

槲皮黄酮通过抑制Traf6/NF- κ B信号转导通路增强5-氟尿嘧啶对HepG2的化疗作用

顾文燕¹, 吴敏², 李丽² (1.恩施土家族苗族自治州中心医院 消毒供应中心, 湖北 恩施 445000; 2.恩施土家族苗族自治州中心医院 手术室, 湖北 恩施 445000)

摘要: 目的 研究槲皮黄酮(querletin, Qu)影响肝癌细胞HepG2对5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)的敏感性及其Traf6/NF- κ B信号转导通路。方法 体外培养HepG2细胞, 取对数期细胞进行后续实验, 将细胞分为对照组(不含任何药物的培养基孵育细胞24 h)、单独Qu组(含40 μ g/ml Qu的培养基孵育细胞24 h)、单独5-FU组(含50 μ mol/L 5-FU的培养基孵育细胞24 h)、Qu + 5-FU联合处理组(含40 μ g/ml Qu和50 μ mol/L 5-FU的培养基共同孵育细胞24 h)、单独Traf6抑制剂C25-140组(2 μ mol/L C25-140的培养基孵育细胞8 h)、C25-140 + Qu + 5-FU组(C25-140预处理细胞8 h, 然后含40 μ g/ml Qu和50 μ mol/L 5-FU的培养基共同处理细胞24 h)。采用CCK8法检测细胞活力, 采用倒置显微镜记录细胞克隆数, 采用流式细胞术检测细胞凋亡率, 采用Western blot检测剪切的半胱氨酸蛋白酶-7 (cleaved-caspase 7, Cle-caspase 7)、Cle-caspase 3、剪切的聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶 (cleaved poly ADP-ribose polymerase, Cle-PARP)、肿瘤坏死因子受体相关蛋白6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor-6, Traf6)、磷酸化转化生长因子- β 活化激酶1 (phosphorylation transforming growth factor- β -activated kinase 1, p-TAK1) 和磷酸化核转录因子 (phosphorylation nuclear factor kappa-B, p-NF- κ B) 蛋白的表达水平。结果 Qu (40 μ g/ml)、5-FU (50 μ mol/L) 和Qu + 5-FU组细胞相对活力分别为(82.3 \pm 3.1) %、(53.7 \pm 4.1) %和(42.4 \pm 4.4) %, 均显著低于对照组的(100.0 \pm 3.4) %, 差异有统计学意义($t = 5.83$ 、9.54、14.65, P 均 < 0.05) ; Qu (40 μ g/ml) 组、5-FU (50 μ mol/L) 组和Qu + 5-FU组HepG2细胞克隆数分别为534 \pm 26、236 \pm 25、115 \pm 42, 均显著低于对照组的701 \pm 32 (P 均 < 0.05) , 且Qu + 5-FU组显著低于Qu (40 μ g/ml) 组和5-FU (50 μ mol/L) 组($t = 31.74$, $P < 0.001$; $t = 11.34$, $P = 0.008$) 。Qu (40 μ g/ml) 组、5-FU (50 μ mol/L) 组和Qu + 5-FU组HepG2细胞凋亡率[(18.9 \pm 4.2) % vs (21.4 \pm 4.1) % vs (35.7 \pm 3.6) % vs (4.6 \pm 1.5) %]、Cle-caspase 7 (0.11 \pm 0.02 vs 0.22 \pm 0.03 vs 0.32 \pm 0.03 vs 0.05 \pm 0.02)、Cle-caspase 3 (0.13 \pm 0.02 vs 0.18 \pm 0.03 vs 0.28 \pm 0.03) 和Cle-PARP (0.15 \pm 0.02 vs 0.24 \pm 0.03 vs 0.41 \pm 0.03 vs 0.08 \pm 0.02) 表达水平均显著高于对照组, 且Qu + 5-FU组显著高于Qu (40 μ g/ml) 组和5-FU (50 μ mol/L) 组(P 均 < 0.05) 。Qu (40 μ g/ml) 组、5-FU (50 μ mol/L) 组、Qu + 5-FU组HepG2细胞Traf6 (0.28 \pm 0.02 vs 0.19 \pm 0.03 vs 0.11 \pm 0.03 vs 0.38 \pm 0.02)、p-TAK1 (0.23 \pm 0.02 vs 0.11 \pm 0.03 vs 0.04 \pm 0.03 vs 0.38 \pm 0.02) 和p-NF- κ B (0.28 \pm 0.02 vs 0.13 \pm 0.03 vs 0.05 \pm 0.02 vs 0.44 \pm 0.03) 蛋白相对表达量均显著低于对照组, 且Qu + 5-FU组均显著低于Qu (40 μ g/ml) 组和5-FU (50 μ mol/L) 组(P 均 < 0.05) 。与对照组相比, C25-140组、Qu + 5-FU组和Qu + 5-FU + C25-140组HepG2细

胞相对活力 $[(73.4 \pm 4.1) \% \text{ vs } (65.8 \pm 3.6) \% \text{ vs } (47.7 \pm 3.9) \% \text{ vs } (100 \pm 3.1) \%]$ 和细胞克隆数 $(456 \pm 26 \text{ vs } 413 \pm 25 \text{ vs } 305 \pm 42 \text{ vs } 763 \pm 32)$ 显著降低, 细胞凋亡率 $[(24.4 \pm 4.1) \% \text{ vs } (29.9 \pm 3.7) \% \text{ vs } (51.2 \pm 3.7) \% \text{ vs } (3.9 \pm 5.2) \%]$ 显著升高 (P 均 < 0.05); 与Qu + 5-FU组比较, Qu + 5-FU + C25-140组HepG2细胞活力和克隆数显著降低, 细胞凋亡率显著升高 (P 均 < 0.05)。与对照组相比, Traf6 mimics组HepG2细胞相对活力 $[(152.4 \pm 6.3) \% \text{ vs } (100 \pm 3.5) \%]$ 、细胞凋亡率 $[(5.3 \pm 3.2) \% \text{ vs } (3.8 \pm 2.1) \%]$ 和细胞克隆数 $(978 \pm 26 \text{ vs } 783 \pm 32)$ 均显著升高 (P 均 < 0.05), Qu + 5-FU组和Traf6 mimics + Qu + 5-FU组HepG2细胞相对活力 $[(65.8 \pm 4.3) \% \text{ vs } (100 \pm 3.5) \%]$; $(79.4 \pm 4.9) \% \text{ vs } (100 \pm 3.5) \%]$ 和细胞克隆数 $(454 \pm 25 \text{ vs } 783 \pm 32; 623 \pm 42 \text{ vs } 783 \pm 32)$ 显著降低, 细胞凋亡率 $[(34.7 \pm 4.4) \% \text{ vs } (3.8 \pm 2.1) \%]$; $(24.4 \pm 3.5) \% \text{ vs } (3.8 \pm 2.1) \%]$ 显著升高 (P 均 < 0.05)。与Qu + 5-FU组相比, Traf6 mimics + Qu + 5-FU组HepG2细胞活力和克隆数显著升高, 细胞凋亡率显著降低 (P 均 < 0.05)。结论 Qu通过抑制Traf6/NF- κ B信号转导通路协同诱导5-FU对肝细胞癌的化疗作用。

关键词: 槲皮黄酮; 肝细胞癌; 5-氟尿嘧啶; Traf6/NF- κ B信号转导通路

Quercetin enhances the chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil on HepG2 by suppressing Traf6/NF- κ B signaling transduction pathway

Gu Wenyan¹, Wu Min², Li Li² (1. Sterile Supply Centre, the Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Enshi 445000, Hubei Province, China; 2. Operating Room, the Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Enshi 445000, Hubei Province, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of quercetin (Qu) on the chemotherapeutic sensitivity of 5-fluorouracil (5-FU) and Traf6/NF- κ B signaling transduction pathway in HepG2. **Methods** HepG2 cells were cultured *in vitro* and log-phase cells were harvested for subsequent experiments. Cells were divided into control group (cells were incubated in a drug-free medium for 24 h), Qu group (cells were incubated in a medium containing 40 μ g/ml of Qu for 24 h), 5-FU group (cells were incubated in a medium containing 50 μ mol/L of 5-FU for 24 h), Qu + 5-FU group (cells were incubated in a medium containing 40 μ g/ml of Qu and 50 μ mol/L of 5-FU for 24 h), C25-140 group (cells were incubated in a medium containing 2 μ mol/L of C25-140 for 8 h) and C25-140 + Qu + 5-FU group (cells were firstly incubated in a medium containing 2 μ mol/L of C25-140 for 8 h, then treated with 40 μ g/ml of Qu and 50 μ mol/L of 5-FU for 24 h). CCK8 assay was performed to detect the cell viability. Cell colonies were measured by inverted microscope. HepG2 cell apoptotic rate was determined by flow cytometry. The expression levels of cleaved-caspase 7 (Cle-caspase 7), Cle-caspase 3, cleaved poly ADP-ribose polymerase (Cle-PARP), tumor necrosis factor receptor-associated factor-6 (Traf6), phosphorylation transforming growth factor- β -activated kinase 1 (p-TAK1) and phosphorylation nuclear factor kappa-B (p-NF- κ B) protein were detected by Western blot. **Results** The relative cell viability in Qu (40 μ g/ml) group, 5-FU (50 μ mol/L) group and Qu + 5-FU group were $(82.3 \pm 3.1)\%$, $(53.7 \pm 4.1)\%$ and $(42.4 \pm 4.4)\%$, respectively, which were significantly lower than that in control group $[(100.0 \pm 3.4)\%, t = 5.83, 9.54, 14.65, \text{all } P < 0.05]$. The HepG2 cell colonies number in Qu (40 μ g/ml) group, 5-FU (50 μ mol/L) group and Qu + 5-FU group were 534 ± 26 , 236 ± 25 and 115 ± 42 , respectively, which were significantly lower than that in control group $(701 \pm 32; \text{all } P < 0.05)$. The HepG2 cell colonies number in Qu + 5-FU group was significantly lower than that in Qu (40 μ g/ml) group and 5-FU (50 μ mol/L) group ($t = 31.74, P < 0.001; t = 11.34, P = 0.008$). The HepG2 cell apoptotic rates $[(18.9 \pm$

4.2)% vs (21.4 ± 4.1)% vs (35.7 ± 3.6)% vs (4.6 ± 1.5)%], Cle-caspase 7 (0.11 ± 0.02 vs 0.22 ± 0.03 vs 0.32 ± 0.03 vs 0.05 ± 0.02), Cle-caspase 3 (0.13 ± 0.02 vs 0.18 ± 0.03 vs 0.28 ± 0.03) and Cle-PARP (0.15 ± 0.02 vs 0.24 ± 0.03 vs 0.41 ± 0.03 vs 0.08 ± 0.02) in Qu (40 μg/ml) group, 5-FU (50 μmol/L) group and Qu + 5-FU group were significantly higher than those in control group, and the above indexes in Qu + 5-FU group were significantly higher than those in Qu (40 μg/ml) group and 5-FU (50 μmol/L) group (all $P < 0.05$). The relative expression levels of Traf6 (0.28 ± 0.02 vs 0.19 ± 0.03 vs 0.11 ± 0.03 vs 0.38 ± 0.02), p-TAK1 (0.23 ± 0.02 vs 0.11 ± 0.03 vs 0.04 ± 0.03 vs 0.38 ± 0.02) and p-NF-κB (0.28 ± 0.02 vs 0.13 ± 0.03 vs 0.05 ± 0.02 vs 0.44 ± 0.03) in Qu (40 μg/ml) group, 5-FU (50 μmol/L) group and Qu + 5-FU group were significantly lower than those in control group, and the above indexes in Qu + 5-FU group were significantly lower than those in Qu (40 μg/ml) group and 5-FU (50 μmol/L) group (all $P < 0.05$). Compared with control group, the cell viability [(73.4 ± 4.1)% vs (65.8 ± 3.6)% vs (47.7 ± 3.9)% vs (100 ± 3.1)%] and colonies number (456 ± 26 vs 413 ± 25 vs 305 ± 42 vs 763 ± 32) in C25-140 group, Qu + 5-FU group and Qu + 5-FU + C25-140 group decreased significantly and the apoptosis rate [(24.4 ± 4.1)% vs (29.9 ± 3.7)% vs (51.2 ± 3.7)% vs (3.9 ± 5.2)%] increased significantly (all $P < 0.05$); compared with Qu + 5-FU group, the cell viability and colonies number in Qu + 5-FU + C25-140 group decreased significantly and the apoptosis rate increased significantly (all $P < 0.05$). Compared with control group, the cell viability [(152.4 ± 6.3)% vs (100 ± 3.5)%], apoptosis rate [(5.3 ± 3.2)% vs (3.8 ± 2.1)%] and colonies number (978 ± 26 vs 783 ± 32) in Traf6 mimics group increased significantly, the cell viability [(65.8 ± 4.3)% vs (100 ± 3.5)%; (79.4 ± 4.9)% vs (100 ± 3.5)%] and colonies number (454 ± 25 vs 783 ± 32; 623 ± 42 vs 783 ± 32) in Qu + 5-FU group and Traf6 mimics + Qu + 5-FU group decreased significantly and the apoptosis rate [(34.7 ± 4.4)% vs (3.8 ± 2.1)%; (24.4 ± 3.5)% vs (3.8 ± 2.1)%] increased significantly (all $P < 0.05$). Compared with Qu + 5-FU group, the cell viability and colonies number in Traf6 mimics + Qu + 5-FU group increased significantly, and the apoptosis rate decreased significantly (all $P < 0.05$). **Conclusions** Qu synergized the chemotherapeutic effect of 5-FU on hepatocellular carcinoma through the suppression of Traf6/NF-κB signaling transduction pathway.

Key words: Quercetin; Hepatocellular carcinoma; 5-fluorouracil; Traf6/NF-κB signaling transduction pathway

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 也是导致癌症相关死亡的主要原因^[1]。尽管化学治疗药物和新疗法已有所改进, 但在过去几十年中HCC预后并未得到显著提升。肿瘤的晚期诊断和细胞对化学治疗药物的耐药性是导致预后不良的关键因素^[2]。5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 是目前治疗肝癌的主流化学治疗药物, 其作用机制主要是诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡^[3,4]。大多数患者在治疗初期表现出对5-FU的敏感性, 但后期肿瘤细胞对5-FU的耐药性和严重不良反应阻碍了其应用。因此, 开发高效、低毒的逆转耐药的化合物是临床迫切需要解决的问题。已有研究指出, 传统中药在较多类型的癌症中可提高化学治疗药物的疗效并降低耐药性^[5,6]。槲皮

黄酮 (quercetin, Qu) 是一种天然黄酮类化合物, 存在于多种水果、种子和蔬菜中。较多研究证实, Qu可能通过诱导凋亡细胞, 抑制增殖、血管生成和肿瘤发生等途径对包括肝癌在内的各种癌症具有预防和抗肿瘤作用^[7,8]。本研究主要探讨Qu抗肝癌细胞增殖机制及其与5-FU协同作用对HCC的影响。

1 资料与方法

1.1 主要材料及试剂 槲皮黄酮购自Sigma公司, 批号: 554-43-15; DMEM培养基、胎牛血清 (FBS) 购自英国Gibco公司; CCK8试剂盒购买于北京智杰方远科技有限公司; Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购买于武汉巴菲尔生物有限公司, 剪切的半胱氨酸蛋白酶-7 (cleaved-caspase 7, Cle-caspase 7)、Cle-caspase 3、剪切的聚腺苷二磷酸-核糖聚合

酶(cleaved poly ADP-ribose polymerase, Cle-PARP)、肿瘤坏死因子受体相关蛋白6(tumor necrosis factor receptor-associated factor-6, Traf6)、转化生长因子- β 活化激酶1(transforming growth factor- β -activated kinase 1, TAK1)、磷酸化转化生长因子- β 活化激酶1(phosphorylation transforming growth factor- β -activated kinase 1, p-TAK1)、核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)和磷酸化核转录因子(phosphorylation nuclear factor kappa-B, p-NF- κ B)抗体购自英国Abcam公司。

1.2 细胞培养及药物处理 肝癌HepG2细胞来自武汉巴菲尔生物有限公司,采用DMEM完全培养液(含10% FBS、1% 100 U/ml青霉素和100 g/ml链霉素)孵育细胞,培养温度为37℃、CO₂浓度为5%。待细胞生长至瓶底的90%左右进行传代培养。取对数期细胞进行后续实验,Qu处理细胞浓度为10 μ g/ml、20 μ g/ml、30 μ g/ml、40 μ g/ml,5-FU处理细胞浓度为25 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L、150 μ mol/L,Qu和5-FU联合处理浓度分别为40 μ g/ml和50 μ mol/L(该浓度时细胞活性已降至50%左右),干预细胞时长为24 h。

1.3 细胞活性试验 收集各组细胞,PBS清洗细胞1遍,每孔加入10 μ l的CCK8试剂,继续培养2 h后,在450 nm波长处检测每孔吸光度(A)值,并计算细胞相对活力。细胞相对活力(%) = $A_{\text{药物组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.4 细胞克隆实验 收集各组细胞,采用倒置显微镜观察细胞形态。随机选择十个视野进行细胞计数,计算平均数即为细胞克隆数。

1.5 细胞凋亡检测 收集各组细胞,PBS清洗2次,PBS重悬后,分别加入Annexin-V FITC和PI处理细胞(按照试剂盒操作说明书进行),最后采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.6 Western blot实验 收集各组细胞,PBS清洗细胞3次,裂解、超声破碎、12000 r/min离心12 min(离心半径为15 cm)后收集上清,采用BCA试剂盒测定上清蛋白浓度。每个样本上样50 μ g进行凝胶电泳,待蛋白完全分离后进行转膜实验。结束后加入5%脱脂奶粉封闭液于摇床上室温封闭1 h后,分别

加入对应一抗抗体(体积稀释比例均为1:1000)4℃反应过夜。次日TBST洗膜3次后加入HRP标记的山羊抗兔IgG(体积稀释比例为1:3000),室温反应1 h。再用TBST洗膜3次,每次10 min,以ECL试剂显影后进行蛋白条带灰度值分析。

1.7 Traf6抑制剂C25-140对HepG2细胞生长的影响 取对数期细胞接种于6孔板,将细胞分为对照组、C25-140(2 μ mol/L)组、Qu + 5-FU组和C25-140 + Qu + 5-FU组。首先采用C25-140预处理HepG2细胞8 h,然后采用40 μ g/ml的Qu和50 μ mol/L的5-FU处理细胞24 h,最后检测细胞活力、克隆数及凋亡率。

1.8 Traf6过表达对HepG2细胞生长的影响 取对数期细胞接种于6孔板,将细胞分为对照组、Traf6 mimics组、Qu + 5-FU组和Traf6 mimics + Qu + 5-FU组。将Traf6 mimics质粒转染HepG2细胞16 h,然后采用40 μ g/ml的Qu和50 μ mol/L的5-FU处理细胞24 h,最后检测细胞活力、克隆数及凋亡率。

1.9 统计学处理 采用SPSS 20.0软件进行统计学分析,细胞相对活力、细胞凋亡率、细胞克隆数及各蛋白相对表达量均为计量资料,符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用LSD- t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Qu协同5-FU抑制HepG2细胞增殖 0 μ g/ml(对照组)、10 μ g/ml、20 μ g/ml、30 μ g/ml、40 μ g/ml Qu处理HepG2细胞24 h后,细胞相对活力分别为(100 \pm 3.4) %、(93.8 \pm 4.5) %、(83.4 \pm 4.1) %、(80.2 \pm 5.1) %、(76.4 \pm 5.2) %,差异有统计学意义($F = 34.64$, $P < 0.001$),与对照组相比,各浓度Qu均能显著抑制细胞活力($t = 5.64$, $P = 0.03$; $t = 7.59$, $P = 0.02$; $t = 8.41$, $P = 0.01$; $t = 14.27$, $P = 0.003$)。采用不同浓度5-FU(25 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L、150 μ mol/L)与40 μ g/ml Qu共同处理HepG2细胞24 h,与单独5-FU处理组比较,不同浓度5-FU + Qu组中HepG2细胞相对活力均显著降低(P 均 < 0.05),见表1。HepG2细胞克隆检测表明,对照组、Qu(40 μ g/ml)组、5-FU(50 μ mol/L)组和Qu + 5-FU组HepG2细胞克隆数分别为701 \pm 32、

表1 Qu与5-FU联合处理后HepG2细胞相对活力($\bar{x} \pm s$, %)

Qu	5-FU				
	0 μ mol/L	25 μ mol/L	50 μ mol/L	100 μ mol/L	150 μ mol/L
0 μ g/ml	100 \pm 3.4	77.4 \pm 4.2	53.7 \pm 4.1	33.5 \pm 4.2	21.5 \pm 3.4
40 μ g/ml	82.3 \pm 3.1	61.2 \pm 3.6	42.4 \pm 4.4	21.7 \pm 3.8	14.9 \pm 3.6
t 值	5.83	7.83	6.12	7.03	8.24
P 值	0.03	0.01	0.02	0.01	0.006

534 ± 26、236 ± 25、115 ± 42, 差异有统计学意义 ($F = 34.62$, $P < 0.001$), 各处理组HepG2细胞克隆数均显著低于对照组 ($t = 7.45$, $P = 0.02$; $t = 9.67$, $P = 0.003$; $t = 16.54$, $P < 0.001$), 且Qu + 5-FU组显著低于Qu组和5-FU组 ($t = 31.74$, $P < 0.001$; $t = 11.34$, $P = 0.008$), 见图1。

2.2 Qu增强5-FU对HepG2细胞凋亡的诱导作用 对照组、Qu (40 μg/ml) 组、5-FU (50 μmol/L) 组和Qu + 5-FU组HepG2细胞凋亡率差异有统计学意义 ($F = 27.61$, $P < 0.001$), 各处理组细胞凋亡率均显著高于对照组, Qu + 5-FU组显著高于Qu (40 μg/ml) 组和5-FU (50 μmol/L) 组 (P 均 < 0.05), 见图2、表2。与对照组相比, Qu (40 μg/ml) 组、5-FU (50 μmol/L) 和Qu + 5-FU组凋亡相关蛋白Cle-caspase 7、Cle-caspase 3和Cle-PARP表达水平显

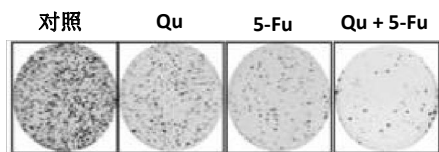


图1 Qu (40 μg/ml) 和 5-FU (50 μmol/L) 联合处理 HepG2 细胞克隆实验图

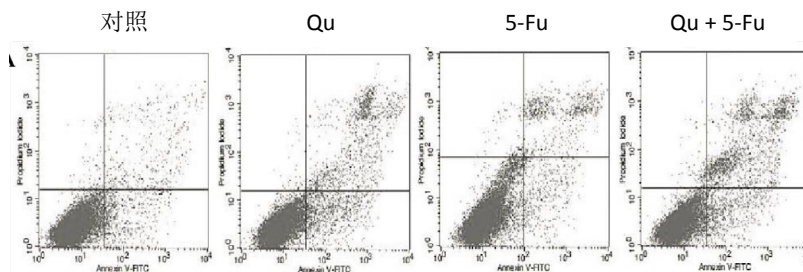


图2 流式细胞术检测 HepG2 细胞凋亡
注: Qu 浓度为 40 μg/ml, 5-FU 浓度为 50 μmol/L。

著升高 (P 均 < 0.05); 与Qu + 5-FU组相比, Qu (40 μg/ml) 组和5-FU (50 μmol/L) 组则显著降低 (P 均 < 0.05), 见图3、表2。

2.3 Qu和5-FU联合处理对HepG2细胞中Traf6/NF-κB信号通路的影响 与对照组相比, Qu (40 μg/ml) 组、5-FU (50 μmol/L) 组、Qu + 5-FU组HepG2细胞中Traf6、p-TAK1和p-NF-κB蛋白相对表达量显著降低 (P 均 < 0.05); 与Qu + 5-FU组比较, Qu (40 μg/ml) 组和5-FU (50 μmol/L) 组HepG2细胞中Traf6、p-TAK1和p-NF-κB蛋白相对表达量显著升高 (P 均 < 0.05), 见图3、表3。

2.4 Traf6抑制剂C25-140对HepG2细胞生长的影响 采用Traf6抑制剂C25-140处理HepG2细胞后, 抑制剂处理组Traf6蛋白相对表达量为0.04 ± 0.02, 显著低于对照组的0.36 ± 0.03, 差异有统计学意义 ($t = 13.06$, $P < 0.001$)。与对照组比较, C25-140组、Qu + 5-FU组和Qu + 5-FU + C25-140组HepG2细胞活力和克隆数显著降低, 细胞凋亡率显著升高 (P 均 < 0.05); 与Qu + 5-FU组比较, Qu + 5-FU + C25-140组HepG2细胞活力和克隆数显著降低, 细胞凋亡率显著升高 (P 均 < 0.05), 见表4。

2.5 Traf6过表达对HepG2细胞生长的影响 与对照组

表2 Qu 和 5-FU 对细胞凋亡率和细胞凋亡相关蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率 (%)	Cle-caspase 7	Cle-caspase 3	Cle-PARP
对照组	4.6 ± 1.5	0.05 ± 0.02	0.07 ± 0.03	0.08 ± 0.02
Qu (40 μg/ml) 组	18.9 ± 4.2	0.11 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.02
5-FU (50 μmol/L) 组	21.4 ± 4.1	0.22 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.24 ± 0.03
Qu + 5-FU组	35.7 ± 3.6	0.32 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.41 ± 0.03
F 值	27.61	31.73	24.16	29.04
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: 与对照组相比, Qu (40 μg/ml) 组、5-FU (50 μmol/L) 组、Qu + 5-FU 组细胞凋亡率 t 值分别为 6.32、10.63、21.47, P 值分别为 0.03、0.002、 < 0.001 , Cle-caspase 7 t 值分别为 4.51、7.54、11.31, P 值分别为 0.03、0.01、0.007, Cle-caspase 3 t 值分别为 4.32、5.63、13.37, P 值分别为 0.03、0.02、0.005, Cle-PARP t 值分别为 5.76、8.25、16.31, P 值分别为 0.02、0.008、0.004; 与 Qu + 5-FU 组相比, Qu (40 μg/ml) 组和 5-FU (50 μmol/L) 组细胞凋亡率 t 值分别为 31.74、11.34, P 值分别为 0.002、0.006, Cle-caspase 3 t 值分别为 9.56、4.86, P 值分别为 0.009、0.041, Cle-caspase 7 t 值分别为 6.54、3.27, P 值分别为 0.016、0.042, Cle-PARP 3 t 值分别为 10.24、5.16, P 值分别为 0.001、0.024。

相比, Traf6 mimics组HepG2细胞相对活力、细胞凋亡率和细胞克隆数均显著升高 (P 均 < 0.05), Qu + 5-FU组和Traf6 mimics + Qu + 5-FU组HepG2细胞活力和克隆数显著降低, 细胞凋亡率显著升高 (P 均 < 0.05)。与Qu + 5-FU组比较, Traf6 mimics + Qu + 5-FU组HepG2细胞活力和克隆数显著升高, 细胞凋亡率显著降低 (P 均 < 0.05), 见表5。

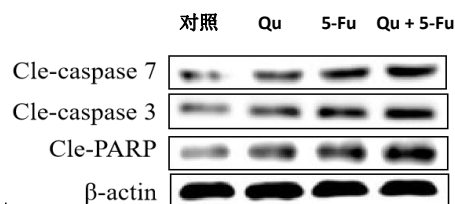


图3 Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白的表达
注: Qu浓度为40 $\mu\text{g/ml}$, 5-FU浓度为50 $\mu\text{mol/L}$ 。

表3 Traf6、p-TAK1 和 p-NF- κ B 蛋白的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Traf6/ β -actin	p-TAK1/TAK1	p-NF- κ B/NF- κ B
对照组	0.38 \pm 0.02	0.38 \pm 0.02	0.44 \pm 0.03
Qu (40 $\mu\text{g/ml}$) 组	0.28 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02	0.28 \pm 0.02
5-FU (50 $\mu\text{mol/L}$) 组	0.19 \pm 0.03	0.11 \pm 0.03	0.13 \pm 0.03
Qu + 5-FU组	0.11 \pm 0.03	0.04 \pm 0.03	0.05 \pm 0.02
F值	25.16	19.57	35.81
P值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: 与对照组相比, Qu (40 $\mu\text{g/ml}$) 组、5-FU (50 $\mu\text{mol/L}$) 组、Qu + 5-FU 组的 Traf6 t 值分别为 4.12、7.32、15.33, P 值分别为 0.04、0.01、0.006, p-TAK1 t 值分别为 5.17、9.15、18.37, P 值分别为 0.03、0.006、0.002, p-NF- κ B t 值分别为 6.37、10.09、19.42, P 值分别为 0.02、0.005、0.001; 与 Qu + 5-FU 组相比, Qu (40 $\mu\text{g/ml}$) 组和 5-FU (50 $\mu\text{mol/L}$) 组 Traf6 t 值分别为 8.26、3.94, P 值分别为 0.008、0.039, p-TAK1 t 值分别为 9.31、6.11, P 值分别为 0.007、0.013, p-NF- κ B t 值分别为 10.51、5.37, P 值分别为 0.002、0.018。

表4 C25-140 处理对 HepG2 细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞相对活力 (%)	细胞凋亡率 (%)	细胞克隆数
对照组	100 \pm 3.1	3.9 \pm 5.2	763 \pm 32
C25-140组	73.4 \pm 4.1	24.4 \pm 4.1	456 \pm 26
Qu + 5-FU组	65.8 \pm 3.6	29.9 \pm 3.7	413 \pm 25
C25-140 + Qu + 5-FU组	47.7 \pm 3.9	51.2 \pm 3.7	305 \pm 42
F值	45.69	48.32	36.71
P值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: Qu浓度为40 $\mu\text{g/ml}$, 5-FU浓度为50 $\mu\text{mol/L}$; 与对照组相比, C25-140组、Qu + 5-FU组、C25-140 + Qu + 5-FU组细胞相对活力 t 值分别为 8.92、23.52、42.46, P 值分别为 0.008、 < 0.001 、 < 0.001 , 细胞凋亡率 t 值分别为 15.27、19.21、51.23, P 值分别为 0.005、 < 0.001 、 < 0.001 , 细胞克隆数 t 值分别为 11.15、14.52、32.28, P 值分别为 0.008、0.006、 < 0.001 ; 与 C25-140 + Qu + 5-FU 组相比, C25-140组和 Qu + 5-FU 组细胞相对活力 t 值分别为 16.23、12.73, P 均 < 0.001 , 细胞凋亡率 t 值分别为 15.99、11.91, P 均 < 0.001 , 细胞克隆数 t 值分别为 26.32、18.64, P 均 < 0.001 。

表5 Traf6 过表达对 HepG2 细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞相对活力 (%)	细胞凋亡率 (%)	细胞克隆数
对照组	100 \pm 3.5	3.8 \pm 2.1	783 \pm 32
Traf6 mimics组	152.4 \pm 6.3	5.3 \pm 3.2	978 \pm 26
Qu + 5-FU组	65.8 \pm 4.3	34.7 \pm 4.4	454 \pm 25
Traf6 mimics + Qu + 5-FU组	79.4 \pm 4.9	24.4 \pm 3.5	623 \pm 42
F值	34.95	31.99	16.74
P值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: Qu浓度为40 $\mu\text{g/ml}$, 5-FU浓度为50 $\mu\text{mol/L}$ 与对照组相比, Traf6 mimics组、Qu + 5-FU组、Traf6 mimics + Qu + 5-FU组细胞相对活力 t 值分别为 13.25、17.82、12.51, P 值分别为 0.007、 < 0.001 、0.008, 细胞凋亡率 t 值分别为 4.83、22.54、14.76, P 值分别为 0.04、 < 0.001 、 < 0.001 , 细胞克隆数 t 值分别为 6.79、8.16、5.14, P 值分别为 0.04、0.03、0.04; 与 Traf6 mimics + Qu + 5-FU 组相比, Traf6 mimics组和 Qu + 5-FU 组细胞相对活力 t 值分别为 10.52、12.73, P 均 < 0.001 , 细胞凋亡率 t 值分别为 18.26、9.45, P 均 < 0.001 , 细胞克隆数 t 值分别为 4.21、6.99, P 值分别为 0.018、0.009。

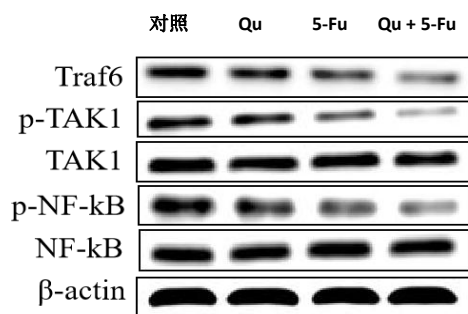


图4 Western blot检测 Traf6、p-TAK1 和 p-NF-κB 蛋白的表达
注: Qu 浓度为 40 μg/ml, 5-FU 浓度为 50 μmol/L。

3 讨论

5-FU作为肝癌临床化学治疗的一线药物,有效提高了患者的总体生存率,但也存在较大局限性,如广泛的肿瘤耐药和毒性使其应用受到限制。尽管如此,5-FU仍是治疗肝肠癌最常见、使用最广泛的药物,因此迫切需提高其治疗效果。Qu对多种肿瘤可表现出抑制作用,包括胰腺癌、肝癌及前列腺癌等^[9]。以往研究表明,Qu具有抗肝癌细胞增殖和促凋亡作用,还可通过靶向多条信号转导通路诱导肿瘤细胞凋亡^[10-12]。大量研究已证实,5-FU和Qu均可分别抑制肿瘤细胞的生长^[13,14],但其联合作用抗肝癌的活性尚未明确。本研究表明,Qu和5-FU增强对肝癌细胞生长的抑制作用是通过同时调节Caspase/PARP和Traf6/NF-κB信号转导通路实现的,Qu可增强肝癌细胞对5-FU的敏感性。本研究提示Qu可作为天然化合物辅助治疗提高肿瘤化学治疗药物疗效的依据,可作为Qu和5-FU协同作用的支撑证据。

流式细胞术分析表明,Qu和5-FU对HepG2细胞毒性的增强作用与诱导细胞凋亡相关。细胞凋亡或细胞程序性死亡是肝癌发生发展和组织内环境稳定的重要生物学过程^[15]。Caspase信号转导途径的激活是细胞凋亡的基础,其中细胞色素c从线粒体膜间隙释放至细胞质中是caspase依赖性凋亡通路的前提。释放的细胞色素c可与ATP结合,并与pro-caspase 7结合形成凋亡小体,从而切断caspase 7前体,激活效应因子caspase 3^[16,17]。本研究表明,Qu显著增强5-FU介导的半胱氨酸蛋白酶Cle-caspase 7、Cle-caspase 3和Cle-PARP的激活,提示5-FU和Qu联合抑制肝癌细胞增殖与caspase依赖性凋亡通路的激活有关。

Traf6/NF-κB信号转导通路与多种肿瘤的增殖、凋亡、迁移和侵袭等生物学行为密切相关,抑制其激活可阻断生存信号通路,加速肿瘤细胞死亡^[18,19]。

研究表明,Traf6/NF-κB信号转导通路的激活与肝癌恶化有关^[20-22],针对Traf6/NF-κB信号转导通路及其相关关键信号分子的有效靶向作用有望成为肿瘤治疗的重要方式^[23-26]。本研究表明,Qu和5-FU联合处理可抑制肝癌细胞中Traf6/NF-κB信号转导通路,Traf6抑制剂干预可部分促进Qu和5-FU介导的肝癌细胞凋亡,而Traf6基因过表达则部分降低它们对肿瘤细胞增殖的抑制作用。

综上,Qu通过增强化疗药物抗肿瘤细胞增殖及促凋亡活性协同5-FU抑制肝癌细胞的生长。Qu协同5-FU对肝癌HepG2细胞的抑制作用是通过同时靶向caspase/PARP和Traf6/NF-κB信号转导通路实现的。这为Qu协同5-FU治疗肝癌的分子机制提供了新见解,这种组合干预可能成为肝癌治疗的一种更有效的方法。

参考文献

- [1] MOHAMED AA, LOUFTYL SA, CRAIK JD, et al. Chronic hepatitis C genotype-4 infection: role of insulin resistance in hepatocellular carcinoma[J]. *Virology*, 2011, 8:496.
- [2] European Association for the Study of the Liver, European Organisation for Research and Treatment of Cancer. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2012, 56(4):938-943.
- [3] ZHANG C, KOLB A, BÜCHLER P, et al. Corticosteroid co-treatment induces resistance to chemotherapy in surgical resections, xenografts and established cell lines of pancreatic cancer[J]. *BMC Cancer*, 2006, 6:61.
- [4] LONGLEY DB, HARKIN DP, JOHNSTON PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(5): 330-338.
- [5] BRITO AF, RIBEIRO M, ABRANTES AM, et al. Quercetin in cancer treatment, alone or in combination with conventional therapeutics[J]. *Curr Med Chem*, 2015, 22(26):3025-3039.
- [6] SHAFABAKHSH R, ASEMI Z. Quercetin: a natural compound for ovarian cancer treatment[J]. *J Ovarian Res*, 2019, 12(1):55.
- [7] MEN K, DUAN X, WEI XW, et al. Nanoparticle-delivered quercetin for cancer therapy[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2014, 14(6):826-832.
- [8] DARBAND SG, KAVIANI M, YOUSEFI B, et al. Quercetin: a functional dietary flavonoid with potential chemo-preventive properties in colorectal cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9):6544-6560.
- [9] FAROOQI AA, JABEEN S, ATTAR R, et al. Quercetin-mediated regulation of signal transduction cascades and microRNAs: natural weapon against cancer[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(12):9664-9674.
- [10] WU L, LI J, LIU T, et al. Quercetin shows anti-tumor effect in hepatocellular carcinoma LM3 cells by abrogating JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(10):4806-4820.
- [11] SALAMA YA, EL-KAREF A, EL GAYYAR AM, et al. Beyond its antioxidant properties: quercetin targets multiple signalling pathways in hepatocellular carcinoma in rats[J]. *Life Sci*, 2019, 236:116933.
- [12] CHEN Z, HUANG C, MA T, et al. Reversal effect of quercetin on

- multidrug resistance via FZD7/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Phytomedicine*,2018,43:37-45.
- [13] RAUF A, IMRAN M, BUTT M S, et al. Resveratrol as an anti-cancer agent: a review[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*,2018,58(9):1428-1447.
- [14] JI Y, LI L, MA Y X, et al. Quercetin inhibits growth of hepatocellular carcinoma by apoptosis induction in part via autophagy stimulation in mice[J]. *J Nutr Biochem*,2019,69:108-119.
- [15] LEE C M, CHOI Y J, PARK S H, et al. Indole-3-carbinol induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma Huh-7 cells[J]. *Food Chem Toxicol*,2018,118:119-130.
- [16] WANG R, CONG WH, GUO G, et al. Synergism between carnosic acid and arsenic trioxide on induction of acute myeloid leukemia cell apoptosis is associated with modulation of PTEN/Akt signaling pathway[J]. *Chin J Integr Med*,2012,18(12):934-941.
- [17] LI P, ZHOU L, ZHAO T, et al. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application[J]. *Oncotarget*,2017,8(14):23996-24008.
- [18] ZHU G, CHENG Z, HUANG Y, et al. TRAF6 promotes the progression and growth of colorectal cancer through nuclear shuttling regulation NF- κ B/c-jun signaling pathway[J]. *Life Sci*,2019,235:116831.
- [19] WAN C, WU M, ZHANG S, et al. α nAChR-mediated recruitment of PP1 γ promotes TRAF6/NF- κ B cascade to facilitate the progression of hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Carcinog*,2018,57(11):1626-1639.
- [20] DING Y F, PENG Z X, DING L, et al. Baishouw extract suppresses the development of hepatocellular carcinoma via TLR4/MyD88/NF- κ B pathway[J]. *Front Pharmacol*,2019,10:389.
- [21] MATSUMURA T, DEGAWA T, TAKII T, et al. TRAF6-NF- κ B pathway is essential for interleukin-1-induced TLR2 expression and its functional response to TLR2 ligand in murine hepatocytes[J]. *Immunology*,2003,109(1):127-136.
- [22] BAO S, ZHENG J, LI N, et al. Role of interleukin-23 in monocyte-derived dendritic cells of HBV-related acute-on-chronic liver failure and its correlation with the severity of liver damage[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*,2017,41(2):147-155.
- [23] MIN Y, KIM M J, LEE S, et al. Inhibition of TRAF6 ubiquitin-ligase activity by PRDX1 leads to inhibition of NF- κ B activation and autophagy activation[J]. *Autophagy*,2018,14(8):1347-1358.
- [24] KIM B, LEE K Y, PARK B. Icaritin abrogates osteoclast formation through the regulation of the RANKL-mediated TRAF6/NF- κ B/ERK signaling pathway in Raw264.7 cells[J]. *Phytomedicine*,2018,51:181-190.
- [25] KHUSBU F Y, ZHOU X, ROY M, et al. Resveratrol induces depletion of TRAF6 and suppresses prostate cancer cell proliferation and migration[J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2020,118:105644.
- [26] MENG Q, LIANG C, HUA J, et al. A miR-146a-5p/TRAF6/NF- κ B p65 axis regulates pancreatic cancer chemoresistance: functional validation and clinical significance[J]. *Theranostics*,2020,10(9):3967-3979.

收稿日期: 2020-06-14

顾文燕, 吴敏, 李丽. 槲皮黄酮通过抑制Traf6/NF- κ B信号转导通路增强5-氟尿嘧啶对HepG2的化疗作用[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2022,14(1):50-57.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对来稿参考文献格式的要求

本刊执行 GB/T 7714-2015《信息与文献 参考文献著录规则》。采用顺序编码制著录, 依照其在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字标出, 并将序号置于方括号中, 排列于文后。内部刊物、未发表资料(不包括已被接受的待发表资料)、个人通信等请勿作为文献引用, 确需引用时, 可将其在正文相应处注明。日文汉字请按日文规定书写, 勿与我国汉字及简化字混淆。同一文献作者不超过3人全部著录; 超过3人可以只著录前3人, 后依文种加表示“等”的文字。作者姓名一律姓氏在前、名字在后, 外国人的名字采用首字母缩写形式, 缩写名后不加缩写点; 不同作者姓名之间用“,”隔开, 不用“和”、“and”等连词。请于文献题名项后增加标注文献类型标志项目, 示例如下:

[1] 陈登原. 国史旧闻 [M]. 北京: 中华书局, 2000:29.

[2] 袁训来, 陈哲, 肖书海, 等. 蓝田生物群: 一个认识多细胞生物起源和早期演化的新窗口 [J]. *科学通报*, 2012,55(34):3219.

[3] 余建斌. 我们的科技一直在追赶: 访中国工程院院长周济 [N/OL]. *人民日报*, 2013-01-12(2). [2013-03-20]. http://paper.people.com.cn/rmrb/html/2013-01/12/nw.D110000renmrb_20130112_5-02.htm.

本刊编辑部