Journal of Chinese Oncology,2021,Vol.27,No.7

# TNF-α 通过 NF-κB 信号通路调控宣威肺癌恶性生物学行为

查艳梅,张军玉,於　薇,郭举鼎,贺琳媛
(云南医药健康职业学院,云南 昆明 650000)

**摘　要**:[目的] 探讨肿瘤坏死因子-α(TNF-α)通过影响核因子-κB(NF-κB)信号通路对宣威肺癌恶性生物学行为的调控。[方法] ELISA 检测临床收集宣威肺癌、非宣威肺癌及正常人血清样本中 TNF-α 水平。RT-qPCR、Western blot 检测人支气管上皮样细胞 16HBE、人肺腺癌细胞 A549 及宣威肺癌细胞 XWLC-05 中 TNF-α;CCK-8 检测细胞增殖水平; 流式细胞术检测细胞凋亡率及细胞周期;Transwell 检测细胞迁移能力;Western blot 检测 NF-κB 经典及非经典信号通路相关蛋白水平。[结果] TNF-α 在宣威肺癌患者血清及细胞中显著性高表达,差异均有统计学意义($P<0.05$)。沉默 TNF-α 不仅阻滞细胞周期、抑制细胞增殖及迁移,并促进凋亡($P<0.05$);也抑制 NF-κB 经典信号通路。XWLC-05 被外源性 TNF-α 促进的恶性生物学行为可被 NF-κB 信号通路抑制剂扭转($P<0.05$)。[结论] TNF-α 通过激活 NF-κB 经典信号通路促进宣威肺癌细胞恶性生物学行为。

**主题词**:TNF-α;NF-κB 信号通路;宣威肺癌;增殖;凋亡;细胞周期;迁移
**中图分类号**:R734.2　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-170X(2021)07-0560-06
doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2021.07.B009

## TNF-α Regulates Malignant Biological Behavior of Xuanwei Lung Cancer Through NF-κB Signal Pathway

ZHA Yan-mei, ZHANG Jun-yu, YU Wei, GUO Ju-ding, HE Lin-yuan
(*Yunnan Medical and Health Vocational College*, *Kunming* 650000, *China*)

**Abstract**: [Objective] To investigate the regulation of tumor necrosis factor-α(TNF-α) on malignant biological behavior of Xuanwei lung cancer by influencing nuclear factor-κB(NF-κB) signal pathway. [Methods] Serum samples of Xuanwei lung cancer, lung cancer and normal people were collected, then the level of TNF-α was detected by ELISA. RT-qPCR and Western blot was used to detect the expression of TNF-α mRNA and protein in normal human bronchial epithelioid cell line 16HBE, human lung adenocarcinoma cell line A549 and Xuanwei lung cancer cell line XWLC-05. Cell proliferation, apoptosis rate, cell cycle and migration were measured by CCK-8, flow cytometry and transwell assay. Moreover, the expression of protein of classical and non-canonical NF-κB signal pathway related proteins were detected by Western blot. [Results] TNF-α was highly expressed in serum and cell line of Xuanwei lung cancer($P<0.05$), silencing TNF-α significantly blocked the cell cycle, inhibited cell proliferation and migration, and promoted cell apoptosis ($P<0.05$). In addition, silencing TNF-α markedly inhibited the classical NF-κB signal pathway. Further experiments confirmed that NF-κB signal pathway inhibitor reversed the promotion of malignant biological behavior of Xuanwei lung cancer which was caused by TNF-α ($P<0.05$). [Conclusion] TNF-α promotes the malignant biological behavior of Xuanwei lung cancer cells by activating the classical NF-κB signal pathway.

**Subject words**: TNF-α; NF-κB signal pathway; Xuanwei lung cancer; proliferation; apoptosis; cell cycle; migration

中国云南省宣威地区肺癌的发病率高达 93/10 万,位居全国第一。因此, 对宣威肺癌发病机制的研究尤为重要。肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)可能是一个的肿瘤启动子基因,在肿瘤发生发展过程中扮演重要角色[1]。研究表明,TNF-α 在乳腺癌进展和转移过程中发挥促肿瘤作用[2];TNF-α 还可通过自分泌机制促进胆囊癌细胞增殖和侵袭[3];此外,TNF-α 被证实可能促进脊索瘤细胞的迁移和侵袭,能够作为脊索瘤进展的预后标志物[4]。在肺癌

**基金项目**:云南省教育厅科学研究基金教师类项目(2020J1253)
**通信作者**:查艳梅,教师,硕士;云南医药健康职业学院,云南省昆明市五华区海屯路 296 号(650000);E-mail:zhayanmei163@163.com
**收稿日期**:2020-09-21;**修回日期**:2021-02-03

研究中发现,TNF-α 在肺癌患者血清中显著性高于健康者,并提示 TNF-α 可作为肺癌诊断的生物标志物[5]。TNF-α 能够通过影响下游信号通路参与调控肿瘤进程,核因子-κB(nuclear factor-κB,NF-κB)信号通路即为其中之一[6]。TNF-α 可调控 NF-κB 信号通路经典途径和非经典途径[7]。因此,为探讨 TNF-α 在肺癌中发挥的作用,及其通过影响 NF-κB 经典或非经典信号通路调控宣威肺癌恶性生物学行为,本研究通过临床收集宣威肺癌患者血清样本,检测 TNF-α 水平,分析其与肺癌分期及淋巴结转移的关系,同时检测 TNF-α 在肺癌细胞中的水平,并研究 TNF-α 对肺癌细胞增殖、凋亡、细胞周期及迁移能力的影响;并通过外源性干预 NF-κB 经典信号通路的激活,分析 TNF-α 通过影响 NF-κB 经典信号通路调控宣威肺癌恶性生物学行为,以期为宣威肺癌的治疗提供新思路。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

2018 年 1 月至 2020 年 6 月期间于宣威市第一人民医院采集就诊的 101 例宣威肺癌、93 例非宣威肺癌(昆明地区肺癌)患者及 87 例正常人血清样本。其中,宣威肺癌患者系来自云南省宣威地区,且在宣威居住超过 15 年的肺癌患者。宣威肺癌Ⅱ期 28 例,Ⅲ期 35 例,Ⅳ期 38 例;淋巴结转移 47 例及无转移患者 54 例。参与研究的患者均签署知情同意书。

### 1.2 细胞培养及处理

由上海冠导生物工程有限公司采购人支气管上皮样细胞系 16HBE(货号 C0007),人肺腺癌细胞系 SPC-A-1(货号 C1218)、HCC-78(货号 C0432)、LXF-289(货号 C0807)、A549(货号 C4215),宣威肺癌细胞系 XWLC-05(货号 GDC249349916-03)。将细胞培养含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于条件为 37℃、5%$CO_2$ 培养箱中。待细胞生长稳定后,根据实验分组需要,采用两组不同位点的短发夹 RNA(short hairpin RNA,shRNA)sh-TNF-α 沉默 XWLC-05 中 TNF-α,其序列分别为 sh-TNF-α-1:5′-GATCCGACACACAACTGGT-GACTTCAAGAGAGTACCACCAGTTGGTTGTCTTTTTTGGAAAA-3′;sh-TNF-α-2:5′-AGCTTTTGGAAAAA-ATGTTTAGACAACTGGCTGCTCTCTTGAAGCAGCC-AGTTGTCTAAACACGG-3′;或采用 10 μg/L TNF-α、5 μmol/L NF-κB 信号通路抑制剂(BAY11-7082)处理 XWLC-05。

### 1.3 研究方法

酶联免疫分析 (enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA):取血清样本,按照 TNF-α(人)ELISA 检测试剂盒操作指导检测血清中 TNF-α 含量。

实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR,RT-qPCR):Trizol 一步法提取各实验组细胞中总 RNA,按照反转录试剂盒操作指导将其反转录为 cDNA 后进行扩增。引物序列见表 1 (Table 1)。GAPDH 为内参,结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算。

Western blot 实验:依照 RIPA 试剂盒操作指导提取各实验组细胞中总蛋白,并用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。上样等量蛋白使用 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,而后转膜至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 2 h 后加入一抗(TNF-α、IκBα、p-IκBα、p65、NIK、p100 及 p52,1∶1 000)4 ℃孵育过夜。次日加入二抗(1∶1 000)室温孵育 1 h。加入 ECL 显色,曝光显影并拍照。采用 Image J 软件对蛋白条带灰度进行分析,将各实验组蛋白条带灰度与对照组对比,获得蛋白相对表达量数据。

细胞增殖检测试剂盒(cell counting kit-8,CCK-8):将各实验组细胞以 $1\times10^4$ 个/ml 接种于 96 孔板,依照 CCK-8 试剂盒操作指导,分别于 0、24、48、72 及 96 h 检测 450 nm 光密度值。

流式细胞术:将各实验组细胞浓度调整为 $1\times10^6$ 个/ml,按照细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒操作指导对细胞进行染色,处理后立即置于流式细胞仪检测分析。

Transwell 实验:将 $5\times10^4$ 各实验组细胞接种于 Transwell 上室,下室加入含胎牛血清的 DMEM 培养基,24 h 后将小室用 4%多聚甲醛固定,30 min 后用结晶紫染色后拍照。

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计分析对实验结果进行分

**Table 1 Primer sequence**

| Target | Sequence(F:Forward primer) | Sequence(R:Reversed primer) |
|---|---|---|
| TNF-α | F:5′-ACCCTCACACTCACAAACCA-3′ | R:5′-ATAGCAAATCGGCTGACGGT-3′ |
| GAPDH | F:5′-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3′ | R:5′-TTTGAGGGTGCAGCCAACTT-3′ |

析,两组间比较采用 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 TNF-α 在宣威肺癌中的水平

与正常宣威人相比,TNF-α 在非宣威肺癌的肺癌患者($t$=15.54,$P$=0.008)及宣威肺癌患者($t$=21.61,$P$=0.0006)中显著性增加;而 TNF-α 在宣威肺癌患者中显著性高于非宣威肺癌的肺癌患者,差异具有统计学意义($t$=7.98,$P$=0.042)(Figure 1A)。宣威肺癌患者随着 TNM 分期升高,TNF-α 水平逐渐升高(Figure 1B);且 TNF-α 水平在淋巴结转移患者中显著性高于无转移患者($t$=11.66,$P$=0.006)(Figure 1C)。

检测各细胞系中 TNF-α,结果表明,其在宣威肺癌细胞 XWLC-05 及人肺腺癌细胞 SPC-A-1、HCC-78、LXF-289、A549 中 mRNA ($t$=20.33,14.58,18.29,26.62,15.93,$P$ 均<0.05)及蛋白水平($t$=17.76,19.37,10.67,8.825,13.80,$P$ 均<0.05)都显著性高于人支气管上皮样细胞 16HBE(Figure 1D,1E)。

### 2.2 TNF-α 对宣威肺癌恶性生物学行为的影响

在 XWLC-05 中转染 sh-TNF-α,结果显示,与对照组相比,sh-TNF-α-1 及 sh-TNF-α-2 组 TNF-α mRNA ($t$=22.35,18.27,$P$ 均<0.05)及蛋白水平($t$=11.06,10.24,$P$ 均<0.05)显著性降低(Figure 2A,2B)。检测细胞增殖能力(Figure 2C),沉默 TNF-α 显著性抑制 XWLC-05 增殖($t$=34.21,36.34,$P$ 均<0.05)。

流式细胞术检测凋亡率(Figure 2D)及细胞周期(Figure 2E),结果显示,沉默 TNF-α 组 XWLC-05 凋亡率显著性上升($t$=15.3,10.75,$P$ 均<0.05);且敲除 TNF-α 后 XWLC-05 细胞 $G_2$+M 期($t$=26.52,19.79,$P$ 均<0.05)及 S 期($t$=34.16,36.54,$P$ 均<0.05)细胞显著性降低,$G_0$+$G_1$ 期细胞显著性增加($t$=38.67,42.33,$P$ 均<0.05)。Transwell 实验结果显示(Figure 2F),沉默 TNF-α 能够显著性抑制 XWLC-05 迁移 ($t$=16.46,12.05,$P$ 均<0.05)。

### 2.3 宣威肺癌中 TNF-α 对 NF-κB 信号通路的调控

检测 XWLC-05 和 A549 中 NF-κB 信号通路相关蛋白的表达 (Figure 3A),经典途径中 p-IκBα 及 p65 在 XWLC-05 中的表达水平显著性高于其在 A549 中的水平($t$=8.36,11.17,$P$ 均<0.05),而 IκBα 在 XWLC-05 中显著性下调($t$=6.89,$P$=0.035);而非经典途径中 NIK、p100 及 p52 在 XWLC-05 及A549 中的表达水平无显著性差异($t$=0.573,0.362, 0.497,$P$

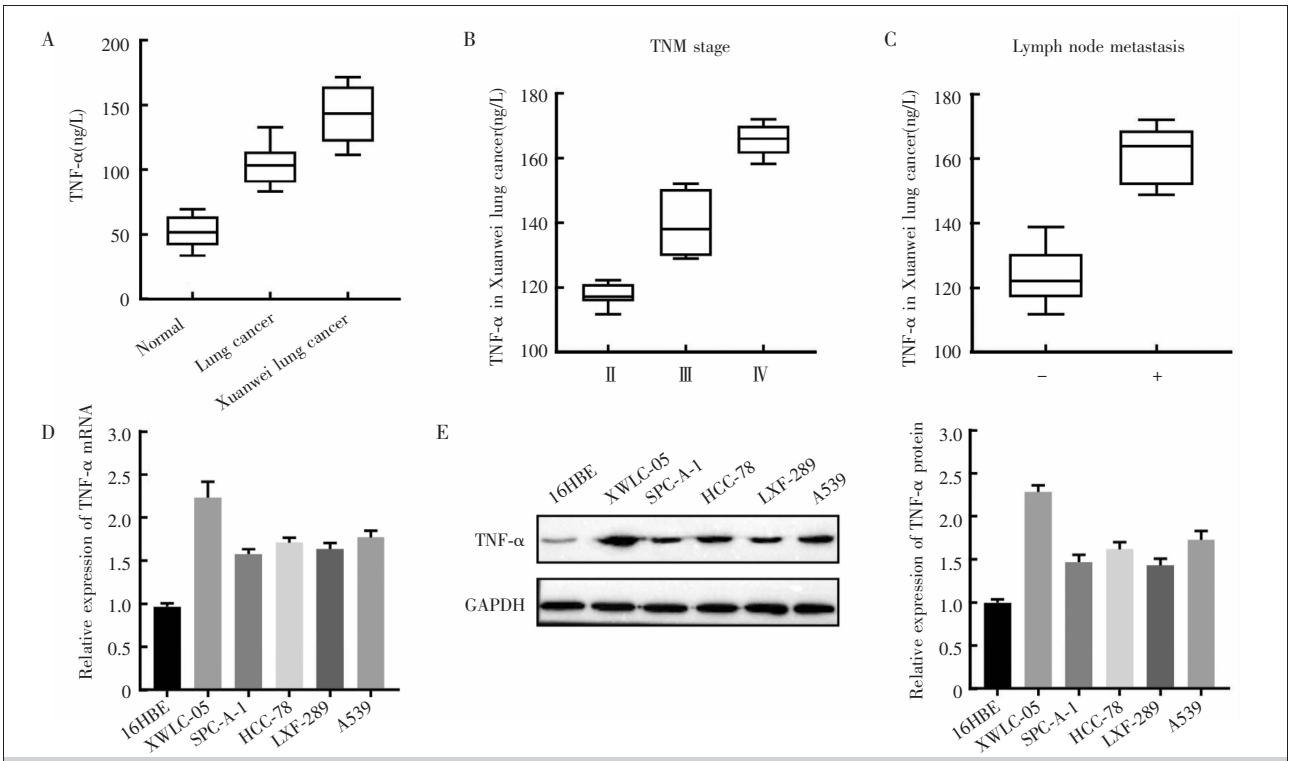


**Figure 1 Expression of TNF-α in Xuanwei lung cancer**

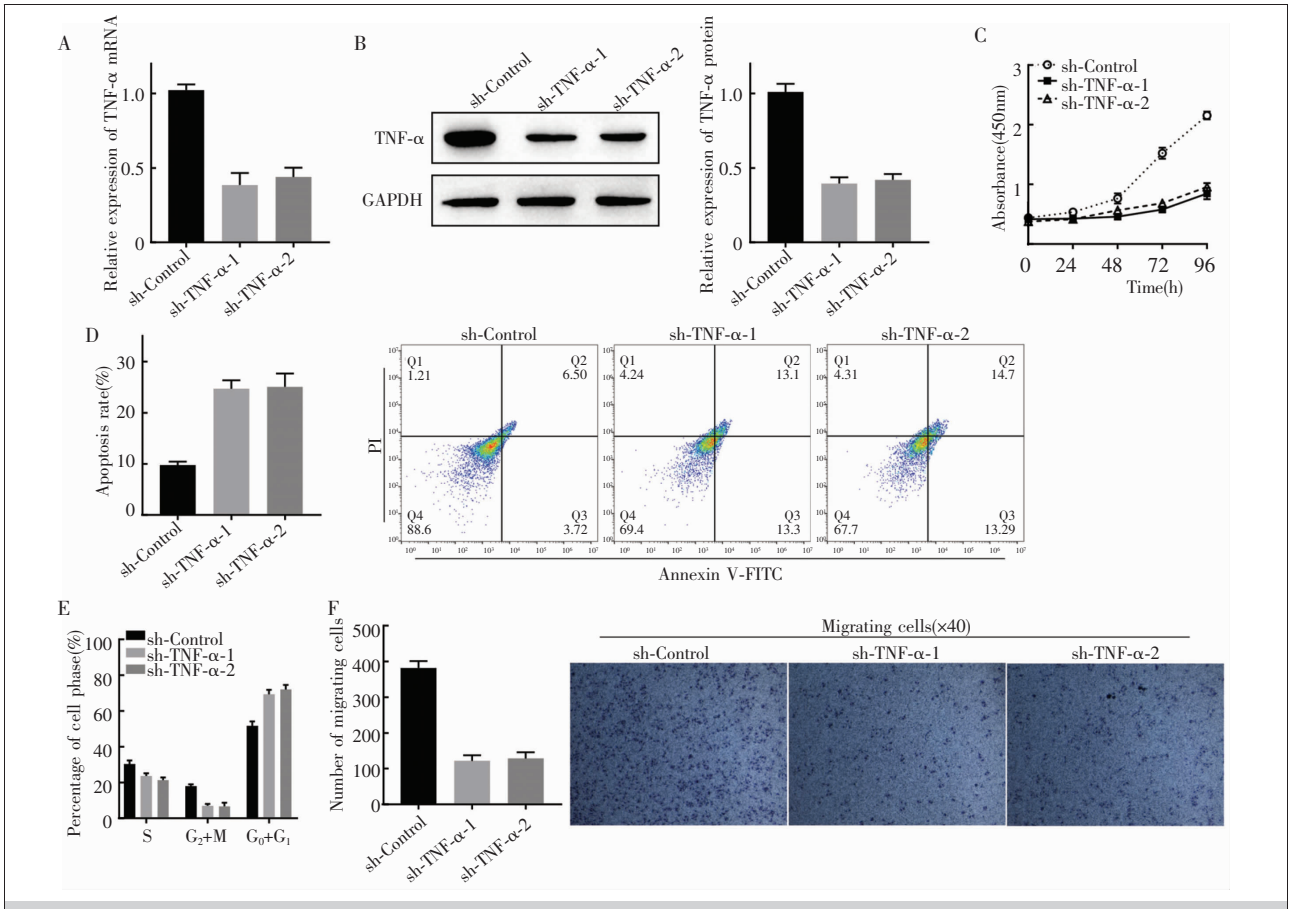


**Figure 2　Effect of TNF-α on malignant biological behavior of Xuanwei lung cancer**

均>0.05)。沉默 XWLC-05 中 TNF-α 可显著性上调 NF-κB 经典途径中 IκBα 表达水平（$t$=7.25，$P$=0.027），且抑制 p-IκBα 及 p65 水平（$t$=6.597，5.99，$P$ 均<0.05），并对非经典途径相关蛋白的表达水平无显著性影响（$t$=0.438，0.601，0.577，$P$ 均>0.05）（Figure 3）。

### 2.4　TNF-α 通过 NF-κB 经典信号通路影响宣威肺癌的恶性生物学行为

将 XWLC-05 经 TNF-α 处理或同时使用 NF-κB 信号通路抑制剂（BAY11-7082）抑制 IκBα 磷酸化，Western blot 实验结果显示，与未经任何处理的 XWLC-05 相比，TNF-α 处理显著性增加 TNF-α、p-IκBα 及 p65（$t$=7.68，5.841，8.01，$P$ 均<0.05），并减少 IκBα（$t$=6.884，$P$=0.041）；同时采用 BAY11-7082 处理则可逆转 TNF-α 处理对以上蛋白的调节作用（Figure 4A）。此外，TNF-α 处理显著性促进 XWLC-05 细胞增殖（$t$=30.66，$P$=0.031）、细胞周期（$t$=11.326，8.17，15.493，$P$ 均

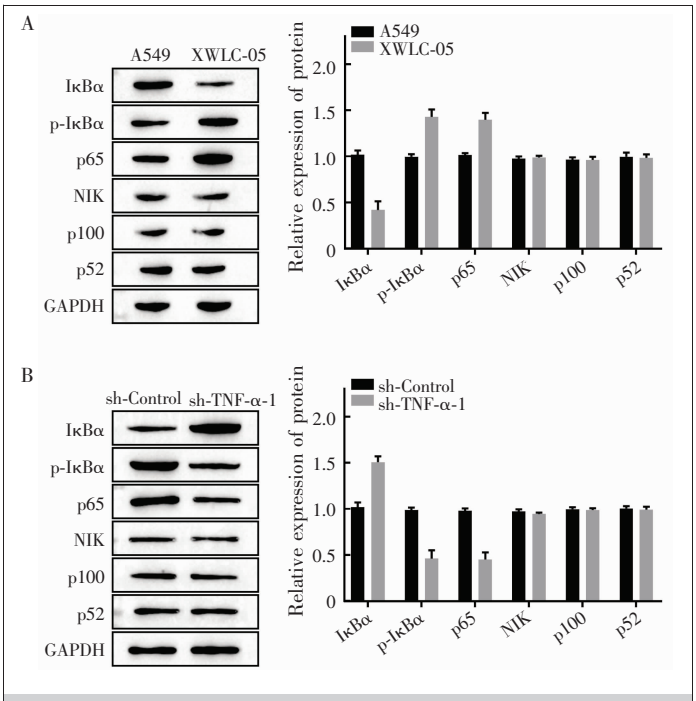


**Figure 3　Regulation of TNF-α to NF-κB signal pathway in Xuanwei lung cancer**

<0.05)、细胞凋亡($t$=11.99,$P$=0.007)以及迁移($t$=13.07,$P$=0.004)(Figure 4B~4E);但同时使用 TNF-α 及 BAY11-7082 处理 XWLC-05 细胞后，与仅采用 TNF-α 处理组相比,细胞增殖能力降低($t$=26.81,$P$=0.044),凋亡促进($t$=13.14,$P$=0.002),细胞周期由 $G_2$+M 期及 S 期转至 $G_0$+$G_1$ 期（$t$=4.51,6.172,9.007,$P$ 均<0.05)，且细胞迁移能力也显著性降低（$t$=10.241,$P$=0.008)。

## 3 讨 论

宣威肺癌不仅具有高发性，还具有恶性程度高及预后差等特征,对患者的生命及健康产生着极严重的威胁[8]。因此,研究宣威肺癌发生发展的机制对肺癌诊断和治疗意义重大。

TNF-α 是一种主要由单核细胞和巨噬细胞分泌的细胞因子,因其具有抑制肿瘤生长、使其发生坏死的作用而在肿瘤研究中备受关注[9]。本研究结果发现,TNF-α 在宣威肺癌患者及宣威肺癌细胞 XWLC-05 中均显著性上调;且临床数据显示 TNF-α 水平与宣威肺癌 TNM 分期及淋巴转移密切相关。这可能是因为肿瘤细胞自身可分泌 TNF-α，且在其发生迁移、侵袭的过程中浸润的细胞受肿瘤抗原刺激也会产生 TNF-α[10],因此导致癌症患者血清 TNF-α 升高。针对 TNF-α 在非小细胞肺癌中的研究发现,其在癌组织中的水平显著性高于癌旁组织,且在肿瘤体积较大、淋巴结转移以及分化程度较低的Ⅲ期患者体内呈现较高水平;而针对原发性肺癌患者的研究则表明，血清 TNF-α 的水平测定可用于评估患者预后。本研究结果也证实 TNF-α 在宣威肺癌中高表达,且其水平随临床进展加深而增加。

本研究发现沉默 TNF-α 可使宣威肺癌细胞发生细胞周期阻滞,在此过程中,细胞 DNA 合成或有丝分裂可能被抑制,进而导致其增殖及迁移能力减弱,与此同时,细胞凋亡则被促进;进一步实验证实,TNF-α 处理可促进宣威肺癌细胞的恶性生物学行为,其原因是沉默 TNF-α 可抑制宣威肺癌中 NF-κB 经典信号通路，经抑制 NF-κB 经典信号通路中 IκBα 磷酸化的 BAY11-7082 处理可逆转宣威肺癌的恶化进一步支撑了此结论。研究报道,在非小细胞肺癌中 TNF-α 可通过激活 NF-κB 信号通路调控细胞周期,进而影响细胞增殖和凋亡[11]。研究表明,激活 NF-κB 信号通路时,p65 可上调 cyclin D1,加

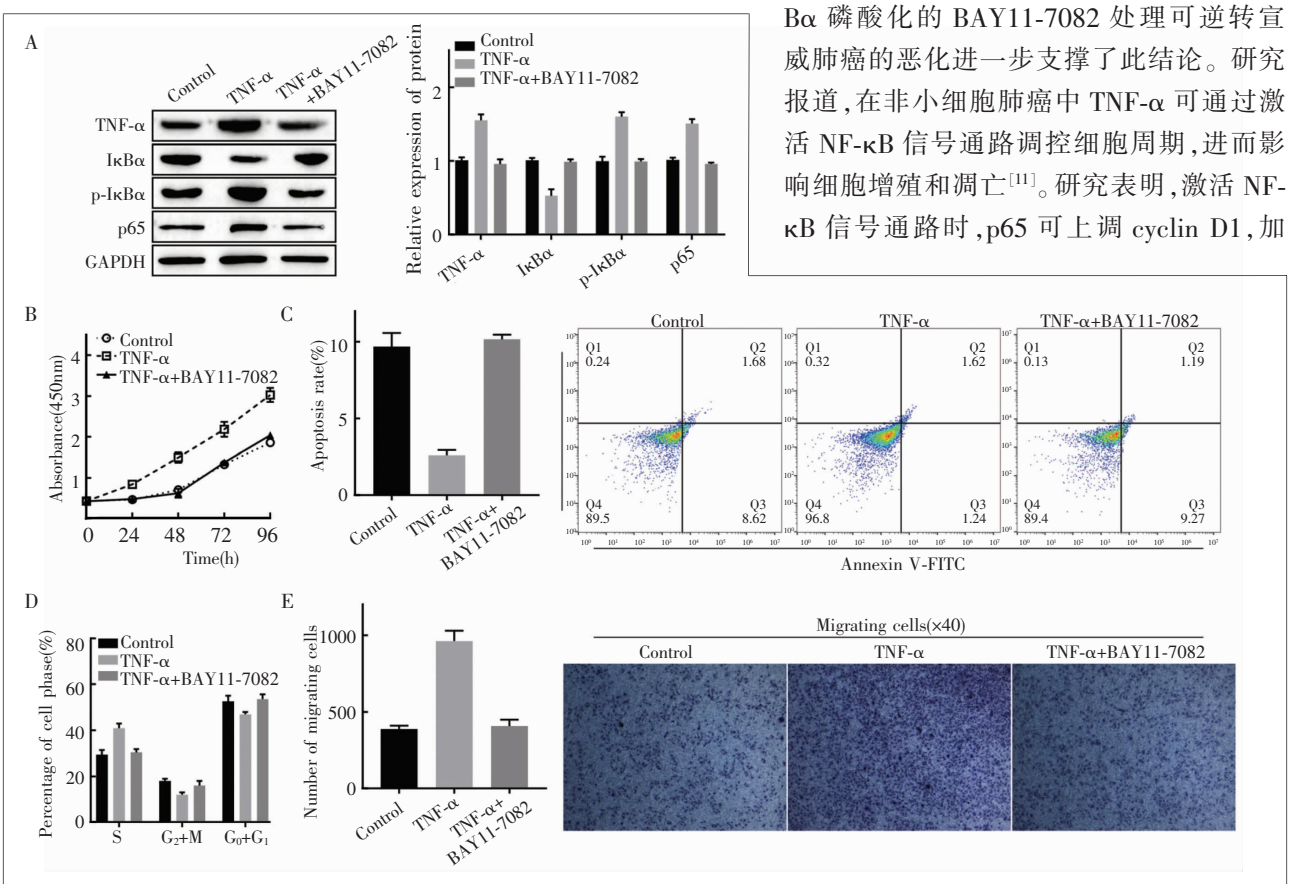


**Figure 4 TNF-α affects malignant biological behavior of Xuanwei lung cancer through classical NF-κB signal pathway**

快细胞周期,促进细胞增殖[12]。而抑制 NF-κB 信号通路后，下调的 p-IκBα 及 p65 与 DNA 结合活性降低,激活了 Caspase 介导的细胞凋亡[13]。此外,抑制 TNF-α/NF-κB 信号通路可调控非小细胞肺癌上皮间质转化,进而抑制其迁移和侵袭[14]。TNF-α 在非小细胞肺癌中发挥作用的方式除通过调控 NF-κB/PXR 炎症通路实现,还可通过对去 SUMO 化修饰的调控参与肿瘤的发生过程[15]。由此推测,TNF-α 在宣威肺癌中发挥促癌作用的方式也可能是多种多样的,仍需进行更深入的研究。

综上所述，宣威肺癌中上调的 TNF-α 通过激活 NF-κB 经典信号通路发挥对宣威肺癌恶性生物学行为的促进作用,希望通过本研究为宣威肺癌进展机制提供理论依据,为寻求新的治疗途经提供参考依据。

## 参考文献:


[1] Josephs SF,Ichim TE,Prince SM,et al. Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic [J]. J Transl Med,2018,16(1):242.

[2] Cruceriu D,Baldasici O,Balacescu O,et al. The dual role of tumor necrosis factor-alpha(TNF-α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches[J]. Cell Oncol (Dordrecht),2020,43(1):1–18.

[3] Zhu G,Du Q,Wang X,et al. TNF-α promotes gallbladder cancer cell growth and invasion through autocrine mechanisms[J]. Int J Molecular Medicine,2014,33(6):1431–1440.

[4] Gulluoglu S,Tuysuz EC,Sahin M,et al. The role of TNF-α in chordoma progression and inflammatory pathways [J]. Cell Oncol(Dordrecht),2019,42(5):663–677.

[5] Gaur P,Bhattacharya S,Kant S,et al. Association of inflammatory biomarkers with lung cancer in North Indian population[J]. African Health Sciences,2019,19(2):2147–2155.

[6] Wang Z,Li MY,Mi C,et al. Mollugin has an anti-cancer therapeutic effect by inhibiting TNF-α-induced NF-κB activation[J]. Int J Mol Sci,2017,18(8):1619–1632.

[7] Roos C,Wicovsky A,Müller N,et al. Soluble and transmembrane TNF-like weak inducer of apoptosis differentially activate the classical and noncanonical NF-kappa B pathway[J]. J Immunol,2010,185(3):1593–1605.

[8] Li R,Liu Y,Wang T,et al. The characteristics of lung cancer in Xuanwei county:a review of differentially expressed genes and noncoding RNAs on cell proliferation and migration[J]. Biomed Pharmacother,2019,119:109312.

[9] Sun L,Rollins D,Qi Y,et al. TNFα regulates intestinal organoids from mice with both defined and conventional microbiota[J]. Int J Biological Macromolecules,2020,1(164):548–556.

[10] Umemura N,Sugimoto M,Kitoh Y,et al. Metabolomic profiling of tumor-infiltrating macrophages during tumor growth[J]. Cancer Immunol Immunother,2020, 69(11):2357–2369.

[11] Subkamkaew C,Limtrakul Dejkriengkraikul P,Yodkeeree S. Proanthocyanidin-rich fractions from red rice extract enhance TNF-α-induced cell death and suppress invasion of human lung adenocarcinoma cell A549[J]. Molecules(Basel, Switzerland),2019,24(18):3393–3408.

[12] Li S,Zhou Y,Zheng X,et al. Sphk1 promotes breast epithelial cell proliferation via NF-κB-p65-mediated cyclin D1 expression[J]. Oncotarget,2016,7(49):80579–80585.

[13] Sun L,Sun C,Sun J,et al. Downregulation of ENDOCAN in myeloid leukemia cells inhibits proliferation and promotes apoptosis by suppressing nuclear factor-κB activity [J]. Mol Med Rep,2019,19(4):3247–3254.

[14] Wang S,Yan Y,Cheng Z,et al. Sotetsuflavone suppresses invasion and metastasis in non-small-cell lung cancer A549 cells by reversing EMT via the TNF-α/NF-κB and PI3K/AKT signaling pathway[J]. Cell Death Discov,2018, 4:26–37.

[15] 于雪姣，卫红军，张芳，等. TNF-α 对非小细胞肺癌中 NF-κB/PXR 信号通路和去 SUMO 化修饰的调控作用[J]. 现代生物医学进展,2020,20(17):3221–3226.
Yu XJ,Wei HG,Zhang F,et al. Regulation of TNF-α on NF-κB/PXR signaling pathway and desumo modification in non-small cell lung cancer[J]. Advances in Modern Biomedicine,2020,20(17):3221–3226.