

# siRNA 干扰即刻早期基因 Egr-1 对汉防己甲素诱导的胰腺癌细胞自噬、凋亡的作用研究

彭琬昕<sup>1</sup>, 万燕雅<sup>2</sup>, 葛璐<sup>1</sup>, 金洁<sup>1</sup>, 龚爱华<sup>1</sup>, 吴朝阳<sup>2</sup>

(1. 江苏大学医学院生物系, 江苏 镇江 212013)

(2. 江苏大学附属人民医院肿瘤放疗科, 江苏 镇江 212013)

**[摘要]** 本实验将胰腺癌细胞 PaTu8988 分别转染无干扰对照组 (siRNA-Scramble) 和干扰即刻早期基因 Egr-1 组 (siRNA-Egr-1), 再用不同浓度的汉防己甲素处理 24 h 后, CCK-8 法检测不同浓度的汉防己甲素对细胞活力的影响; Western blot 检测细胞自噬和凋亡相关蛋白表达水平的改变. 结果表明: (1) 低浓度的汉防己甲素能显著激活 PaTu8988 细胞自噬, 但对增殖和凋亡无明显影响; (2) 与对照组相比, 转染了 siRNA-Egr-1 组自噬相关蛋白 Beclin-1 表达量显著下降, LC3II/LC3I 比值下调; 凋亡相关蛋白 Bcl2/Bax 的比值降低. 上述结果表明, 干扰即刻早期基因 Egr-1 的表达可以有效抑制低浓度汉防己甲素引起的胰腺癌细胞 PaTu8988 自噬, 促进细胞凋亡.

**[关键词]** 胰腺癌, 汉防己甲素, Egr-1, 细胞自噬, 细胞凋亡

**[中图分类号]** R730.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2015)03-0071-05

## Effect of RNA Interference Targeting Egr-1 Inhibite Tetrandrone-Induced Autophagy and Apoptosis of Pancreatic PaTu8988 Cells *in vitro*

Peng Wanxin<sup>1</sup>, WanYanya<sup>2</sup>, Ge Lu<sup>1</sup>, Jin Jie<sup>1</sup>, Gong Aihua<sup>1</sup>, Wu Chaoyang<sup>2</sup>

(1. Department of Biology, School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

(2. Department of Radiation Oncology, Affiliated People's Hospital, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract:** Human pancreatic cancer cells PaTu8988 were transfected with siRNA-Scramble and siRNA-Egr-1 for 24 h respectively, then treated with tetrandrone for another 24 h. Treated by different concentration of tetrandrone, the cytotoxic effect of tetrandrone was examined by CCK-8, and expression of autophagy-related protein were detected by Western blot. The expression of cell autophagy- and apoptosis-related protein were detected by Western blot. All of the results indicated that comparing with control group, siEgr-1 significantly attenuates tetrandrone-induced autophagy and promotes the apoptosis of PaTu8988 cells.

**Key words:** pancreatic cancer, tetrandrone, Egr-1, autophagy, cell apoptosis

胰腺癌是恶性程度极高的消化道肿瘤. 近年来, 我国胰腺癌发病率呈现上升趋势, 居肿瘤死因前 10 位. 大多数患者在确诊时肿瘤已发生转移, 失去根治性手术切除时机, 5 年生存率低, 预后极差<sup>[1,2]</sup>.

汉防己甲素 (tetrandrone, Tet) 是从防己科植物粉防己的块根中提取的一种双萜基异喹啉类生物碱, 具有非常广泛的药理效用, 临床上常用来治疗高血压、肺纤维化、矽肺等疾病. 近年来发现, 汉防己甲素在肿瘤治疗方面也具有很好活性, 可以逆转多药耐受, 较高浓度的汉防己甲素可诱导肺癌、肝癌、淋巴瘤细胞凋亡, 而较低浓度的汉防己甲素对肿瘤细胞存活并无影响. 近年来有研究报道, 低浓度的汉防己甲素可能通过激活细胞自噬引起对肿瘤细胞的保护作用, 抑制凋亡<sup>[3,4]</sup>.

我们前期的研究发现即刻早期因子 Egr-1 对低氧诱导的细胞自噬有明显的促进作用, 并可引起肝癌细胞化疗耐受. 本研究通过特异性 siRNA 干扰 Egr-1 表达, 探讨干扰 Egr-1 对低浓度汉防己甲素引起的胰腺癌细胞 PaTu8988 自噬、凋亡的影响.

收稿日期: 2014-10-05.

基金项目: 国家自然科学基金 (31100964)、江苏省博士后基金 (1402102C)、江苏大学高级人才科研启动基金 (10JDG045).

通讯联系人: 吴朝阳, 博士, 主任医师, 研究方向: 肿瘤耐药时间. E-mail: wuchaoyang9@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞和试剂

人胰腺癌细胞株 PaTu8988 购自美国 ATCC; 汉防己甲素购自 Sigma (T2695) 公司; CCK-8 购自 Promega 公司; 二甲基亚砜 (DMSO) 购自 Amresco 公司; 鼠抗人  $\alpha$  微管蛋白抗体购自 Bioworld; 鼠抗人 Bcl-2、Bax 抗体购自 Santa Cruz 公司; HRP 标记的抗鼠和抗兔的二抗购自上海康成公司。DMEM, 胎牛血清及脂质体 Lipofectamine 2000 转染试剂均购自 Invitrogen 公司。

#### 1.1.2 主要仪器

SW-CJ-1CU 型双人单面净化工作台购自苏州净化设备有限公司; Western-blot 电泳仪、电泳槽、转膜仪、酶标仪购自伯乐公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 细胞培养

人胰腺癌细胞 PaTu8988 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 待细胞处于对数生长期时, 加入不同处理因素后进行检测。

#### 1.2.2 siRNA 转染

取对数生长期的细胞严格按照试剂说明书操作, 采用脂质体 Lipofectamine 2000 转染试剂将 Scramble-siRNA (5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3') 和 Egr-1-siRNA (5'-GCA UAC CAA GAU CCA CUU GCC GUU-3') 分别瞬时转染细胞, 48 h 后 Western blot 检测干扰效果。

#### 1.2.3 细胞增殖实验

PaTu8988 细胞转染 siScramble 和 siEgr-1 24 h 后, 以  $4 \times 10^4$  个/ml 密度接种于 96 孔板 (100  $\mu$ l/孔), 分别加入不同浓度的汉防己甲素 (1  $\mu$ g/mL, 2  $\mu$ g/mL, 2.5  $\mu$ g/mL, 5  $\mu$ g/mL), 以含 0.1% DMSO 的培养液为对照组, 每种处理设 6 个复孔, 处理 24 h 后, 每孔加入 20  $\mu$ l CCK-8 继续孵育 2 h, 终止培养, 在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光度 (OD) 值。

#### 1.2.4 Western blot

RIPA 裂解液冰浴裂解不同处理组细胞, 收集总蛋白。取 50  $\mu$ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 湿转法转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉在室温下封闭 1 h, TBST 洗涤 1 次后加入一抗 (Bcl-2、Bax 以 1:500 稀释,  $\alpha$ -tubulin 以 1:2 000 稀释), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次后加入 HRP 标记的二抗 (1:10 000 稀释), 室温下孵育 1 h, 再以 TBST 漂洗 3 次后, 用化学发光试剂显示阳性条带, 图像分析, 每组实验重复 3 次。

#### 1.2.5 统计学分析

所有实验结果重复 3 次, 用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 并采用单因素方差分析数据,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度的汉防己甲素对胰腺癌细胞 PaTu8988 增殖能力的影响

选取不同浓度的汉防己甲素 (1  $\mu$ g/mL, 4  $\mu$ g/mL, 8  $\mu$ g/mL, 20  $\mu$ g/mL) 处理 PaTu8988 细胞 24 h, CCK-8 检测细胞增殖情况。如图所示 (图 1), 汉防己甲素对 PaTu8988 细胞增殖抑制呈明显的浓度依赖, 低浓度的汉防己甲素对 PaTu8988 细胞增殖抑制作用不明显 ( $p > 0.05$ )。

### 2.2 不同浓度的汉防己甲素对胰腺癌细胞 PaTu8988 自噬、凋亡的影响

选取不同浓度的汉防己甲素 (1  $\mu$ g/mL, 4  $\mu$ g/mL, 8  $\mu$ g/mL)

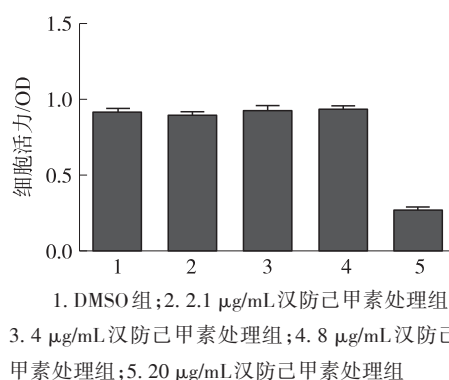


图 1 不同浓度汉防己甲素对 PaTu8988 细胞增殖的影响  
Fig.1 Effect of different concentration of tetrandrine on PaTu8988 cell proliferation

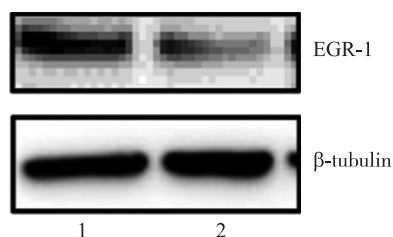
处理PaTu8988细胞24 h, Western blot检测自噬相关蛋白的表达情况. 与DMSO对照组相比, 汉防己甲素能明显上调自噬关键蛋白Beclin-1的表达量, 增加LC3II/LC3I的比值, 并且呈现浓度依赖性; 而凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax的表达量并没有变化(图2), 与上述结果一致.

### 2.3 Western blot检测siEgr-1的干扰效果

PaTu8988细胞转染siScramble和siEgr-1 48 h后, 裂解细胞, Western blot检测Egr-1蛋白表达水平的变化. 结果显示(图3), 与无干扰对照组相比, 干扰了Egr-1组细胞内的Egr-1表达水平明显降低, 说明特异性Egr-1-siRNA能有效抑制PaTu8988细胞Egr-1的表达.

### 2.4 干扰Egr-1对汉防己甲素引起的PaTu8988细胞增殖抑制的促进作用

PaTu8988细胞转染siScramble和siEgr-1 24 h后, 按4 000/孔接种于96孔板, 根据上述实验结果, 选取8  $\mu\text{g/mL}$  汉防己甲素处理细胞, 24 h后, CCK-8检测细胞存活率. 结果显示(图4), 与对照组相比, 干扰Egr-1能显著提高汉防己甲素对PaTu8988细胞的增殖抑制作用, 提高汉防己甲素的抗肿瘤效果.



1. 转染 siRNA-scramble; 2. 转染 siRNA-Egr-1

图3 转染 siRNA-Egr-1 对 Egr-1 蛋白表达的干扰效果

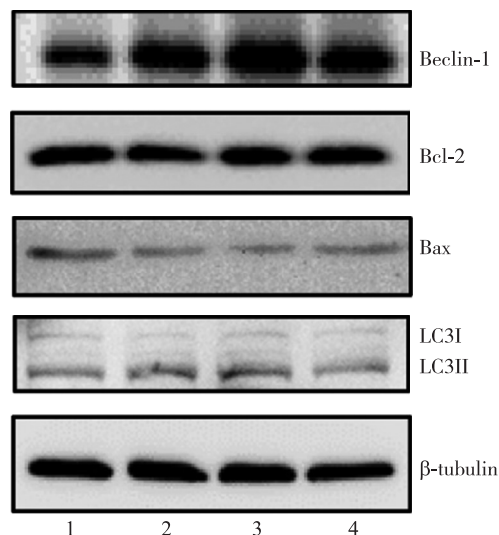
Fig.3 Effect of siRNA-Egr-1 on Egr-1 protein expression

### 2.5 干扰Egr-1抑制汉防己甲素引起的PaTu8988细胞自噬

PaTu8988细胞转染siScramble和siEgr-1 24 h后, 8  $\mu\text{g/mL}$  汉防己甲素处理细胞, 24 h后, 裂解细胞, Western blot检测自噬相关蛋白表达水平的变化. 结果表明, 与转染siScramble的对照组相比, 转染siEgr-1组能显著减低汉防己甲素引起的Beclin-1表达的上调, 降低LC3II/LC3I的比值, 显著抑制细胞自噬.

### 2.6 干扰Egr-1促进汉防己甲素引起的PaTu8988细胞凋亡

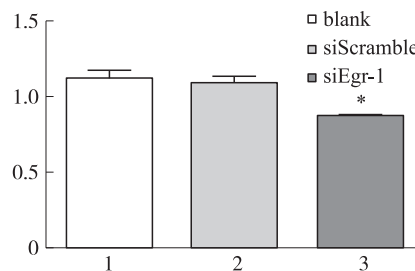
PaTu8988细胞转染siScramble和siEgr-1 24 h后, 8  $\mu\text{g/mL}$  汉防己甲素处理细胞, 24 h后, 裂解细胞, Western blot检测凋亡相关蛋白表达水平的变化. 结果表明, 与转染siScramble的对照组相比, 转染siEgr-1组能显著上调Bax的表达, 同时上调Bcl-2, 降低Bcl-2/Bax的比值, 显著促进细胞凋亡.



1. DMSO组; 2. 1  $\mu\text{g/mL}$  汉防己甲素处理组; 3. 4  $\mu\text{g/mL}$  汉防己甲素处理组; 4. 8  $\mu\text{g/mL}$  汉防己甲素处理组

图2 不同浓度汉防己甲素处理对PaTu8988细胞自噬和凋亡的影响

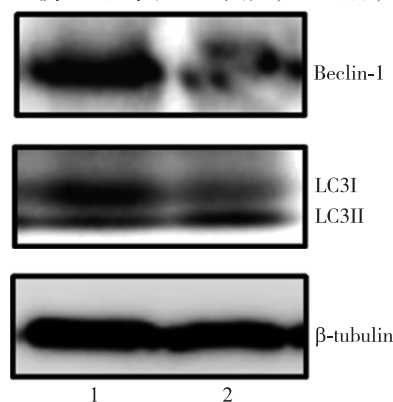
Fig.2 Effect of different concentration of tetrandrine on cell autophagy and apoptosis



1. DMSO; 2. 转染 siScramble; 3. 8  $\mu\text{g/mL}$  汉防己甲素处理. \* $p < 0.05$

图4 转染 siRNA-Egr-1 促进汉防己甲素引起的细胞凋亡

Fig.4 Knockdown of Egr-1 promotes tetrandrine-induced cell apoptosis



1. 转染 siRNA-scramble+汉防己甲素; 2. 转染 siRNA-Egr-1+汉防己甲素

图5 干扰Egr-1抑制汉防己甲素引起的自噬

Fig.5 Knockdown of Egr-1 attenuates tetrandrine-induced autophagy

### 3 讨论

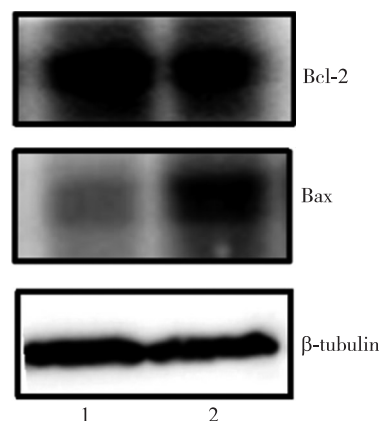
细胞自噬是细胞通过溶酶体途径清除内部一些衰老、无用的细胞器或者错误合成的蛋白质的过程,在进化上高度保守. 已有大量的研究证实,多种疾病的发生发展与细胞自噬的失调有关,尤其是恶性肿瘤<sup>[5]</sup>. 肿瘤细胞自噬是引起肿瘤细胞放、化疗耐受的重要原因<sup>[6-8]</sup>,因此通过调节和抑制自噬进行肿瘤的预防及治疗将成为临床肿瘤治疗的重要策略之一<sup>[9-11]</sup>.

胰腺癌是一种具有高度侵袭性的恶性肿瘤,发病隐匿,大部分患者确诊时已属中晚期,预后极差,对放疗和化疗抵抗,死亡率接近100%,5年生存率低于5%<sup>[12,13]</sup>. 研究证实,胰腺癌的发生、发展对自噬有独特的依赖性. 胰腺癌的原发肿瘤和细胞系在基础状态下呈现出较高的自噬水平,抑制自噬能延长胰腺癌小鼠模型的存活率、极大地减缓瘤体的生长<sup>[14-16]</sup>.

汉防己甲素现又名粉防己碱,是从防己科植物粉防己的块根中提取的双苄基异喹啉类生物碱,是粉防己的主要有效成分. 有文章报道,体外运用较高浓度汉防己甲素不仅能直接抑制肿瘤生长,并且具有诱导肿瘤细胞凋亡、放疗增敏、逆转耐药等作用<sup>[17-19]</sup>. 但同时也有文章报道,低浓度汉防己甲素可诱导肝癌、乳腺癌、宫颈癌细胞自噬,作为一种保护机制拮抗细胞凋亡<sup>[20,21]</sup>,但目前汉防己甲素对胰腺癌细胞自噬的影响未见报道. 本实验中我们采用不同浓度(1  $\mu\text{g/mL}$ , 4  $\mu\text{g/mL}$ , 8  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$ )的汉防己甲素处理胰腺癌细胞 PaTu8988,结果证实低浓度(1  $\mu\text{g/mL}$ , 4  $\mu\text{g/mL}$ , 8  $\mu\text{g/mL}$ )汉防己甲素对细胞增殖无明显抑制作用,但可显著诱导 PaTu8988 自噬,且呈浓度依赖性,同时对细胞凋亡无明显影响.

即刻早期基因 Egr-1 是具有锌指结构的转录因子,能对各种外界刺激,包括血清、缺氧、化疗药物等做出迅速的反应,启动一系列下游基因的表达,调控肿瘤细胞的生长、迁移和化疗耐受<sup>[22,23]</sup>. 并且我们前期的实验证实,即刻早期基因 Egr-1 通过调控自噬引起肝癌化疗耐受. 因此,本次实验采用 siRNA 干扰的方法,抑制 Egr-1 的表达,实验结果显示,转染 siRNA-Egr-1 48 h 能有效地下调 PaTu8988 中内源性 Egr-1 的表达. 不仅如此,干扰 Egr-1 能显著抑制低浓度的汉防己甲素(8  $\mu\text{g/mL}$ )所引起的自噬相关蛋白 Beclin-1 的表达及下调 LC3II/LC3I 的比例,同时上调凋亡相关蛋白 Bax 表达,下调 Bcl-2 表达,降低 Bcl-2/Bax 的比值.

本次实验证实,抑制即刻早期基因 Egr-1 可以有效拮抗汉防己甲素引起的胰腺癌细胞 PaTu8988 的自噬,促进细胞凋亡,提高汉防己甲素的抗肿瘤效果. 目前汉防己甲素的各种抗肿瘤作用研究多局限于基础试验阶段,系统的临床研究尚未见报道. 因此深入了解汉防己甲素引起细胞凋亡、自噬的机制,将为开发出特色有效的抗肿瘤药物提供一定的理论基础.



1. 转染 siRNA-scramble+汉防己甲素; 2. 转染 siRNA-Egr-1+汉防己甲素

图6 干扰 Egr-1 促进汉防己甲素引起的凋亡

Fig.6 Knockdown of Egr-1 attenuates tetrandrine-induced apoptosis

### [参考文献]

- [1] He Y, Zheng R, Li D, et al. Pancreatic cancer incidence and mortality patterns in China, 2011[J]. Chinese Journal of Cancer Research, 2015, 27(1): 29.
- [2] Tang S C, Chen Y C. Novel therapeutic targets for pancreatic cancer[J]. World Journal of Gastroenterology: WJG, 2014, 20(31): 10 825.
- [3] Gong K, Chen C, Zhan Y, et al. Autophagy-related gene 7 (ATG7) and reactive oxygen species/extracellular signal-regulated kinase regulate tetrandrine-induced autophagy in human hepatocellular carcinoma[J]. J Biol Chem, 2012, 287(42): 35 576-35 588.
- [4] Mei L, Chen Y, Wang Z, et al. Synergistic anti-tumour effects of tetrandrine and chloroquine combination therapy in human



- cancer: a potential antagonistic role for p21[J]. Br J Pharmacol, 2015, 172(9): 2 232–2 245.
- [5] Baek K H, Park J, Shin I. Autophagy-regulating small molecules and their therapeutic applications[J]. Chem Soc Rev, 2012, 41(8): 3 245–3 263.
- [6] Li Y, Luo P, Wang J, et al. Autophagy blockade sensitizes the anticancer activity of CA-4 via JNK-Bcl-2 pathway[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2014, 274(2): 319–327.
- [7] Han M W, Lee J C, Choi J Y, et al. Autophagy inhibition can overcome radioresistance in breast cancer cells through suppression of TAK1 activation[J]. Anticancer Research, 2014, 34(3): 1 449–1 455.
- [8] Lorin S, Hamai A, Mehrpour M, et al. Autophagy regulation and its role in cancer[C]//Seminars in Cancer Biology. Manhattan, New York: Academic Press, 2013.
- [9] Steeves M A, Dorsey F C, Cleveland J L. Targeting the autophagy pathway for cancer chemoprevention[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2010, 22(2): 218–225.
- [10] Carew J S, Nawrocki S T, Cleveland J L. Modulating autophagy for therapeutic benefit[J]. Autophagy, 2007, 3(5): 464–467.
- [11] Rubinsztein D C, Gestwicki J E, Murphy L O, et al. Potential therapeutic applications of autophagy[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2007, 6(4): 304–312.
- [12] Li D, Xie K, Wolff R, et al. Pancreatic cancer[J]. The Lancet, 2004, 363(9 414): 1 049–1 057.
- [13] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2010, 60(5): 277–300.
- [14] Yang S, Wang X, Contino G, et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth[J]. Genes & Development, 2011, 25(7): 717–729.
- [15] Kang R, Tang D, Schapiro N E, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) sustains autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival[J]. Cell Death & Differentiation, 2010, 17(4): 666–676.
- [16] Fujii S, Mitsunaga S, Yamazaki M, et al. Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome[J]. Cancer Science, 2008, 99(9): 1 813–1 819.
- [17] Zhu R, Liu T, Tan Z, et al. Tetrandrine induces apoptosis in gallbladder carcinoma *in vitro*[J]. International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2014, 52(10): 900–905.
- [18] Chen L M, Liang Y J, Zhang X, et al. Reversal of P-gp-mediated multidrug resistance by Bromotetrandrine *in vivo* is associated with enhanced accumulation of chemotherapeutic drug in tumor tissue[J]. Anticancer Res, 2009, 29(11): 4 597–4 604.
- [19] Li X, Su B, Liu R, et al. Tetrandrine induces apoptosis and triggers Caspase cascade in human bladder cancer cells[J]. J Surg Res, 2011, 166(1): e45–e51.
- [20] Liu C, Gong K, Mao X, et al. Tetrandrine induces apoptosis by activating reactive oxygen species and repressing Akt activity in human hepatocellular carcinoma[J]. International Journal of Cancer, 2011, 129(6): 1 519–1 531.
- [21] Wang H, Liu T, Li L, et al. Tetrandrine is a potent cell autophagy agonist via activated intracellular reactive oxygen species[J]. Cell & Bioscience, 2015, 5(1): 4–12.
- [22] Lee B S, Kang S, Kim K A, et al. Met degradation by SAIT301, a Met monoclonal antibody, reduces the invasion and migration of nasopharyngeal cancer cells via inhibition of EGR-1 expression[J]. Cell Death & Disease, 2014, 5(4): e1159.
- [23] Sun S, Ning X, Zhai Y, et al. Egr-1 mediates chronic hypoxia-induced renal interstitial fibrosis via the PKC/ERK pathway[J]. American Journal of Nephrology, 2014, 39(5): 436–448.

[责任编辑:黄 敏]