

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.23.009

白藜芦醇上调 BATF2 表达及抑制肝癌细胞增殖的研究*

付晓红,许志臻,钟 丹,吕细林,闫小晶,赵 力,黄 刚[△]
(第三军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

[摘要] **目的** 初步探讨白藜芦醇对 BATF2 表达的调控作用及对肝癌细胞(HepG2)增殖能力的影响。**方法** 用不同剂量的白藜芦醇(终浓度分别为 20、40、80 μmol/L)处理 HepG2 细胞,进行逆转录 PCR(RT-PCR)、实时定量 PCR(Real-time PCR)、Western blot 检测碱性亮氨酸拉链转录因子 2(BATF2) mRNA 和蛋白水平表达的变化,并采用细胞增殖检测试剂(CCK-8)实验检测对细胞增殖能力的影响。**结果** 在 HepG2 细胞中,白藜芦醇能剂量依赖性地诱导 BATF2 在转录和翻译水平的表达,并抑制细胞的增殖($P<0.05$);基因检测发现白藜芦醇显著诱导 BATF2 启动区活性,−244~−152 区域存在白藜芦醇的可能结合位点。**结论** 白藜芦醇能增强 HepG2 细胞中 BATF2 的表达并抑制细胞的增殖,提示上调 BATF2 的表达可能是白藜芦醇抑制肝癌细胞增殖的机制之一。

[关键词] 肝肿瘤;细胞增殖;肝癌细胞;白藜芦醇;碱性亮氨酸拉链转录因子 2
[中图分类号] R394.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)23-3193-03

Resveratrol up-regulates BATF2 expression and inhibits hepatomacell proliferation*
Fu Xiaohong, Xu Zhizhen, Zhong Dan, Lv Xilin, Yan Xiaojing, Zhao Li, Huang Gang[△]
(Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Science, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of resveratrol regulating the expression of BATF2 and the effect of inhibiting hepatoma (HepG2) cell proliferation. **Methods** HepG2 cells were treated with different concentrations (20, 40, 80 μmol/L) resveratrol. RT-PCR, Real-time PCR and Western blotting were used to detect BATF2 mRNA and protein expression levels. Cell viability was measured by CCK-8 assay. **Results** Resveratrol significantly induced the BATF2 mRNA and protein expression levels in a dose-dependent manner. The proliferation of HepG2 cells was suppressed ($P<0.05$). Reporter assays revealed that resveratrol enhanced the transcriptional activity of BATF2 promoter, and the DNA fragment (−244 to −152) in the BATF2 promoter region contained the binding site of transcriptional factor(s) in response to resveratrol. **Conclusion** Up-regulation of BATF2 might be involved in the process of resveratrol inhibiting HepG2 cell proliferation.

[Key words] liver neoplasms; cell proliferation; hepatomacell; resveratrol; BATF2

碱性亮氨酸拉链转录因子 2(BATF2),属于 AP-1 转录因子家族成员^[1],是一种以亮氨酸拉链为基本结构的干扰素,可诱导早期蛋白。在多种正常细胞中广泛高表达,而在相应肿瘤细胞中低表达或不表达,在肿瘤的进程中发挥着重要作用^[2]。白藜芦醇的药理作用相当广泛,具有抗氧化、抗突变等多种生物学活性和药理作用^[3]。近年来,白藜芦醇的抗肿瘤活性日益受到重视,其对肺癌^[4]、乳腺癌^[5-6]、前列腺癌^[7]等多种癌症具有显著抗肿瘤效应。但目前为止,白藜芦醇具体抗癌机制仍未完全明了,尤其是白藜芦醇是否能影响 BATF2 表达,并进而抑制肝癌细胞增殖,目前尚无相关文献报道。因此,本研究以人 HCC 细胞株 HepG2 为模型,采用不同剂量的白藜芦醇处理细胞,检测其对 BATF2 表达和细胞增殖能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 人肝癌 HepG2 细胞株(美国 ATCC),胎牛血清、DMEM 培养基(美国赛默飞公司),白藜芦醇(美国西格玛公司),异硫氰酸胍试剂(Trizol,北京康为世纪公司),琼脂糖、M-MLV 反转录酶(美国英骏公司),rTaq 酶、实时定量 PCR

(Real-time PCR)检测试剂盒(大连宝生物公司),dNTP(美国普洛麦格公司),蛋白酶抑制剂(美国罗氏公司),蛋白抽提试剂盒、聚氧基丙烯酸正丁酯(BCA)检测试剂盒(南京碧云天公司),封闭蛋白干粉(武汉博士德公司),小鼠抗人 β-actin 抗体、兔抗人 BATF2 抗体(美国圣克鲁斯公司),山羊抗小鼠二抗、山羊抗兔二抗(北京中杉公司),聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜)、ECL 化学发光试剂盒(美国赛默飞公司),细胞增殖检测试剂盒(CCK-8,日本同仁化学研究公司)。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和处理 HepG2 细胞常规培养,用含 10% 胎牛血清的改良的 eagle(DMEM)培养基,37℃、5%CO₂ 培养,每 3 天左右换液传代。取对数生长期时细胞,加白藜芦醇处理 24 h 后,进行 Real-time PCR、Western blot 及 CCK-8 检测,所有实验设置相应空白对照,3 次重复。

1.2.2 总 RNA 提取及逆转录 参照文献[8]方法,待细胞培养至对数生长期,按细胞密度为 5×10⁵/孔接种,采用 Trizol 法

* 基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(cstc2016jcyjA2111)。作者简介:付晓红(1983—),实验师,硕士,主要从事核受体与基因表达调控方面研究。 △ 通讯作者,E-mail:cqhuanggang@aliyun.com。

表 1 BATF2 和 β -actin 的引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	用途
BATF2	上游:AGA CCC CAA GGA GCA ACA	RT-PCR、Real-time PCR
	下游:CAG GGC GAG GTT GTC TTT	
β -actin	上游:CCA TGT ACG TTG CTA TCC AGG	RT-PCR
	下游:TCT CCT TAA TGT CAC GCA CGA	
β -actin	上游:GTG AAG GTG ACA GCA GTC GGT	Real-time PCR
	下游:GAA GTG GGG TGG CTT TTA GGA	

提取白藜芦醇处理后的细胞总 RNA，用核酸检测仪测 RNA 浓度，并测定 OD_{260}/OD_{280} 比值，按 M-MLV 说明书进行逆转录反应得到 cDNA。

1.2.3 逆转录 PCR(RT-PCR)检测 采用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 引物序列，由上海英骏公司合成。反应体系按 TaKaRa rTaq 酶说明书进行：模板 cDNA 1 μ L，上下游引物（引物序列见表 1，10 μ mol/L）各 1 μ L，dNTP(2.5 mmol/L)2 μ L，10 $\times$ Buffer（不含 Mg^{2+} ）2.5 μ L， Mg^{2+} （2.5 mmol/L）2 μ L，rTaq 酶 0.2 μ L，以双蒸水(ddH₂O)补齐至 25 μ L。 β -actin 反应程序：95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min；95 $^{\circ}$ C 变性 45 s，60 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s，扩增 26 个循环，4 $^{\circ}$ C 保存。BATF2 反应程序：95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min；95 $^{\circ}$ C 变性 15 s，60 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s，扩增 25 个循环。所获得 PCR 产物进行琼脂糖(1%)凝胶电泳检测，用 Bio-Rad 凝胶成像仪观察电泳结果。

1.2.4 Real-time PCR 检测 取 1.2.2 扩增得到的 cDNA，采用 Real-time PCR 试剂盒测定 BATF2 mRNA 表达水平变化。反应体系为：SYBR Green (2 $\times$) 10 μ L，BATF2 或 β -actin 上下游引物（引物序列见表 1，10 μ mol/L）各 1 μ L，cDNA 1 μ L，补超纯水至 20 μ L，每个样品设置 3 复孔，置 Bio-Rad Real-time PCR 仪扩增，设定反应条件：95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min；95 $^{\circ}$ C 变性 10 s，60 $^{\circ}$ C 退火 30 s，扩增 40 个循环。反应结束后以 Bio-Rad IQ5 软件对结果进行分析，以 β -actin 为内参，计算目的基因的相对表达水平。

1.2.5 Western blot 检测 参照文献[9]方法，用含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液提取总蛋白，按照 BCA 法测定蛋白浓度，蛋白煮沸变性制备浓度为 12% 的胶，每孔上样 50 μ g，恒定电流 100 mA 电泳，转移 1 h 至 PVDF 膜，按照目的蛋白的相对分子质量截取相应大小的 PVDF 膜，37 $^{\circ}$ C 脱脂奶粉封闭 1 h，一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，PBST 洗涤 4 次，8 分钟/次，用相应的二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h，PBST 洗涤 4 次，8 分钟/次，ECL 化学发光显影。

1.2.6 荧光素酶报告基因检测 提取 HepG2 细胞基因组，经 PCR 从中扩增 BATF2 基因启动子区不同长度片段（-975 $\sim$ +184、-413 $\sim$ +184、-244 $\sim$ +184、-152 $\sim$ +184），并构建于 pGL3/basic 荧光素酶报告基因载体，重组报告基因质粒分别命名为 pBATF2/-975、pBATF2/-413、pBATF2/-244、pBATF2/-152。细胞按照一定的密度（1 $\times$ 10⁵/孔）接种于 48 孔板中，转染重组报告基因质粒 6 h 后，加入白藜芦醇（终浓度为 80 μ mol/L）处理 24 h，每孔加入 100 μ L Luciferase 裂解液，分别取 20 μ L 裂解液测定 Luc 值和 β -gal 值，以各孔细胞的 β -gal 值对相应 Luc 值进行标化，设 3 个复孔。

1.2.7 CCK-8 检测 将处于对数生长期的 HepG2 细胞用胰酶消化后，以 2 $\times$ 10⁴/孔的密度，接种于 96 孔培养板中，16 h 后待细胞贴壁成单层后分别加入二甲亚砜(DMSO)和不同浓度的白藜芦醇（终浓度分别为 20、40、80 μ mol/L），37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养 24 h 后，每孔加入 10 μ L CCK-8 检测试剂，继续孵育 2 h 后，用酶标仪测定 450 nm 处 OD 值。设 3 复孔。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5 统计软件分析，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，各组间均数比较用单因素方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 白藜芦醇在转录和翻译水平上诱导 BATF2 的表达
2.1.1 白藜芦醇上调 BATF2 mRNA 的表达 以不同剂量的白藜芦醇（终浓度分别为 20、40、80 μ mol/L）处理 HepG2 细胞。提取总 RNA 并逆转录后，以 RT-PCR 及 Real-time PCR 检测不同浓度的白藜芦醇对 BATF2 mRNA 表达的影响。结果表明，白藜芦醇可在 mRNA 水平上提高 BATF2 的表达，并呈剂量依赖的关系（ $P<0.05$ ），见图 1、2。

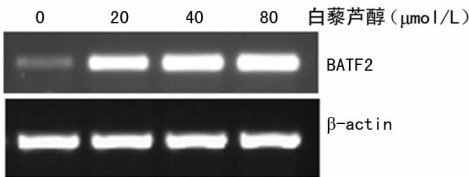
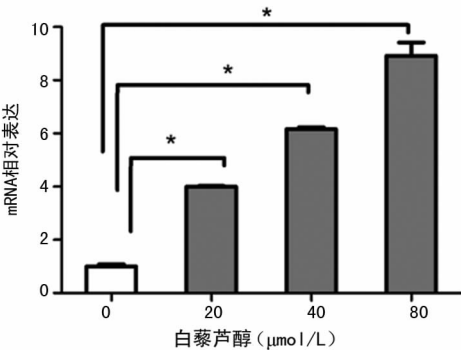


图 1 RT-PCR 检测白藜芦醇对 BATF2 mRNA 表达的影响



* : $P<0.05$ ，与 0 μ mol/L 白藜芦醇比较。

图 2 Real-time PCR 检测白藜芦醇对 BATF2 mRNA 表达的影响

2.1.2 白藜芦醇增强 BATF2 蛋白的表达 提取细胞总蛋白，以 Western blot 检测 BATF2 蛋白水平的表达。随着白藜芦醇浓度的升高，其诱导 BATF2 蛋白表达的作用逐渐增强，

见图 3。

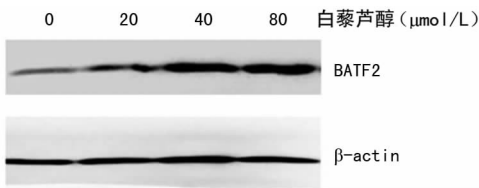


图 3 Western blot 检测白藜芦醇对 BATF2 蛋白表达的影响

2.2 白藜芦醇对 BATF2 启动子区活性的影响 实验结果表明:白藜芦醇能显著促进 pBATF2/-975、pBATF2/-413、pBATF2/-244 的活性,却对 pBATF2/-152 的转录活性没有明显影响,见图 4。该结果表明-244~-152 区域可能是调节 BATF2 表达的转录因子的主要结合区域,白藜芦醇可能对结合在该区域的转录因子有诱导作用。

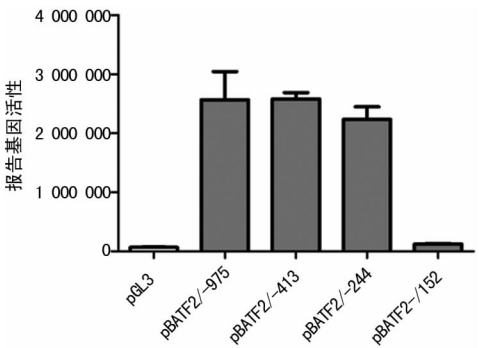


图 4 白藜芦醇在 HepG2 细胞中上调 BATF2 5' 调控区的活性

2.3 白藜芦醇抑制 HepG2 细胞增殖 用终浓度分别为 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇处理细胞 24 h 后,经 CCK-8 检测,结果显示,随着白藜芦醇浓度的升高,细胞数量明显减少($P < 0.05$),见图 5。

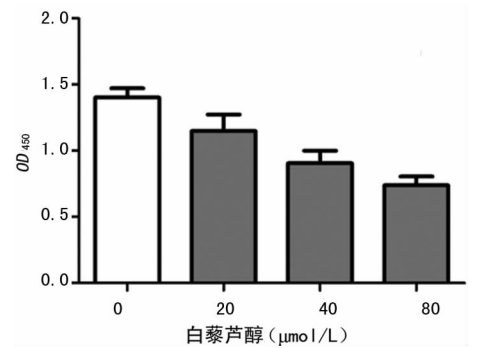


图 5 CCK-8 检测白藜芦醇对 HepG2 细胞的增殖抑制效应

3 讨 论

HCC 是原发性肝癌中最主要,最普遍的一种,其发病凶险,进展速度快,病死率较高,发生、发展的分子机制所知有限^[8,10]。目前已发现许多生物分子在 HCC 的发生、发展中发挥重要作用,其中 BATF2 在抗 HCC 中的作用备受关注,Su 等^[11]发现 BATF2 通过与 AP-1 结合而抑制 AP-1 介导的靶基因转录,如富含半胱氨酸 61(CCN1)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)等基因,进而影响细胞增殖、侵袭等能力^[12-13]。或者是在 p53 介导情况下,BATF2 通

过抑制核因子 κB (NF- κB)的活性而诱导肿瘤细胞凋亡^[14]。此外,BATF2 还可通过激活 GSK-3 β 及 β -catenin 信号通路抑制肺腺癌上皮细胞间质化(EMT),进而促进肿瘤的侵袭和转移^[15]。综上所述,BATF2 已成为一个 HCC 防治的新靶点,上调其基因表达或功能活性,无疑有助于肿瘤治疗,但是目前关于其表达调控的报道较少,具体调控 BATF2 的作用机制仍然未知。

同样,近年研究表明,白藜芦醇对包括 HCC 在内的多种肿瘤细胞具有显著抑制效应。其抗肝癌的主要作用机制是通过 p53 依赖性途径诱导细胞凋亡^[16],Res 诱导 p53 的活化可能涉及细胞外信号调节的 p38 激酶和蛋白激酶(ERK)。白藜芦醇通过影响 Cyclin-CDK 机制^[6],实现对细胞周期的阻滞,抑制肿瘤细胞的增殖^[17-18]。也有发现白藜芦醇可通过降低 MMP-9 的表达水平,抑制癌细胞与细胞外基质纤维蛋白的黏附作用及对基质的降解而达到抗癌细胞侵袭转移的作用。

鉴于二者重要的抗肿瘤功能及相近的效应通路,本研究推测白藜芦醇可能通过调控 BATF2 发挥抗 HCC 作用。因此,本研究通过 RT-PCR、Real-time PCR、Western blot 等实验,证实了白藜芦醇可剂量依赖性地上调 BATF2 在 mRNA 水平和蛋白水平的表达。通过 CCK-8 实验,证实了白藜芦醇明显抑制 HepG2 细胞的增殖。报告基因实验显示白藜芦醇可显著促进 BATF2 启动子的转录活性,-244~-152 区域可能包含有可调节 BATF2 表达的转录因子的结合位点。

本研究结果提示通过上调 BATF 表达进而抑制细胞增殖可能是白藜芦醇抗肝癌的一个新机制,这一方面丰富了 BATF2 自身表达调控的机制,为探索以 BATF2 为靶点的肝癌防治提供了新的候选策略;另一方面也为深入揭示白藜芦醇的抗肝癌机制提供了一定理论依据和实验基础。

参考文献

[1] Guler R,Roy S,Suzuki H,et al. Targeting Batf2 for infectious diseases and cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6 (29): 26575-26582.

[2] Liu Z,Yang Y,Zhou X. BATF2 in human colorectal cancer[J]. Aging (Albany NY), 2015, 7(5): 284-285.

[3] Albuquerque RV, Malcher NS, Amado LL, et al. In Vitro Protective Effect and Antioxidant Mechanism of Resveratrol Induced by Dapsone Hydroxylamine in Human Cells [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e134768.

[4] Sadarani BN, Majumdar AS. Resveratrol potentiates the effect of dexamethasone in rat model of acute lung inflammation [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 28(1): 773-779.

[5] Chin YT, Hsieh MT, Yang SH, et al. Anti-proliferative and gene expression actions of resveratrol in breast cancer cells in vitro[J]. Oncotarget, 2014, 5(24): 12891-12907.

[6] Khan A, Aljarbou AN, Aldebasi YH, et al. Resveratrol suppresses the proliferation of breast cancer cells by inhibiting fatty acid synthase signaling pathway[J]. Cancer Epidemiol, 2014, 38(6): 765-772.

[7] Lee MH, Kundu JK, Keum YS, et al. Resveratrol inhibits iL-6-induced transcriptional activity of AR(下转第 3200 页)

- 模型中支抗稳定性的研究[J]. 口腔医学研究, 2011, 27(3):183-186.
- [7] Meguro R, Asano Y, Odagiri S, et al. Nonheme-iron histochemistry for light and electron microscopy: a historical, theoretical and technical review[J]. Arch Histol Cytol, 2007, 70(1):1-19.
- [8] Waldvogel-Abramowski S, Waeber G, Gassner C, et al. Physiology of Iron metabolism[J]. Transfus Med Hemoth, 2014, 41(3):213-221.
- [9] De Campos Mazo DF, De Vasconcelos GB, Pereira MA, et al. Clinical spectrum and therapeutic approach to hepatocellular injury in patients with hyperthyroidism[J]. Clin Exp Gastroenterol, 2013(6):9-17.
- [10] Liew CF, Cheah JS. Thyrotoxicosis-induced hyperferritinaemia[J]. Hosp Med, 2003, 64(2):114.
- [11] 孔卫娜, 段相林, 常彦忠. 单核巨噬细胞系统铁代谢调控机制[J]. 自然科学进展, 2008, 18(6):615-621.
- [12] Immenschuh S, Baumgart-Vogt E, Tan M, et al. Differential cellular and subcellular localization of heme-binding protein 23/peroxiredoxin I and heme oxygenase-1 in rat liver[J]. J Histochem Cytochem, 2003, 51(12):1621-1631.
- [13] Knutson M, Wessling-Resnick M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2003, 38(1):61-88.
- [14] Wegiel B, Nemeth Z, Correa-Costa M, et al. Heme oxygenase-1: a metabolic nuke[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(11):1709-1722.
- [15] Sass G, Barikbin R, Tiegs G. The multiple functions of heme oxygenase-1 in the liver[J]. Z Gastroenterol, 2012, 50(1):34-40.
- [16] Farombi EO, Surh YJ. Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection[J]. J Biochem Mol Biol, 2006, 39(5):479-491.
- [17] 杨明, 陈晓春. 血红素氧合酶与肝脏氧化应激[J]. 福建医科大学学报, 2008, 42(4):380-383.
- [18] Origassa CS, Câmara NO. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 and heme degradation derived end products in liver injury[J]. World J Hepatol, 2013, 5(10):541-549.
- [19] Yücel R, Ozdemir S, Dar'yerli N, et al. Erythrocyte osmotic fragility and lipid peroxidation in experimental hyperthyroidism[J]. Endocrine, 2009, 36(3):498-502.
- (收稿日期:2016-04-24 修回日期:2016-06-23)
- (上接第 3195 页)
- and STAT3 in human prostate cancer LNCaP-FGC cells[J]. Biomol Ther (Seoul), 2014, 22(5):426-430.
- [8] Burra P, Zanetto A, Rodriguez-Castro KI. HCC criteria for liver transplantation: controversies[J]. Liver Transpl, 2015, 21S(1):S27-31.
- [9] He F, Li J, Mu Y, et al. Downregulation of endothelin-1 by farnesoid X receptor in vascular endothelial cells[J]. Circ Res, 2006, 98(2):192-199.
- [10] Lee KW, Seo YD, Oh SC, et al. What is the best immunosuppressant combination in terms of anti-tumor effect in HCC[J]. Hepatol Res, 2016, 46(6):593-600.
- [11] Su ZZ, Lee SG, Emdad L, et al. Cloning and characterization of SARI (suppressor of AP-1, regulated by IFN)[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(52):20906-20911.
- [12] Schraml BU, Hildner K, Ise W, et al. The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation[J]. Nature, 2009, 460(7253):405-409.
- [13] Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle[J]. Cell, 2002, 109 Suppl:S81-96.
- [14] Ma H, Liang X, Chen Y, et al. Decreased expression of BATF2 is associated with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 2011, 128(4):771-777.
- [15] Grant CM, Kyprianou N. Epithelial mesenchymal transition (EMT) in prostate growth and tumor progression[J]. Transl Androl Urol, 2013, 2(3):202-211.
- [16] Harikumar KB, Kunnumakkara AB, Sethi G, et al. Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine in vitro and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer[J]. Int J Cancer, 2010, 127(2):257-268.
- [17] Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies[J]. Anticancer Res, 2004, 24(5A):2783-2840.
- [18] Kuo PL, Chiang LC, Lin CC. Resveratrol-induced apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in Hep G2 cells[J]. Life Sci, 2002, 72(1):23-34.
- (收稿日期:2016-04-18 修回日期:2016-06-27)

《重庆医学》对临床研究论文医学伦理学要求

凡投本刊的临床研究论文(主体是以人为研究对象),作者应说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位性的、地区性的或国家性的)所制订的伦理学标准,并提供(上传)该委员会的批准文件复印件及受试对象或其亲属的知情同意书复印件。

《重庆医学》编辑部