 μmol/L DCFH-DA 于各组细胞中,避光孵育 30 min,收集细胞,PBS 洗涤 2 次后用流式细胞仪检测细胞中过氧化氢水平。

1.2.6 统计学分析 实验数据用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析,两样本间用独立样本 *t* 检验。

2 结 果

2.1 Hirsutanols A 对 HepG2、SW480 细胞增殖的影响

用不同浓度的 Hirsutanols A 处理 HepG2、SW480 细胞 72 h,MTT 法检测 Hirsutanols A 对细胞的增殖抑制率显示与对照组相比,Hirsutanols A 对 HepG2、SW480 细胞的增殖有明显的抑制作用,且呈剂量依赖性(*n*=3, *P*<0.05 或 *P*<0.01),差异有统计学意义。其 IC₅₀ 分别为 6.45、3.67 μmol/L(图 1)。

2.2 NAC 能逆转 hirsutanols A 引起的 HepG2、SW480 细胞内 ROS 升高

HepG2 细胞分成 4 组,对照、30 μmol/L hirsutanols A 处理 1 h、5 mmol/L NAC 处理 1 h、先用 5 mmol/L NAC 预处理 1 h 后再用 30 μmol/L Hirsutanols A 处理 1 h。加入 DCFDA-CM 后在流式细胞仪上检测细胞内过氧化氢的含量。SW480 细胞用终浓度 15 μmol/L hirsutanols A 处理,其余同 HepH2 细胞。流式结果显示 hirsutanols A 能引起两细胞产生大量 ROS,抗氧化剂

NAC能逆转 hirsutanols A 诱导的细胞内ROS积累(图2)。
 2.3 NAC 能够抑制 hirsutanol A 诱导 HepG2、SW480 细胞凋亡

HepG2、SW480 细胞分成 4 组,对照、30 $\mu\text{mol/L}$ hirsutanols A (SW480 采用 15 $\mu\text{mol/L}$ hirsutanols A) 处理 48 h、5 mmol/L $\mu\text{mol/L}$ NAC 处理 48 h 以及 5 mmol/L

NAC 预处理 1 h 后再用 30 $\mu\text{mol/L}$ hirsutanols A (SW480 采用 15 $\mu\text{mol/L}$ hirsutanols A) 处理 48 h 到时间。用 Annexin-V/PI 双染法流式检测 4 组的细胞凋亡,结果显示 hirsutanol A 可诱导两种细胞凋亡,且 NAC 能够抑制这一过程(图3)。

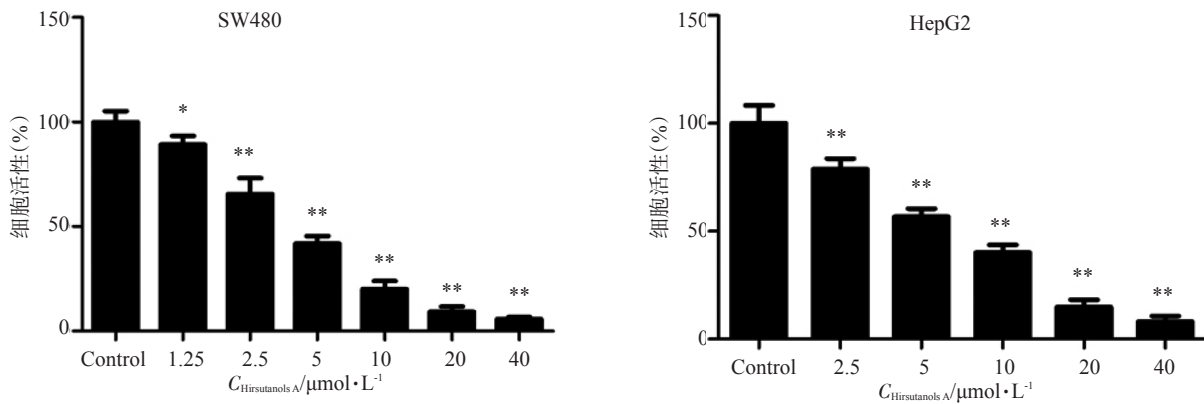


图1 Hirsutanols A 作用 72 h 对 HepG2、SW480 细胞增殖抑制的影响
 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig.1 Changes in the viability of HepG2 and SW480 cells after treatment with hirsutanols A ($n=3$).

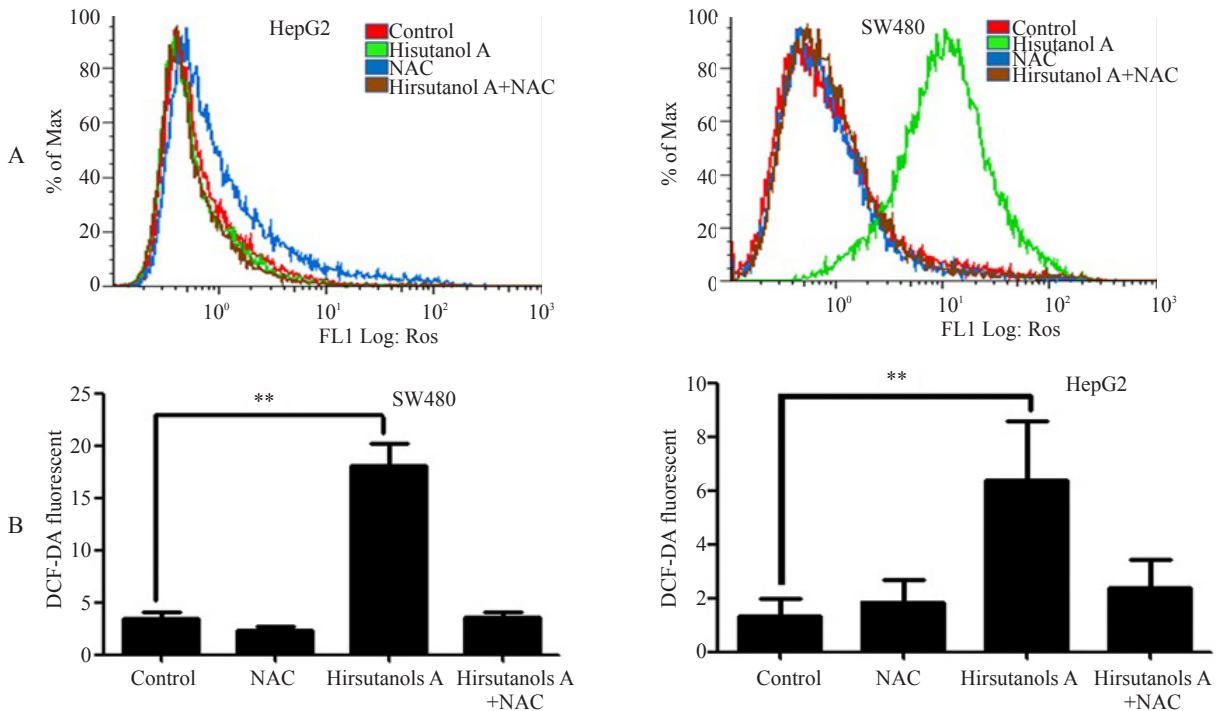


图2 Hirsutanols A 诱导 HepG2、SW480 产生 ROS 以及 NAC 逆转 Hirsutanols A 诱导的 ROS 在两细胞株中的积累

A: DCF-DA 检测自由基流式图; B: 各组平均荧光统计图($n=3$, 与对照组相比, ** $P < 0.01$)

Fig.2 Effect of NAC on hirsutanols A-induced ROS production in HepG2 and SW480 cells.

2.4 干扰 Nrf2 能增强 hirsutanols A 对 HepG2、SW480 的增殖抑制作用

Western Blot 检测表达针对 Nrf2 的 siRNA 转染明

显抑制 Nrf2 的蛋白表达, MTT 结果显示干扰 Nrf2 后, Hirsutanols A 对 HepG2、SW480 的增殖抑制作用明显增强(图4)。

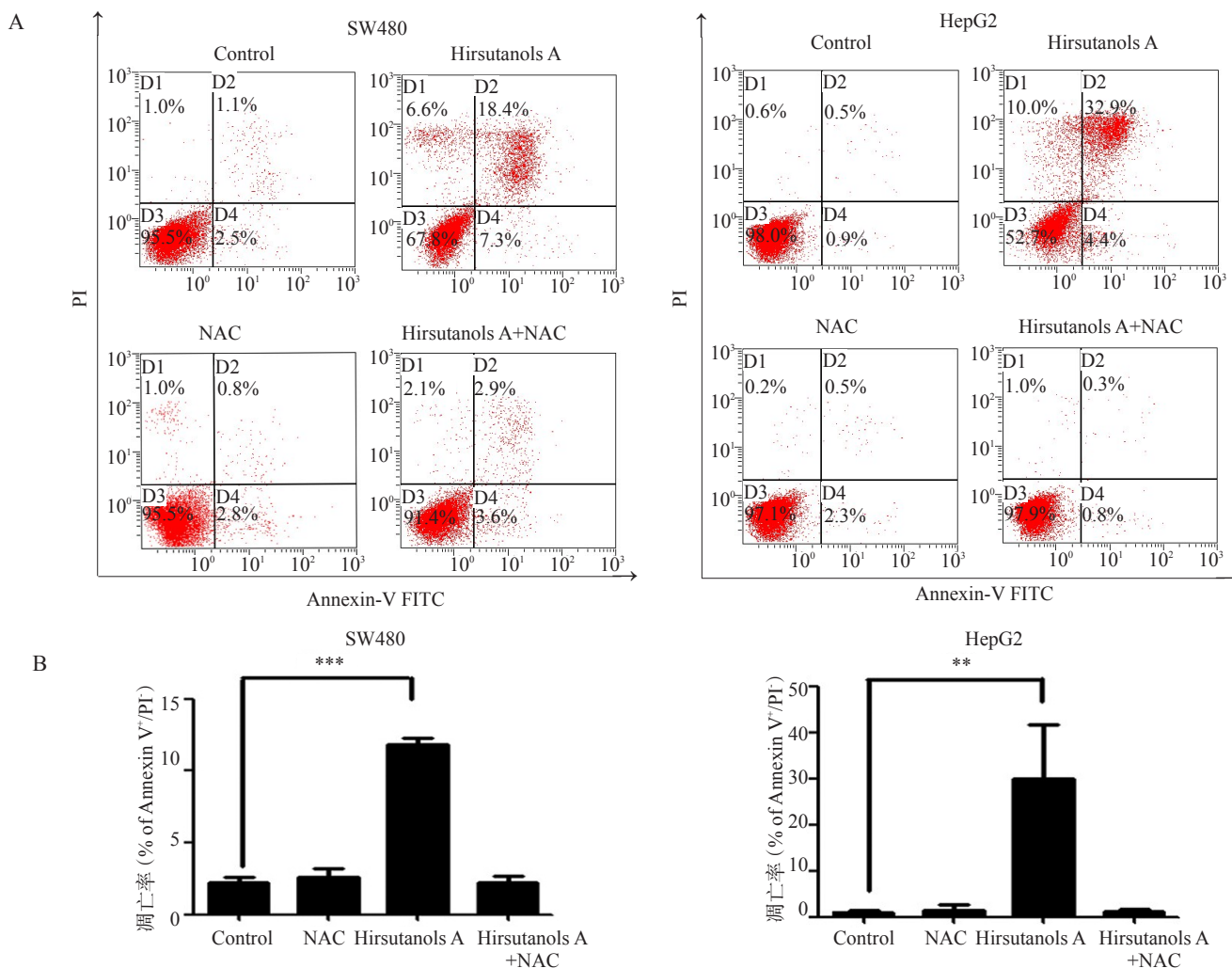


图3 Annexin V-FITC/PI双染后流式细胞术检测细胞凋亡
 A: 流式散点图; B: 凋亡细胞比率统计(n=3, 与对照组比较, **P<0.01, ***P<0.0001)
 Fig.3 Cell apoptosis detected by flow cytometry with Annexin V-FITC/PI staining.

3 讨论

越来越多的证据表明肿瘤细胞与同类型正常细胞相比表现出高氧化应激现象^[1-2]。在正常情况下,ROS对于细胞的生长是必需的,适当升高的ROS可以促进细胞的增殖、分化和侵袭^[10-11],虽然ROS在肿瘤形成和发展中可能有着重要的作用,但是由于肿瘤长期处于高ROS水平,细胞内氧化还原调控能力相对正常细胞弱,若用ROS诱导剂升高肿瘤细胞ROS水平,则肿瘤细胞不能及时清除而被选择性杀死。Hirsutanols A是从南海珊瑚 *Sarcophyton tortuosum* 的内生菌中分离的一个倍半萜类化合物,能诱导过氧化氢的产生从而杀死肿瘤细胞^[12]。本实验证明该化合物能诱导SW480、HepG2产生大量ROS,并杀死肿瘤细胞,NAC能逆转这一过程。

Nrf2/ARE是近年新发现的机体抵抗内外界氧化和化学等刺激的防御性转导通路。生理条件下,Nrf2在胞浆中与Keap1结合处于非活性、易降解的状态。在氧化应激和受外源性化学物质刺激时,Keap1的构象改变或者Nrf2直接被磷酸化,导致Nrf2与Keap1解离而活

化。活化的Nrf2进入细胞核,与抗氧化反应元件结合启动调控基因的转录,包括过氧化氢酶、谷胱甘肽-S-转移酶、环氧化物水解酶、磺基转移酶、乙醛基转移酶、醌氧化还原酶、血红素加氧酶、UGT葡萄糖转移酶、乙醛脱氢酶、谷氨酸半胱氨酸连接酶、谷胱甘肽合成酶等。这些蛋白参与有害物质代谢,降低ROS水平,保护细胞^[13-15]。本实验结果发现,Hirsutanols A能抑制人肝癌细胞HepG2、结肠癌细胞SW480增殖,并能诱导其凋亡。进一步研究发现Hirsutanols A能诱导两细胞株产生大量ROS。这一过程能被自由基清除剂NAC所抑制。细胞内氧化应激被Keap1和Nrf2复合物所感应,造成该复合物分离。分离后的Nrf2稳定性增加,并从胞浆转位到胞核,与药物代谢、清除ROS相关基因的启动子结合,增强其表达,从而降低细胞内ROS水平使细胞存活。我们通过干扰Nrf2的表达发现肿瘤细胞清除外来物质引起的ROS的能力降低,导致肿瘤细胞在低药物溶度下发生大量死亡。若能开发出Nrf2的抑制剂联合促进ROS产生药物既能降低药物用量从而降低副作用,

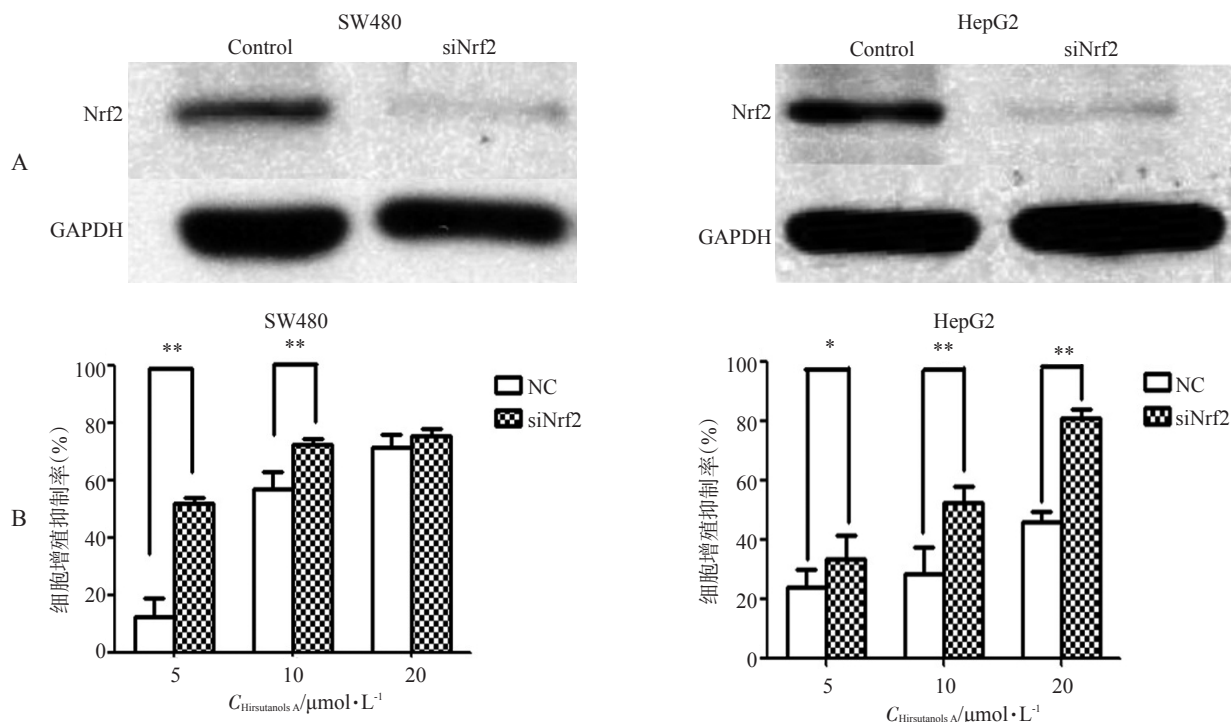


图4 干扰 Nrf2 增强 Hirsutanols A 对 HepG2、SW480 细胞的增殖抑制作用

A: Western-blot 检测 siRNA 干扰 HepG2、SW480 细胞株中 Nrf2 蛋白表达效果; B: 干扰 Nrf2 对 Hirsutanols A 抑制 HepG2 和 SW480 细胞增殖作用的影响; 与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig.4 Nrf2 knockdown enhances hirsutanols A-induced cytotoxic effect in HepG2 and SW480 cells.

又能靶向杀伤肿瘤细胞,是一种值得尝试的治疗方案。

参考文献:

- [1] Zhou Y, Hileman EO, Plunkett W, et al. Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents [J]. *Blood*, 2003, 101(10): 4098-104.
- [2] Kamiguti AS, Serrander L, Lin K, et al. Expression and activity of NOX5 in the circulating malignant B cells of hairy cell leukemia [J]. *J Immunol*, 2005, 175(12): 8424-30.
- [3] Martínez-Sánchez G, Giuliani A. Cellular redox status regulates hypoxia inducible factor-1 activity. Role in tumour development [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2007, 26(1): 39-50.
- [4] Patel BP, Rawal UM, Dave TK, et al. Lipid peroxidation, total antioxidant status, and total thiol levels predict overall survival in patients with oral squamous cell carcinoma [J]. *Integr Cancer Ther*, 2007, 6(4): 365-72.
- [5] Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach [J]? *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(7): 579-91.
- [6] 吴克伟, 杨芬, 刘俊龄, 等. Hirsutanols A 通过增加活性氧选择性诱导多西他赛耐药非小细胞肺癌细胞 PC14/TXT 凋亡 [J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(8): 1005-10.
- [7] Wang G, Abrell LM, Avelar A, et al. New hirsutane-based sesquiterpenes from salt water cultures of a marine sponge-derived fungus and terrestrial fungus *coriolus* [J]. *Tetrahedron*, 1998, 54(26): 7335-42.
- [8] Kim SK, Yang JW, Kim MR, et al. Increased expression of Nrf2/ARE-dependent anti-oxidant proteins in tamoxifen-resistant breast cancer cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45(4): 537-46.
- [9] 辛爱, 任环宇, 唐修文. 低表达 Nrf2 增敏奥沙利铂抗 H460 细胞增殖作用 [J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2010, 39(1): 11-6.
- [10] Kumar B, Koul S, Khandrika L, et al. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(6): 1777-85.
- [11] Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, et al. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis [J]. *Science*, 2008, 320(5876): 661-4.
- [12] Yang F, Gao YH, Wu KW, et al. A novel sesquiterpene Hirsutanol A induces autophagical cell death in human hepatocellular carcinoma cells by increasing reactive oxygen species [J]. *Chin J Cancer*, 2010, 29(7): 655-60.
- [13] Moinova HR, Mulcahy RT. Up-regulation of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene involves binding of Nrf-2 to an electrophile responsive element [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 261(3): 661-8.
- [14] Banning A, Deubel S, Kluth D, et al. The GI-GPx gene is a target for Nrf2 [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(12): 4914-23.
- [15] Kim YC, Masutani H, Yamaguchi Y, et al. Hemin-induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2. A differential regulation of the antioxidant responsive element by a switch of its binding factors [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(21): 18399-406.

(编辑:吴锦雅)