

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.06.005

· 专题报道 ·

舒尼替尼通过 NF- κ B 旁路途径诱导人肝癌 HepG2 细胞 NKG2DLs 的表达

黄宇贤¹, 陈心彤², 林遐³, 翁关样¹, 郭坤元¹, 吴秉毅¹, 宋朝阳¹, 贺艳杰¹, 李玉华¹ (1. 南方医科大学珠江医院血液科, 广东广州 510282; 2. 纽约州立大学西奈山医学院基因组学与生物学研究所生物信息学实验室, 美国纽约 10029; 3. 广州市第十二人民医院血液科, 广东广州 510620)

[摘要] **目的:** 探讨舒尼替尼通过 NF- κ B 信号通路诱导肝癌 HepG2 细胞表达自然杀伤细胞 2 族成员 D 配体 (natural killer group 2 member D ligands, NKG2DLs) 的分子机制。 **方法:** 常规体外培养 HepG2 细胞, 单细胞凝胶电泳检测 1 μ mol/L 舒尼替尼处理 HepG2 细胞 24 h 前后 DNA 损伤情况, 实时荧光定量 PCR 检测药物处理前后细胞 DNA 损伤修复分子 mRNA 的表达, Western blotting 检测分别以 NF- κ B 激动剂和抑制剂处理 HepG2 细胞前后 NKG2DLs 蛋白表达及 IKK α 和 I κ B α 表达情况。 **结果:** 舒尼替尼药物处理后, HepG2 细胞均发生不同程度 DNA 损伤; 且 *AP-1*、*ATM*、*ATR* mRNA 表达水平明显升高, 而 *CHK1*、*CHK2*、*GSK3 β* mRNA 表达水平明显降低; 不同处理组间 DNA 损伤修复相关信号分子 mRNA 表达有显著差异 ($F = 61.242, P = 0.000$)。 NF- κ B 转录活性抑制剂 JSH-23 可降低 HepG2 细胞 NKG2DLs 蛋白表达量, 而 NF- κ B 转录活性激动剂 TNF- α 、PMA 均可增加 HepG2 细胞 NKG2DLs 蛋白表达量 ($F = 15.043, P = 0.000$); 舒尼替尼处理肿瘤细胞后 NF- κ B 的抑制分子 IKK α 被抑制, 而激活分子 I κ B α 被激活。 **结论:** 舒尼替尼可通过 DNA 损伤修复分子激活 NF- κ B 旁路途径诱导肿瘤细胞表达 NKG2DLs。

[关键词] 舒尼替尼; 肝细胞癌; DNA 损伤修复分子; HepG2 细胞; NF- κ B 家族成员

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)06-0703-07

Sunitinib induces the expressions of NKG2DLs on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by activating alternative NF- κ B pathway

Huang Yuxian¹, Chen Xintong², Lin Xia³, Weng Guanyang¹, Guo Kunyuan¹, Wu Bingyi¹, Song Chaoyang¹, He Yanjie¹, Li Yuhua¹ (1. Department of Hematology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China; 2. Incahn Institute for Genomics and Multiscale Biology, Mount Sinai School of Medicine Levy Place New York, NY 10029, USA; 3. Department of Hematology, Twelfth People's Hospital of Guangzhou Municipal, Guangzhou 510620, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate molecular mechanism of sunitinib-induced expressions of natural killer group 2 member D ligands (NKG2DLs) in human hepatocellular carcinoma cell HepG2. **Methods:** HepG2 cells were cultivated by routine method. DNA damage in HepG2 cells was detected by single cell gel electrophoresis (SCGE) assay. The expressions of DNA damage-related molecule were quantitated by RT-qPCR. The levels of NKG2DLs, IKK α and I κ B α were determined by immunoblotting. **Results:** Single cell gel electrophoresis revealed that HepG2 cells have various degree of DNA damages after exposed to sunitinib. RT-qPCR analysis showed that the expressions of *AP-1*, *ATM*, and *ATR* mRNA in HepG2 cells treated with sunitinib were significantly increased, whereas the levels of *CHK1*, *CHK2*, *GSK3 β* mRNA were markedly lower. While the NF- κ B inhibitor JSH-23 decreased the expressions of NKG2DLs in HepG2 cells, the agonist of NF- κ B increased the expressions of these molecules. Furthermore, in HepG2 treated with sunitinib, IKK α was phospho-

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金资助项目 (No. 81302372, 81300431); 南方医科大学珠江医院优秀中青年人才资助项目 (No. 201207008)。Project supported by the National Natural Science Foundation for Young Scientists of China (No. 81302372, 81300431), and the Excellent Middle and Yong Aged Experts Project of Zhujiang Hospital Southern Medical University (No. 201207008)

[作者简介] 黄宇贤 (1980 -), 男, 广东省揭阳市人, 博士, 副主任医师, 主要从事肿瘤生物治疗相关研究, E-mail: hyx6610@163.com

[通信作者] 李玉华 (Li Yuhua, corresponding author), E-mail: liyuhua2011gz@163.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20151216.1245.010.html>

rylated, and I κ B α was activated. **Conclusion:** The data indicated that sunitinib induces the upregulated expressions of NKG2DLs in carcinoma cells by DNA damage-related molecules with activate the NF- κ B pathway.

[**Key words**] sunitinib; hepatocellular carcinoma; DNA damage repair signal molecule; HepG2 cell; NF- κ B gene family member

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(6): 703-709]

本专题前几篇论文已显示,舒尼替尼作用于肝细胞癌 HepG2 细胞后,舒尼替尼作为多靶点酪氨酸激酶受体抑制剂,可以阻断血管内皮细胞生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR1)、血小板源性生长因子受体 α (platelet-derived growth factor receptor α , PDGFR α)、干细胞因子受体 (stem cell factor receptor, C-kit)、FMS 样酪氨酸激酶 3 (FMS-like tyrosine kinase 3, Flt3) 等分子靶点,诱导肿瘤细胞凋亡;诱导凋亡主要是通过上调促凋亡基因,如 B 细胞淋巴瘤基因-2 相关 X 蛋白 (B cell lymphoma 2 associated X protein, Bax)、Noxa (又称成人 T 细胞白血病衍生植物血凝素反应基因, ATL-derived PMA-responsive gene, APR)、p53 上调凋亡调控因子 (apoptosis of modulator upregulated p53, PUMA)、p53 基因起作用的。另外,舒尼替尼可以作为刺激因素诱导肿瘤细胞表达免疫细胞活化性配体-细胞自然杀伤细胞 2 族成员 D 配体 (natural killer group 2 member D ligands, NKG2DLs), 增强 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤敏感性,舒尼替尼促进肿瘤细胞表达 NKG2DLs 与上调表达 MHC-I 类链相关分子 A 或 B (MHC class I-related chain molecules A/B, MICA/MICB)、人巨细胞病毒糖蛋白 UL16 结合蛋白 (UL16-binding protein, ULBP) 基因有关。那么,舒尼替尼通过那些信号通路上调 MICA/B 及 ULBP2 基因表达呢,前期实验结果显示主要是与核因子 kappa B (Nuclear factor B kappa NF- κ B) 信号通路有关,特别是由 NF- κ B2 和 RelB 形成二聚体组成的旁路途径。在高表达 MICA/B 及 ULBP2 蛋白的肿瘤细胞中, NF- κ B2 和 RelB 基因也是高表达的。文献 [1-3] 报道,在研究不同刺激因素引起肿瘤细胞表达 NKG2DLs 的过程中发现, DNA 损伤修复反应机制居重要地位,认为低剂量药物刺激会导致肿瘤细胞 DNA 损伤, DNA 损伤修复分子 ATM/ATR 高表达,激活 NF- κ B 信号通路,启动多种与肿瘤细胞修复相关的基因,包括免疫细胞活化性受配体。那么,舒尼替尼诱导肿瘤细胞表达 NKG2DLs 是否与 DNA 损伤修复反应有关、启动哪些 DNA 修复分子、与 NF- κ B 旁路途径发生哪些相互作用? 将在本研究中进一步探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

人肝癌细胞株 HepG2 细胞株由本实验室保存,用含有双抗(青霉素+链霉素)及胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养。苹果酸舒尼替尼购自美国辉瑞公司, DNA 损伤彗星检测试剂盒购自上海拜沃生物科技有限公司, NF- κ B 转录活性抑制剂 JSH-23 和一抗: IKK α 、I κ B α 鼠单抗购自 Med Chem Express, MICA/B 单抗、ULBP1-3 单抗、一抗 (NF- κ B1、NF- κ B2、RelB、TNF- α) 和 PUMA 鼠单抗均购自美国 BD 公司, PE 标记羊抗鼠 IgG₁ 购自上海远慕生物公司, Gibco 胎牛血清购自上海玉博生物科技有限公司, RPMI 1640 购自上海生博生物医药科技有限公司, cDNA 合成和 PCR 试剂购自立陶宛 Fermentas (MBI) 公司, 引物由上海英骏生物公司合成。LipofectamineTM RNAiMAX 转染试剂购自 Invitrogen 公司 (Cat. No. 13778-075), HRP 标记的 GAPDH 内参购自上海康成生物工程有限公司, 山羊抗兔 IgG (H + L chain specific) 购自 Southern Biotech, Immobilon western chemilum HRP substrate、Immobilon-P Transfer Membrane 均购自 MILLIPORE 公司, Opti-MEM 培养基购自 Gibco (Cat. No. 31985-070), 流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司, Biophotometer 生物分光光度计购自美国 Eppendorf 公司, PE9700PCR 仪购自美国 PE 公司, 水平核酸电泳仪购自美国 One Lambda 公司, 倒置荧光显微镜购自 Olympus 公司。

1.2 单细胞凝胶电泳检测舒尼替尼处理对 HepG2 细胞 DNA 的损伤情况

单细胞凝胶电泳技术参照文献 [4]。收集 1 μ mol/L 舒尼替尼处理 24 h 前后的 HepG2 细胞, 分为 HepG2 细胞未处理组、HepG2 细胞药物处理组。(1) 制片: 制成的单细胞悬液用锥虫蓝染色法测定细胞存活率, 存活率均大于 90%; 将正常熔点琼脂糖放入 37 $^{\circ}$ C 水浴中待用, 每个标本制备 4 片 24 mm \times 24 mm 凝胶片;(2) 第一层胶制备: 将 110 μ l 质量分数为 0.8% 的正常熔点琼脂糖浇注到磨砂粗面载玻片上, 盖上盖玻片, 使胶展开, 4 $^{\circ}$ C 固化 10 min;(3) 第二层胶制备: 取适量的单细胞悬液以 1:3

的比例加入 37 °C、质量分数为 0.8% 的低熔点凝胶中,混匀后,取 75 μ l 滴加到取下盖玻片的第一层胶上,覆盖盖玻片,4 °C 冰箱固化 10 min,待冷却凝固后轻轻移去盖玻片;(4)细胞裂解:将上述制好的载玻片,浸入新鲜配置的细胞裂解液中,4 °C 裂解 1 h,去除生物膜、细胞质、RNA,只留下细胞核中的 DNA;(5)解旋:从裂解液中取出载玻片,用少量冰冷的 PBS 缓冲液轻轻冲洗 3 次,置入装有预冷电泳液的电泳槽中,避光静置 20 min,使 DNA 链充分松解;(6)电泳:调节电泳仪至电压 23 V,改变电泳液量使电流达 280 mA,4 °C 下电泳 20 min;(7)漂洗及染色:电泳完毕,取出载玻片放入冰冷的 PBS 缓冲液约 10 min,以中和胶中的强碱液,晾干,然后向琼脂上滴加 30 μ l 溴化乙啶染色,盖上盖玻片。在荧光显微镜下观察,绿光激发,吸收滤光片 590 nm,高速 SHD 400 摄影和照相,彩色胶卷同步照相。用 TriTck CometScoreTM 软件进行分析,计算出彗星拖尾长度(tail length)、尾部 DNA 的相对含量[tail DNA (%),尾部 DNA 占总 DNA 的百分比]、尾矩[(tail moment, TM)尾长与尾部 DNA 相对含量的乘积]、Olive 尾矩(Olive TM, 从头部密度重心到尾部密度重心的距离与尾部 DNA 相对含量的乘积)等参数,用于评价 DNA 的损伤程度。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测舒尼替尼处理对 HepG2 细胞 DNA 损伤修复分子 mRNA 表达的影响

收集 1 μ mol/L 舒尼替尼孵育 24 h 前后的 HepG2 细胞,分为 2 组: HepG2 细胞未处理组、HepG2 细胞药物处理组。用 RNA 试剂盒提取细胞总 RNA,电泳鉴定 RNA 纯度,反转录合成 cDNA。所检测的 DNA 损伤修复分子及其 PCR 引物序列见表 1。实时荧光定量 PCR 反应: SYBR 反应体系总体积为 100 μ l, 94 °C、5 min, 94 °C、45 s, 60 °C、1 min, 30 个循环,同时设空白对照。PCR 反应前 3 ~ 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号,调节基线至适宜处,各荧光曲线与基线交叉点的循环数即为 Ct 值。根据公式 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\beta\text{-actin}}$ 和 $\Delta\Delta Ct = 2^{-\Delta Ct}$, 计算检测基因的 mRNA 相对表达量。每组重复 3 次并取平均值。

1.4 Western blotting 检测 NF- κ B 激动剂及抑制剂对 HepG2 细胞 NKG2DLs 表达的影响

收集对数期的 HepG2 细胞,分 5 组: 未处理组(细胞未经药物处理)、药物处理组(靶细胞经苹果酸舒尼替尼 1 μ mol/L 共孵育 24 h)、JSH-23 组(靶细胞经 7.5 μ mol/L JSH-23 共孵育 24 h; JSH-23 为 NF- κ B 转录活性抑制剂)、TNF- α 组

(靶细胞经 0.5 μ mol/L TNF- α 处理 24 h; TNF- α 为 NF- κ B 转录活性激动剂)、PMA(靶细胞经 0.2 μ mol/L PMA 共孵育 24 h; PMA 为 NF- κ B 转录活性激动剂)组。用细胞裂解液处理后,加入适量 SDS-PAGE 上样缓冲液,沸水中加热 5 min,在行 10% SDS-PAGE,用湿转法转膜至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上;以 5% 脱脂牛奶 37 °C 封闭 2 h; TBST 洗 10 min,重复 3 次,各加入 NKG2DLs(MICA/B、ULBP1 ~ 3)一抗(1:200)室温孵育 1 h; TBST 洗 10 min,重复 3 次,加羊抗兔二抗(1:10 000)室温孵育 1 h; TBST 洗 10 min,重复 3 次;暗室曝光拍照。

表 1 肝癌细胞 HepG2 DNA 损伤修复分子 mRNA 引物序列
Tab. 1 Primers of damaged DNA repair signal molecule mRNAs in hepatocellular carcinoma HepG2 cell

Gene	Primer	Sequence	Size (bp)
ATM	Sense	5'-ATTTTCGCTTAGCAGGAGG-3'	697
	Antisense	5'-CGTAATGCCACAACTTC-3'	
ATR	Sense	5'-GCCACTTCTCAACATGAATG-3'	125
	Antisense	5'-GCAAGTTTTACTGGACTAGG-3'	
CHK1	Sense	5'-AATTGCCATGGGACCAACC-3'	145
	Antisense	5'-CTAGAGGAGCAGAATCGATT-3'	
CHK2	Sense	5'-CTGAAGTCTGGGCAGAAGTC-3'	205
	Antisense	5'-GTAGAAGGCTGGGCTAGAAC-3'	
AP-1	Sense	5'-GGCTGAGCTACAGATGAAC-3'	164
	Antisense	5'-AACAACTGGGCAGGATAC-3'	
GSK3 β	Sense	5'-CTGCACCTTCTTTCCACTGA-3'	122
	Antisense	5'-GCATTGGTGCAGACAAGATG-3'	

1.5 Western blotting 检测舒尼替尼处理对 HepG2 细胞 IKK α 和 I κ B α 表达的影响

收集 1 μ mol/L 舒尼替尼孵育 24 h 前后的 HepG2 细胞,分为未处理组、药物处理组,用细胞裂解液处理后,加入适量 SDS-PAGE 上样缓冲液,沸水中加热 5 min,行 10% SDS-PAGE,用湿转法转膜至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上;以 5% 脱脂牛奶 37 °C 封闭 2 h; TBST 洗 10 min,重复 3 次,加入 IKK α 、I κ B α 和 GAPDH 单抗、(1:200)室温孵育 1 h; TBST 洗 10 min,重复 3 次,加羊抗兔二抗(1:10 000)室温孵育 1 h; TBST 洗 10 min,重复 3 次;暗室曝光拍照。通过曝光的灰度值计算蛋白表达量,利用 Bio-Rad 软件进行定量分析。

1.6 统计学处理

采用 SPSS15.0 软件进行统计学处理。HepG2 细胞药物处理前后靶细胞 DNA 损伤情况、NF-κB 基因家族成员 mRNA 表达水平、IKKα 和 IκBα 表达情况、NF-κB 激动剂及抑制剂处理肿瘤细胞前后 NKG2DLs 蛋白表达情况均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 *t* 检验和单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 舒尼替尼处理导致 HepG2 细胞 DNA 损伤

单细胞凝胶电泳检测结果(图 1、2)显示,在 HepG2 细胞未经 1 μmol/L 舒尼替尼处理前,慧尾长度、慧尾 DNA 百分比、TM 和 Olive TM 分别为 $(8.20 \pm 0.21)\%$ 、 $(32.76 \pm 0.98)\%$ 、 $(2.81 \pm 0.54)\%$ 和 $(1.00 \pm 0.20)\%$;经舒尼替尼处理后,慧尾长度、慧尾DNA百分比、尾矩TM和OliveTM分别为

$(15.30 \pm 1.14)\%$ 、 $(84.35 \pm 0.48)\%$ 、 $(13.13 \pm 0.39)\%$ 和 $(41.36 \pm 2.18)\%$;靶细胞经药物处理前后单细胞凝胶电泳各项指标差异均有统计学意义 ($t = 28.57, P = 0.001, t = 5.578, P = 0.033$)。

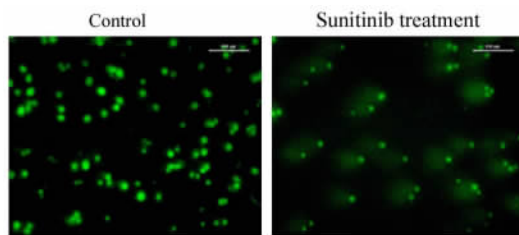


图 1 单细胞凝胶电泳检测舒尼替尼处理前后靶细胞 DNA 损伤荧光显微镜形态(×200)

Fig. 1 Morphologies of the DNA damage of HepG2 cells detected by single cell gel electrophoresis(SCGE) assay before and after treatment with sunitinib under flurecence microscope (×200)

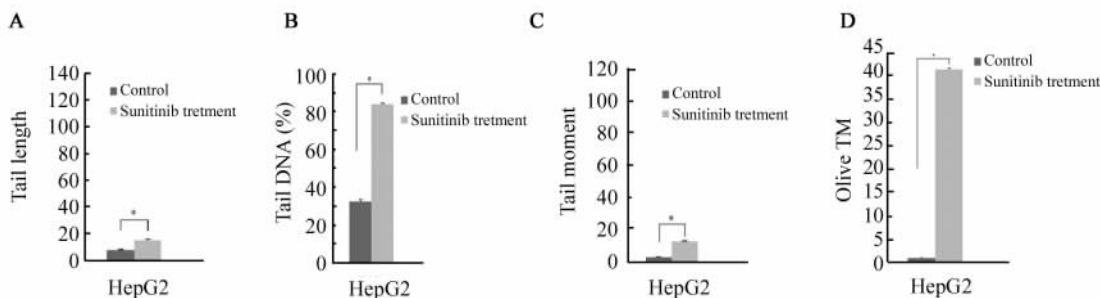


图 2 单细胞凝胶电泳检测舒尼替尼处理前后靶细胞 DNA 损伤各项指标

Fig. 2 Indexs of the DNA damage of HepG2 cells detected by single cell gel electrophoresis before and after treatment with sunitinib

A: Tail length; B:Tail DNA(%); C: TM; D: Olive TM

The tail length, Tail DNA(%), TM and Olive TM were significantly increased after treatment with sunitinib, which indicated that the cells had different levels of DNA damage

2.2 舒尼替尼促进 HepG2 细胞内 DNA 损伤修复分子 AP-1、ATM、ATR mRNA 的表达

实时荧光定量 PCR 检测结果(表 2)显示,在 DNA 损伤修复相关信号分子 mRNA 组中,未经舒尼替尼处理的 HepG2 细胞的 AP-1、ATM、ATR、CHK1、CHK2、GSK3β mRNA 表达水平分别为 (1.00 ± 0.09) 、 (1.00 ± 0.18) 、 (1.00 ± 0.13) 、 (1.00 ± 0.13) 、 (1.00 ± 0.06) 和 (1.00 ± 0.12) 。经舒尼替尼处理后,主要是 AP-1、ATM、ATR mRNA 表达水平明显升高,分别为 (3.18 ± 0.43) 、 (1.35 ± 0.11) 和 (1.38 ± 0.07) ;而 CHK1、CHK2、GSK3β mRNA 表达水平明显降低,分别为 (0.69 ± 0.05) 、 $(0.62 \pm$

$0.06)$ 和 (0.81 ± 0.06) ;不同处理组间 DNA 损伤修复相关信号分子 mRNA 表达差异有显著统计学意义(ANOVA for factorial analysis, $F = 61.242, P = 0.000$)。

2.3 NF-κB 激动剂和抑制剂对 HepG2 细胞 MICA、MICB 和 ULBP2 蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果(图 3)显示,在未处理组,HepG2 细胞 NKG2DLs(MICA、MICB、ULBP1、ULBP2 和 ULBP3)蛋白表达量明显较低;经舒尼替尼处理后,即药物处理组 NKG2DLs 蛋白表达量升高,以 MICA、MICB 和 ULBP2 升高为主;在抑制剂 JSH-23 组中,5 种 NKG2DL 蛋白表达量与未处理组

相似,蛋白表达量均较低;而在激动剂 TNF-α 组和 PMA 组中,5 种 NKG2DL 蛋白表达量与药物处理组相似,同样以 MICA、MICB 和 ULBP2 升高为主,不同

处理组间差异有显著统计学意义(ANOVA for factorial analysis, $F = 15.043, P = 0.000$)。

表 2 舒尼替尼处理前后靶细胞 DNA 损伤修复分子 mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Expressions of damaged DNA repair signal molecule mRNAs in HepG2 cells before and after incubation with sunitinib ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>AP-1</i> mRNA	<i>ATM</i> mRNA	<i>ATR</i> mRNA	<i>CHK1</i> mRNA	<i>CHK2</i> mRNA	<i>GSK3β</i> mRNA
Control	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.12
Sunitinib	3.18 ± 0.43*	1.35 ± 0.11*	1.38 ± 0.07*	0.69 ± 0.05	0.62 ± 0.06	0.81 ± 0.06

* $P < 0.05$ vs control group

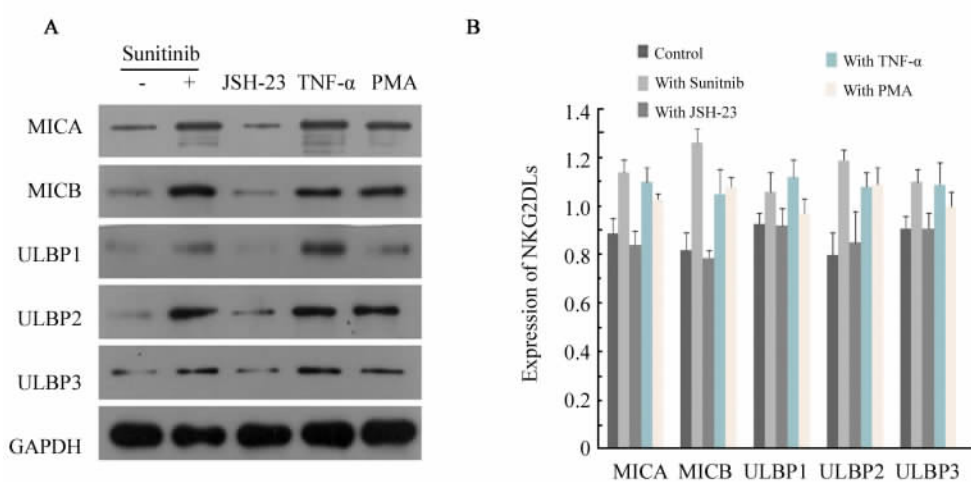


图 3 舒尼替尼、NF-κB 激动剂及抑制剂对 HepG2 细胞 NKG2DLs 表达的影响

Fig. 3 Effect of treatment with sunitinib, inhibitor and activator of NF-κB on NKG2DL expressions on HepG2 cells

A: The activator of NF-κB promotes the expressions of NKG2DLs and its inhibitors inhibit their expressions on the HepG2 cells; B: The histogram shows that the activator of NF-κB promotes the expressions of NKG2DLs and its inhibitors of inhibit their expressions

2.4 舒尼替尼处理前后 HepG2 细胞 IKKα 和 IκBα 表达水平的变化

Western blotting 检测舒尼替尼处理前后 HepG2 细胞 IKKα 和 IκBα 蛋白的表达,结果(图 4)显示,药物处理后 IKKα 表达明显高于处理前,[(1.04 ± 0.16) vs (0.36 ± 0.06)];而 IκBα 恰好相反,即 HepG2 细胞经药物处理后蛋白水平明显低于药物处理前[(0.45 ± 0.02) vs (0.79 ± 0.06)];两种蛋白的表达差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结果提示,经舒尼替尼处理后 NF-κB 通路的抑制剂 IκBα 被抑制,而通路的激动剂被激动,两者的变化均促进了 NF-κB 信号通路旁路途径的激活。

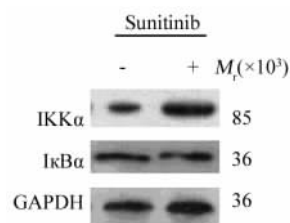


图 4 Western blotting 检测舒尼替尼处理前后肿瘤细胞 IKKα 和 IκBα 表达

Fig. 4 Expressions of IKKα and IκBα on the HepG2 cells before and after treatment with sunitinib determined by Western blotting

3 讨论

苹果酸舒尼替尼是多靶点酪氨酸酶抑制剂,能同时抑制多条信号传导通路,具有抗肿瘤和抗血管生成作用。受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)在一系列细胞生长周期(例如细胞生长、分化和死亡)的信号转导途径中起重要作用^[5]。很多类型的肿瘤因为存在 RTK 功能紊乱,从而诱导肿瘤细胞生长、增殖及分化^[6]。VEGFR、PDGFR、c-Kit 与 Flt-3 属于受体酪氨酸激酶,在很多肿瘤细胞中高表达,能够被舒尼替尼抑制而起到抗肿瘤作用^[7]。本课题组另一研究(本专题论文“舒尼替尼对人肝癌细胞 HepG2 的凋亡作用及其分子机制”)结果显示, HepG2 高表达上述四种受体酪氨酸激酶,靶细胞与舒尼替尼共孵育后, VEGFR、PDGFR、c-Kit 与 Flt-3 蛋白表达量明显下降,提示舒尼替尼对 HepG2 细胞的受体酪氨酸激酶有明显抑制作用。舒尼替尼对肿瘤细胞抗肿瘤效应也在双标记流式细胞术和 TUNEL 法凋亡检测中得到证实。

文献报道及笔者研究发现,分子靶向药物对肿瘤细胞 NKG2DLs 的表达具有诱导作用,且不同分子靶向药物对肿瘤细胞 NKG2DLs 表达的诱导作用不同,其中以酪氨酸激酶抑制剂舒尼替尼的诱导作用最强^[8]。本课题组另一研究(本专题论文“舒尼替尼诱导人肝癌 HepG2 细胞 NKG2DLs 表达促进 NK 细胞的杀伤活性”)结果证实,舒尼替尼孵育肿瘤细胞前, HepG2 细胞 NKG2DLs 表达率极低,对 NK 细胞杀伤敏感性也低,但经舒尼替尼孵育后,靶细胞 NKG2DLs 表达率明显升高,对 NK 细胞杀伤敏感性也明显升高;并且舒尼替尼能够促进肿瘤细胞表达 NKG2DLs 与上调表达 *MICA/B* 及 *ULBP2* 基因有关。那么,诱导肿瘤细胞上调表达 NKG2DLs 的分子机制是什么呢,至今仍是个谜。

目前部分学者认为 DNA 损伤修复反应与肿瘤细胞 NKG2DLs 表达有明显关系。Stephan 等^[9]认为, DNA 损伤修复反应诱导肿瘤细胞表达 NKG2DLs。在低或高剂量化学药物的刺激下,细胞的 DNA 损伤反应可激活信号转导分子,如 ATM 或 ATR 激酶,这些激酶进一步活化下游的信号通路,例如 NF- κ B 信号通路,从而诱导 NKG2DLs 的表达。Weizman 等^[10]报道,激活蛋白 1(active protein-1, AP-1)能联合 DNA 损伤反应,上调 NKG2DLs 的表达。本研究中,单细胞凝胶电泳技术证实舒尼替尼处理肿瘤细胞后存在不同程度的 DNA 损伤,实时荧光定量 PCR 结果提示舒尼替尼处理后的肿瘤细胞

AP-1、*ATM*、*ATR* mRNA 表达水平明显升高, *GSK3 β* 表达水平下降,这与既往文献报道是一致的;而 *CHK1*、*CHK2* mRNA 表达水平下降,提示 *ATM*、*ATR* 可能还有通过其他下游分子起作用,只是目前仍未被发现。

NK 细胞活化性配体的表达受多种因素和细胞内环境的影响,刺激因素不同,配体表达的种类和表达水平也不同,这种调控的复杂性不是单一基因和信号分子能够解释的。NF- κ B 是一种多向调节功能的转录因子,广泛参与了许多基因的转录调控,依据刺激因素和细胞环境的不同,能够与相应基因的启动子结合,依据细胞内环境的需要发挥不同的生物功能,这一点与免疫细胞活化性配受体调节的特点是相吻合的^[11]。NF- κ B (nuclear factor- κ B) 是一个大家族,包括 5 个成员: RelA (p65)、RelB、c-Rel、p105-p50 (NF- κ B1) 和 p100-p52 (NF- κ B2), 它们之间两两形成同源或者异源二聚体,从而发挥作用^[12]。NF- κ B 抑制蛋白为 I κ B (包括 I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ), 激活蛋白为 IKK 蛋白激酶复合体,由 IKK α 、IKK β 和 IKK γ 组成,抑制蛋白和激活蛋白被外界因素诱导磷酸化之后激活,发挥活化或抑制等转录功能^[13]。NF- κ B 可由经典途径和非经典途径激活;脂多糖(LPS)等刺激因素可通过经典途径激活 NF- κ B, 药物、紫外线照射和细胞因子可通过非经典途径激活 NF- κ B^[14]。

在本课题组另一研究(本专题论文“siRNA 干扰 NF- κ B 家族成员表达抑制人肝癌 HepG2 细胞表达 NKG2DLs”)中,实时荧光定量 PCR 结果提示,舒尼替尼处理肿瘤细胞后的 *NF- κ B2*、*RelB* mRNA 表达水平明显升高,而肿瘤细胞的 NKG2DLs 表达也随之升高,而 NF- κ B2 与 RelB 结合后主要介导非经典途径(旁路途径)激活,提示肿瘤细胞的 NKG2DLs 表达与 NF- κ B 旁路途径有关。NF- κ B 信号通路的激活涉及 I κ B (NF- κ B 抑制剂)的磷酸化,而 I κ B 有赖于 IKK (I κ B 激酶)的调控,非经典途径激活 NF- κ B 信号通路必须有 IKK α 的参与, IKK/I κ B/NF- κ B 是一个有机联系的系统^[15]。本研究中, Western blotting 检测舒尼替尼处理前后 HepG2 细胞 IKK α 和 I κ B α 蛋白的表达结果提示,经舒尼替尼处理后肿瘤细胞 I κ B α 蛋白被抑制,而 IKK α 被激活, IKK α 激活与 NF- κ B 旁路激活途径有关。

同一研究中, Western blotting 结果证实, siRNA 能明显降低 HepG2 细胞 *NF- κ B1*、*NF- κ B2*、*RelB* 目的基因的表达量,并且 siRNA 阻断 *NF- κ B* (旁路途径) 基因表达后,舒尼替尼处理肿瘤细胞不能诱导

NKG2DLs(MICA/B 和 ULBP2)表达。提示在 NF- κ B 信号通路中,以 NF- κ B 组成的非经典激活途径更占优势,支持了本研究首次观察到的舒尼替尼主要通过 NF- κ B 旁路途径激活肿瘤细胞表达 NKG2DLs 的观点。

[参考文献]

- [1] Kelley MR, Logsdon D, Fishel ML. Targeting DNA repair pathways for cancer treatment: what's new? [J]. *Futture Oncol*, 2014, 10(7): 1215-1237.
- [2] Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, et al. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor [J]. *Nature*, 2005, 436(7054): 1186-1190.
- [3] Fang L, Choudhary S, Zhao Y, et al. ATM regulates NF- κ B-dependent immediate-early genes via RelA Ser 276 phosphorylation coupled to CDK9 promoter recruitment [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(13): 8416-8432.
- [4] Bowman L, Castranova V, Ding M. Single cell gel electrophoresis assay (comet assay) for evaluating nanoparticles-induced DNA damage in cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 906: 415-422.
- [5] Lencioni R. Chemoembolization for hepatocellular carcinoma [J]. *Semin Oncol*, 2012, 39(4): 503-509.
- [6] Macho AP, Lozano-Durán R, Zipfel C. Importance of tyrosine phosphorylation in receptor kinase complexes [J]. *Trends Plant Sci*, 2015, 20(5): 269-272.
- [7] Glück AA, Aebersold DM, Zimmer Y, et al. Interplay between

receptor tyrosine kinases and hypoxia signaling in cancer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 62(3): 101-114.

- [8] 黄宇贤,郭坤元. 肿瘤生物治疗的新模式——靶向-过继性细胞免疫治疗 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(3): 243-249.
- [9] 黄宇贤,王杨,李玉华,等. 分子靶向药物诱导耐药鼻咽癌细胞 NKG2D 配体的表达 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(3): 250-255.
- [10] Gasser S, Raulat DH. The DNA damage response arouses the immune system [J]. *Cancer Res* 2006,66(8): 3959-3962.
- [11] Weizman N, Shiloh Y, Barzilai A. Contribution of the Atm protein to maintaining cellular homeostasis evidenced by continuous activation of the AP-1 pathway in ATM-deficient brains [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(9): 6741-6747.
- [12] Bradford JW, Baldwin AS. IKK/nuclear factor-kappaB and oncogenesis: roles in tumor-initiating cells and in the tumor microenvironment [J]. *Adv Cancer Res*, 2014, 121:125-145.
- [13] Baldwin AS. Regulation of cell death and autophagy by IKK and NF- κ B: critical mechanisms in immune function and cancer [J]. *Immunol Rev*, 2012, 246(1): 327-345.
- [14] Hoffmann A, Baltimore D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling [J]. *Immunol Rev*, 2006, 210:171-186.
- [15] Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF-kappaB and the immune response [J]. *Oncogene*, 2006, 25(51): 6758-6780.

[收稿日期] 2015 - 09 - 06

[修回日期] 2015 - 11 - 04

[本文编辑] 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中国肿瘤生物治疗杂志》“转化医学”栏目征稿启事

转化医学(translational medicine)是近年国际医学领域出现的新热潮,是实验研究与临床研究双向转化(bench to bedside and bedside to bench)的研究体系,转化医学为基础研究和临床医疗之间架起了桥梁,从而把基础医学研究的最新成果快速、有效地转化为临床疾病诊治的药物、技术和手段,有力地推动医学科学的发展。

为了顺应转化医学的发展热潮,为我国广大肿瘤防治工作者提供有关“转化医学”信息传播和学术交流的平台,促进转化医学在肿瘤学领域的发展,本刊特开辟“转化医学”新栏目,并向广大肿瘤防治工作者征集“转化医学”相关稿件。

本刊“转化医学”栏目文稿内容包括以下几个方面:

- (1)宣传“转化医学”的观念、理论、研究体系、研究模式和方法、发展趋势等;
- (2)讨论我国肿瘤学领域深入开展“转化医学”研究的策略和措施;
- (3)介绍国外肿瘤学领域“转化医学”发展的新闻、成功案例和发展动向;
- (4)我国作者肿瘤学领域“转化医学”的研究成果和经验体会;
- (5)与“转化医学”有关的在肿瘤学领域有发表价值的其他文稿。

“转化医学”文稿的写作格式要求:如果是(4)类中的原创性研究成果文稿,格式同本刊论著(基础研究和临床研究);如果是(1)、(2)、(3)和(5)类的文稿,格式类似于本刊的综述,篇幅在 5 000 字左右,附中文摘要(报道式、非结构式),文内图表用中文表达,参考文献应精选最主要的 20 篇左右。文稿的文字力求简洁明了、通顺流畅、层次清楚、重点突出。如文稿有新颖性,可进入本刊快速发表通道,在 3 个月左右发表。

(本刊编辑部)