NF-κB 信号通路在食管鳞癌细胞系中的激活

田 芳[1],许培荣[1],侯卫红[1],刘红涛[1],陈奎生[2],薛乐勋[1]

The Activation of NF-κB Signaling Transduction Pathway in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cell Lines

TIAN Fang[1], XU Pei-rong[1], HOU Wei-hong[1], LIU Hong-tao[1], CHEN Kui-sheng[2], XUE Le-xun[1]

1. *Laboratory for Cell Biology, Zhengzhou University, Zhengzhou* 450052, *China*; 2. *Department of pathology, The First Affiliated Hospital, Zhengzhou University*

Corresponding Author: XUE Le-xun, E-mail: Xuelx@371.net

Abstract: Objective More and more evidences have shown that transcription factor Nuclear Factor-kappaB (NF-κB) plays a critical role in the initiation and progression of carcinogenesis. In the present study, we investigated whether the NF-κB signaling transduction pathway was constitutively activated in ESCC cell lines. **Methods** Immunocytochemistry and Western blotting were used to determine the protein levels of the subunits of NF-κB, p50 and p65, inhibitor-κBα and IKKβ in two ESCC cell lines. Nuclear proteins from the ESCC cell lines were extracted to evaluate the DNA-binding activity by electrophoretic mobility gel shift assay (EMSA). **Results** Immunocytochemical analysis showed that p50 and p65, two representative subunits of NF-κB, IκBα, a natural inhibitor of NF-κB, and its upstream kinase IKKβ were mainly expressed and localized in the cytoplasm. Cytoplasm protein extracts from the cell lines each were analyzed by Western blotting. The results revealed that there was the same high NF-κB activity in the cytoplasm in two ESCC cell lines compared to that of the positive control cell line. In addition, the results of EMSA analysis for nuclear protein extract showed high DNA-binding activity of p50 and p65. **Conclusion** The findings demonstrate that NF-κB signaling transduction pathway is constitutively activated in human ESCC cell lines, suggesting that NF-κB may play a critical role in carcinogenesis of the esophagus.

Key words: Esophageal cancer; NF-κB; Signaling transduction pathway

摘 要:目的 核转录因子 NF-kappaB(NF-κB)是一种重要的转录因子,参与调控多种与炎症、抗凋亡、肿瘤形成和转化有关的基因表达。本研究拟通过检测 NF-κB 信号通路在食管鳞癌细胞系中是否存在,分析 NF-κB 在食管鳞癌细胞中的激活状态及其对食管鳞癌细胞的生存及转化作用。**方法** 采用免疫细胞化学法和 Western blotting 法检测两株食管鳞癌细胞系中 NF-κB 亚单位 p50 和 p65,阻遏物 IκBα 及其上游激酶 IKKβ 的蛋白表达。并采用 EMSA 法检测两株食管鳞癌细胞核中 NF-κB 与 DNA 的结合活性。**结果** 食管鳞癌细胞中存在激活的 NF-κB 信号通路,p50、p65、IκBα 及其上游激酶 IKKβ 的蛋白在细胞质中均表达,并且 p50 / p65 在细胞核中具有较高的 DNA 结合活性。**结论** 本研究发现 NF-κB 信号通路在两种食管鳞癌细胞系被激活,提示激活的 NF-κB 信号通路可能在食管鳞癌发生中起重要作用。

关键词:食管癌;NF-κB;信号传导通路

中图分类号:R735.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2006)01-0011-04

0 引言

食管癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,其死亡率为整个肿瘤死亡的第六位[1]。目前,食管癌的主要类型仍是鳞癌。食管鳞癌是一种侵袭性很强的肿瘤,它的预后差,临床进展迅速,多伴有淋巴结转移,且易复发。因此,从分子水平上了解食管鳞癌的发生机制,将有助于提高这些病人的预后。

核因子 NF-κB (nuclear factor-kappa B) 是 1986 年从成熟的 B 淋巴细胞中抽提出,并能与免疫球蛋白 k 链基因增强子结合的核因子[2]。在哺乳细胞中,NF-κB 家族有 5 个成员:p50/p105 (NF-κB 1)、p65(Rel A)、C-Rel、p52/p100(NF-κB) 和 Rel B,Rel 蛋白成员间可形成同源或异源二聚体,不同的 NF-κB 二聚体具有不同的结合序列,而且具有不同的转录激活特性。NF-κB 最常见的形式是由 p50 和 p65 组成的异源二聚体。在绝大多数静止期的细

收稿日期:2005-03-09;**修回日期:**2005-07-08

基金项目:教育部"十五"211 工程重点建设项目(教重办[2002]第 2 号)

作者单位:1. 450052 郑州大学细胞生物学研究室;2. 郑州大学一附院病理科

通讯作者:薛乐勋,E-mail: Xuelx@371.net

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

胞中,NF-κB 与其阻抑物 IκBs 蛋白相结合,以非活性形式存在于细胞质中,NF-κB 可以被许多刺激物所激活,这些刺激物可以通过对 IκBα 的磷酸化而使其降解,并与 NF-κB 解离,暴露 NF-κB 的核识别位点,使其进入核内,促进靶基因的转录。IκBα 的磷酸化是激活 NF-κB 通路中关键的一步,这一步由 IκBα 激酶复合物 IKK所催化。

NF-κB 的激活在细胞生存,粘附,分化和细胞生长中起关键作用,有研究表明,在许多人类肿瘤,如肝癌、肠癌、宫颈癌中 NF-κB 信号通路的激活在肿瘤的发生发展中起着重要的作用[3-5]。但是这些信号通路在食管鳞癌的发生发展中是否起作用,NF-κB 的激活是否参与了食管鳞癌细胞的转化及增殖,尚不清楚。因此,我们研究了 NF-κB、IκBα 以及 IKKβ 蛋白在食管鳞癌细胞系中的表达,探讨了激活的 NF-κB 信号通路在食管鳞癌发生发展中的作用。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞系及细胞培养　食管癌细胞系 Eca109 由本室保存,食管癌细胞系 EC9706 由中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室惠赠,阳性对照宫颈癌细胞系 HeLa229 购自中国科学院上海生物所细胞库。三株细胞在含有 10 % 的胎牛血清,100u/ ml 青霉素,100μg/ ml 链霉素的 1640 培养液(Gibco 公司)中生长,并置于 37 ℃,5 % CO_2 的条件下培养,实验细胞均处于对数生长期。

1.1.2　抗体和试剂　鼠抗人 p65 (sc-8008)、IKKβ (sc-8014) 单克隆抗体和兔抗人 p50 (sc-114)、IκBα (sc-371) 多克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。细胞核和细胞质蛋白提取试剂盒、生物素 3 ’末端标记试剂盒 (89818)、化学发光 EMSA 试剂盒 (78833) 均购自 Pierce 公司。SP 试剂盒购自北京中山生物公司。

1.2　方法

1.2.1　免疫细胞化学法　将培养瓶中 80 %融合的食管癌细胞(Eca109、EC9706)经胰酶消化后,接种于装有小盖玻片的 6 孔培养板中,在 37 ℃、5 % CO_2 条件下培养 24h,制备细胞爬片。SP 法检测 p65、p50、IκBα、IKKβ 的蛋白表达,一抗浓度均为 1 ∶100。

1.2.2　胞浆、胞核蛋白的制备　按照细胞核和细胞质蛋白提取试剂盒说明书,分别提取细胞质、细胞核蛋白,Bradford 法检测蛋白质的含量,- 70 ℃保存。

1.2.3　Western Blotting 测定四种蛋白的表达　从三种细胞株中分别取细胞质蛋白 50μg,与 2 × SDS 缓冲液按 1 ∶1混合,沸水煮浴 10min,与预染的蛋白质分子量标准一起上样,经 SDS-PAGE 分离后,电转到硝酸纤维膜上。5 %的脱脂奶粉 TBST 溶液封闭 2h,与 p50、p65、IκBα 和 IKKβ 抗体按 1 ∶100 孵育 4 ℃过夜,TBST 溶液洗涤 10min ×3 次,硝酸纤维膜分别与辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠、羊抗兔 (1 ∶50000) 室温孵育 1h 后,TBST 溶液洗涤 10min ×3 次,DAB 显色。实验重复三次。

1.2.4　凝胶电泳迁移率 (electrophoretic mobility shift assay,EMSA) 检测 NF-κB 与 DNA 的结合活性　采用生物素 3 ’末端标记法将 NF-κB 探针 5 ’-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3 ’,3 ’-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5 ’(上海生工生物有限公司合成) 进行标记。将细胞核提取物 (10μg) 与生物素标记的探针在 20μl 的缓冲液 (10M Tris-HCl, pH 8.5, 0.5 mM EDTA, 5 mM $MgCl_2$, 1 M KCl, 0.05 % NP-40, 2.5 % Glycerol, 1 μg/μl Poly (dI·dC) and 0.2μg/μl BSA) 中充分结合,行 6 %非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后,采用毛吸转移法转移至带正电荷的尼龙膜上,120mJ 紫外交联 5min,增强探针与膜的结合。生物素标记的 DNA 探针与 HRP 标记的亲和素之间相结合,通过化学发光,X 光片暴光,显影,定影。

2　结果

2.1　NF-κB 亚单位 p50,p65 在食管鳞癌细胞株 EC9706、Eca109 中的表达

免疫细胞化学结果表明,NF-κB 亚单位 p50,p65 在食管鳞癌细胞株 EC9706、Eca109 的细胞质中强表达,见图 1。采用 Western Blotting 方法检测 p50,p65 在 Eca109、EC9706 细胞质中的蛋白表达水平,并与一阳性对照细胞株 HeLa229 相比较,结果同样显示 EC9706、Eca109 细胞质中存在高表达的 p50,p65 蛋白,见图 2。

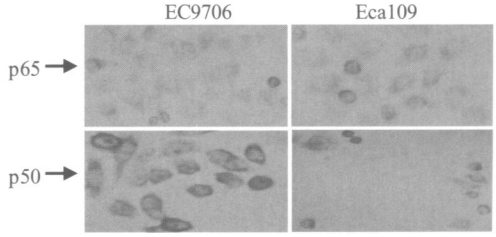

图 1　p50 和 p65 分别在 EC9706 和 Eca109 细胞质中过表达(×400)

2.2　NF-κB 阻遏物 IκBα 及其上游激酶 IKKβ 的表达

免疫细胞化学法结果表明,IκBα 及其上游激酶

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

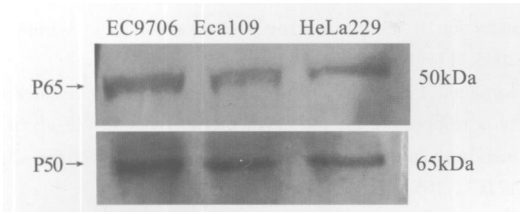

图 2 EC9706、Eca109、HeLa229 细胞中 NF-κB 亚单位 p50,p65 的表达

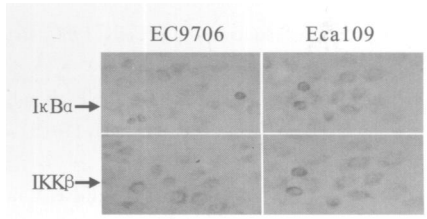

图 3 IκBα and IKKβ 在 EC9706、Eca109 细胞质中过表达(×400)

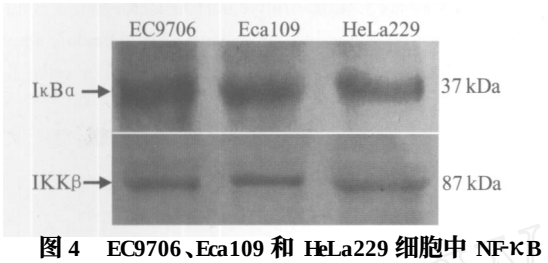

图 4 EC9706、Eca109 和 HeLa229 细胞中 NF-κB 阻遏物 IκBα 及其上游激酶 IKKβ 的蛋白表达

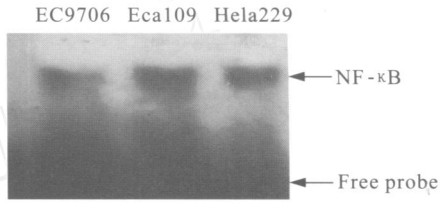

图 5 EC9706、Eca109 和 HeLa229 细胞核中 NF-κB 的活性

IKKβ 在 EC9706、Eca109 细胞质中过表达,见图 3。同样,在 EC9706、Eca109 和 HeLa229 细胞质中检测到了 IκBα 及其上游激酶 IKKβ 蛋白的表达,见图 4。

2.3 NF-κB 的 DNA 结合活性

凝胶电泳迁移率实验结果显示,在 EC9706、Eca109 和 HeLa229 的细胞核中 NF-κB 存在较高的 DNA 结合活性,见图 5。

3 讨论

目前研究表明,NF-κB 可以调控凋亡相关的基因、原癌基因、肿瘤相关粘附分子等,这些基因与肿瘤的发生、转化、浸润和转移有密切的关系[6]。活化的 NF-κB 存在于许多人类肿瘤中如非何杰金氏淋巴瘤、前列腺癌和头颈部鳞癌,并在这些肿瘤的发生发展中起着重要的作用[7,8]。在 NF-κB 的同源或异源二聚体中,p50/p65 是核内 NF-κB 最经典的二聚体,Yang 等[9]的研究表明,与人的正常上皮黑素细胞相比,在八株黑素瘤细胞系中证实了 p50/p65 复合物具有较强的核定位能力。本实验通过免疫细胞化学法和 Western Blot 法发现,NF-κB 的亚单位 p50、p65 在食管鳞癌细胞系中的表达升高,并通过 EMSA 法证实了进入到核内的 p50、p65 具有与 DNA 结合并促进转录的能力。NF-κB 的半衰期只有 30min,因此其活性的维持就需要持续的蛋白合成及不断的刺激。许多物质都可以刺激 NF-κB 的活性,如细胞因子 TNF-α、IL-1、放射线、化疗药等,为了排除这些因素对 NF-κB 活性的影响,在本实验中未使用任何刺激因素。因此,在食管鳞癌细胞系中,激活的 NF-κB 或许是肿瘤细胞维持其转化及生长的一种内在特征。

在 NF-κB 活化的信号通路中,IκB 的降解将使 NF-κB 的核定位序列被暴露出来,并使其进入核内起始转录。IκBα 是 IκB 家族的主要成员,在一些典型的炎症刺激因子的作用下,IκBα 可以被其上游激酶 IKK 磷酸化。IKK 是一个大分子量复合物,包括 IKKα、IKKβ 和 IKKγ。实验表明,IKK 的活化是激活 NF-κB 信号通路的主要限速步骤。在本次实验中,通过免疫细胞化学法和 Western Blot 法发现,IκBα 及其上游激酶 IKKβ 蛋白在食管鳞癌细胞系中也表达,进一步证实了 IκBα 及其上游激酶 IKKβ 的表达在 NF-κB 激活途径中的重要性。同时也证实了经典的 IKKβ-IκB-p65/p50 活化途径在食管鳞癌细胞的转化中所起的作用。Wang 等[10]的研究发现,在具有抗胸腺酸合酶抑制剂(如 5-氟尿嘧啶)抗性的肿瘤细胞株中,存在有激活的 NF-κB 信号通路并且活化的 NF-κB 有助于这些肿瘤细胞抵抗化疗药物,产生耐药性。因此,可以通过抑制 NF-κB 活化途径中的关键因子,将其作为药物筛选的靶,这将有助于减少肿瘤细胞的抗凋亡作用。

总之,在本实验当中,我们证实了在食管鳞癌细胞系中,存在有激活的 NF-κB 信号通路,并且活化的 NF-κB 在食管鳞癌细胞的生存、增殖中起着重要的作用。由于 NF-κB 在肿瘤的发生发展及抗凋亡中的作用,因此阻断活化的 NF-κB 的信号通路将为基因治疗提供更多的靶点。下一步我们将重点研究活化的 NF-κB 在食管鳞癌细胞抗凋亡中的作用。

参考文献:

[1] Pisani P, Parkin DM, Bray F. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990[J]. Int J Cancer, 1999,83(6): 18-29.

[2] Sen R,Baltimore D. Mutiple nuclear factors interact with the

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

immunoglobulin enhancer sequences[J]. Cell, 1986, 46(5): 705-716.
[3] Wang J H, Huang Q K, Chen M X. The role of NF-κB in hepatocellular carcinoma cell[J]. Chin Med J, 2003, 116(5): 747-752.
[4] Yu H G, Yu L L, Yang Y. Increased expression of RelA/nuclear factor-kappa B protein correlates with colorectal tumorigenesis[J]. Oncology, 2003, 65(1): 37-45.
[5] Nair A, Venkatraman M, Maliekal T T. NF-κB is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix[J]. Oncogene, 2003, 22(1): 50-58.
[6] Green D R. Death and NF-kappaB in T cell activation: life at the edge[J]. Mol Cell, 2003, 11(3): 551-552.
[7] Pham L V, Tamyo A T, Yoshimura L C. Inhibition of constitutive NF-κB activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis[J]. J Immunol, 2003, 171(1): 88-95.
[8] Tamatani T, Azuma M, Aota K. Enhanced IκB kinase activity is responsible for the augmented activity of NF-κB in human head and neck carcinoma cells[J]. Cancer Letters, 2001, 171(2): 165-172.
[9] Yang J, Richmond A. Constitutive IkappaB kinase activity correlates with nuclear factor-kappaB activation in human melanoma cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(12): 4901-4909.
[10] Wang W, Cassidy J. Constitutive nuclear factor-kappa B mRNA, protein overexpression and enhanced DNA-binding activity in thymidylate synthase inhibitor-resistant tumor cells[J]. Br J Cancer, 2003, 88(4): 624-629.

[编辑:贺　文]

·短篇 ·个案·

甲状旁腺囊肿 3 例报告

王文强

关键词:甲状旁腺;囊肿
中图分类号:R736.2　　**文献标识码**:D
文章编号:1000-8578(2006)01-0014-01

甲状旁腺囊肿临床少见,笔者遇到 3 例。报道如下:

例 1:男,45 岁。发现颈部肿块 3 年。发现时肿块如鸽蛋大,以后肿块渐渐增大,自觉无不适。检查:左侧甲状腺下极触及5cm ×4cm ×3.5cm肿块,表面光滑,质中,无触痛,边界清,能随吞咽而上下活动。T3、T4、TSH、血钙、血磷检查正常。B 超:左甲状腺囊性肿块(囊肿)。术中发现左侧甲状腺下极背面 5cm ×4cm ×3.5cm 囊肿,内容物为淡黄色清亮液体,与甲状腺下极疏松粘连。完整切除囊肿。术后病理报告为甲状旁腺囊肿。

例 2:女,31 岁。发现颈部肿块 2 个月入院。2 个月前无意中发现左颈部肿块,无痛,肿块无增大,以甲状腺囊肿入院。查体:左侧甲状腺下极触及 3cm × 3cm 肿块,质软,无触痛,边界清,能随吞咽而上下活动。B 超提示:左甲状腺囊性肿块。T3、T4、TSH、血钙、血磷检查均正常。术中见左侧甲状腺下方一 3cm ×3cm ×3.5cm 肿块,囊性,壁薄,半透明,色淡黄,与甲状腺呈膜性疏松粘连。完整摘除肿块。病理报告为甲状旁腺囊肿。

例 3:女,52 岁。发现颈部肿块 4 年。4 年前发现颈前部有一核桃大肿物,渐渐增大,现已有鸡蛋大。无痛,无不适,无吞咽困难。查体:左侧颈前可及一 5cm ×5cm ×4cm 肿块,质中,无触痛,界清,随吞咽而上下活动。B 超:左侧甲状腺下极 44cm ×42cm ×49cm 液性暗区。提示:左甲状腺囊性肿块。T3、T4、FT3、FT4、TSH、血钙、血磷检查均正常。术中见左侧甲状腺下方一 5cm ×5cm × 4cm 肿块,囊性,壁薄,半透明,色淡黄,与甲状腺呈膜性疏松粘连。完整摘除肿块。术后病理报告为甲状旁腺囊肿。

讨论:文献报道本病罕见。约占甲状旁腺肿瘤1.5%～3.5%,女多于男,约 1.5～3.5∶1。甲状旁腺微小囊肿通常不为人注意,临床较大的囊肿很罕见[1]。大部分甲状旁腺囊肿来自胚胎剩余,少数是由于腺瘤囊性变的结果[2],甲状旁腺囊肿通常发生于下甲状旁腺,也可发生于上颈部及纵隔。大部分甲状旁腺囊肿直径1.0～10cm,平均 4cm。多数病例仅表现为颈部肿块,少数可有压迫症状。术前极易误诊[2]。病理表现:肉眼观为单房囊肿,壁薄光滑,囊内有澄清液体,可提出 PTH。光镜下见囊壁为单层透亮细胞所衬,细胞下为纤维组织有片段平滑肌和巢状正常甲状旁腺组织。甲状旁腺囊肿需与甲状腺腺瘤囊性变、腮裂囊肿及甲状舌管囊肿鉴别。甲状腺腺瘤囊性变有完整的包膜,切开囊内多为棕色胶质或变性液化胶质,局部多见出血、钙化、骨化等。光镜下见囊壁为纤维性,囊壁内多可见残留的甲状腺滤泡组织,出血区有吞噬细胞反应和含铁血黄素沉着,纤维性囊壁外可见受挤压萎缩的甲状腺组织。腮裂囊肿多位于下颌角、胸锁乳突肌前缘处。镜下见纤维性囊壁内衬复层扁平上皮,囊壁内含有大量淋巴样组织,并可形成淋巴滤泡。甲状舌管囊肿为胚胎发育时甲状舌管未退化所致,由残留组织形成囊肿,位于颈前舌骨与甲状软骨之间。镜下见纤维性囊壁内衬扁平上皮、假复层纤毛上皮或化生的鳞状上皮,纤维性囊壁周围常有散在小的甲状腺滤泡。

术前对颈部肿块病人,如 B 超和 CT 提示甲状腺外囊性肿块,应考虑本病的可能。术中根据本病与甲状腺呈膜性疏松粘连,囊液澄清的特性,亦可作出诊断。

参考文献:

[1] 回允中. 阿克曼外科病理学[M]. 第 8 版. 辽宁:辽宁教育出版社,1999. 577-578.
[2] 刘复生,刘明华. 肿瘤病理学[M]. 第 1 版. 北京:北医大、中国协和医大联合出版,1997. 1346.

[编辑:刘红武]

收稿日期:2005-02-01;**修回日期**:2005-03-30
作者单位:312000 浙江绍兴第二医院肿瘤科

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net