

文章编号:1005-6947(2007)03-0232-04

· 基础研究 ·

核因子- κ B 与肿瘤坏死因子 α mRNA 在肝细胞癌中的表达及其意义

曹杰, 陈孝平

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 肝脏外科中心, 湖北 武汉, 430030)

摘要:目的 探讨核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 与肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) mRNA 在肝细胞癌中表达的意义。方法 采用化学发光凝胶电泳迁移率 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 的方法检测正常肝组织、肝血管瘤、肝癌癌灶及癌旁肝组织 NF- κ B 的活性表达, 用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法检测 TNF- α mRNA 的表达。结果 正常肝组织、肝血管瘤 TNF- α mRNA 分别为 0.24 ± 0.12 和 0.21 ± 0.10 , 显著低于癌旁肝组织和肝癌癌灶的 0.36 ± 0.16 和 0.68 ± 0.21 ($P < 0.05$); 正常肝组织、肝血管瘤 NF- κ B 未被检测到明显的活性, 而癌旁肝组织、肝癌癌灶 NF- κ B 表达与正常肝组织及肝血管瘤组织比较差异具有显著性 ($P < 0.05$)。癌旁肝组织、肝癌癌灶 TNF- α mRNA 表达与 NF- κ B 的活性呈显著正相关 ($r = 0.773, P < 0.05$; $r = 0.838, P < 0.05$)。结论 NF- κ B 信号传导途径异常激活及 TNF- α 与肝细胞癌的发生发展密切相关。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(3): 232-235]

关键词: 癌, 肝细胞; 核因子- κ B; 肿瘤坏死因子 α

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

Activation of nuclear factor- κ B and expression of tumor necrosis factor- α mRNA in hepatocellular carcinoma

CAO Jie, CHEN Xiao-ping

(Department of Hepatic Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To investigate the significance of activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA in hepatocellular carcinoma. **Methods** Chemoluminescent electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was used to detect the activity of NF- κ B in normal liver tissues, hemangiomas of liver, HCC tissues and tissues adjacent to cancer; and expression of TNF- α mRNA in each group was detected by RT-PCR analysis. **Results** Expression of TNF- α mRNA in tissues adjacent to cancer and HCC tissues groups was 0.36 ± 0.16 and 0.68 ± 0.21 , respectively, significantly higher than that in normal liver tissues and hemangiomas of liver 0.24 ± 0.12 and 0.21 ± 0.10 (all $P < 0.05$). The activity of NF- κ B in tissues adjacent to cancer and HCC tissues was significantly higher than that in normal liver tissues and hemangiomas of liver ($P < 0.05$), and the expression of TNF- α mRNA in tissues adjacent to cancer and HCC tissues had a significant positive correlation with the activity of NF- κ B ($r = 0.773, P < 0.05$; $r = 0.838, P < 0.05$, respectively). **Conclusions** Abnormal activation of NF- κ B signal transduction pathway and TNF- α was related to development and progression of HCC.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(3): 232-235]

Key words: Carcinoma, Hepatocellular; Nuclear factor- κ B; TNF- α

CLC number: R735.7

Document code: A

收稿日期: 2006-11-25; 修订日期: 2007-02-28。

作者简介: 曹杰, 男, 江西新余人, 华中科技大学同济医学院博士研究生 (广州市第一人民医院教授), 主要从事肝癌外科治疗方面的研究。

通讯作者: 曹杰 E-mail: czhongt@126.com。

有研究^[1]表明,核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)的异常激活与肝炎相关性肝癌的发生有着紧密联系,乙型肝炎病毒(HBV)或丙型肝炎病毒(HCV)能激活肝细胞内NF- κ B,导致肝细胞系肿瘤的发生。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)是一组由活化的单核-巨噬细胞产生,具有多种生物学活性功能,是与炎症和肿瘤发生密切相关的细胞因子。笔者应用化学发光凝胶电泳迁移率实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法分别检测NF- κ B以及TNF- α mRNA在肝癌组织中的表达,以探讨NF- κ B信号传导途径的激活与TNF- α 在肝细胞癌发生发展中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本 收集本院2005年8月—2006年8月29例患者手术切除的新鲜肝细胞癌(术后病理均证实为肝细胞癌)及癌旁组织标本(距肿瘤边缘 ≥ 2 cm),其中男21例,女8例;年龄30~65(平均51.7)岁。另收集10例正常对照肝组织(外伤性肝破裂行肝叶切除),排除肝炎及肝脏肿瘤等肝病病史以及8例肝血管瘤标本。所有标本立即置于 -80°C 液氮中保存。所有肝细胞癌患者均为首次手术,术前未经放疗或化疗。

1.1.2 主要试剂、仪器及软件 人TNF- α , GAPDH引物及探针两对由赛百盛基因技术有限公司合成;EMSA实验试剂盒(20148)、核蛋白提取试剂盒(78833)及带正电荷尼龙膜均购自美国Pierce公司;电泳仪采用美国产Biometra Standard Power Pack P25;美国Alpha Innotech ChemilmagerTM 5500仪器观察凝胶电泳结果。另有Primer Premier 5.0软件,Image-Pro Plus 5.0图像分析软件和SPSS11.0专业统计学软件。

1.2 实验方法

1.2.1 EMSA检测各组肝脏标本内NF- κ B的活性 参照核蛋白提取试剂盒说明由冷冻的各组肝组织提取核蛋白。含NF- κ B结合位点的双链寡核苷酸探针(5'-AGTTGAGGGACTTTCCAGGC-3', 3'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-5')两对,其中一对为5'末端生物素标记探针。将标记生物素的探针稀释至10 fmol/ μL ,未标记生物素的探针稀释至

1 pmol/ μL 。制备5%非变性聚丙烯酰胺凝胶,预电泳45 min(100V)。DNA结合反应体系包括:10 \times binding buffer 2 μL , 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Poly(dIodC) 1 μL , 1% NP-40 1 μL , 1 M KCl 1 μL , 未标记探针 4 μL , 各组肝组织核蛋白提取物 4 μL , 生物素标记探针 2 μL , 每组结合反应体系加入 ddH₂O 至总体积 20 μL , 室温孵育 20 min 后将各组结合反应产物加入 5 μL 5 \times loading buffer 混匀。取 20 μL 加样于电泳仪内凝胶电泳 60 min。电泳后将凝胶内的结合反应产物转移至带正电荷之尼龙膜上;距离尼龙膜 0.5 cm 以 254 nm 波长之紫外灯照射进行交链(cross-link) 5 min;将膜置于干净容器内,加入结合/封闭缓冲液后洗膜 4 次,每次 5 min;先后加入化学发光之底物平衡缓冲液及底物工作液各 5 min,立即于暗室曝光 5 min 后洗片,并对 NF- κ B 与标记探针结合的相对量进行密度分析,以相对吸光度 \times 面积(mm²)表示其活性的强度。

1.2.2 RT-PCR 人 TNF- α 上游引物 5'-AA-CATCCAACCTTCCCAAAC-3', 下游引物 5'-CAAGTC-CTGCGGCATTCT-3', 产物长度 319 bp; 用人 GAPDH 作为参照, 上游引物 5'- AACGGATTTGCTCGTATTG-3', 下游引物 5'- GGAAGATGCTGATGGGATT-3', 产物长度 208 bp。取约 50 mg 肝组织, 采用 Trizol 一步法提取总 RNA。cDNA 第一链合成体系含: RNA 2 μg , Oligdt 4 μL , 5 \times buffer 5 μL , dNTP 1.5 μL , MMLV 200 v, RNA 酶抑制剂 1 μL , 加 DEPC 水至总体积 25 μL , 经 42 $^{\circ}\text{C}$ 1 h 逆转录, 再经 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 变性。PCR 反应体系含: 25 mM MgCl₂ 5 μL , 10 \times buffer 5 μL , 10 Mm dNTP 1 μL , 上、下游引物各 1 μL , cDNA 4 μL , TaqDNA 聚合酶 2.5 μL , 加 ddH₂O 至总体积 50 μL 。TNF- α 反应条件: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 后续循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 退火 51 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s 延伸; 共 31 个循环, 最后一个循环延伸 10 min。GAPDH 退火温度为 51 $^{\circ}\text{C}$, 其余过程相同。结果观察: 取 3 μL 扩增产物加样至 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果, 计算机对电泳条带进行扫描分析并处理。目的基因表达强度: 各组肝组织 TNF- α mRNA 吸光度/GAPDH 吸光度。

1.3 统计学处理

结果均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。经方差齐性检验后,进行单因素方差分析(ANOVA)、 t 检验和回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 EMSA 检测肝组织 NF-κB 的表达

正常对照肝组织及肝血管瘤内获微量活性的 NF-κB 的表达,显著低于癌旁组织及肝细胞癌 ($P < 0.05$)。癌旁组织 NF-κB 活性表达显著低于肝细胞癌组(图1)(表1)。

2.2 RT-PCR 结果

各组肝组织 TNF-α 扩增产物为 319bp,人GAPDH 为内参(图2),扩增产物为 208bp。肝细胞癌及癌旁组织内 TNF-α mRNA 表达均显著高于正常对照组及肝血管瘤组,差异有显著意义 ($P < 0.05$)。肝癌组织与癌旁组织相比差异亦有显著性 ($P < 0.05$)。正常对照组与肝血管瘤组之间 TNF-α mRNA 表达差异无显著意义 ($P > 0.05$)(表1)。

2.3 癌旁组织及肝细胞癌 TNF-α mRNA 与 NF-κB 的相关性

癌旁组织及肝细胞癌 TNF-α mRNA 表达与 NF-κB 的活性呈显著正相关(回归方程分别是: $y = -0.632 + 0.756x, r = 0.773, P < 0.05$; $y = -0.781 + 0.811x, r = 0.838, P < 0.05$)(图3-4)。

表1 NF-κB 的活性在各组肝脏组织中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	病例数	NF-κB 的活性表达值	TNF-α mRNA 表达值
正常对照	10	0.19 ± 0.20 ^{1),2)}	0.24 ± 0.12 ^{1),2)}
肝血管瘤	8	0.16 ± 0.11 ^{1),2)}	0.21 ± 0.10 ^{1),2)}
癌旁组织	29	0.58 ± 0.15 ²⁾	0.36 ± 0.16 ²⁾
肝细胞癌	29	1.44 ± 0.23	0.68 ± 0.21

注: 1)与癌旁组织比较, $P < 0.05$; 2)与肝细胞癌比较, $P < 0.05$

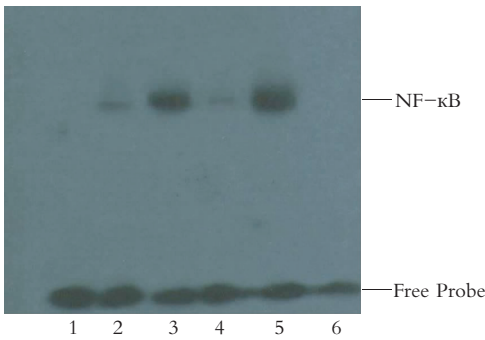


图1 化学发光 EMSA 检测各肝组织核蛋白提取物 NF-κB 的活性 1:生物素标记探针; 2~5:生物素标记探针+各组肝组织核蛋白提取物(分别为外伤性肝破裂肝组织、癌旁肝组织、肝血管瘤、肝细胞癌癌灶); 6:200 倍未标记生物素探针+生物素标记探针+肝脏组织核蛋白提取物

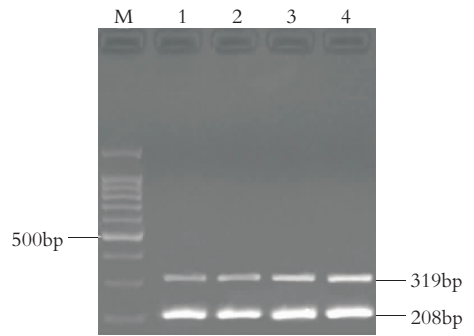


图2 TNF-α(扩增产物为 319bp) 和 GAPDH (扩增产物为 208bp) 在各组肝组织中的表达 1:为正常对照组; 2:肝血管瘤组; 3:癌旁组织组; 4:肝细胞癌组

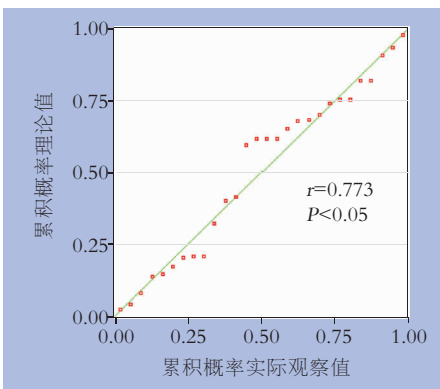


图3 癌旁组织组 NF-κB 的活性与 TNF-α mRNA 表达的关系

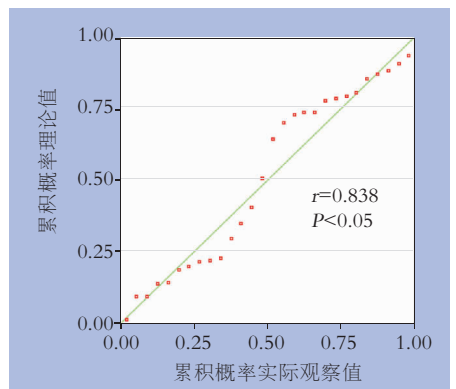


图4 肝细胞癌组 NF-κB 的活性与 TNF-α mRNA 表达的关系

3 讨论

正常肝细胞中 NF- κ B 以 p50/p65 异二聚体形式在胞浆内与 I κ B 结合呈无活性状态,当它受细胞因子、有丝分裂原、病毒等刺激激活后, I κ B 发生磷酸化并降解, NF- κ B 核定位信号的暴露并转入核内与靶基因 κ B 基序结合,增强或抑制下游相关基因的表达。激活的 NF- κ B 在肝细胞增殖和凋亡中扮演重要角色,可参与癌症的启动、发生及发展过程,在炎症相关的恶性肿瘤呈高表达,在炎症与细胞癌变间起桥梁作用^[2]。有研究^[3]发现在诱癌过程中随肝细胞癌变的发生,肝组织中 NF- κ B 表达愈来愈高。在肝细胞变性组, NF- κ B 表达的总体趋势已明显高于对照组;在肝细胞发生癌变时, NF- κ B 表达达高峰。此外 NF- κ B 在肝癌组织中的异常激活,可抑制细胞凋亡^[4]、促进肝细胞存活,与肝癌的发生发展密切相关^[5-6]。

TNF- α 是一种由多种免疫细胞产生和分泌的细胞因子,具有介导炎症、免疫调节及抗肿瘤等多种生物学功能。Nabors 等^[7]发现, TNF- α 能诱导一种 RNA 稳定蛋白的过度表达,上调肿瘤血管生成因子,并能有效地诱导血管内皮细胞表面黏附分子的表达,促进肿瘤新生血管的形成。血清中 TNF- α 含量的高低可以反映机体的抗肿瘤免疫状态; TNF- α 水平的升高可能有益于调动机体自身的抗癌能力^[8]。TNF- α 对鼠肝癌细胞的研究中发现, TNF- α 能损害肝细胞的 DNA, 可能在肝细胞向肝癌细胞转变的早期阶段起一定作用。提示 TNF- α 与肝癌的发生有关^[9-10]。

本研究结果表明,与对照组及肝血管瘤组相比较, NF- κ B 在肝细胞癌及癌旁组织内存在着显著的激活;相应地, TNF- α mRNA 表达水平显著升高且与 NF- κ B 的活性呈显著正相关。提示 NF- κ B 信号传导途径的激活与 TNF- α 共同参与了肝细胞的癌变过程。由此推测, NF- κ B 与 TNF- α 在肝细胞癌中的相互关系是:当肝细胞内的 NF- κ B 信号传导途径受细胞因子、有丝分裂原、病毒等刺激激活后,一方面抑制 FAS 和 TNFR 基因表达;另一方面其下游的抗凋亡基因如 IEX-1L、抗凋亡蛋白 Bcl-X 或凋亡抑制蛋白 c-IAP1 和 c-IAP2 的表达有所增加,以利于癌细胞的存活及增殖,同时亦启动了下游靶基因 TNF- α 的基因转录,使得肝癌细胞 TNF- α 表达即自身分泌 TNF- α 增加。此外,单核-巨噬细胞受刺激后亦能增加 TNF- α 的分泌^[11],于肝细胞癌变过程中 TNF- α 又可与其

受体结合于上游激活 NF- κ B 信号传导途径;周而复始,抑制了肝癌细胞的凋亡,促进了肝癌细胞的不断增殖,最终导致肿瘤形成^[12]。TNF- α 能否通过激活 NF- κ B 信号传导途径上调肿瘤血管生成因子并促进肿瘤新生血管的形成,其机制尚不明了,有待研究阐明。

综上所述,抑制 NF- κ B 活性或阻止 I κ B 降解的药物若能增加癌细胞凋亡,抑制癌细胞生长,便可用于耐化疗药物肿瘤的治疗。因 NF- κ B 基因位于多药耐药基因上游与启动子的转录相关,抑制 NF- κ B 表达或阻止 I κ B 降解便可阻断多药耐药基因转录以达到治疗耐化疗药物肿瘤的目的。笔者期望通过对肝细胞癌变发生过程中细胞因子功能紊乱规律的深入研究,为指导肝细胞癌的临床治疗提供新的途径。

参考文献:

- [1] Wang J, Huang Q, Chen M. The role of NF-kappa B in hepatocellular carcinoma cell [J]. Chin Med J, 2003, 116 (5): 747 - 752.
- [2] Pikarsky E, Porat RM, Stein J, et al. NF-kappa B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer [J]. Nature, 2004, 431 (7007): 461 - 462.
- [3] 苏小琴, 姚登福, 章建国, 等. 肝细胞癌变过程中 NF- κ B 及其 TNF- α 动态表达与改变. 南通大学学报(医学版) [J]. 2006, 26 (3): 163 - 166.
- [4] Kim YS, Schwabe RF, Qian T, et al. TRAIL-mediated apoptosis requires NF-kappa B inhibition and the mitochondrial permeability transition in human hepatoma cells [J]. Hepatology, 2002, 36 (6): 1498-1498.
- [5] Chiao PJ, Na R, Niu J, et al. Role of Rel/NF-kappa B transcription factors in apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells [J]. Cancer, 2002, 95 (8): 1696 - 1705.
- [6] 梁帅, 王志明, 吕新生, 等. NF- κ B 在肝细胞癌组织中的表达及意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2006, 15 (10): 749 - 751.
- [7] Nabors LB, Suswam E, Huang Y, et al. Tumor necrosis factor Alpha induces angiogenic factor up-regulation in malignant glioma cells: a role for RNA stabilization and HuR [J]. Cancer Res, 2003, 63 (14): 4181 - 4181.
- [8] 李金茂, 鲍恩武, 马庆久, 等. 肝癌患者 RFA 治疗前后血清中 TNF 和 AFP 的变化 [J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14 (2): 84 - 86.
- [9] Wheelhouse NM, Chan YS, Gillies SE, et al. TNF-alpha induced DNA damage in primary murine hepatocytes [J]. Int J Mol Med, 2003, 12 (6): 889 - 894.
- [10] 王禹, 张颖超, 杜艳. 原发性肝癌患者 sIL-2R, IL-6 和 TNF- α 测定及其临床意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13 (8): 622 - 623.
- [11] Wang YY, Lo GH, Lai KH, et al. Increased serum concentrations of tumor necrosis factor-alpha are associated with disease progression and malnutrition in hepatocellular carcinoma [J]. J Chin Med Assoc, 2003, 66 (10): 593 - 598.
- [12] Wang J, Huang Q, Chen M. The role of NF-kappa B in hepatocellular carcinoma cell [J]. Chin Med J, 2003, 116 (5): 747 - 752.