

敲低 NOD2 通过调控(p)NF- κ B/STAT3 改善肝细胞癌细胞炎症反应^{*}

赵亮¹ 艾尔哈提·胡赛音¹ 布祖克拉·阿布都艾尼² 王锦秋¹ 亚力坤·赛来¹

(新疆医科大学第一附属医院 1. 全科医学科(普通外科); 2. 重症二科, 新疆 乌鲁木齐 830054)

【摘要】 目的 探讨核苷酸结合寡聚化结构域蛋白 2(NOD2)对肝细胞癌(HCC)细胞炎症反应的影响和机制。方法 培养 HCC 细胞。Western blot 检测 NOD2 在 HCC 细胞和正常肝细胞中的表达水平。利用小干扰 RNA(siRNA)建立 NOD2 的敲低 RNA(siNOD2 组)用来抑制 NOD2 的表达,阴性对照为 siNC 组,使用这二者处理 HCC 细胞。CCK-8 法检测细胞增殖率,流式细胞术检测细胞凋亡率。Western blot 检测 NF- κ B P65、STAT3、NOD2 的表达,并检测磷酸化的(p-)NF- κ B P65 以及磷酸化的(p-)STAT3 的表达水平。ELISA 法测定培养 HCC 细胞培养物上清液中 TNF- α 、IL-12、IL-6、IFN- γ 质量浓度的变化。在 siNOD2 处理 HCC 细胞的基础上,用 NF- κ B/STAT3 的激活剂重组人 Lipocalin-2(rhLipocalin-2)蛋白进行处理(siNOD2+rhLipocalin-2 组),检测细胞增殖率、凋亡率和炎症因子水平。结果 与正常肝细胞相比,HCC 细胞中 NOD2 的表达水平显著上调($P < 0.05$)。与 siNC 组相比,siNOD2 组的 NOD2、p-NF- κ B P65 及 p-STAT3 的表达水平均显著下调、细胞增殖率降低,细胞凋亡率增高,且细胞培养物上清液中 TNF- α 、IL-12、IL-6、IFN- γ 水平均下调(均 $P < 0.05$)。而与 siNOD2 组相比,siNOD2+rhLipocalin-2 组的 p-NF- κ B P65 及 p-STAT3 的表达水平均显著上调,细胞增殖率增高,细胞凋亡率降低,且细胞培养物上清液中 TNF- α 、IL-12、IL-6、IFN- γ 水平均上调(均 $P < 0.05$)。结论 敲低 NOD2 通过调控 NF- κ B/STAT3 通路抑制 HCC 细胞的炎症反应,该结果为 HCC 治疗提供了一个新的潜在靶点。

【关键词】 肝细胞癌;核因子- κ B/信号转导与转录激活因子 3;核苷酸结合寡聚化结构域蛋白 2;炎症反应

【中图分类号】 R735.7;R392.1 **【文献标志码】** A DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 07. 005

Knockdown of NOD2 improves inflammatory response in hepatocellular carcinoma cells by regulating (p)NF- κ B/STAT3

ZHAO Liang¹, AIERHATI Husaiyin¹, BUZUKELA Abduaini², WANG Jinqiu¹, YALIKUN Sailai¹

(1. Department of General Medicine, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China;

2. The Second Department of Intensive Care, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of inhibiting the activation of nucleotide binding oligomerization domain protein 2 (NOD2) on inflammatory response of hepatocellular carcinoma cells. **Methods** Hepatocellular carcinoma cells were cultured. Western blot was used to detect NOD2 expression in hepatocellular carcinoma cells and normal hepatocytes. Small interfering RNA (siRNA) was used to establish NOD2 knockdown agents (siNOD2 group) to inhibit NOD2 expression, while the negative control group was siNC group, and hepatocellular carcinoma cells were treated. Cell proliferation rate was measured by CCK-8 method and apoptosis rate was measured by flow cytometry. The expressions of NF- κ B P65, STAT3 and NOD2 were detected by Western blot, and the expression levels of phosphorylated (P-) NF- κ B P65 and phosphorylated (P-) STAT3 were detected. The concentrations of TNF- α , IL-12, IL-6 and IFN- γ in supernatant of hepatocellular carcinoma cell culture were determined by ELISA. On the basis of siNOD2 treatment, hepatocellular carcinoma cells were treated with NF- κ B/STAT3 activator recombinant human lipocalin-2 protein

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2021D01C309)

通讯作者:亚力坤·赛来,主任医师,E-mail:yalkun700909@sohu.com

引用本文:赵亮,艾尔哈提·胡赛音,布祖克拉·阿布都艾尼,等.敲低 NOD2 通过调控(p)NF- κ B/STAT3 改善肝细胞癌细胞炎症反应[J].西部医学,2023,35(7):964-969. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 07. 005

(siNOD2+ rhLipocalin-2 group). The proliferation rate, apoptosis rate and inflammatory factor levels of hepatocellular carcinoma cells were measured. **Results** Compared with normal hepatocytes, NOD2 expression level in hepatocellular carcinoma cells was significantly up-regulated ($P < 0.05$). Compared with siNC group, NOD2, P-NF- κ B P65 and P-STAT3 expression levels in siNOD2 group were significantly down-regulated (all $P < 0.05$), cell proliferation rate was decreased ($P < 0.05$), and cell apoptosis rate was increased ($P < 0.05$). The levels of TNF- α , IL-12, IL-6 and IFN- γ in supernatant of cell culture were down-regulated (all $P < 0.05$). Compared with siNOD2 group, the expression levels of P-NF- κ B P65 and P-STAT3 in siNOD2+ rhLipocalin-2 group were significantly up-regulated (all $P < 0.05$), the cell proliferation rate was increased ($P < 0.05$), and the cell apoptosis rate was decreased ($P < 0.05$). The levels of TNF- α , IL-12, IL-6 and IFN- γ in supernatant of cell culture were up-regulated (all $P < 0.05$). **Conclusion** NOD2 knockdown inhibits the inflammatory response of hepatocellular carcinoma cells by regulating the NF- κ B/STAT3 pathway, providing a new potential target for HCC treatment.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; Nuclear factor- κ B/ Signal transduction and transcription activator 3; Nucleotide binding oligomerization domain protein 2; Inflammatory response

肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是世界范围内最常见的癌症之一,每年因 HCC 死亡的人数超过 78 万^[1-2]。尽管近年来 HCC 治疗手段取得了很大进展,但疗效仍不理想,患者 5 年生存率低^[3]。越来越多的研究表明,HCC 与慢性炎症有关^[4]。因此,阐明炎症在 HCC 进展中的分子机制有助于寻找新的 HCC 治疗靶点。促进肿瘤炎症和躲避免疫检查点是癌症的关键特征^[5-6]。肿瘤微环境中的炎症不仅会促进肿瘤细胞的增殖和转移,还会引发化疗耐药性^[7]。肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)和转化生长因子 β (TGF- β)等细胞因子是肿瘤微环境中负责细胞间交换的主要介质^[8]。研究表明 IL-6 是促进 HCC 进展的核心因素之一^[9]。目前,虽然探索肿瘤相关炎症反应的病理机制备受关注,但炎症相关 HCC 进展的分子机制仍不明确。寡聚化结构域蛋白 2(NOD2)属于 NOD 样受体家族的一员,能引起细菌感染后的先天免疫反应。研究表明,NOD2 的失调参与了结肠炎相关结肠癌的发病机制^[10]。另外,NOD2 基因多态性与淋巴瘤、结直肠癌、胃癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌和喉癌的风险增加均有关^[11]。有报道称,NOD2 激动剂能激活肿瘤微环境中免疫细胞的细胞毒性潜能,从而促进它们与癌细胞的接触^[12]。然而,NOD2 在 HCC 中的确切作用仍不明确。基于此,本研究旨在探讨 NOD2 在炎症相关 HCC 细胞进展中的作用及其潜在机制,预期为 HCC 治疗提供一个新的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 人肝癌细胞 Hep3B、Huh-7 和人正常肝细胞 HHL-5 均购于美国模式培养物保藏所(American type culture collection, ATCC)。siRNA 由上海 GenePharma 有限公司合成。重组人 Lipocalin-2(rhLipocalin-2)蛋白购于英国 Abcam 公司。RPMI 1640 培养基购于美国 GIBCO 公司;CCK-8 细

胞增殖/毒性检测试剂盒购于北京全式金生物公司;Lipofectamine 3000 Transfection Reagent 购于美国 Thermo Fisher 公司(L3000-008);Annexin V /PI 试剂盒购于美国 BD 公司;TRIzol™ Reagent 购于美国 ambion 公司;Easy II Protein Quantitative Kit (BCA) 购于北京全式金公司;RIPA 裂解液购于美国博士德公司;山羊抗兔 IgG H&L (HRP)、山羊抗小鼠 IgG H&L (HRP)(ab205719)购于英国 Abcam 公司。

1.2 细胞培养 将 10 mL 的胎牛血清加入 90 mL 的 RPMI 1640 培养基中,添加 1 mL 的青-链霉素双抗溶液配制含 RPMI 1640 培养基用于培养人肝癌细胞 Hep3B、Huh-7 和人正常肝细胞 HHL-5。

1.3 细胞转染 取生长状态良好汇合率达 90% 的 Hep3B 和 Huh-7 细胞,胰酶消化细胞后,用无抗生素的培养基制备成 5×10^4 cells/mL 单细胞悬液,接种至 24 孔板中,500 μ L/孔,置 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、5%CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h。取 4 个 2 mL 的 EP 管设为 A、B、C、D 管,向 A 管中加入 25 μ L 无血清、无抗生素的培养基和 0.35 μ L Lipofectamine® 3000 试剂,轻轻混匀。向 B 管中加入 25 μ L 无血清、无抗生素的培养基和 0.75 μ L Lipofectamine® 3000 试剂,轻轻混匀。向 C 管中加入 50 μ L 的无血清无抗生素的培养基、1 μ g siNC、2 μ L P3000™ 试剂,柔和混匀。向 D 管中加入 50 μ L 的无血清无抗生素的培养基、1 μ g siNOD2、2 μ L P3000™ 试剂,柔和混匀。将各组培养基加入含 Hep3B 和 Huh-7 细胞的培养基中,置 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、5%CO₂ 细胞培养箱中继续培养 24 h。Hep3B 和 Huh-7 细胞分组为:阴性对照为 siNC 组,NOD2 的敲低组(siNOD2 组),以及 NF- κ B/STAT3 的激活剂重组人 Lipocalin-2(rhLipocalin-2)蛋白联合作用组(siNOD2+rhLipocalin-2 组)。

1.4 Western blot 检测 根据制造商的说明,用总蛋

白提取试剂盒 (Beyotime) 提取各组细胞总蛋白。参考 Zhang 等^[13] 发表的研究, 对全细胞裂解物进行 SDS-PAGE 和蛋白免疫印迹实验。转膜后, 用 5% 脱脂牛奶封闭, 并将膜与 STAT3 (1:500)、磷酸化 STAT 3 (p-STAT 3) (1:500)、GAPDH (1:2000)、P65 (1:500)、磷酸化 P65 (p-P65) (1:500)、NOD2 (1:800) 的一抗在 4 °C 下孵育过夜。然后将膜与 HRP 标记的二抗 (1:5000) 在 37 °C 下孵育 1 h。ECL 系统用于显示蛋白条带, ImageJ-lab 3.0 版用于分析条带强度。

1.5 定量实时 PCR (qRT-PCR) 根据既往研究^[14] 所述, 提取 HCC 细胞的总 RNA, 逆转录成 cDNA, 然后用于进行 qRT-PCR。列出了 NOD2、IL-6、TNF α 、IL-1 β 、IL-8、IL-10、Bcl-xl、cyclin D、Mcl1 和 GAPDH 的 qRT-PCR 引物。将获得的数据以 GAPDH 表达为内参进行处理, 分析每个样本中的水平, 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列
NOD2	F: 5'-TGCCTCGGGAACAGTAAGAC-3' R: 5'-GCCGCCCTCTCCATTAAAC-3'
siNOD2	5'-TCGAAGATTGAGGACTACTTTCC-3'
siNC	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
GAPDH	F: 5'-TCAACAGCAACTCCCACTCTTCCA-3' R: 5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCGTATTCA-3'

1.6 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 细胞按照 1.3 中进行处理, 并根据制造商的说明, 收集各组培养上清液, 使用 ELISA 试剂盒检测 TNF- α 、IL-12、IL-6、IFN- γ 蛋白表达水平。

1.7 CCK-8 检测细胞增殖 10% CCK-8 溶液配制: 按照 CCK-8 与完全培养基 1:9 比例配制 10% CCK-8 检测溶液。取生长状态良好汇合率达 90% 的肝癌细胞, 胰酶消化细胞后, 用完全培养基制备成 5×10^4

cells/mL 单细胞悬液, 接种至 96 孔板中 ($100 \mu\text{L}/\text{孔}$, 即 5×10^3 cells/孔), 37 °C、5% CO₂ 培养 24 h 贴壁后, 弃去培养基, 按照 1.3 实验分组进行转染, 每组重复 5 次。干预完成后, 弃去培养基, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 配置好的 10% CCK-8 溶液, 继续在培养箱中孵育, 2 h 后用酶标仪测定 450 nm 处的 OD 值。

1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡 按 1.3 实验分组干预细胞, 将每组细胞瓶内的培养液吸出至离心管内, PBS 洗涤贴壁细胞两次, 将 PBS 一并收集至离心管内; 胰酶消化细胞, 将细胞转移至离心管内, 1000 rpm 离心 5 min, 弃上清。用预冷的 PBS 洗涤 2 遍, 弃上清。加入 $500 \mu\text{L}$ 1 $\times$ Binding Buffer 重悬细胞, 过 200 目筛网, 制成单细胞悬液。每管加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V 和 $10 \mu\text{L}$ PI, 轻轻混匀, 4 °C 避光放置 10 min。在 30 min 内进行流式细胞仪检测。

1.9 统计学分析 使用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析。所有结果均采用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。通过 t 检验确定符合正态分布数据的两组组间的统计学显著差异。3 组及以上的组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NOD2 在 HCC 组织和细胞中的表达 为确定 NOD2 在 HCC 发展中的作用, 本研究观察了 NOD2 在 HCC 组织中以及 HCC 细胞中的表达。首先, TCGA 数据库收录的 374 例 HCC 组织 (Cancer 组) 和 50 例健康组织 (Normal 组) 中, NOD2 在 Cancer 组中的表达水平显著高于 Normal 组 ($P < 0.05$)。进一步检测 NOD2 在人 HCC 细胞系 Hep3B 和 Huh-7 细胞中的蛋白表达水平, 与正常人胚胎肝细胞 HHL-5 相比, NOD2 在 Hep3B 和 Huh-7 中的表达均明显增加 ($P < 0.05$)。见图 1、表 2。

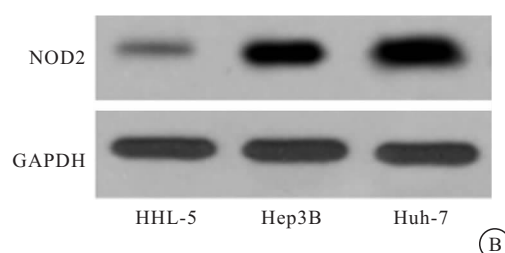
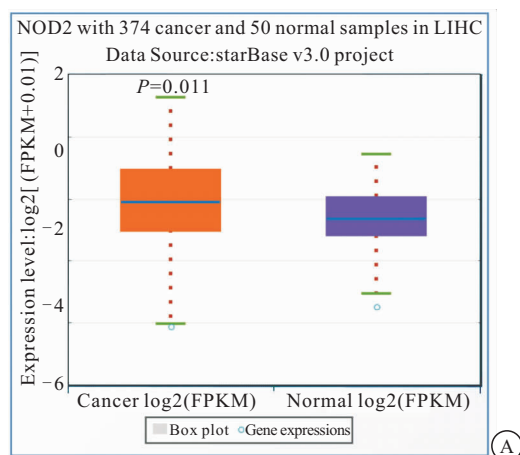


图 1 NOD2 在 HCC 组织及细胞中的表达

Figure 1 Expression of NOD2 in HCC tissues and cells

注: A. TCGA 数据库中 NOD2 在肝癌和健康组织中的表达对比; B. Western blot 检测 NOD2 在 HHL-5、Hep3B 和 Huh-7 中的表达条带。

表 2 HHL-5、Hep3B 和 Huh-7 细胞中 NOD2 的表达分析($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 2 Expression analysis of NOD2 in HHL-5, Hep3B and Huh-7 cells

组别	相对表达水平
HHL-5	1.00±0.11
Hep3B	6.82±0.51 ^①
Huh-7	5.31±0.48 ^①

注:与 HHL-5 组相比,① $P<0.05$ 。

2.2 敲低 NOD2 抑制 HCC 细胞的增殖活性并促进凋亡 为确定 NOD2 是否影响 HCC 细胞的发展,检测敲低 NOD2 处理的 Hep3B 和 Huh-7 细胞的增殖。与 siNC 组细胞比较,siNOD2 组的细胞增殖率明显降低($P<0.05$),并表现出更多的凋亡细胞($P<0.05$)。见表 3、表 4、图 2。

表 3 敲低 NOD2 对 Hep3B 和 Huh-7 细胞增殖率的影响($\bar{x} \pm s, \times 10^{-2}, n=3$)
Table 3 Effects of knockdown of NOD2 on the proliferation rate of Hep3B and Huh-7 cells

组别	Hep3B	Huh-7
siNC 组	92.99±3.11	97.99±4.35
siNOD2 组	38.69±4.51 ^①	42.16±6.01 ^①

注:与 siNC 组相比,① $P<0.05$ 。

表 4 敲低 NOD2 对 Hep3B 和 Huh-7 细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, \times 10^{-2}, n=3$)
Table 4 Effect of knockdown of NOD2 on apoptosis rate of Hep3B and Huh-7 cells

组别	Hep3B	Huh-7
siNC 组	1.63±0.25	2.10±0.08
siNOD2 组	15.11±0.72 ^①	19.25±0.67 ^①

注:与 siNC 组相比,① $P<0.05$ 。

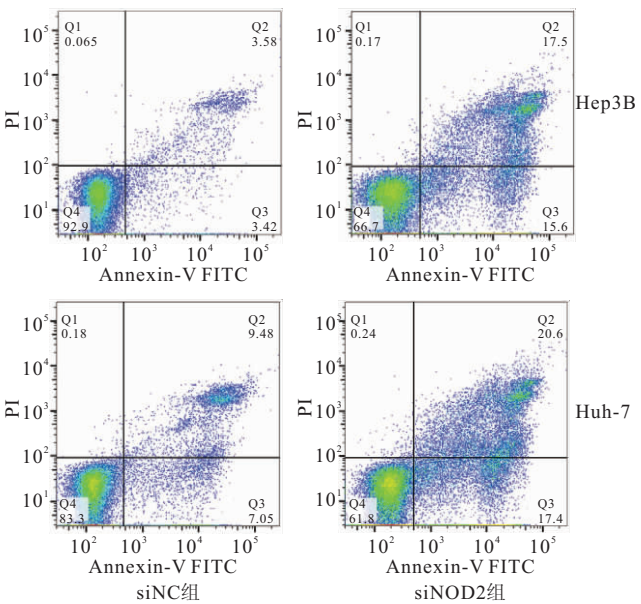


图 2 流式细胞术检测敲低 NOD2 后 HCC 细胞的凋亡率
Figure 2 Apoptosis rate of HCC cells after knockdown of NOD2 detected by flow cytometry

2.3 敲低 NOD2 减弱 HCC 细胞的炎症反应 对 Hep3B 和 Huh-7 细胞中炎症细胞因子(IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ)进行检测,结果显示,与 siNC 组细胞比较,siNOD2 组的细胞 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 的水平均明显降低($P<0.05$),见表 5、表 6。

表 5 敲低 NOD2 对 Hep3B 细胞炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n=3, \text{ng/mL}$)
Table 5 Effects of NOD2 knockdown on inflammatory factors in Hep3B cells

组别	IL-6	TNF- α	IL-1 β	IFN- γ
siNC 组	243.63±15.99	362.85±41.08	175.33±12.85	183.62±8.89
siNOD2 组	29.25±5.33 ^①	46.15±6.25 ^①	29.03±5.24 ^①	23.55±7.57 ^①

注:与 siNC 组相比,① $P<0.05$ 。

表 6 敲低 NOD2 对 Huh-7 细胞炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n=3, \text{ng/mL}$)
Table 6 Effects of NOD2 knockdown on inflammatory factors in Huh-7 cells

组别	IL-6	TNF- α	IL-1 β	IFN- γ
siNC 组	309.22±30.58	196.28±18.62	208.45±16.88	188.53±9.88
siNOD2 组	42.08±5.33 ^①	33.45±3.96 ^①	36.08±2.17 ^①	22.13±2.66 ^①

注:与 siNC 组相比,① $P<0.05$ 。

2.4 敲低 NOD2 抑制 HCC 细胞中的 NF- κ B (p65)/STAT3 信号激活 NF- κ B (p65)/STAT3 是一种关键的细胞内促炎途径。TCGA 数据库中 HCC 组织中 NOD2 和 NF- κ B (p65)基因以及 STAT3 基因均呈现显著正相关关系。而与 siNC 组细胞比较,siNOD2 组的细胞中 p-NF- κ B (p65)、p-STAT3 的表达水平均明显降低($P<0.05$)。见表 7、表 8、图 3A~C。

表 7 敲低 NOD2 抑制 Hep3B 细胞 NF- κ B (p65)/STAT3 信号蛋白的相对表达($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 7 Knockdown of NOD2 inhibits the relative expression of NF- κ B (p65)/STAT3 signaling protein in Hep3B cells

组别	NF- κ B p65	NF- κ B p-p65	STAT3	p-STAT3
siNC 组	1.00±0.09	1.00±0.08	1.00±0.10	1.00±0.05
siNOD2 组	0.97±0.09	0.39±0.02 ^①	1.02±0.07	0.33±0.03 ^①

注:与 siNC 组相比,① $P<0.05$ 。

表 8 敲低 NOD2 抑制 Huh-7 细胞 NF- κ B (p65)/STAT3 信号蛋白的相对表达($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 8 Knockdown of NOD2 inhibits the relative expression of NF- κ B (p65)/STAT3 signaling protein in Huh-7 cells

组别	NF- κ B p65	NF- κ B p-p65	STAT3	p-STAT3
siNC 组	1.00±0.10	1.00±0.11	1.00±0.08	1.00±0.09
siNOD2 组	0.98±0.07	0.40±0.07 ^①	1.00±0.09	0.21±0.05 ^①

注:与 siNC 组相比,① $P<0.05$ 。

2.5 HCC 细胞中 NOD2 以依赖 NF- κ B/STAT3 信号激活的方式增强炎症反应 重组人 Lipocalin-2(rh-Lipocalin-2)蛋白是 NF- κ B/STAT3 的激活剂。首先,

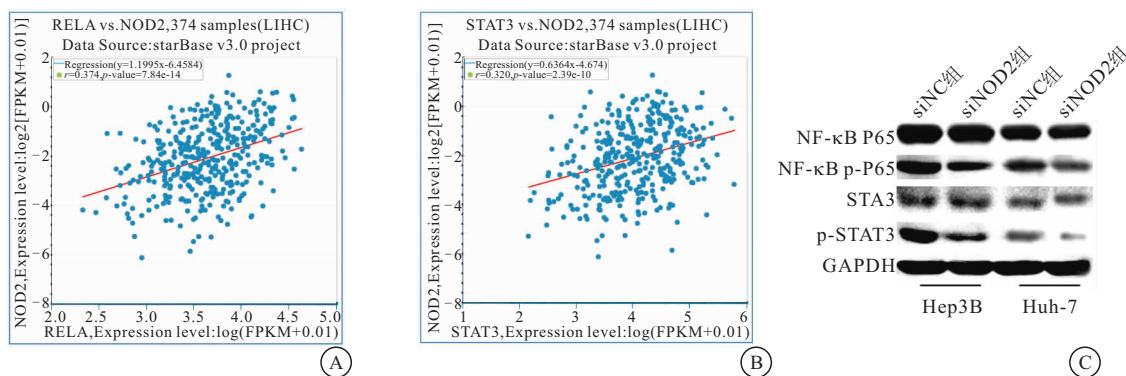


图3 HCC中NOD2与NF-κB (p65)/STAT3的相关性及敲低NOD2对HCC细胞中的NF-κB (p65)/STAT3信号表达的影响

Figure 3 The correlation between NOD2 and NF-κB (p65)/STAT3 in liver cancer and the effect of knockdown of NOD2 on the expression of NF-κB (p65)/STAT3 in hepatocellular carcinoma cells

注:A. NOD2与NF-κB (p65)的相关性;B. NOD2与STAT3的相关性;C. Western blot检测细胞中敲低NOD2对HCC细胞中的NF-κB (p65)/STAT3信号表达的影响。

在Hep3B与Huh-7细胞中,与siNC组比,siNOD2组中NOD2的蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$);而rh-Lipocalin-2对NOD2表达的影响不明显,差异无统计

学意义($P > 0.05$)。其次,本研究还观察到rhLipocalin-2可明显恢复被siNOD2所抑制的炎症因子(IL-6、TNF-α、IL-1β和IFN-γ)。见表9、表10。

表9 重新激活NF-κB/STAT3对Hep3B细胞炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 9 Effects of reactivation of NF-κB/STAT3 on inflammatory factors in Hep3B cells

组别	NOD2(/siNC)	IL-6(ng/mL)	TNF-α(ng/mL)	IL-1β(ng/mL)	IFN-γ(ng/mL)
siNC组	1.00±0.00	243.63±15.99	362.85±41.08	175.33±12.85	183.62±8.89
siNOD2组	0.13±0.01 ^①	29.25±5.33 ^①	36.15±6.25 ^①	39.03±5.24 ^①	23.55±7.57 ^①
siNOD2+rhLipocalin-2组	0.12±0.01 ^①	206.78±14.09 ^{①②}	212.84±15.77 ^{①②}	109.54±10.66 ^{①②}	72.36±4.55 ^{①②}

注:与siNC组相比,① $P < 0.05$;与siNOD2组相比,② $P < 0.05$ 。

表10 重新激活NF-κB/STAT3对Huh-7细胞炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Effects of reactivation of NF-κB/STAT3 on inflammatory factors in Huh-7 cells

组别	NOD2(/siNC)	IL-6(ng/mL)	TNF-α(ng/mL)	IL-1β(ng/mL)	IFN-γ(ng/mL)
siNC组	1.00±0.00	309.22±30.58	196.28±18.62	208.45±16.88	188.53±9.88
siNOD2组	0.15±0.04 ^①	32.08±5.33 ^①	33.45±3.96 ^①	26.08±2.17 ^①	42.13±2.66 ^①
siNOD2+rhLipocalin-2组	0.15±0.03 ^{①②}	199.33±25.11 ^{①②}	112.47±21.40 ^{①②}	115.36±5.63 ^{①②}	121.58±7.88 ^{①②}

注:与siNC组相比,① $P < 0.05$;与siNOD2组相比,② $P < 0.05$ 。

3 讨论

HCC的临床治疗效果有限,因此仍需深入研究HCC的分子机制,为开发有效的治疗药物和治疗方法提供新思路。本研究探讨了NOD2在HCC细胞炎症中的作用及其潜在机制。结果显示NOD2在肝癌组织和细胞中表达增高,而NOD2的高表达和STAT3及NF-κB的表达均呈显著正相关关系;敲低NOD2可以通过抑制NF-κB/STAT3信号通路来减少HCC细胞中的炎症因子的表达,结果表明NOD2在HCC炎症进展中发挥关键作用。

大多数早期HCC和肝硬化异常结节慢性炎症均可引起多个基因表达不稳定。本研究发现NOD2在HCC细胞中表达明显上调,与Nabergoj等^[12]研究结果一致。研究还表明NOD2是一种新型肝脏中介物,可以感知HCC患者肠道菌群失调、肝脏慢性炎症和

基因组不稳定^[15]。本研究还发现在TCGA数据库收录的374例HCC组织和50例健康组织中,NOD2在肿瘤组织中的表达水平是健康组织的1.7倍。而且NOD2在人HCC细胞系Hep3B和Huh-7细胞中的蛋白表达是正常人胚胎肝细胞HHL-5的5~6倍。这表明NOD2可作为HCC诊断和治疗的一种有价值的靶标。

本研究中还观察到敲低NOD2后,NOD2的表达明显被抑制,不仅Hep3B和Huh-7细胞的增殖率明显被抑制,而且细胞的凋亡率增加。这表明NOD2抑制类药物可能是一种潜在的HCC治疗药物,因为研究表明,在二乙基亚硝胺-四氯化碳(DEN-CCl₄)治疗的HCC动物模型中,肝脏中NOD2被激活,而研究者观察到,NOD2敲除可明显抑制肝细胞癌的肿瘤发生^[15]。

本研究观察了 NOD2 对 Hep3B 和 Huh-7 细胞中炎症细胞因子(IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ)分泌水平的影响。当 NOD2 表达被抑制时,两种细胞中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 的水平都明显降低。表明 NOD2 是一种 HCC 细胞炎症反应调节因子。NF- κ B (p65)/STAT3 在细胞内促进炎症反应已被多个实验研究证实,而研究表明激活 NOD2 后可以激活多种炎症疾病中的 NF- κ B^[16-17]。除了 NF- κ B, NOD2 还可以激活 JAK2/STAT3 通路从而触发促炎反应^[15]。已知细菌及其代谢物可以通过直接或间接方式触发炎症反应来破坏宿主细胞 DNA。研究也证实,细菌持续激活肝细胞 NOD2 信号通路会破坏 DNA 修复并增加癌变^[15]。本研究在 TCGA 数据库 HCC 组织中观察到, NOD2 和 NF- κ B (p65)基因以及 STAT3 基因均呈现显著正相关关系。本研究结果显示,当敲低 NOD2 后, HCC 细胞中 p-NF- κ B (p65)、p-STAT3 的表达水平均明显降低,表明敲低 NOD2 可抑制 NF- κ B (p65)/STAT3 的激活。为了更进一步验证 NF- κ B (p65)/STAT3 信号通路是 NOD2 敲低后抑制炎症反应的必经之路,本研究使用一种被证实的 NF- κ B (p65)/STAT3 通路激活剂 rhLipocalin-2^[18]对敲低 NOD2 的细胞进行回复实验。结果表明,在敲低 NOD2 基础上使用 rhLipocalin-2 处理后明显恢复了 siNOD2 所抑制的炎症因子(IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和 IFN- γ)的水平。这表明 NOD2 的抑制剂可能是新型 HCC 抗癌药,在改善肿瘤的炎症反应中展现出突出的效果。虽然 NOD2 抑制剂尚未进行临床试验,但已有研究报道 NOD2 抑制剂在体内表现出良好的抗癌活性^[19-20]。因此, NOD2 抑制剂可能是治疗 HCC 患者的有前途的化学工具。

4 结论

NOD2 是一种关键的 HCC 促炎调控因子,抑制其表达可减弱 HCC 细胞的增殖,并通过抑制 NF- κ B/STAT3 通路激活干扰 HCC 细胞的炎症反应。靶向肝内 NOD2 可能是一种有前途的肝细胞癌治疗策略。

【参考文献】

- [1] RASHED W M, KANDEIL M A M, MAHMOUD M O, *et al.* Hepatocellular Carcinoma (HCC) in Egypt: A comprehensive overview[J]. J Egypt Natl Canc Inst, 2020, 32(1): 5.
- [2] 陈小彬,郑凡,黎成金,等. 肝细胞癌相关独立危险因素研究进展[J]. 临床普外科电子杂志, 2021, 9(4): 59-63.
- [3] GALLE P R, FOERSTER F, KUDO M, *et al.* Biology and significance of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma[J]. Liver Int, 2019, 39(12): 2214-2229.
- [4] 张婷婷,白莉. 肝细胞癌和慢性炎症相互关系的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2014, 19(8): 752-758.
- [5] 冉君,屈献乐,肖彬彬,等. 肝细胞癌免疫微环境与免疫抑制治疗的研究进展[J]. 肝脏, 2022, 27(7): 825-828.
- [6] 熊凌风,区奕猛. 炎症微环境: 肝肿瘤细胞和肝肿瘤干细胞中的问题[J]. 临床医学进展, 2021, (10): 4591-4603.
- [7] 何芳,龚海英,何大川,等. 蛋白酪氨酸磷酸酶 SHP2 在肺癌中的研究进展[J]. 西部医学, 2020, 32(8): 1245-1249.
- [8] 牛玉苗,严翔,齐宏妍,等. 肿瘤微环境中主要炎症细胞因子对 PD-L1 表达调控的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(9): 1704-1708.
- [9] 柳辉,郭乐,丁淑琴,等. IL-6/STAT3 信号通路与肝癌研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(13): 1656-1662.
- [10] LOHITESH K, CHOWDHURY R, MUKHERJEE S. Resistance a major hindrance to chemotherapy in hepatocellular carcinoma: an insight[J]. Cancer Cell Int, 2018, 18: 44.
- [11] KUTIKHIN A G. Role of NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 gene polymorphisms in cancer etiology [J]. Hum Immunol, 2011, 72(10): 955-968.
- [12] NABERGOJ S, MLINARIĆ-RASČAN I, JAKOPIN Ž. Harnessing the untapped potential of nucleotide - binding oligomerization domain ligands for cancer immunotherapy[J]. Med Res Rev, 2019, 39(5): 1447-1484.
- [13] ZHANG Y, LI T, GUO P, *et al.* MiR-424-5p reversed epithelial-mesenchymal transition of anchorage-independent HCC cells by directly targeting ICAT and suppressed HCC progression[J]. Sci Rep, 2014, 4: 6248.
- [14] HAMM C M, REIMERS M A, MCCULLOUGH C K, *et al.* NOD2 status and human ileal gene expression [J]. Inflamm Bowel Dis, 2010, 16(10): 1649-1657.
- [15] ZHOU Y, HU L, TANG W, *et al.* Hepatic NOD2 promotes hepatocarcinogenesis via a RIP2-mediated proinflammatory response and a novel nuclear autophagy-mediated DNA damage mechanism[J]. J Hematol Oncol, 2021, 14(1): 1-19.
- [16] 曹兰秀,吕娟,赵娟,等. 基于 TLRs/NODs 受体与 MAPK 及 NF- κ B 信号通路的朱砂七免疫调节机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(4): 424-428, 434.
- [17] WANG G, FU Y, MA K, *et al.* NOD2 regulates microglial inflammation through the TAK1-NF- κ B pathway and autophagy activation in murine pneumococcal meningitis[J]. Brain Res Bull, 2020, 158: 20-30.
- [18] GUO H, JIN D, CHEN X. Lipocalin 2 is a regulator of macrophage polarization and NF- κ B/STAT3 pathway activation[J]. Mol Endocrinol, 2014, 28(10): 1616-1628.
- [19] DONG Y, WANG S, WANG C, *et al.* Antagonizing NOD2 signaling with conjugates of paclitaxel and muramyl dipeptide derivatives sensitizes paclitaxel therapy and significantly prevents tumor metastasis[J]. J Med Chem, 2017, 60(3): 1219-1224.
- [20] WANG S, YANG J, LI X, *et al.* Discovery of 1,4-Benzodiazepine-2,5-dione (BZD) derivatives as dual nucleotide binding oligomerization domain containing 1/2 (NOD1/NOD2) antagonists sensitizing paclitaxel (PTX) to suppress Lewis lung carcinoma (LLC) growth in vivo[J]. J Med Chem, 2017, 60: 5162-5192.

(收稿日期:2022-06-14;修回日期:2023-03-30;编辑:刘灵敏)