

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.01.004

## TNF- $\alpha$ 通过 JNK 和 AP-1 途径调节乳腺癌 MCF-7 细胞 VEGF 的表达

殷咏梅<sup>1</sup> $\Delta$ , 束永前<sup>1</sup> $\Delta$ , 陈晓锋<sup>1</sup>, 李 薇<sup>1</sup>, 刘凌翔<sup>1</sup>, 韩 晓<sup>2\*</sup> (1. 南京医科大学第一附属医院 肿瘤科, 南京 210029; 2. 南京医科大学江苏省人类功能基因组实验室, 南京 210029)

[摘要] 目的: 探讨肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )诱导血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的机制。方法: 以 20 ng/ml TNF- $\alpha$  处理 MCF-7 细胞, 用 Western blotting 检测 MAPK( JNK, p38, ERK )信号通路中蛋白磷酸化水平的变化以及 AP-1 家族( c-Jun, Jun-B, c-Fos, Fra-1, Fra-2, JunD )的蛋白表达及磷酸化水平的变化; 以免疫共沉淀法检测激活后的 AP-1 存在形式; 以 RT-PCR 以及 Western blotting 检测 VEGF mRNA 和蛋白表达水平; 以 MAPK 抑制剂预处理后, 检测 VEGF 蛋白表达水平; 运用 ChIP 的方法验证 p-c-Jun 结合在 VEGF 启动子区。结果: TNF- $\alpha$  通过激活 JNK 信号转导通路活化 AP-1; 被 TNF- $\alpha$  激活后 AP-1 以 p-c-Jun-c-Jun 和 p-c-Jun-JunB 同源二聚体形式存在; TNF- $\alpha$  通过激活转录因子 AP-1 促进 VEGF 的转录, 并增强 VEGF 的蛋白表达水平; p-c-jun 通过与 VEGF 启动子 AP-1 结合参与对 VEGF 转录的调控。结论: 在 TNF- $\alpha$  作用下, AP-1 通过 p-c-jun 同源二聚体结合在 VEGF 启动子的 AP-1 结合位点上, 直接对 VEGF 转录进行调控。

[关键词] 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 血管内皮细胞生长因子; 激活蛋白-1; c-Jun N 末端激酶

[中图分类号] R737.9; R392.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)01-012-06

## Tumor necrosis factor- $\alpha$ regulates expression of vascular endothelial growth factor via JNK and AP-1 pathway in MCF-7 cells

YIN Yong-mei<sup>1</sup> $\Delta$ , SHU Yong-qian<sup>1</sup> $\Delta$ , CHEN Xiao-feng<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, LIU Ling-xiang<sup>1</sup>, HAN Xiao<sup>2</sup> (1. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 2. Lab of Human Functional Genome, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism by which tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induces expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) in MCF-7 cells. **Methods:** MCF-7 cells were treated with TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) for different time periods. Western blotting was used to detect the phosphorylation of MAPK pathway proteins (JNK, P38, and ERK) and the expression and phosphorylation of AP-1 family members( c-Jun, Jun-B, c-Fos, Fra-1, Fra-2, JunD ). The activation of AP-1 was detected by immunoprecipitation( IP ). RT-PCR and Western blotting were used to detect the VEGF mRNA and protein expression. The VEGF protein expression was also detected after pre-treatment with inhibitor of MAPK. ChIP method was used to verify the binding of p-c-Jun to the promoter region of VEGF. **Results:** TNF- $\alpha$  activated AP-1 through JNK signal pathway. AP-1 existed in the form of p-c-Jun-c-Jun and p-c-Jun-JunB homodimer after activation. TNF- $\alpha$  increased VEGF transcription by activating transcriptional factor AP-1 and result in increased expression of VEGF protein. P-c-jun regulated the transcription of VEGF through binding to the AP-1 site of VEGF. **Conclusion:** TNF- $\alpha$  can mediate the transcription of VEGF through a AP-1-dependent pathway.

[Key words] tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ); vascular endothelial growth factor(VEGF); activator protein 1 (AP-1); c-Jun N-terminal kinase( JNK )

[ Chin J Cancer Biother, 2009, 16(1): 12-17 ]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目( No. 30772474 );江苏省自然科学基金资助项目( No. BK2008477 )。Supported by the National Natural Science Foundation of China( No. 30772474 ); the Natural Science Foundation of Jiangsu Province ( No. BK2008477 )

[作者简介] 殷咏梅( 1969- ), 女, 江苏省南通市人, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事乳腺癌基础及临床研究, E-mail: ym.yin@hotmail.com; 束永前( 1962- ), 男, 江苏省苏州市人, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事肿瘤生物治疗研究, E-mail: shuyongqian@cscs.org.cn。

$\Delta$ 殷咏梅, 束永前为并列第一作者

\* 通讯作者( Corresponding author ). E-mail: hanxiao@njmu.edu.cn

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )是一种重要的炎症因子,近年来研究表明,由肿瘤相关巨噬细胞分泌的 TNF- $\alpha$  可以通过多种机制促进肿瘤侵袭和转移,其机制之一是通过诱导血管生成。

VEGF 是诱导血管生成的强大的促进因子。许多细胞因子可以上调 VEGF 的表达,如 TNF- $\alpha$ 、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、转化生长因子- $\alpha$ (transforming growth factor- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ )等<sup>[1]</sup>。在 VEGF 基因的启动子区有 SP-1、AP-1 等结合位点<sup>[2]</sup>。在不同的细胞中, TNF- $\alpha$  可以通过不同的机制诱导细胞中 VEGF 的表达。在脑胶质瘤细胞中,通过转录因子 SP-1 诱导 VEGF 的表达<sup>[3]</sup>。在乳腺癌中 TNF- $\alpha$  通过何种途径调节 VEGF 的表达尚不明确。本实验通过 RT-PCR、Western blotting、免疫沉淀等方法探讨 TNF- $\alpha$  如何通过 Jun 和 AP-1 途径调节乳腺癌 MCF 细胞中 VEGF 的表达,进而促进肿瘤的侵袭和转移,以期加深对 TNF- $\alpha$  促进肿瘤侵袭转移的作用机制的认识,为临床上研发抑制肿瘤侵袭和转移的新的靶向药物提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株和试剂

人乳腺癌细胞株 MCF-7 购自 ATCC。PCR 扩增试剂盒购自美国 invitrogen 公司, Fugene 6 购自美国 Roche 公司, 荧光素酶检测试剂盒购自美国 Promega 公司, CHIP 试剂盒购自美国 Upstate 公司。c-Jun(H-79)、JunD(SC-74)、JunB(Sc-8051)、c-Fos(Sc-52)、Fra-1(N-17)、Fra-2(Q-20)、p-JNK(Sc6254)等抗体购自美国 Santa Cruz 公司, p-c-Jun(ser63)、p-p38(Thr180/Tyr182)、p-ERK(Thr202/204)购自美国 Cell Signal 公司, p-c-Jun(ser73)抗体购自美国 Upstate 公司, VEGF 抗体购自日本 Abcam 公司,  $\beta$ -actin 抗体购自美国 Sigma 公司。DMEM、L-Glutamine 购自美国 GIBCO 公司, 细胞裂解用蛋白酶抑制剂混合片购自美国 Roche 公司。TNF- $\alpha$  购自 R&D 公司, 所有实验中的终质量浓度为 20 ng/ml。

### 1.2 细胞培养

MCF-7 细胞采用 DMEM 培养液, 加入 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素, 置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下的细胞培养箱中, 取对数生长期细胞用于实验。

### 1.3 Western blotting 检测 TNF- $\alpha$ 对 MCF-7 细胞 AP-1 家族成员表达和相关信号通路的影响

以 20 ng/ml 的 TNF- $\alpha$  处理对数生长期 MCF-7 细胞, 作用 0、0.5、3、6、12、24 h 后按约  $5 \times 10^7$  个细

胞加入 400  $\mu$ l 细胞裂解缓冲液处理, 提取细胞总蛋白, 分光光度法定量。取 50  $\mu$ g 蛋白上样到 NuPage 10% Bis-Tris 预制胶分离, 印迹转染醋酸纤维膜。用含 5% 脱脂干燥奶粉的 0.05% Tween-20/PBS 在室温下孵育 2 h 以去除非特异结合部分, 漂洗 2 次。加入抗 Fra-1(1:1 000)、Fra-2(1:1 000)、c-Jun(1:1 000)、p-c-Jun(1:1 000)、c-Fos(1:1 000)、JunB(1:1 000)、JunD(1:1 000)以及 VEGF(1:500)、p-JNK(1:1 000)、p-ERK(1:1 000)、p-P38(1:1 000)、 $\beta$ -actin(1:2 000, 作为内参)的抗体于 4  $^{\circ}$ C 过夜。分别加入相应的二抗孵育 1 h。加入 ECL 后冲洗, 曝光, 分析所显影条带的性质。

### 1.4 RT-PCR 检测 TNF- $\alpha$ 对 MCF-7 细胞 VEGF mRNA 表达的影响

以 20 ng/ml TNF- $\alpha$  处理对数生长期 MCF-7 细胞 0、3、24 h, Trizol 试剂一步法提取细胞总 RNA。1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定, 紫外分光光度法测定纯度并定量。分别取各组总 RNA 2  $\mu$ g, 用 SuperScript™ 逆转录酶系统合成 cDNA 后进行 PCR 反应。94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后进入 30 个 PCR 循环, 94  $^{\circ}$ C 变性 60 s, 57  $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 最后在 72  $^{\circ}$ C 继续延伸 5 min。取 10  $\mu$ l RT-PCR 产物在 1.8% 的琼脂糖凝胶上电泳。

引物序列: VEGF 正向引物 5'-GCGGGCTGCCTCGCAGTCTA-3', 反向引物 5'-TCACCGCCTTG-GCTTGTAC-3'; GAPDH 正向引物 5'-GGCTCTC-CAGAATCATCCCTGC-3', 反向引物 5'-GGGT-GTCGCTGTGAAGTCAGAGG-3'。

### 1.5 免疫沉淀检测 TNF- $\alpha$ 激活的 AP-1 家族成员二聚体存在形式

以 20 ng/ml 的 TNF- $\alpha$  处理对数生长期 MCF-7 细胞, 作用 0、0.5、3 h 后, 按约  $5 \times 10^7$  个细胞加入 400  $\mu$ l 细胞裂解液。取所制备的蛋白样品加入 1  $\mu$ l p-c-Jun, 4  $^{\circ}$ C 摇动过夜。加入 20  $\mu$ l 充分重悬的 Protein A agarose, 4  $^{\circ}$ C 缓慢摇动 1~3 h。瞬时高速离心, 小心吸弃上清。以细胞裂解液(每次 0.5~1 ml)洗涤沉淀 2 次。去除上清, 加入 20  $\mu$ l SDS-PAGE 上样缓冲液涡旋后重悬沉淀, 瞬时高速离心把样品离心至管底。沸水浴处理 3~5 min, 取部分样品用于 SDS-PAGE 电泳。

### 1.6 染色质免疫沉淀检测 AP-1 对 VEGF 表达的调控作用

以 20 ng/ml TNF- $\alpha$  处理对数生长期 MCF-7 细胞, 作用 0、0.5、3 h 后, 按 Upstate 公司的 chromatin immunoprecipitation assay kit 操作程序操作。(1)

在实验前 24 h 将  $1 \times 10^7$  MCF-7 细胞种于 150 mm 细胞培养皿, 用 TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) 分别作用 3、12 h 后, 加入甲醛, 使终体积分数为 1%。(2) 37 °C 作用 10 min, 吸弃培养液, 用冷 PBS 洗涤 2 次。将细胞刮下后  $400 \times g$  4 °C 离心 4 min。沉淀细胞中加入 1 ml SDS 裂解液冰上孵育 10 min。(3) 采用超声将 DNA 剪切成长度在 500 ~ 1 000 bp 的片段。(4) 4 °C  $11\ 000 \times g$  离心 10 min。上清移至 2 ml 离心管中, 弃去沉淀。将上清用染色质免疫沉淀缓冲液 10 倍稀释。取出 100  $\mu$ l 作为内参。(5) 为了避免非特异的背景, 加入鲑鱼精 DNA/protein A agarose-50% slurry, 4 °C 搅动 30 min, 离心后在上清中加入 p-c-jun 抗体, 4 °C 旋转过夜, 再加入鲑鱼精 DNA/protein G 琼脂糖 4 °C 旋转 1 h。离心后将珠子用洗涤缓冲液冲洗, 65 °C 过夜后恢复 DNA-蛋白质交联。(6) DNA 片段采用 QIAquick PCR 试剂盒纯化。含 AP-1 结合位点长度为 150 bp。VEGF 的序列的扩增: 引物序列为: 正向引物 5'-AGATGTTGCCAGGGAAGTGA-3'; 反向引物 5'-GAGACGAAACCCCATTTCT-3'。按试剂盒要求进行 PCR 操作。

## 2 结果

### 2.1 TNF- $\alpha$ 对 AP-1 家族成员的活化作用

AP-1 家族成员的激活主要表现在蛋白质表达水平的提高或者磷酸化水平的提高, 因此本实验检测了 TNF- $\alpha$  作用后 AP-1 家族成员的表达水平。结果表明, TNF- $\alpha$  作用可明显上调 MCF-7 细胞 AP-1 家族中 c-Jun、c-Fos 和 JunB 的表达; 其中 c-Fos 在 TNF- $\alpha$  作用后表达水平略有升高, 但是在 3 h 后即出现下降趋势(图 1A)。AP-1 家族其他成员如 Fra-1、Fra-2 在 MCF-7 细胞中呈弱表达, JunD 呈强表达, 在 TNF- $\alpha$  作用后表达水平均未出现明显改变; 因此 TNF- $\alpha$  对 AP-1 家族成员 Fra-1、Fra-2 和 JunD 无明显活化作用(图 1B)。c-Jun 是 AP-1 家族中最重要的一个成员, 磷酸化的 c-Jun 可以在转录水平对基因进行调控。TNF- $\alpha$  作用后增强了 p-c-Jun(ser73) 的表达水平(图 1C)。本实验未检测到 p-c-Jun(ser63) 水平的改变(图未显示)。

### 2.2 TNF- $\alpha$ 诱导活化的 AP-1 家族成员主要以 p-c-Jun 和 c-Jun 以及 p-c-Jun 和 JunB 结合的同源二聚体形式存在

正常情况下 AP-1 家族成员以 Jun-Jun 同源二聚体和 Jun-Fos 异源二聚体形式存在。但同源二聚体的转录活性较异源二聚体的活性弱, 在细胞中异源二聚体起着主要的转录调节作用<sup>[4]</sup>。本实验采

用免疫共沉淀方法进一步了解活化的 AP-1 以何种结合形式存在。由于已检测到 TNF- $\alpha$  处理后 p-c-Jun(ser73) 表达增加, 而 p-c-Jun(phospho-c-Jun) 是 AP-1 的活化形式。此前已经证明 TNF- $\alpha$  刺激后 c-Jun、c-Fos 和 JunB 的表达上调, 因此本实验检测的是这 3 种被活化的 AP-1 家族成员是否与 p-c-Jun 结合在一起。实验结果表明, TNF- $\alpha$  诱导活化的 AP-1 家族成员以 p-c-Jun-c-Jun 以及 p-c-Jun-JunB 同源二聚体的形式存在(图 2)。因为 c-Fos 在 MCF-7 细胞中表达水平较低, TNF- $\alpha$  作用后表达水平略有增强, 但是在 3 h 后即出现表达水平下降, 因此采用免疫共沉淀方法未能检测到 p-c-Jun-c-Fos 异源二聚体的存在。

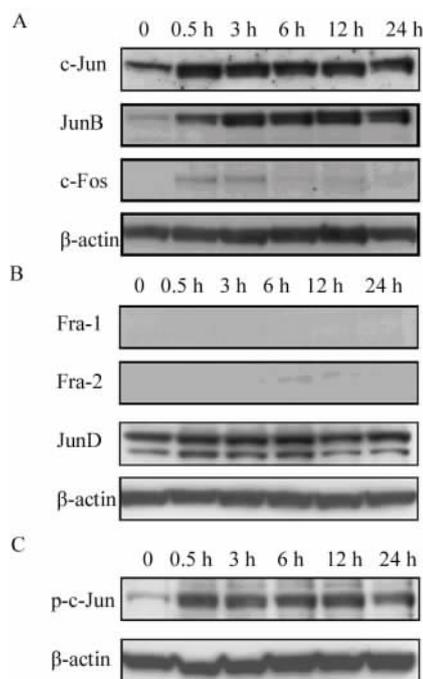


图 1 TNF- $\alpha$  对 MCF-7 细胞中 AP-1 家族成员表达的影响

### Fig. 1 Effects of TNF- $\alpha$ on expression of AP-1 family members in MCF-7 cells

A: c-jun, JunB, and c-Fos were up-regulated in cells 30 min after treatment with TNF- $\alpha$ ; B: Fra-1, Fra-2 and JunD were not significantly changed 24 h after treatment with TNF- $\alpha$ ; C: p-c-jun was significantly up-regulated 30 min after treatment with TNF- $\alpha$

### 2.3 TNF- $\alpha$ 对 MCF-7 细胞中 JNK、P38 和 ERK 信号通路的影响

AP-1 的活性主要受 MAPKs 家族调节, 该家属有多个亚家族, 其中在细胞信号转导中发挥重要作用的有 3 种: JNK, p38 及 ERK。在不同的组织和细胞中, AP-1 受不同的激酶调控。本实验以 Western

blotting 检测了 TNF- $\alpha$  作用后磷酸化 JNK、p38 以及 ERK 的水平。结果显示, TNF- $\alpha$  作用 30 min 后即出现磷酸化 JNK 水平的增强, 而 p-P38 和 p-ERK 的水平无明显改变(图 3)。说明在 MCF-7 细胞中, TNF- $\alpha$  通过 JNK 信号通路激活 AP-1 家族成员, 而对其他两条 MAPKs 通路没有明显影响。

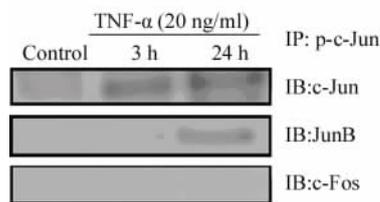


图 2 TNF- $\alpha$  诱导活化的 AP-1 家族成员的存在形式

Fig. 2 Status of AP-1 complex after TNF- $\alpha$  treatment

Activated AP-1 family members existed as p-c-Jun-c-Jun and p-c-Jun-JunB homodimer

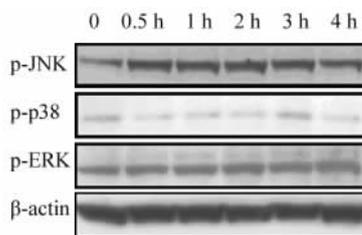


图 3 TNF- $\alpha$  对 MCF-7 细胞中 MAPK 信号通路的影响

Fig. 3 Effect of TNF- $\alpha$  on MAPK pathway in MCF-7 cells

p-JNK was enhanced when MCF-7 cells were treated with TNF- $\alpha$  for more than 30 min; p-P38 and p-ERK were not enhanced by TNF- $\alpha$

#### 2.4 TNF- $\alpha$ 对 MCF-7 细胞 VEGF mRNA 表达的影响

RT-PCR 检测结果显示, TNF- $\alpha$  作用可以增强 MCF-7 细胞内 VEGF mRNA 的水平(图 4)。

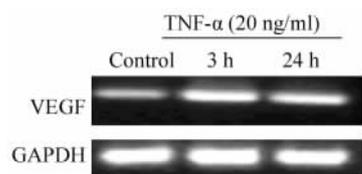


图 4 TNF- $\alpha$  诱导 VEGF 转录水平升高

Fig. 4 VEGF gene transcription was elevated by TNF- $\alpha$

#### 2.5 TNF- $\alpha$ 对 MCF-7 细胞 VEGF 蛋白表达的影响

实验结果显示: TNF- $\alpha$  处理 3 h 后 MCF-7 细胞即可以出现 VEGF 蛋白表达水平增强; 用 5  $\mu$ mol/L

SP600125( JNK 抑制剂 )预处理 MCF-7 细胞 30 min, 再用 TNF- $\alpha$  处理 MCF-7 细胞 3 h, 发现细胞内 VEGF 的蛋白表达水平明显降低(图 5)。

#### 2.6 TNF- $\alpha$ 对磷酸化 c-Jun 与 VEGF 启动子结合能力的影响

为了解 AP-1 主要家族成员磷酸化 c-Jun 是直接结合在 VEGF 启动子区域参与转录调控, 还是通过结合在启动子区域的其他转录调控因子间接调节 VEGF 的转录, 本实验在免疫沉淀 p-c-Jun 后, PCR 扩增含 AP-1 结合位点、长度为 150 bp 的 VEGF 启动子序列的 DNA 片段。结果表明, 磷酸化的 c-Jun 结合于 VEGF 的启动子区域, 直接参与调节 VEGF 转录; TNF- $\alpha$  的刺激增强了磷酸化 c-Jun 与 VEGF 启动子结合的能力(图 6)。

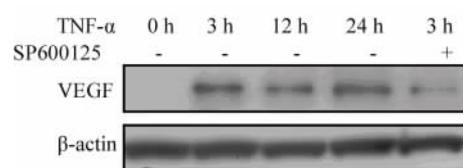


图 5 TNF- $\alpha$  对 MCF-7 细胞 VEGF 蛋白表达的影响

Fig. 5 VEGF protein expression was induced by TNF- $\alpha$  in MCF-7 cells

VEGF protein was significantly induced by TNF- $\alpha$  after 3 h. Pretreatment with SP600125 ( 5  $\mu$ mol/L ), a specific inhibitor of JNK, significantly decreased the VEGF protein expression

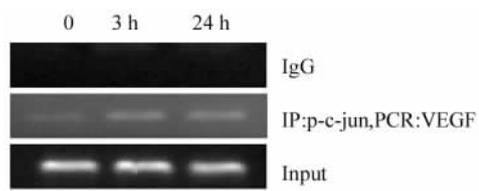


图 6 TNF- $\alpha$  对磷酸化 c-Jun 与 VEGF 启动子结合能力的影响

Fig. 6 Effect of TNF- $\alpha$  on the binding of p-c-Jun to VEGF promoter

PCR amplification of DNA present in the anti-p-c-Jun chromatin immunoprecipitation precipitate showed that TNF- $\alpha$  treatment promote p-c-Jun binding to VEGF promoter DNA

### 3 讨论

浸润肿瘤组织的巨噬细胞分泌的内源性 TNF- $\alpha$  可以通过多种机制促进乳腺癌细胞的侵袭和转移<sup>[5-7]</sup>, 而 TNF- $\alpha$  有促进肿瘤血管生成的作用<sup>[8-9]</sup>。VEGF 作为重要的促血管形成的调控因子, 其表达

又受到许多细胞因子的调节, TNF- $\alpha$  是其中重要的一个成员<sup>[10]</sup>。在 VEGF 基因的启动子区有转录因子 SP-1、AP-1、AP-2 的结合位点<sup>[2]</sup>, 但是在不同组织细胞中, VEGF 转录水平的调节各不相同。在脑胶质瘤细胞中, TNF- $\alpha$  可通过转录因子 SP-1 诱导肿瘤细胞中 VEGF 的表达<sup>[3]</sup>。在乳腺癌细胞中 TNF- $\alpha$  通过何种途径调节 VEGF 的表达目前尚不明确。

现有研究表明, AP-1 参与了 TNF- $\alpha$  受体的信号转导通路<sup>[11]</sup>。将人乳腺癌细胞与巨噬细胞共培养, 均发现 AP-1 表达水平上调<sup>[6]</sup>。本研究结果表明, TNF- $\alpha$  可以增强 AP-1 家族成员 c-Jun、c-Fos 和 JunB 的表达水平, 而对其他家族成员如 Fra-1、Fra-2 和 JunD 的表达无明显作用。c-Jun 是 AP-1 家族的主要成员, 在许多细胞中通常呈低水平表达, 多种生长因子、细胞因子和紫外线均可使其表达水平上调。Smith 等<sup>[12]</sup> 将 c-jun 基因导入雌激素受体阳性的 MCF-7 细胞, 其雌激素受体表达转为阴性, 同时侵袭能力明显增强, 提示 c-Jun 的激活能够促进肿瘤的侵袭和转移。

AP-1 的激活表现为表达水平的升高, 同时还表现在磷酸化水平的增强。因此, 本实验同时检测了 AP-1 的主要成员 c-Jun 的磷酸化水平。TNF- $\alpha$  作用半小时后即出现磷酸化 c-Jun (phospho-c-Jun, p-c-Jun) 的表达水平升高。据文献<sup>[13]</sup>报道 c-Jun 可以在 N 端 Ser63 位和 Ser73 位点发生磷酸化。为了了解 TNF- $\alpha$  作用后, c-Jun 究竟在哪个位点发生磷酸化改变, 将 TNF- $\alpha$  作用后的 MCF-7 细胞裂解产物用抗 p-c-Jun (ser63) 抗体和 p-c-Jun (ser73) 抗体标记, 发现 p-c-Jun (ser63) 的水平未见明显改变, 而 p-c-Jun (ser73) 则明显升高。这个结果与 Arnett<sup>[14]</sup> 用化学物质诱导小鼠皮肤肿瘤后, 皮肤组织中的 p-c-Jun (ser73) 的表达水平增高, 而 TNF- $\alpha$  的小鼠则无 p-c-Jun (ser73) 的表达水平增高的结果相一致。

其他的 AP-1 家族成员 c-Fos、JunB 表达水平也有增加的现象。这个结论与 Hagemann<sup>[6]</sup> 的研究结果相一致, 但是 c-Fos 在 TNF- $\alpha$  刺激 3 h 后表达水平就开始出现下降趋势。为了了解活化了的 AP-1 家族成员在 MCF-7 细胞中以何种形式结合存在, 本研究进一步运用免疫沉淀的方法检测到 p-c-Jun 和 c-Jun 以及和 JunB 形成同源二聚体。在实验中没有检测到明显的 p-c-Jun 和 c-Fos 结合的异源二聚体形式, 分析出现这种结果的原因, 可能因为 c-Fos 在 MCF-7 细胞中的表达水平本来就很低, 在 TNF- $\alpha$  刺激后仅出现较弱的短暂的蛋白表达水平升高有关。

因为 AP-1 的活性主要受 MAPK 家族调节<sup>[15]</sup>,

后者有多个亚家族, 其中在细胞功能中发挥重要作用的有 3 种: JNK, p38 以及 ERK。在不同的组织和细胞中, AP-1 受不同的激酶调控。本实验发现在 MCF-7 中, TNF- $\alpha$  刺激后 30 min 就出现磷酸化 JNK 水平的升高, 提示 JNK 参与了 TNF- $\alpha$  对 AP-1 的激活, 相反 P38 和 ERK 在 TNF- $\alpha$  刺激 3 h 后均未出现磷酸化水平的提高, 提示在 MCF-7 细胞中这两条信号转导通路可能未起重要的作用。这个结果与 Hagemann 等<sup>[6]</sup> 的研究一致。因此, 本研究推测 P38 和 ERK 在这个过程中无明显作用或作用有限。

TNF- $\alpha$  可以增强 VEGF mRNA 以及蛋白质的表达水平。由于 AP-1 通过 JNK 途径激活, 因此用 JNK 抑制剂 SP600125 预处理 MCF-7 细胞, 发现可以逆转 TNF- $\alpha$  诱导的 VEGF 蛋白表达水平的增强, 进一步证明了 JNK 信号转导通路对 TNF- $\alpha$  诱导 VEGF 的升高起着重要作用。

AP-1 对基因的转录调控, 可以通过直接结合到基因启动子区域的结合位点上参与调控, 还可以与其他转录调控因子如 NF- $\kappa$ B 等结合, 招募这些转录调控因子结合到所调控基因启动子区域, 间接参与调控基因的转录<sup>[16]</sup>。因此本研究采用染色质免疫沉淀方法进一步检测磷酸化的 c-Jun 是否直接结合到 VEGF 的启动子。结果显示, 免疫沉淀 p-c-Jun 后, PCR 扩增出了含 AP-1 结合位点, 长度为 150 bp VEGF 的启动子序列。表明磷酸化的 c-Jun 结合于 VEGF 的启动子区域, 直接参与调节 VEGF 的转录; TNF- $\alpha$  的刺激增强了磷酸化 c-Jun 与启动子结合能力, 进而促进基因转录。总之, 本实验发现 TNF- $\alpha$  可以上调 MCF-7 细胞的 VEGF 表达水平, 这一作用主要是通过 JNK 和 AP-1 依赖的信号转导途径。尽管在这个信号转导途径中所涉及的其他参与调控的分子尚需要进一步明确, 但是目前的实验结果, 不仅丰富了对炎症因子 TNF- $\alpha$  促进肿瘤侵袭转移作用机制的认识, 更重要的是为临床上研发抑制肿瘤侵袭和转移的药物提供了实验依据。

## [参考文献]

- [1] Breen EC. VEGF in biological control [J]. J Cell Biochem, 2007, 102(6): 1358-1367.
- [2] Josko J, Mazurek M. Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis [J]. Med Sci Monit, 2004, 10(4): RA89-98.
- [3] Ryuto M, Ono M, Izumi H, et al. Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1 [J]. J Biol Chem, 1996, 271(45): 28220-28228.

- [ 4 ] Wagner EF. AP-1--Introductory remarks [ J ]. *Oncogene*, 2001, 20( 19 ): 2334-2335.
- [ 5 ] Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, *et al.* Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases[ J ]. *Carcinogenesis*, 2004, 25( 8 ): 1543-1549.
- [ 6 ] Hagemann T, Wilson J, Kulbe H, *et al.* Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK [ J ]. *J Immunol*, 2005, 175( 2 ):1197-1205.
- [ 7 ] Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, *et al.* Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop [ J ]. *Cancer Res*, 2005, 65( 12 ): 5278-5283.
- [ 8 ] Bingle L, Lewis CE, Corke KP, *et al.* Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids *in vivo*[ J ]. *Br J Cancer*, 2006, 94( 1 ): 101-107.
- [ 9 ] Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter [ J ]. *Eur J Cancer*, 2006, 42( 6 ): 745-750.
- [ 10 ] Hata Y, Sassa Y, Kita T, *et al.* Vascular endothelial growth factor expression by hyalocytes and its regulation by glucocorticoid [ J ]. *Br J Ophthalmol*, 2008, 92( 11 ):1540-1544.
- [ 11 ] Royuela M, Rodríguez-Berriguete G, Fraile B, *et al.* TNF-alpha/IL-1/NF-kappaB transduction pathway in human cancer prostate [ J ]. *Histol Histopathol*, 2008, 23( 10 ):1279-1290.
- [ 12 ] Smith LM, Wise SC, Hendricks DT, *et al.* cJun overexpression in MCF-7 breast cancer cells produces a tumorigenic, invasive and hormone resistant phenotype [ J ]. *Oncogene*, 1999, 18( 44 ): 6063-6070.
- [ 13 ] Vogt PK. Jun, the oncoprotein [ J ]. *Oncogene*, 2001, 20( 19 ): 2365-2377.
- [ 14 ] Arnott CH, Scott KA, Moore RJ, *et al.* Tumour necrosis factor-alpha mediates tumour promotion via a PKC alpha- and AP-1-dependent pathway [ J ]. *Oncogene*, 2002, 21( 31 ): 4728-4738.
- [ 15 ] Leaner VD, Donninger H, Birrer MJ. Transcription factors as targets for cancer therapy: AP-1 a potential therapeutic target [ J ]. *Curr Cancer Ther Rev*, 2007, 3( 1 ): 1-6.
- [ 16 ] Chinenov Y, Kerppola TK. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity [ J ]. *Oncogene*, 2001, 20( 19 ): 2438-2452.
- [ 收稿日期 ] 2008 - 10 - 24 [ 修回日期 ] 2008 - 12 - 05  
[ 本文编辑 ] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 《中国肿瘤生物治疗杂志》常用英文缩略词表( 三 )

PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PD	progressive disease	疾病进展, 恶化
PFS	progression-free survival	无进展生存
PMBC	peripheral blood mononuclear cell	外周血单个核细胞
PR	partial remission, partial response	部分缓解
PSA	prostate specific antigen	前列腺特异抗原
RFS	relapse-free survival	无复发生存
RIA	radioimmunoassay	放射免疫分析
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
RR	response rate	有效率
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction	反转录-聚合酶链式反应
SD	stable disease	疾病稳定
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SOD	superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
SOP	standard operating procedure	( 临床试验 ) 标准操作规程
TEM	transmission electron microscope	透射电子显微镜
TNF	tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
TNM	tumor, node, metastasis system	肿瘤( T )、淋巴结( N )及转移( M )分期法
TTF	time to treatment failure	治疗失败时间
TTP	time to progression	疾病进展时间
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling	末端脱氧核苷酸转移酶介导的原位缺口末端标记法
UICC	International Union Against Cancer	国际抗癌联盟
WHO	World Health Organisation	世界卫生组织

( 本刊编辑部 )