RNA 干扰 NF-κBp65 基因表达对胃癌细胞株 SGC-790 增殖、凋亡的影响

王桂臣，薛　鸣，高　阳
（北大医疗鲁中医院，山东 淄博 255400）

摘　要：［目的］探讨 RNA 干扰 NF-κBp65 基因表达对胃癌细胞株 SGC-790 增殖、凋亡的影响。［方法］培养 SGC-790 胃癌细胞株，分为阴性对照组、siRNA-NC 组、NF-κBp65-siRNA 转染组。检测不同组细胞增殖抑制率及凋亡率，采用 Western blot 检测 STAT3 信号通路相关蛋白表达水平。［结果］(1)MTT 检测发现，在 48h 及 72h 时，NF-κBp65-siRNA 组的细胞抑制率显著高于空白组与 siRNA-NC 组（P 均<0.05）。(2) 流式细胞术检测发现，48h 时，空白组、siRNA-NC 组、NF-κBp65-siRNA 组的细胞凋亡率分别为 5.85%±0.25%、6.13%±0.39%、16.05%±0.14%，NF-κBp65-siRNA 组的细胞凋亡率显著增加（P<0.001）。(3)Transwell 检测结果显示，空白组、siRNA-NC 组、NF-κBp65-siRNA 组穿过 Transwell 小室的细胞数量分别为 379.62±10.51、386.86±11.42、89.62±5.73，NF-κBp65-siRNA 组的穿膜细胞数量显著少于空白组与 siRNA-NC 组（P 均<0.001）。(4)Western-blot 检测显示，与空白组相比，NF-κBp65-siRNA 组中 p-STAT3、PCNA、MMP-2 蛋白的表达量均显著下降（P 均<0.05）。［结论］在 SGC-790 胃癌细胞株中，抑制 NF-κBp65 表达水平可能通过降低 STAT3 信号通路活性，抑制细胞增殖并促进凋亡。

主题词：胃肿瘤；NF-κBp65；细胞增殖；STAT3 信号通路
中图分类号：R735.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1671-170X(2020)08-0679-05
doi：10.11735/j.issn.1671-170X.2020.08.B004

RNA Interference of NF-κBp65 on Proliferation and Apoptosis of Gastric Cancer SGC-790 Cells

WANG Gui-cheng，XUE Ming，GAO Yang
(*PKU Care Luzhong Hospital*，*Zibo* 255400，*China*)

Abstract：［Objective］To investigate the effect of RNA interference of NF-κBp65 on proliferation and apoptosis of gastric cancer cell line SGC-790. ［Methods］SGC-790 gastric cancer cells were divided into control group，siRNA-NC group and NF-κBp65-siRNA group. Cell proliferation inhibition rate and apoptosis rate were determined with MTT assay and cytometry，respectively；cell migration was examined with Transwell test；and the expression of STAT3 signaling pathway related proteins were detected by Western blot. ［Results］MTT assay showed that the inhibition rate of SGC-790 cells in NF-κBp65-siRNA group was significantly higher than that in control group and siRNA NC group at 48 h and 72 h(all P<0.05). Flow cytometry showed that the apoptosis rate in NF-κBp65-siRNA group was significantly higher than those in control group and siRNA-NC group (16.05%±0.14% *vs* 5.85%±0.25% and 6.13%±0.39%，P<0.001). The Transwell test results showed that the number of passing cells in NF-κBp65-siRNA group was significantly less than that in control group and siRNA-NC group(89.62±5.73 *vs* 379.62±10.51 and 386.86±11.42，P<0.001). Compared with the control group，the expression of p-STAT3，PCNA and MMP-2 protein in NF-κBp65-siRNA group decreased significantly(all P<0.05). ［Conclusion］The knockdown of NF-κBp65 can inhibit cell proliferation and promote apoptosis in SGC-790 gastric cancer cells，which may be associated with down-regulation of STAT3 signaling pathway activity.

Subject words：gastric cancer；NF-κBp65；cell proliferation；STAT3 signaling pathway

胃癌是我国常见恶性肿瘤之一，我国现有胃癌患者人数约 80 万，每年新增胃癌患者约 40 万，死亡人数达 30 万[1]。在我国，随着社会经济的发展，人们的饮食习惯、生活习惯发生明显改变，胃癌的发病率也呈逐渐上升趋势[2-3]。胃癌的发生涉及多阶段、多

通信作者：王桂臣，主治医师，硕士；北大医疗鲁中医院肿瘤一科，山东省淄博市临淄区闻韶街道太公路 65 号（255400）；E-mail：fuzhitanq@163.com
收稿日期：2020-03-03；**修回日期：**2020-04-09

步骤、多种癌基因[4]。核因子 κB(NF-κB)蛋白最早由 David Baltimore 发现[5],该蛋白家族可以选择性的结合在 B 细胞 κ-轻链增强子上调控许多基因的表达[6]。近年来有研究发现,NF-κBp65 在结肠癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤中存在表达异常。本研究探讨 RNA 干扰 NF-κBp65 基因表达对胃癌细胞株 SGC-790 增殖、凋亡的影响及机制,以期为胃癌的防治提供更多信息。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

人正常胃上皮细胞 SGC-790 购于日本 Takara 公司，本实验室保存传代培养。STAT3 抗体、p-STAT3 抗体、PCNA 抗体、MMP-2 抗体购于美国瑞普斯生物科技有限公司。四甲基偶氮唑盐、二甲基亚砜购于碧云天生物技术研究所。NF-κBp65 小干扰 RNA(NF-κBp65 siRNA)、小干扰 RNA 阴性对照(siRNA-NC)均购于南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 细胞培养及转染

将胃癌细胞株 SGC-790 置于含 10%胎牛血清的完全培养基中进行培养,在 37℃、5% CO_2 孵箱中孵育,经胰酶数次消化传代后,取对数生长期细胞进行实验。接种于 24 孔板，当细胞汇合度达约 60%时,应用 Lipofectin TM 2000 进行转染,根据实验方案,分为:(1)未转染的空白对照组;(2)siRNA-NC组:阴性对照组;(3)NF-κBp65 siRNA 转染组。转染 4h 后在新培养基中继续培养。

1.3 MTT 检测

根据实验分组方案,分别更换空白对照组、siRNA-NC 组和 NF-κBp65-siRNA 转染组的细胞培养液，用含 10%胎小牛血清的培养液配成单细胞悬液,以每孔 1000 个细胞接种到 96 孔板,每孔体积 200μl。同时培养至 24h、48h、72h。培养结束后,于每孔细胞加入 20μl MTT 溶液,孵育 4h,检测 570nm 波长处的吸光度(A 值),记录结果,以时间为横坐标，吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.4 细胞侵袭能力检测

将细胞在含 2% FBS 的培养基中饥饿过夜，取 1ml 细胞接种于 Transwell 小室的上室,下室加入完全培养基，孵育 18h 后取出小室，乙醇固定、染色,计数穿膜细胞数量,取平均值,以迁移细胞的相对数目来表示肿瘤细胞迁移能力，实验设 3 个平行小室,重复实验 3 次。

1.5 Western blot 检测

收集各分组的实验细胞，应用 RIPA 裂解液裂解细胞样品并提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。混合上样缓冲液,煮沸变性,电泳、转膜、封闭、一抗二抗孵育、ECL 法显影定影。通过 Quantity One 软件分析条带强度,以 GAPDH 为内参,检测 p-STAT3、PCNA、MMP-2 蛋白表达。

1.6 流式细胞检测

细胞传代、消化后，转移至离心管，室温下，1000r/min,离心 10min,弃去上清。添加细胞培养液,调整细胞浓度约为 10^6/ml，分别加入 Buffer 200μl、Annexin V-FITC 10μl 及 PI 10μl，避光反应 15min。再次加入 Buffer 300μl,上机,流式细胞仪检测凋亡率,每组细胞重复检测 3 次,取平均值。

1.7 统计学处理

应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料采用均数±标准差表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 转染效率测定

NF-κBp65-siRNA 转入胃癌细胞株 SGC-790 后 48h,在荧光显微镜下观察,可见多数实验组细胞携带绿色荧光,细胞转染率约为 87%(Figure 1)。

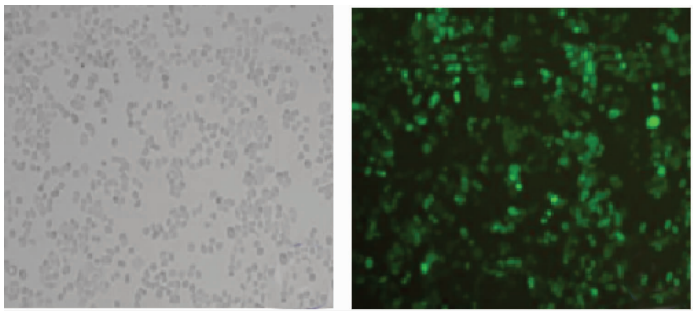

Image under ordinary optical microscope (×200)　Image under fluorescence microscope (×400)

Figure 1 Image of SGC-790 cells after transfection of NF-κBp65-siRNA for 48h

2.2 RT-PCR 及 Western-blot 检测 NF-κBp65 表达

RT-PCR 检测显示，空白组、siRNA-NC 组、NF-κBp65-siRNA 组的 NF-κBp65 mRNA 相对表达量分别为 0.97±0.23、0.95±0.22、0.24±0.09。空白组与 siRNA-NC 组 NF-κBp65 mRNA 相对表达量无明显差异(t=0.140,P=0.892),但均显著高于 NF-κBp65-siRNA 组(t=6.609,P<0.001;t=6.678,P<0.001)。Western-blot 检测发现,3 组细胞的 NF-κBp65 蛋白表达量分别为 0.852±0.087、0.841±0.0739、0.283±0.025,趋势与 RT-PCR 检测结果一致。表明 NF-κBp65 干扰基因成功转入 SGC-790 细胞,并发挥了沉默效应(Figure 2)。

2.3 细胞增殖抑制率比较

MTT 检测发现,siRNA-NC 组、NF-κBp65-siRNA 组在 24h 时细胞抑制率分别为 3.32%±0.23%、3.58%±0.30%,组间比较差异无统计学意义(t=1.538,P=0.163)。48h 时，生长抑制率分别为 1.84%±0.19%、18.92%±0.87%,差异有统计学意义(t=42.888,P<0.001)。72h 时分别为 2.03%±0.35%、49.8±8.23%,差异有统计学意义(t=65.023,P<0.001)。

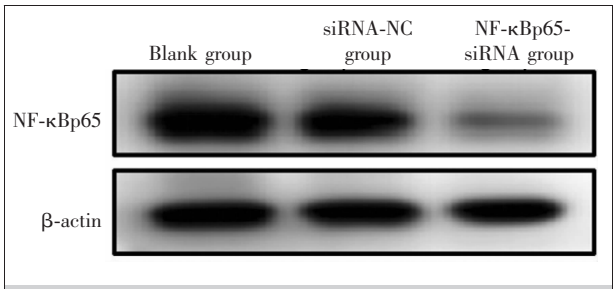

Figure 2 NF-κBp65 protein expression in each group detected by Western blot

2.4 细胞凋亡率比较

流式细胞检测发现,在 48h 时,空白组、siRNA-NC 组、NF-κBp65-siRNA 组的细胞凋亡率分别为 5.85%±0.25%、6.13%±0.39%、16.05%±0.14%,NF-κBp65-siRNA 组的细胞凋亡率显著高于空白组及 siRNA-NC 组 (t=79.600,P<0.001;t=53.532,P<0.001)(Figure 3)。

2.5 细胞体外侵袭能力比较

Transwell 检测结果显示，空白组、siRNA-NC 组、NF-κBp65-siRNA 组穿过 Transwell 小室的细胞数量分别为 379.62±10.51、386.86±11.42、89.62±5.73,NF-κBp65-siRNA 组的穿膜细胞数量显著少于空白组与 siRNA-NC 组 (t=54.171,P<0.001;t=52.019,P<0.001)(Figure 4)。

2.6 STAT3 信号通路相关蛋白表达

Western-blot 检测显示，与空白组相比,siRNA-NC 组的 p-STAT3、PCNA、MMP-2 蛋白表达量无明显变化,NF-κBp65-siRNA 组 p-STAT3、PCNA、MMP-2 蛋白的表达量显著下降(Figure 5)。

3 讨 论

NF-κB 由 p50、p52、REL-A、REL 和 REL-B 组成[7],这些蛋白质二聚化后形成有功能的 NF-κB[8]。大多数的细菌可以结合细胞膜表面的受体，从而激发 NF-κB 信号通路改变基因的表达，并可影响到各种不同的生物学过程,包括先天和适应性免疫、炎症、应激反应、B 细胞发育和淋巴器官形成[9]。

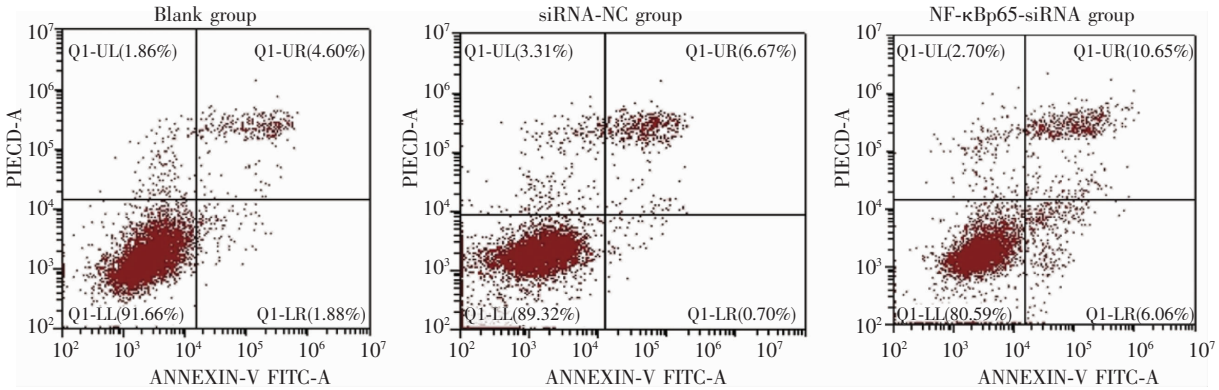

Figure 3 The apoptosis rate of each group detected by Flow cytometry

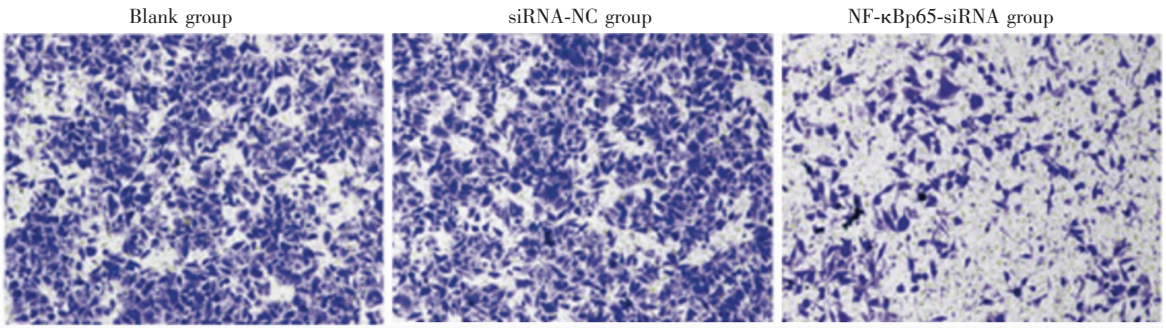

Figure 4 Number of transmembrane cells detected by Transwell experiment

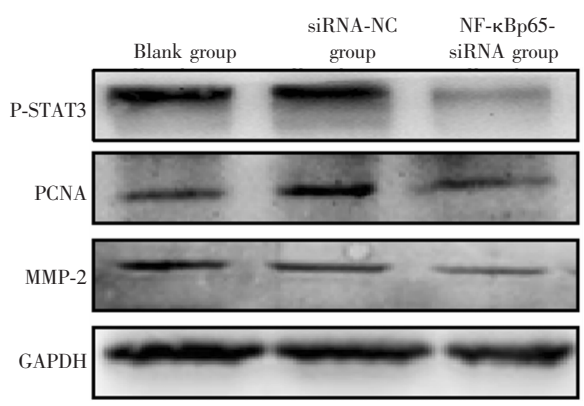

Figure 5 STAT3 signaling pathway related protein expression level in each group of cells

目前的研究认为,NF-κBp65 具有某些原癌基因的特征,可能参与了肿瘤的发生发展过程[10]。在本研究中,我们利用 RNA 干扰技术敲低了胃癌细胞株中 NF-κBp65 基因的表达，将胃癌细胞分为空白组、siRNA-NC 组及 NF-κBp65-siRNA 组。RNA 干扰是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA 诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象。RNA 干扰技术提供了一种经济、快捷、高效的抑制特异基因表达的技术手段，有助于研究该基因在生物模型系统中的作用,并逐步成为遗传性疾病、肿瘤疾病等基因治疗研究的一种手段[11-12]。干扰模型构建成功后,通过 MTT 检测发现，在 48h 及 72h 时,NF-κBp65-siRNA 组的细胞抑制率显著高于空白组与 siRNA-NC 组。表明 NF-κBp65 基因的表达缺失对肿瘤细胞的生长起到了显著的抑制作用，生长速度明显下降。进一步的流式细胞检测发现,与空白组相比,NF-κBp65-siRNA 组的细胞凋亡率显著增加。细胞凋亡是指为维持内环境稳定，由基因控制的细胞自主的有序的死亡[13]。细胞凋亡是细胞的一种基本生物学现象,在多细胞生物去除不需要的或异常的细胞中起着必要的作用，临床使用的放射疗法和化疗药物主要就是通过诱导肿瘤细胞凋亡而发挥疗效[14-15]。表明降低 NF-κBp65 基因表达有利于诱导肿瘤细胞凋亡。STAT3 信号通路是众多细胞因子信号转导的共同途径,广泛参与细胞增殖、分化、凋亡以及炎症等过程,可以通过负调节因子与其他信号通路相互作用、STATs 共价修饰等多种途径进行调节。STAT3 通路的激活促进各种疾病的发生、发展,包括各种炎症性疾病、淋巴瘤、白血病以及实体肿瘤等疾病，针对 STAT3 信号通路的靶向治疗是目前的热点。在本研究中,通过 Western-blot 检测发现,与空白组相比,NF-κBp65-siRNA 组中 p-STAT3、PCNA、MMP-2 蛋白的表达量显著下降。表明 NF-κBp65 可能通过降低 STAT3 信号通路活性发挥效应。

综上所述,本研究发现,在 SGC-790 胃癌细胞株中，抑制 NF-κBp65 表达水平可通过降低 STAT3 信号通路活性,抑制胃癌细胞增殖并促进凋亡。

参考文献:

[1] Deng J,Liu J,Wang W,et al. Validation of clinical significance of examined lymph node count for accurate prognostic evaluation of gastric cancer for the eighth edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM staging system[J]. Chin J Cancer Res,2018,30(5):5-19.

[2] Chen Z,Zhang S,Shao J,et al. Synthesis,structure,and in vitro antigastric cancer activity evaluation of two new Zn (Ⅱ) and Cd (Ⅱ)-organic frameworks [J]. J Coord Chem,2019,72(11):1833-1844.

[3] Zhang J,Gan L,Xu MD,et al. The prognostic value of age in non-metastatic gastric cancer after gastrectomy:a retro-

spective study in the U.S. and China[J]. J Cancer,2018,9(7):1188–1199.

[4] Dan Z,Zheng J,Ni M,et al. Comparative efficacy and safety of Chinese herbal injections combined with the FOLFOX regimen for treating gastric cancer in China:a network meta-analysis[J]. Oncotarget,2017,8(40):68873–68889.

[5] Hamed MM,Darwish SS,Herrmann J,et al. First bispecific inhibitors of the epidermal growth factor receptor kinase and the NF-κB activity as novel anti-cancer agents [J]. J Med Chem,2017,60(7):2853–2868.

[6] Horn S,Hughes MA,Schilling R,et al. Caspase-10 negatively regulates Caspase-8-mediated cell death,switching the response to CD95L in favor of NF-κB activation and cell survival[J]. Cell Rep,2017,19(4):785–797.

[7] Chang HY,Chen YC,Lin JG,et al. Asatone prevents acute lung injury by reducing expressions of NF-κB,MAPK and inflammatory cytokines [J]. Am J Chin Med,2018,46(3):651–671.

[8] Yu WG,Shen Y,Wu JZ,et al. Madecassoside impedes invasion of rheumatoid fibroblast-like synoviocyte from adjuvant arthritis rats via inhibition of NF-κB-mediated matrix metalloproteinase-13 expression [J]. Chin J Nat Med,2018,16(5):330–338.

[9] Kuo WY,Hwu L,Wu CY,et al. STAT3/NF-κB-regulated lentiviral TK/GCV suicide gene therapy for cisplatin-resistant triple-negative breast cancer[J]. Theranostics,2017,7(3):647–663.

[10] Wang H,Liang L,Dong Q,et al. Long noncoding RNA miR503HG,a prognostic indicator,inhibits tumor metastasis by regulating the HNRNPA2B1/NF-κB pathway in hepatocellular carcinoma [J]. Theranostics,2018,8(10):2814–2829.

[11] Pillai AB,Nagarajan U,Mitra A,et al. RNA interference in mosquito:understanding immune responses,double-stranded RNA delivery systems and potential applications in vector control[J]. Insect Mol Biol,2017,26(2):127–139.

[12] Parker KM,Borrero VB,Leeuwen DMV,et al. Environmental fate of RNA interference pesticides:adsorption and degradation of double-stranded RNA molecules in agricultural soils[J]. Environ Sci Technol,2019,53(6):3027–3036.

[13] Woo JH,Ahn JH,Jang DS,et al. Effect of kumatakenin isolated from cloves on the apoptosis of cancer cells and the alternative activation of tumor-associated macrophages [J]. J Agric Food Chem,2017,65(36):7893–7899.

[14] Wei M,Jiao D,Han D,et al. Knockdown of RNF2 induces cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells through the upregulation of TXNIP[J]. Oncotarget,2017,8(3):5323–5338.

[15] Law BYK,Gordillo-Martínez F,Qu YQ,et al. Thalidezine,a novel AMPK activator,eliminates apoptosis-resistant cancer cells through energy-mediated autophagic cell death[J]. Oncotarget,2017,8(18):30077–30091.