

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2003 )02-0097-04

## 丝裂霉素 C 对肝癌细胞中 NF- $\kappa$ B 基因表达和分布的影响

唐 亮, 满晓波, 曹惠芳, 邱秀华, 刘淑琴, 谈冶雄, 吴孟超, 王红阳 ( 第二军医大学东方肝胆外科医院国际合作生物信号转导研究中心 上海 200438 )

[ 摘 要 ] 目的: 探讨丝裂霉素 C ( MMC ) 对肝癌细胞中 NF- $\kappa$ B 分布和基因表达的影响。方法: 应用细胞免疫组织化学检测不同浓度的 MMC 对 SK-HEP-1 细胞中 NF- $\kappa$ B 分布的影响, Western-blot 检测 50  $\mu$ g/ml MMC 作用不同时间的 NF- $\kappa$ B 蛋白水平, RT-PCR 方法比较 50  $\mu$ g/ml MMC 持续处理细胞不同时间和作用 2 h 停止用药后不同时间 NF- $\kappa$ B 基因表达水平的影响。结果: 不同剂量的 MMC 能够不同程度地使细胞核中 NF- $\kappa$ B 免疫组化染色增强, 50  $\mu$ g/ml 的 MMC 导致了 NF- $\kappa$ B 蛋白印迹水平升高, 并在 MMC 处理 8 h 的细胞中升至最高, RT-PCR 方法检测 NF- $\kappa$ B 基因 mRNA 水平在 MMC 持续处理的细胞中也上升, 在第 2 小时水平最高, 随后下降, 但是在 MMC 处理 2 h 停止用药后 NF- $\kappa$ B 基因 mRNA 水平没有下降反而继续上升, 并持续到第 12 小时。结论: MMC 能够促进 NF- $\kappa$ B 自细胞浆进入细胞核, 50  $\mu$ g/ml 的 MMC 导致了 NF- $\kappa$ B 自身表达升高并在撤除用药后仍旧存在, 提示 NF- $\kappa$ B 同细胞抗 MMC 活性密切相关。

[ 关键词 ] NF- $\kappa$ B; 丝裂霉素 C; 基因表达

[ 中图分类号 ] R735.7 [ 文献标识码 ] A

## Effect of MMC on Gene Expression and Distributing of NF- $\kappa$ B in SK-HEP-1 Cell

TANG Liang, MAN Xiao-bo, CAO Hui-fang, QIU Xiu-hua, LIU Shu-qing, TAN Ye-xiong, WU Meng-chao, WANG Hong-yang ( International Co-operation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China )

[ Abstract ] **Objective:** To detect the effect of Mitomycin-C ( MMC ) on expression level and cellular distribution of NF- $\kappa$ B after MMC stimulation to further understand the mechanism of the NF- $\kappa$ B signal transduction in the response of SK-HEP-1 cell to the chemical drug. **Methods:** The cellular distribution and protein level of NF- $\kappa$ B was detected by Immunohistochemistry and Western blot method in SK-HEP-1 cell treated with different concentration of MMC for different duration. The mRNA expression of NF- $\kappa$ B gene was determined by RT-PCR in SK-HEP-1 cell treated with 50  $\mu$ g/ml concentration MMC for different time after continuing treatment and 2 h treatment. **Results:** MMC stimulated the NF- $\kappa$ B influx into the nucleus from plasma and elevated the protein level of NF- $\kappa$ B and reached the peak at 8th hour. On effect of continual treatment of 50  $\mu$ g/ml concentration MMC the expression level of NF- $\kappa$ B gene was elevated until the peak at 2nd h and then descended. However after treatment of MMC for 2 h and then withdrawal, the expression of NF- $\kappa$ B was elevated until 12<sup>th</sup> h. **Conclusions:** MMC could drive the NF- $\kappa$ B to come into the nucleus and elevate the expression of the gene. It was suggested that the NF- $\kappa$ B signal transduction pathway had relation to the response of SK-HEP-1 cell to MMC treatment.

[ Key words ] NF- $\kappa$ B; mitomycin-C; gene expression

\* 丝裂霉素 C 是临床上肝癌术中、术后以及插管化疗中常用的药物,并能诱导肝癌细胞的凋亡<sup>[1]</sup>,但其基因调控机制尚缺乏深入研究。NF- $\kappa$ B 作为一种普遍存在的转录因子,是多种信号转导途径的汇聚点<sup>[2]</sup>,不

[ 基金项目 ] 国家“863”项目( 2001AA221021 )资助

[ 作者简介 ] 唐亮( 1975- ), 男, 上海人, 技师, 主要从事肿瘤信号转导研究。

仅参与介导了免疫应答、病毒复制、细胞凋亡和增殖的多种基因的表达调控,在调节肿瘤相关基因、肿瘤逃避凋亡和肿瘤化疗耐药中也发挥重要作用<sup>[3]</sup>。我们发现丝裂霉素 C 除了能够引起 NF- $\kappa$ B 进入细胞核以控制转录调控之外,还能直接引起 NF- $\kappa$ B 的表达升高。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和主要仪器

SK-HEP-1 系人肝癌细胞系, ATCC 编号 HTB-52。NF- $\kappa$ B p65 (RelA) 小鼠抗人、大鼠和小鼠单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司, sc-8008x)。丝裂霉素 C (MMC, 日本协和发酵公司), 稀释浓度 1 mg/ml, -80℃ 保存。Trizol Reagent 和 SuperScript II 逆转录试剂盒购自美国 Invitrogen, 引物由上海申友生物技术有限责任公司合成, PCR 试剂购自上海申能博彩生物科技有限公司, 免疫组织化学染色缓冲液、Western-blot 缓冲液均为标准配方, 所用试剂均为进口分装或国产分析纯。

### 1.2 细胞培养爬片制备

SK-HEP-1 细胞在 10 cm 培养皿中培养至 90% 融合, 消化后平均接种至 2 个预先置有灭菌盖玻片的六孔板中培养至 90% 融合, 各孔依次编号, 一组加入 MMC 至终浓度 4  $\mu$ g/ml ~ 100  $\mu$ g/ml, 1 号孔作为阴性对照, 过预定时间后取出进行免疫组化实验。另一组 50  $\mu$ g/ml MMC 处理的细胞分别于相应时间点收集, 用于 RT-PCR 和 Western-blot 印迹杂交。

### 1.3 免疫组化

经 MMC 处理的 SK-HEP-1 细胞爬片, 依次经 1% 甲醛固定, 1% 甲醇双氧水灭活内源性过氧化物酶, 1% BSA 封闭, 1:2 000 稀释 NF- $\kappa$ B 抗体 50  $\mu$ l 37℃ 温育 30 min, 4℃ 过夜, 1:500 稀释 HRP 标记的羊抗小鼠二抗 50  $\mu$ l 37℃ 温育 30 min, 1:10 稀释 DAB 50  $\mu$ l 显色, 苏木精复染 (以上各步间以 1  $\times$  PBS 清洗); 脱水, 透明, 封片。

### 1.4 Western-blot

细胞去培养液, PBS 洗后以 RIPA 0.5 ml 裂解, 加入 PMSF 至 100  $\mu$ g/ml, 冰浴 1 h, 4℃ 10 000  $\times$  g 离心 10 min, 取上清, -80℃ 冻存。分光光度计 Bradford 法定量。10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转移 2 h, 丽春红 S 染色, 标记 Marker 位置。1  $\times$  TBST-milk 缓冲液 (1  $\times$  TBST, 5% 脱脂奶粉) 封闭 1 h。1:10 000 NF- $\kappa$ B 抗体室温孵育 1 h, 1  $\times$  TBST 洗膜, HRP 标记的羊抗小鼠抗体 (1:10 000 稀释), 室温作用 1 h, 1  $\times$  TBST 洗膜, 新鲜配制的 ECL 显色液 4 ml (A, B 液等体积混匀) 显色 1 min, 封入保鲜膜中, 压片, 显影 1 min。

### 1.5 总 RNA 的提取

细胞总 RNA 提取依照 Trizol Reagent 常规方法进

行。

### 1.6 RT-PCR

总 RNA 逆转录反应方法依照 SuperScript II 常规方法进行。PCR 反应过程如下: 在 PCR 管中配制 47  $\mu$ l PCR 反应体系 (10  $\times$  Buffer 5  $\mu$ l, 25  $\mu$ mol/L MgCl<sub>2</sub> 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L dNTP 2  $\mu$ l, 25  $\mu$ mol/L NF- $\kappa$ B 上、下游引物各 1  $\mu$ l (上游引物: 5'-GAG GTG TAT TTC ACG GGA CC-3'; 下游引物: 5'-GAA GTC CAT GTC CGC AAT GG-3', 扩增片段 954 bp, Taq 酶 5U, 去离子水 32  $\mu$ l), 加入逆转录产物 1  $\mu$ l 作为模板, 在 PCR 仪上作如下扩增: 94℃ 3 min, 94℃ 50 s, 60℃ 50 s, 72℃ 90 s, 8 次循环后加入  $\beta$ -actin 上、下游引物各 1  $\mu$ l (上游引物: 5'-CAG CCA TGT ACG TTG CTA TC-3'; 下游引物: 5'-GGA GTA CTT GCG CTC AGG AG-3', 扩增片段 626 bp), 继续 22 次循环, 最后延伸 10 min。完成后各管取 10  $\mu$ l 进行琼脂糖凝胶电泳。用 SxImage 系统拍摄和分析, 以目的条带与  $\beta$ -actin 条带的量的比值, 计算各产物的相对量。

## 2 结果

### 2.1 MMC 处理 SK-HEP-1 细胞的 NF- $\kappa$ B 蛋白表达和细胞内分布

分别用 4  $\mu$ g/ml ~ 100  $\mu$ g/ml 浓度的 MMC 处理 SK-HEP-1 细胞 8 h。制备细胞爬片后进行免疫组化检测 (见图 1), 发现 MMC 能够促进 NF- $\kappa$ B 自细胞浆进入细胞核, 并随着剂量的增加而更加显著, 其中采用 50  $\mu$ g/ml 的 MMC 处理细胞 8 h, NF- $\kappa$ B 染色较深, 而在第 24 小时对肿瘤细胞又具有较强的杀伤作用, 采用较小剂量处理的细胞中对 NF- $\kappa$ B 的激活入核效果不明显。核内 NF- $\kappa$ B 量增多, 说明 MMC 能使 I $\kappa$ B 磷酸化造成 NF- $\kappa$ B 解离进入细胞核, 同时观察到在第 8 小时细胞内 NF- $\kappa$ B 总量增加, 提示在 MMC 处理后的细胞中 NF- $\kappa$ B 还可能存在自身的表达增加。为了验证 MMC 是否上调了 NF- $\kappa$ B 的表达水平, 我们随后用 Western-blot 方法检测了 NF- $\kappa$ B 的蛋白含量变化。分别收集 MMC 作用不同时间的细胞制备总蛋白, Western-blot 检测总蛋白中的 NF- $\kappa$ B 含量的变化。发现在 MMC 处理 8 h 的细胞中, NF- $\kappa$ B 蛋白升至最高 (见图 2), 结果提示在 MMC 作用后期, 不但引起 NF- $\kappa$ B 的空间转移, 而且还导致了 NF- $\kappa$ B 自身蛋白水平升高, 12 h 后 NF- $\kappa$ B 蛋白量仍较高, 但是少于第 8 小时, 而至第 24 小时几乎检测不到信号。为了进一步研究 MMC 对 NF- $\kappa$ B 的影响, 采用 RT-PCR 检测了 NF- $\kappa$ B 基因表达水平的变化。

### 2.2 MMC 处理细胞中 NF- $\kappa$ B 基因表达的影响

用 RT-PCR 方法检测了 MMC 处理细胞后的各时间点的 NF- $\kappa$ B 的表达情况,内参照采用  $\beta$ -actin,表达程度以 PCR 电泳条带的光密度的面积积分的比值表示。NF- $\kappa$ B 的引物设计采用人、小鼠和大鼠同源并且符合引物设计原则的序列。结果显示,NF- $\kappa$ B 的基因表达在 MMC 处理后 2 h 表达水平超过了正常水平(见图 3),说明 MMC 的确上调了 NF- $\kappa$ B 基因的表达,这一时间较免疫组化和 Western-blot 显示的 NF- $\kappa$ B 蛋白总量增多的时间点提前。为了深入研究 MMC 对 NF- $\kappa$ B 基因表达的作用,我们又进行了 MMC 作用 2 h 后停止作用后不同时间点的 NF- $\kappa$ B 基因表达水平变化的检测,结果发现在 MMC 作用停止后,NF- $\kappa$ B 基因的表达水平不但没有下降,反而在 24 h 内逐渐升高(见图 4)。

### 3 讨论

研究表明,肿瘤细胞同化疗药物接触后,不仅对此药物产生耐受,而且对其它结构和功能不同的药物也产生抗药性<sup>[4]</sup>。抗肿瘤药物的疗效不仅取决于药物杀伤肿瘤细胞的能力,也同样取决于诱导细胞凋亡的能

图 3 RT-PCR 检测丝裂霉素处理不同时间的 NF- $\kappa$ B 的表达情况

Fig. 3 The expression level of the NF- $\kappa$ B gene in SK-HEP-1 cells treated by MMC for different duration detected by RT-PCR

M: pUC mix 8 ( Fermentas ); 1: Negative; 2: 2 h; 3: 4 h; 4: 8 h; 5: 12 h

图 1 不同浓度丝裂霉素处理 SK-HEP-1 细胞 8 h 后 NF -  $\kappa$ B 的免疫组化结果

Fig. 1 The Immunohistochemistry result of SK-HEP-1 cells treated by MMC with different concentration

A: 4  $\mu$ g/ml; B: 7  $\mu$ g/ml; C: 10  $\mu$ g/ml; D: 20  $\mu$ g/ml; E: 50  $\mu$ g/ml; F: 100  $\mu$ g/ml

图 2 Western-blot 检测丝裂霉素处理不同时间内 NF- $\kappa$ B 蛋白表达变化

Fig. 2 The expression NF -  $\kappa$ B protein in SK-HEP-1 cells treated by MMC for different duration detected by Western-blot

1: 0 h; 2: 2 h; 3: 4 h; 4: 8 h; 5: 12 h; 6: 24 h

图 4 RT-PCR 检测丝裂霉素处理 2 h 后换普通培养基后细胞各时间点的 NF- $\kappa$ B 的表达情况

Fig. 4 The expression level of the NF- $\kappa$ B gene in SK-HEP-1 cells at different time  $\beta$  after withdrawal of 2 h treatment of MMC detected by RT-PCR

M: pUC mix 8 ( Fermentas ); 1: Negative; 2: 0 h; 3: 1 h; 4: 2 h; 5: 4 h; 6: 8 h; 7: 12 h

力。临床上,原发性肝癌在围手术期的辅助治疗仍很重要。研究肝癌耐药信号转导通路中的关键调节基因,将对肝癌的临床化疗提供理论基础。如果能阻断其中的耐药通路,用阻断剂辅助化疗药物将提高肝癌化疗的疗效,使肝癌从对药物不敏感到敏感,从耐药到不耐药,将提高肝癌治疗效果。MMC 是临床上治疗肝癌常用的化疗药物,通常用于肝癌手术切除后的肠系膜上静脉注射治疗和静脉埋泵持续化疗。

NF- $\kappa$ B 能与很多基因的启动子和增强子中的  $\kappa$ B 序列位点发生特异结合,是一类关键性的核转录因子<sup>[3,5]</sup>。非激活条件下,NF- $\kappa$ B 在胞浆与它的抑制蛋白 I $\kappa$ B 家族形成复合物,当细胞受到细胞外信号刺激时,可激活一个或多个信号转导途径,导致 NF- $\kappa$ B 与 I $\kappa$ B 发生解离,调节有关基因的转录<sup>[6]</sup>。NF- $\kappa$ B 参与众多的基因转录调控,同肿瘤细胞的耐药和抗凋亡作用密切相关<sup>[7]</sup>,而诱导细胞凋亡是许多抗癌药物治疗肿瘤的机制之一,NF- $\kappa$ B 使肿瘤细胞对化疗药物诱导的细胞凋亡产生抗性,减弱治疗效果。肿瘤细胞中 NF- $\kappa$ B 的活化是其抗药性产生的机制之一,而在抗肿瘤的过程中对于那些能同时使核转录因子 NF- $\kappa$ B 活化者如果能抑制 NF- $\kappa$ B 的活化,相信可以提高治疗效果。

我们观察到受 MMC 刺激的 SK-HEP-1 细胞胞浆 NF- $\kappa$ B 进入细胞核,同时发现在 MMC 激活的 NF- $\kappa$ B 转录调控中不但有 NF- $\kappa$ B 的空间变化,而且随着 MMC 作用时间的延长,NF- $\kappa$ B 的自身的表达也会上升,提示细胞动员 NF- $\kappa$ B 的量的增多来增强对 MMC 产生的由 NF- $\kappa$ B 介导的下游基因的转录过程,这其中可能就包含肿瘤耐药的机制。我们发现 NF- $\kappa$ B 基因 RNA 水平升高的时间较免疫组化和 Western blot 显示的 NF- $\kappa$ B 蛋白总量增多的时间点提前,说明细胞中总 NF- $\kappa$ B 的

升高是 NF- $\kappa$ B 基因表达激活所致。MMC 持续处理的肝癌细胞中 NF- $\kappa$ B 基因表达在一定的时间段中先上升而后下降,其机制除了细胞死亡所致,也可能是由于因为 MMC 本身抑制 NF- $\kappa$ B 的持续表达,但我们发现在 MMC 处理肝癌细胞 2 h 后停止作用,NF- $\kappa$ B 基因表达水平不是随之下降,反而逐渐上升,所以对于 MMC 这样的化疗药物短时间作用会持续诱导像 NF- $\kappa$ B 这样的抗凋亡基因的持续表达,说明短时间应用化疗药后撤除药物则可能使肝癌细胞的抗凋亡能力增强,这可能同化疗药物耐药的机制相关,提示化疗药物也需要持续应用,其机制和临床意义值得进一步研究。阻断 NF- $\kappa$ B 信号转导通路将有助于增强化疗药物对肝癌的治疗疗效。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] 陈绪军,刘志苏,艾中立. 丝裂霉素诱导人肝癌细胞凋亡的研究[ J ]. 中华实验外科杂志, 2000, 5: 467.  
 [ 2 ] Dixit V, Mak TW. NF- $\kappa$ B Signaling: Many Roads Lead To Madrid [ J ]. Cell. 2002, 111(5): 615-619.  
 [ 3 ] Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. TNF- and Cancer Therapy-Induced Apoptosis: Potentiation by Inhibition of NF- $\kappa$ B [ J ]. Science, 1996, 274: 784-787.  
 [ 4 ] Pasran I, Gottesman MM. Multidrug resistance [ J ]. Annu Rev Med, 1991, 42: 277-286.  
 [ 5 ] Ting AY, Endy D. Decoding NF- $\kappa$ B Signaling [ J ]. Science, 2002, 298: 1189-1190.  
 [ 6 ] Huxford T, Huang DB, Malek S, et al. The Crystal Structure of the I $\kappa$ B $\alpha$ / NF- $\kappa$ B Complex Reveals Mechanisms of NF- $\kappa$ B Inactivation[ J ]. Cell, 1998, 95: 759-770.  
 [ 7 ] Antwerp van DJ, Martin SJ, Kafri T, et al. Suppression of TNF- $\alpha$ -Induced Apoptosis by NF- $\kappa$ B [ J ]. Science, 1996, 274: 787-789.

[ 收稿日期 ] 2002 - 08 - 10 [ 修回日期 ] 2003 - 01 - 20

《 中华医学实践杂志 》征订启事

《中华医学实践杂志》具有 ISSN/CN 标准刊号,是由中华临床医药学会主办的综合性、国际性医学期刊。也是《中国核心期刊(遴选)数据库》收录期刊、国家科技部西南信息中心《中文科技期刊数据库》收录期刊及中文生物医学期刊文献数据库收录期刊。主要反映医学科研成果、实验研究与临床实践和中西医的诊疗经验,传播医药新理论,交流医学新技术,帮助医学教研及医疗卫生技术人员更新知识,促进医学学术交流与研究。

本刊栏目有:论著、综述、讲座、临床医学、中西医结合、中医中药、药物与临床、检验与临床、医学影像、误诊分析、病例报告、预防医学、医学教育、医院管理、护理研究等。

来稿刊登周期短,免收审稿费,录用文稿颁发论文证书,欢迎投稿。

来稿请寄:山东省济南市北园大街 598 - 1 号( 邮编 250031 )

电话:0531 - 5922668

E - mail: chjh@ public. jn. sd. cn

传真:( 0531 )5939166