

# TNF- $\alpha$ 调节鼻咽癌凋亡抑制蛋白表达的体外研究

TNF- $\alpha$  Modulated Inhibitor of Apoptosis Protein Expression of Nasopharyngeal Carcinoma in Vitro

SONG Qi-bin, CHU Yu-xin, WANG Gui-hua

宋启斌, 褚玉新, 王桂华

(武汉大学人民医院肿瘤中心, 湖北 武汉 430060)

**摘要:** [目的] 研究 TNF- $\alpha$  对鼻咽癌中 c-IAP1 和 c-IAP2 表达水平的影响, 探索鼻咽癌抗凋亡的机制。[方法] 培养鼻咽癌 5-8F 细胞, 经不同浓度 (0、1、5、10、20、30 ng/ml) 的 TNF- $\alpha$  处理细胞 16h、24h 之后, 半定量 RT-PCR 检测 c-IAP1 和 c-IAP2 基因表达水平的变化, 用 Western Blot 检测 c-IAP1 和 c-IAP2 蛋白表达水平的变化。[结果] 低浓度 TNF- $\alpha$  上调鼻咽癌中 c-IAP1 表达, 而高浓度 TNF- $\alpha$  下调 c-IAP1 表达。随着 TNF- $\alpha$  浓度增高, c-IAP2 表达量不断上调。[结论] TNF- $\alpha$  通过上调鼻咽癌细胞中 c-IAP2 的表达而使肿瘤细胞抗凋亡, 可能成为抗癌靶点。

**关键词:** 鼻咽癌; TNF- $\alpha$ ; 凋亡抑制蛋白

**中图分类号:** R739.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)12-0932-03

鼻咽癌(nasopharyngeal cancer, NPC)是中国南方地区最常见的头颈部恶性肿瘤, 5 年生存率大约为 70%<sup>[1]</sup>。随着放疗技术的进步, NPC 获得良好的局部控制, 但仍然有 31% 的 NPC 患者在 3 年内出现肿瘤远处转移<sup>[2]</sup>。TNF- $\alpha$  是巨噬细胞分泌的重要细胞因子, 其表达水平的变化与 NPC 的进展和预后密切相关, 高水平的 TNF- $\alpha$  会促进 NPC 骨转移<sup>[2]</sup>。然而, TNF- $\alpha$  促进 NPC 生长的机制尚未明确。凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)是一类高度保守的内源性抗细胞凋亡蛋白家族, 主要通过抑制 Caspase 活性和参与调节核转录因子 NF- $\kappa$ B 的作用而抑制细胞凋亡。c-IAP1 和 c-IAP2 是其中重要的重要成员, 在 TNF- $\alpha$  诱导 NF- $\kappa$ B 信号通路中发挥关键作用<sup>[3]</sup>。本文将探讨 TNF- $\alpha$  对鼻咽癌细胞中 c-IAP1 和 c-IAP2 表达水平的影响, 探求 NPC 抗凋亡可能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

细胞来源: 鼻咽癌 5-8F 细胞来自武汉大学人民

医院中心实验室。

引物序列: c-IAP1: F 5'-GCACATTCATTATCT-CCCACC-3'; R 5'-TGTCTGCATGCTCAGATTTG-3'; c-IAP2: F 5'-TGGATATTTCCGTGGCTCTT-3'; R 5'-CCCACATAATAAAAACCCGCA-3';  $\beta$ -actin: F 5'-CACCAACTGGGACGACA-3'; R 5'-CCCACATAATAAAAACCCGCA-3', 引物由上海 Invitrogen 公司合成。 $\beta$ -actin, c-IAP1 和 c-IAP2 抗体以及二抗来自 Cell Signaling 公司。

### 1.2 方法

细胞培养: 鼻咽癌 5-8F 细胞培养于 DMEM 培养基中, 含 10% 胎牛血清、青霉素和链霉素, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱, 培养至贴壁细胞占瓶底面积 80%~90%。然后消化传代。

药物处理: 将消化传代的细胞充分混匀, 尽量吹打成单个细胞的悬液, 按照 5×10<sup>5</sup>/孔接种于 6 孔板, 放入培养箱过夜, 直到大多数细胞贴壁。给 6 孔板编号, 给予 6 种不同浓度的 TNF- $\alpha$  (0、1、5、10、20、30 ng/ml) 处理细胞, 分别处理 16h 和 24h。

RT-PCR: 总 RNA 的提取按照 Trizol 试剂盒说明书进行。采用 Fermentas 公司的 RevertAid First strand cDNA synthesis Kit 试剂盒做逆转录合成 cDNA。然后以 cDNA 为模板配置 PCR 反应体系, 含 2×PCR Master Mix, 引物和水。PCR 反应条件为:

收稿日期: 2012-09-02; 修回日期: 2012-10-10

通讯作者: 褚玉新, E-mail: 258438514@qq.com

94℃ 30s; (94℃, 30s, 60℃ 30s, 68℃ 90s)25 个周期, 68℃ 10; 4℃ 保存, Actin 循环次数为 20 次, c-IAP1 循环次数为 25 次, c-IAP2 循环次数为 30 次。

**Western Blot:**取出 6 孔板, 弃去培养基, 用 PBS 洗 1 次, 加入 150 $\mu$ l/孔的 RIPA 裂解液 (含 1:100 PMSF), 冰浴 30min 之后, 收集裂解液, 12 000rpm 离心 5~10min。吸取上清蛋白质备用。经 BCA 蛋白定量之后, 按照 1:9 比例与蛋白上样缓冲液混匀, 经 90~100℃处理 5~10min 让蛋白质变性。制作 SDS-PAGE 胶, 下层为 10%分离胶, 上层为 5%浓缩胶。按照每孔蛋白总量一致的方式点样。电泳至溴酚蓝接近胶底。割掉多余的胶, 转到 PVDF 膜, 恒定电流 180~200mA 转膜 1~1.5h。经 PBST 洗涤 3 次后, 用脱脂牛奶封闭 1h。一抗 c-IAP1 和 c-IAP2 用 PBST 按照 1:1000 稀释, actin 按照 1:3000 稀释, 浸泡膜条, 4℃过夜。二抗用脱脂牛奶按照 1:2000~1:4000 稀释, 摇床孵育 1h。然后洗膜, 经 ECL 液暗室曝光, 显影。

### 1.3 数据分析

先采用 Image J 软件定量分析 cDNA 电泳的条带。用 c-IAP1/ $\beta$ -actin 和 c-IAP2/ $\beta$ -actin 的光密度比值来代表 mRNA 的相对表达水平。采用 SPSS19.0 统计软件, 不同浓度的 TNF- $\alpha$  处理 16h 和 24h 对于 mRNA 表达的比较采用配对 *t* 检验, 检验水准为  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结 果

### 2.1 不同浓度 TNF- $\alpha$ 处理后 c-IAP1 mRNA 和 c-IAP2 mRNA 水平变化

当 TNF- $\alpha$  浓度达到 10ng/ml 时, c-IAP1 mRNA 水平到达高峰, 然后随着 TNF- $\alpha$  浓度的增大, c-IAP1 mRNA 水平开始下降。见图 1。

随着 TNF- $\alpha$  浓度的加大, c-IAP2 mRNA 水平逐渐升高。当 TNF- $\alpha$  浓度为 30ng/ml 时, c-IAP2 mRNA 水平达到最大值。

不同浓度 TNF- $\alpha$  处理 16h 和 24h 时 c-IAP1 mRNA 和 c-IAP2 mRNA 的水平见表 1, 可见随着 TNF- $\alpha$  对鼻咽癌细胞作用时间的延长, c-IAP1 和 c-IAP2 mRNA 表达水平增加。见图 2。

### 2.2 不同浓度 TNF- $\alpha$ 处理后 c-IAP1 和 c-IAP2 蛋白水平变化

当 TNF- $\alpha$  浓度为 10ng/ml 时, c-I-

AP1 的蛋白水平到达高峰, 然后随着 TNF- $\alpha$  浓度的增大, c-IAP1 蛋白水平开始下降。见图 3。

当 TNF- $\alpha$  浓度为 0~1ng/ml 时, c-IAP2 蛋白水平极低, 当 TNF- $\alpha$  5ng/ml 时, c-IAP2 开始明显上调, 而且, 随着 TNF- $\alpha$  浓度的增加, c-IAP2 蛋白水平逐渐升高。

## 3 讨 论

探讨鼻咽癌抗凋亡相关基因表达水平对研究鼻咽癌的发病机制及新的治疗方法具有重要意义<sup>[4]</sup>。凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 因其特殊的分子结构以及抑制细胞凋亡的功能日益引起人们的关注, 并可能作为靶蛋白为肿瘤的诊断与治疗开辟新途径。越来越多的证据显示, TNF- $\alpha$  是介

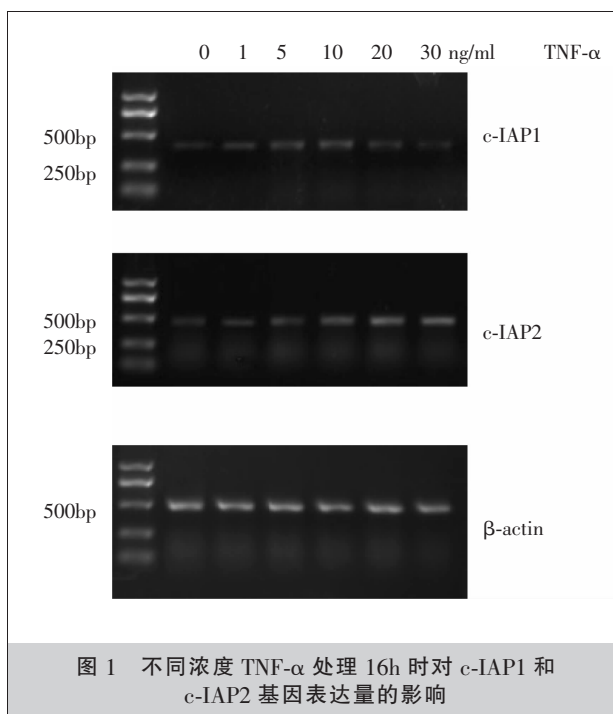


图 1 不同浓度 TNF- $\alpha$  处理 16h 时对 c-IAP1 和 c-IAP2 基因表达量的影响

表 1 不同浓度的 TNF- $\alpha$  处理 16h 和 24h 对 IAP mRNA 水平的影响

| TNF- $\alpha$<br>(ng/ml) | 16h                    |                        | 24h                    |                        |
|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                          | c-IAP1/ $\beta$ -actin | c-IAP2/ $\beta$ -actin | c-IAP1/ $\beta$ -actin | c-IAP2/ $\beta$ -actin |
| 0                        | 0.127                  | 0.018                  | 0.131                  | 0.211                  |
| 1                        | 0.215                  | 0.076                  | 0.364                  | 0.275                  |
| 5                        | 0.376                  | 0.207                  | 0.412                  | 0.331                  |
| 10                       | 0.589                  | 0.315                  | 0.683                  | 0.603                  |
| 20                       | 0.297                  | 0.571                  | 0.317                  | 0.712                  |
| 30                       | 0.136                  | 0.628                  | 0.249                  | 0.825                  |

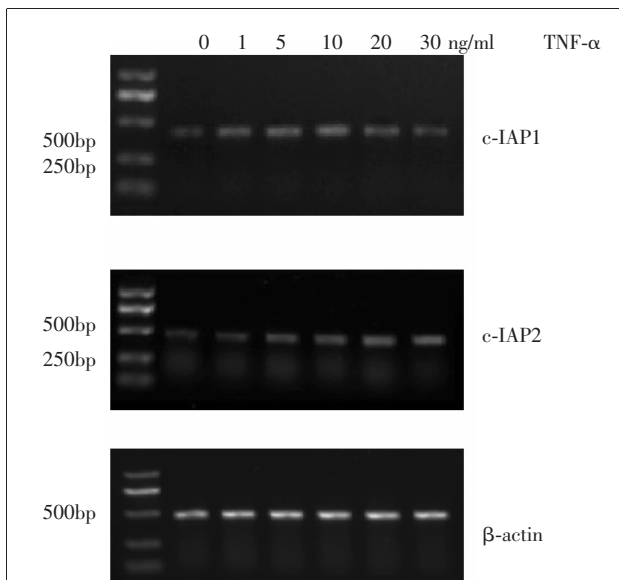


图2 不同浓度 TNF- $\alpha$  处理 24h 时对 *c-IAP1* 和 *c-IAP2* 基因表达量的影响

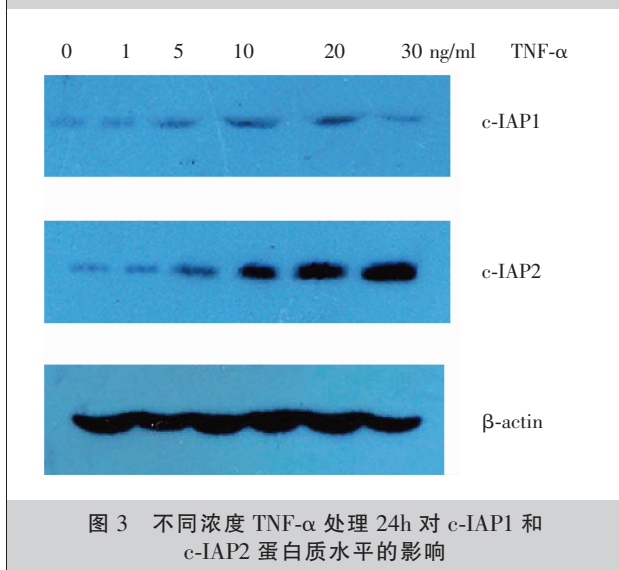


图3 不同浓度 TNF- $\alpha$  处理 24h 对 *c-IAP1* 和 *c-IAP2* 蛋白质水平的影响

导癌症相关炎症反应的关键因子,会促进肿瘤生长和演进<sup>[5]</sup>。日本学者 Taniguchi 等<sup>[6]</sup>的研究报道称,TNF- $\alpha$  能够增加子宫内膜癌细胞中 *c-IAP1* 的表达水平,推测 TNF- $\alpha$  是子宫内膜癌细胞中调控 IAPs 表达的关键因子。我们的研究检测了 TNF- $\alpha$  对于鼻咽癌细胞中 *c-IAP1* 和 *c-IAP2* 的表达水平的影响,结果显示随着 TNF- $\alpha$  剂量的增加,*c-IAP2* 表达水平也随之升高,说明 TNF- $\alpha$  也能调控鼻咽癌中 IAP 的表达。

Mads 等<sup>[7]</sup>报道称,*c-IAP1* 和 *c-IAP2* 在 TNF- $\alpha$  信号转导过程中起协同作用,当这两种蛋白都缺失时会严重损伤 TNF- $\alpha$  介导的 NF- $\kappa$ B 的活性。大多数情

况下,TNF- $\alpha$  并不杀死肿瘤细胞,而是刺激 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 激酶的活性,导致肿瘤细胞生长和炎症反应。人类 *c-IAP1/2* 抑制凋亡功能与 TNF 信号通路中 NF- $\kappa$ B 诱导活化相关,*c-IAP1/2* 调控 TNF- $\alpha$  介导的 NF- $\kappa$ B 的活性<sup>[8]</sup>。近来报道,单价的 IAP 抑制剂 SH-130 能够抑制前列腺癌中 TNF- $\alpha$  和放射诱导的 NF- $\kappa$ B 激活<sup>[9]</sup>。因此,利用 IAP 阻断剂可能会增加肿瘤细胞对放化疗的敏感性。

本研究发现,小剂量的 TNF- $\alpha$  能够诱导 *c-IAP1* 基因表达,而大剂量 TNF- $\alpha$  会抑制 *c-IAP1* 蛋白水平,提示大剂量 TNF- $\alpha$  可能诱导肿瘤凋亡。而且随着 TNF- $\alpha$  剂量的增大,*c-IAP2* 表达水平持续升高,提示 TNF- $\alpha$  诱导 *c-IAP2* 基因表达呈剂量依赖性。因此,利用小分子 *c-IAP2* 拮抗剂联合大剂量 TNF- $\alpha$  可能有助于促进鼻咽癌细胞凋亡,增加其对放化疗的敏感性。

(感谢武汉大学人民医院中心实验室提供的各项仪器设备、试剂和技术支持!)

## 参考文献:

- [1] Wei S,Alajezl NM,Bastianutto C,et al. Significance of Plk1 regulation by miR-100 in human nasopharyngeal cancer[J]. Int J Cancer,2010,126(9): 2036-2048.
- [2] Lu X,Qian CN,Mu YG,et al. Serum CCL2 and serum TNF- $\alpha$  -two new biomarkers predict bone invasion,post-treatment distant metastasis and poor overall survival in nasopharyngeal carcinoma [J]. Eur J Cancer,2011,47(3): 339-346.
- [3] Jin HS,Park HS,Shin JH,et al. A novel inhibitor of apoptosis protein(IAP)-interacting protein,vestigial-like (Vgl)-4, counteracts apoptosis-inhibitory function of IAPs by nuclear sequestration[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2011,412(3):454-459.
- [4] 夏春波,范才文,黄岚珍,等. 鼻咽癌细胞 XIAP mRNA 表达及其意义[J]. 肿瘤基础与临床,2009,22(5):376-377.
- [5] Wu Y,Zhou BP. TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion [J]. Br J Cancer,2010,102(4): 639-644.
- [6] Taniguchi F,Izawa M,Uegaki T,et al. TNF $\alpha$  is a potent mediator of regulating IAP expression in endometriotic cells[J]. Fertility and Sterility,2011,96(3): S138.
- [7] Gyrd-Hansen M,Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- $\kappa$ B,inflammation and cancer [J]. Nature review,2010,10(8):561-574.
- [8] 许杨,赵晓航. IAP 家族分子与肿瘤靶向治疗[J]. 生命科学,2010,22(2):161-168.
- [9] Fulda S. Inhibitor of Apoptosis (IAP) proteins as therapeutic targets for radiosensitization of human cancers[J]. Cancer Treat Rev,2012,38(6):760-766.