

文章编号:1005-6947(2006)10-0749-03

· 基础研究 ·

NF- κ B 在肝细胞癌组织中的表达及意义

梁帅, 王志明, 吕新生, 李劲东, 周乐杜, 李新营

(中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008)

摘要:目的 探讨 NF- κ B 基因在肝细胞癌组织中的表达及生物学意义。方法 采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、Western-blot 免疫组织化学技术检测 32 例肝癌组织及癌旁肝组织中的 NF- κ B 基因的 mRNA 和蛋白表达水平及蛋白定位。结果 NF- κ B 基因在肝癌组织中的表达较癌旁肝组织显著性增高($P < 0.05$)。免疫组化结果显示, NF- κ B 蛋白在肝癌细胞胞浆和胞核中均有表达, 而在癌旁肝细胞中仅在胞浆中有表达。结论 NF- κ B 基因在肝癌组织中呈显著高表达, 提示其可能参与了肝癌的发生发展。NF- κ B 表达定位在癌细胞和癌旁肝细胞中的差异, 提示 NF- κ B 活化后, 进入胞核, 通过调节下游基因的转录, 促进肝癌的发生。

关键词: NF- κ B; 癌, 肝细胞/病理学; 基因表达

中图分类号: R735.7; R730.261

文献标识码: A

Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma tissue and its significance

LIANG Shuai, WANG Zhi-ming, LU Xin-sheng, LI Jing-dong, ZHOU Le-du, LI Xin-ying
(Department of Genetal Surgery, Xiangya Hospital, Central South Univerty, Changsha 410008, China)

Abstract: Objective To investigate the gene expression of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and its biological significance in liver cancer tissue. **Methods** The samples from hepatic cancer tissue and corresponding adjacent tissues were collected in thirty-two patients with primary liver cancer. The mRNA and protein levels of NF- κ B were determined by reverse-transcription PCR and Western bolt, respectively. Immunohistochemistry was employed to determine the localization of NF- κ B protein in liver tissues. **Results** As shown by RT-PCR and Western blot, both mRNA and protein expressions of NF- κ B in liver cancer tissues were significantly higher than those in corresponding adjacent liver tissues ($P < 0.05$). In liver cancer tissues, NF- κ B was shown to be expressed in both cellular nucleus and cytosol, whereas its expression was only detected in cellular cytosol of tissues adjacent to cancer. The difference of the intracellular localization of NF- κ B between liver cancer and tissues adjacent to cancer implies that NF- κ B is activated in liver cancer tissue. **Conclusions** NF- κ B gene is significantly overexpressed and activated in liver cancer tissue. The different location of NF- κ B gene in cancer cell and adjacent liver cell may suggest that after NF- κ B activated and entered to nucleus, which may consequently modulate transcription of some related downstream-gene, and promote the initiation and development of liver cancer.

Key words: Nuclear Factor-kappa B; Carcinoma, Hepalicullar/pathol; Gene Expression

CLC number: R735.7; R730.261

Document code: A

肝细胞癌(HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一,研究^[1]表明,乙型肝炎病毒(HBV)感染和黄曲霉素(AFB1)摄入是我国肝癌发生的主要致病因素,但其发生的具体分子机制尚未完全明了。细胞

核因子(nuclear factor kappa B, NF- κ B)是一种重要的转录因子,其激活参与炎症、细胞增殖、细胞凋亡等基因的调节,在肿瘤的发生中起着重要的作用。但在肝癌组织中 NF- κ B 的表达情况,国内罕见研究,本研究初步探讨 NF- κ B 在肝癌组织中的表达情况及其生物学意义,报告如下。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30600601)。

收稿日期:2006-08-15; **修订日期:**2006-09-04。

作者简介:梁帅,男,山东海阳人,中南大学湘雅医院住院医师,主要从事肝癌方面的研究。

通讯作者:梁帅 E-mail: chinavascular@hotmail.com。

1 资料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本 取自中南大学湘雅医院 2004

年5月—2005年8月间手术切除的32例肝细胞癌和对应的癌旁肝组织(距肿瘤边缘 ≥ 2 cm)。标本离体后立即液氮保存。32例肝癌中男27例,女5例;年龄32~59岁,平均年龄42.6岁。所有标本均经病理组织学切片证实为肝细胞肝癌。

1.1.2 主要试剂 TRIZOL 购自晶美生物科技公司,RT-PCR 试剂盒(DR019A)购自大连宝生物公司,BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自 Pierce of America,兔抗人 NF- κ B 多克隆抗体(sc-109)购自 Santa Cruz 公司,羊抗兔二抗 IgG(H+L)HRP(04-15-06)购自 KPL 公司,山羊抗兔二抗免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 逆转录多聚酶链反应(RT-PCR) 取肝癌组织和癌旁肝组织各100mg,采用 TRIZOL 提取总 RNA,然后逆转录为 cDNA。PCR 按照试剂盒说明书进行操作,采用 50 μ L 反应体系。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 4 min 后,94 $^{\circ}$ C 30s,50 $^{\circ}$ C 40s 和 72 $^{\circ}$ C 40s,顺序循环 35 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶自动成像系统上摄像并分析各条带吸光度值(基因表达值 = NF- κ B/ β -actin)。NF- κ B 引物 Forward:5'-AACAGCAGATGGCCCCATACCT-3', Reverse:5'-ACGCTGAGGTCCATCTCCTTG-3',产物长度 522bp; β -actin 引物 Forward:5'-AACGCAGCT-CAGTAACAGTC-3', Reverse:5'-ATCCGTAAAGACCTC-TATGC-3',产物长度 287bp。

1.2.2 Western 蛋白印迹 称取刚解冻的肝细胞癌或癌旁肝组织组织 100mg,剪碎组织后,放入 1mL 组织裂解液(20mM Tris-HCl,10mM NaCl,1mM EDTA,1mM MgCl₂,1% NP-40,0.1% SDS,0.05% β -ME,0.08mg/mL PMS)中机械匀浆,冰上孵育 30min。4 $^{\circ}$ C 低温 10 000r/min 离心 10min 取上清。采用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测总蛋白质浓度,置于 -70 $^{\circ}$ C 冻存。制备 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(5%分离胶和 10%的浓缩胶),每孔加蛋白样品 100 μ g,电泳(积层胶:电压 80V,30~40min;分离胶:电压 100V,120~140min),湿法(100V 恒压下 65min)将蛋白转到硝酸纤维素滤膜(Millipore,0.45 μ m)。5%脱脂奶粉 PBS 缓冲液室温封闭 2h,一抗 1:500 稀释,4 $^{\circ}$ C 过夜,PBST 洗膜,二抗 1:1 000 室温孵育 1h,PBST 洗涤 5 次,加 SuperSignal 发光试剂,暗室显影 2min 并冲洗胶片。用 Quantity one 软件(Bio-rad)对杂交条带进行定量分析,以蛋白条带吸光度和条带面积的乘积作为代表蛋白表达水

平的计量资料。

1.2.3 免疫组织化学 采用链酶素-生物素-辣根过氧化物酶(SABC)法进行免疫组织化学分析。将石蜡包埋的组织标本连续切成厚度为 3~5 μ m 的切片,60 $^{\circ}$ C 烤片,二甲苯脱蜡 15min,依次浸泡在无水产品、90%乙醇、85%乙醇中各 3min,用新鲜配制的 3%过氧化氢溶液消除内源性过氧化物酶的活性(15min)。用 1:50 EDTA 溶液在 95 $^{\circ}$ C 下进行微波抗原热修复 15min,PBS 溶液处理 20min 后用 4%胎牛血清封闭液 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min,然后滴加 PBS 液稀释的兔抗人 NF- κ B 多克隆抗体,工作浓度为 1:50,37 $^{\circ}$ C 孵育 30min,4 $^{\circ}$ C 过夜。山羊抗兔二抗免疫组化试剂盒与组织切片进行二级免疫反应,滴加新鲜配置的 DAB 显色剂后,显微镜下控制反应颜色,流水冲洗 6min,苏木素复染 30s,流水冲洗 10min,60 $^{\circ}$ C 烤箱内烘干后中性树脂封片。以 Western blot 结果作为阳性对照。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.4 统计学分析 全部数据采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计学分析,计量资料的均数用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料比较采用 *t* 检验。以 $P \leq 0.05$ 作为差异具有显著性意义的界值。

2 实验结果

2.1 NF- κ B 在组织中的 mRNA 表达水平

32 例肝癌组织及癌旁肝组织中均有 NF- κ B mRNA 表达(图 1),癌组织 NF- κ B 的表达为 0.418 ± 0.113 显著高于癌旁组织的 0.183 ± 0.089 ($P < 0.05$)。

2.2 NF- κ B 在组织中的蛋白表达水平

32 例肝癌组织和癌旁肝组织中均有 NF- κ B 的蛋白表达(图 2),分子量为 60kD 左右,与 NF- κ B 符合的分子量(65kD)。癌组织 NF- κ B 的蛋白表达为 186.6 ± 25.4 显著高于癌旁肝组织的 106.5 ± 20.6 ($P < 0.05$)。

2.3 免疫组化结果

采用免疫组化技术检测肝癌组织及癌旁组织中的 NF- κ B 蛋白表达和定位。结果显示:NF- κ B 蛋白在肝癌组织中的表达显著高于癌旁肝组织,这与 Western-blot 结果是一致的;NF- κ B 蛋白在肝癌组织中的胞浆和胞核均有着色,且以胞核着色为主,而在癌旁肝组织,仅能观察到胞浆的着色(图 3)。

M: DNA marker; 1, 3: 肝癌组织; 2, 4: 癌旁肝组织

图1 肝癌组织和癌旁肝组织中 NF- κ B RT-PCR 检测结果

a: 肝癌组织; b: 癌旁肝组织

图2 肝癌组织和癌旁肝组织中 NF- κ B Western-blot 结果

a: 肝癌组织 (×400)

b: 癌旁肝组织 (×400)

图3 肝癌组织和癌旁肝组织中 NF- κ B 免疫组化结果

3 讨论

NF- κ B 是普遍存在于细胞浆中的一种快反应转录因子,正常情况下,它与抑制性蛋白 I κ B 结合而处于非活性状态,但在各种刺激因子的作用下, NF- κ B 被激活,转入核内,调节下游基因的表达^[1]。最初对 NF- κ B 的研究主要探讨其在炎症发生中的作用。近年来,它的功能逐渐被了解, NF- κ B 在肿瘤发生中的作用研究逐渐被重视。

NF- κ B 在肿瘤的发生发展中起着至关重要的作用^[1]。NF- κ B 可以上调 cyclin D1 基因的表达,促进细胞的生长和增殖^[3-4]。NF- κ B 可激活 c-myc 基因的表达, H-ras 癌基因诱导的非正常细胞增生及致癌作用也依赖 NF- κ B^[5]。NF- κ B 可以通过激活某些抗凋亡基因(如 TRAF1, TRAF2 等),阻断 caspase-8 的激活,抑制凋亡的发生^[4]。NF- κ B 还可以促进 EGFP, MMP-2 等因子的表达,参与肿瘤的复发转移^[6]。

乙型肝炎病毒感染是我国肝癌发生的主要原因之一。研究^[7]表明,乙型肝炎病毒 HBsAg 可以通过 ras-raf-map 激酶通路激活 NF- κ B,促使病毒复制和细胞向恶性转变,抑制恶性细胞的凋亡,促进肝癌的发生发展。

本研究表明,肝癌组织中 NF- κ B 的 mRNA 及蛋白表达水平显著的高于癌旁肝组织。免疫组化显示,肝癌组织中 NF- κ B 主要表达于胞核,而在癌旁

肝组织中则只在胞浆有表达,这提示,只有 NF- κ B 被激活后并转入核内,才能通过调节下游基因的表达促进肝癌的发生发展。

本研究结果表明, NF- κ B 的激活可能是肝癌发生发展过程中的重要事件, NF- κ B 可能在肝癌的发生发展中起到关键的作用。有理由相信 NF- κ B 将可能是肝癌治疗的重要靶标。

参考文献:

- [1] Waddick KG, Uckun FM. Innovative treatment programs against cancer: II. Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) as a molecular target [J]. *Biochem Pharm*, 1999, 57(1): 9-17.
- [2] 涂刚, 姚榛祥, 董蒲江. 核因子 κ B 在人乳腺癌组织中的表达及其意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(5): 348-350.
- [3] Cogswell PC, Guttridge DC, Funkhouser WK, et al. Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3 [J]. *Oncogene*, 2000, 19(9): 1123-1131.
- [4] Shah N, Thomas TJ, Lewis JS, et al. Regulation of estrogenic and nuclear factor kappa B functions by polyamines and their role in polyamine analog-induced apoptosis of breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 2001, 20(14): 1715-1729.
- [5] Chen F, Cast ranova V, Shi X, et al. New insights into the role of nuclear factor-kappa B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases [J]. *Clin Chem*, 1999, 45(1): 7-17.
- [6] 胡海燕, 邹典斌, 孙惠等. NF- κ B 与肿瘤细胞增殖及转移关系的研究进展 [J]. *生命科学*, 2003, 15(5): 293-298.
- [7] Pan JB, Duan LX, Sun BS, et al. Hepatitis B virus Xprotein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF-kappa B [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(1): 171-182.