

[文章编号] 1000- 4718(2005)08- 1557- 05

显性失活 I κ B α 质粒对胰腺癌 PC- 3 细胞株核因子- κ B 和环氧合酶- 2 表达的影响*

谢传高¹, 魏树梅², 徐选福³, 王兴鹏³¹ 浙江大学附属二院消化科, 浙江 杭州 310009; ² 日本爱媛大学第一病理, 日本;³ 上海市第一人民医院消化科, 上海 200080)

[摘要] 目的: 观察显性失活 I κ B α 质粒转染胰腺癌 PC- 3 细胞株后, 对细胞核因子- κ B(NF- κ B) 和环氧合酶- 2(COX- 2) 表达的影响。方法: 免疫组织化学证实 NF- κ B 和 COX- 2 在胰腺癌 PC- 3 细胞株中的表达, 逆转录- 聚合酶链反应(RT- PCR) 和蛋白免疫印迹(Western blotting) 检测 PC- 3 细胞转染显性失活 I κ B α 质粒后, 细胞中 NF- κ B 和 COX- 2 表达的变化。结果: 胰腺癌 PC- 3 细胞株中存在 NF- κ B 和 COX- 2 的表达, 转染显性失活 I κ B α 质粒后, 细胞中 NF- κ B 和 COX- 2 表达均下调, 且体现出一定的时间依赖性关系。结论: 胰腺癌 PC- 3 细胞株中存在 NF- κ B 和 COX- 2 的阳性表达。显性失活的 I κ B α 质粒可抑制细胞中 NF- κ B 和 COX- 2 的表达。

[关键词] 胰腺肿瘤; NF- κ B; 质粒; 环氧合酶- 2

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Effects of the dominant- negative I κ B α plasmid on the expression of NF- κ B and cyclooxygenase- 2 in pancreatic carcinoma

XIE Chuan- gao¹, WEI Shu- mei², XU Xuan- fu³, WANG Xing- peng³¹Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310009, China; ²The First Pathology Department of Ai Yuan University, Japan; ³Department of Gastroenterology, Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200080, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effects of the dominant- negative I κ B α plasmid on the expression of NF- κ B and cyclooxygenase- 2 (COX- 2) after its being transfected into pancreatic carcinoma PC- 3 cell line. **METHODS:** The expression of NF- κ B and COX- 2 in PC- 3 cell line was confirmed by immunohistochemistry. The effects of dominant- negative I κ B α plasmid transfection on the expression of NF- κ B and COX- 2 were studied by reverse transcription polymerase chain reaction (RT- PCR) and Western blotting. **RESULTS:** Both NF- κ B and COX- 2 were expressed in pancreatic carcinoma PC- 3 cell line, and the expression of NF- κ B and COX- 2 were down- regulated in a certain time- independent manner after dominant- negative I κ B α plasmid transfection. **CONCLUSIONS:** The NF- κ B and COX- 2 are expressed in pancreatic carcinoma PC- 3 cell lines. The expression of NF- κ B and COX- 2 are inhibited by dominant- negative I κ B α plasmid, while NF- κ B is likely to play an important role in regulating the expression of COX- 2.

[KEY WORDS] Pancreatic neoplasms; NF- kappa B; Plasmids; Cyclooxygenase- 2

NF- κ B 又称为核转录因子, 在非激活情况下, 多在胞浆中与抑制蛋白 I κ B 家族紧密结合而呈无活性状态。目前已知, NF- κ B 与炎症和免疫反应、某些疾病的发病过程、细胞周期的调控等密切相关。环氧合酶- 2(cyclooxygenase- 2, COX- 2) 是花生四烯酸(arachidonic acid, AA) 代谢过程中前列腺素(prostaglandins, PGs) 合成的限速酶。近来发现, COX- 2 与肿瘤的生成与进展关系密切, 而且 NF- κ B 可能在调节细胞 COX- 2 的表达中发挥重要作用^[1,2]。

本实验拟通过显性失活 I κ B α 质粒转染胰腺癌 PC- 3 细胞, 观察其对细胞 I κ B α NF- κ B 和 COX- 2 表达的影响, 初步探讨三者之间的关系。

材 料 和 方 法

1 主要材料

大鼠抗人 NF- κ B(p65) 单克隆抗体、兔抗人 COX- 2 多克隆抗体购于 Cayman 公司, 羊抗鼠 IgG- HRP、羊抗兔 IgG- HRP 购于 Santa Cruz 公司。RT-

[收稿日期] 2003- 11- 12 [修回日期] 2004- 03- 29

* [基金项目] 上海市科技发展基金重点资助项目(No. 994119016)

PCR 试剂盒、Trizol 试剂、RPMI-1640 和小牛血清购于 Gibco 公司, 0.25% 胰蛋白酶购于 Hyclon 公司。质粒纯化试剂盒购自 QiaGene 公司, 显性失活突变体 $\text{IkB}\alpha$ 质粒 S32A/S36A 由英国 ST. ANDREWS 大学 Hay 教授提供, 人胰腺癌 PC-3 细胞株由北京协和医院刘彤华教授惠赠。

2 感受态制备, 质粒的转化、鉴定及抽提、纯化

2.1 CaCl_2 法制备大肠杆菌感受态

划线接种宿主菌; 接种宿主菌于 2 mL LB, 37 °C 220 r/min, 过夜; 摇过夜的宿主菌以 $1/100 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 接入 100 mL LB, 37 °C 300 r/min 摇至 A 值约 0.5–0.6; 无菌条件下将培养物转移至预冷的 50 mL 离心管, 冰浴 10 min, 冷却至 0 °C; 4 °C 4 000 r/min, 10 min, 吸弃上清; 用 10 mL 预冷的 0.1 mol/L CaCl_2 重悬沉淀, 冰浴; 4 °C、4 000 r/min, 10 min, 吸弃上清。

2.2 质粒的转化

100 μL 感受态细胞和质粒 DNA 混合 (DNA $\leq 50 \text{ ng}$, 体积 $\leq 10 \mu\text{L}$); 冰浴 30 min; 42 °C, 反应 90 s; 冰浴, 1–2 min; 加入 37 °C 预热的 LB 5 mL, 摇动 45 min (转速 $\leq 225 \text{ r/min}$); 取 50 μL 涂板, 37 °C, 放置 12–16 h。

2.3 碱裂解法行细菌质粒 DNA 的小量制备

细胞接种于 2 mL 含抗生素的 LB 中, 37 °C 培养过夜; 将 1.5 mL 的培养物倒入微量离心管, 离心, 把细胞沉淀悬浮于 200 μL 溶液 II 中, 震荡数秒, 加入 200 μL 溶液 III, 再震荡数秒; 微量离心机离心 2 min, 上清转入另一离心管, 加入 360 μL 异丙醇, 冰上放置 5 min 后, 4 °C、12 000 r/min, 10 min。然后将沉淀重悬于 100 μL TE 缓冲液中; 37 °C 温育 10–20 min, 加入 60 μL 异丙醇, -20 °C、30 min, 沉淀 DNA; 12 000 r/min, 10 min, 70% 乙醇洗涤沉淀, 将 DNA 重悬于 20 μL TE 缓冲液中; 37 °C 空气浴摇床。

2.4 转化子鉴定

少量抽提转化子质粒, 经限制性内切酶消化鉴定阳性转化子。限制性内切酶为 *Bam*H I, *Xho* I。

2.5 质粒大量抽提

依照质粒纯化试剂盒说明书, 常规方法逐步进行质粒的大量抽提工作。

3 显性失活 $\text{IkB}\alpha$ 质粒转染 PC-3 细胞株

3.1 细胞培养

细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基, 另添加 Na_2CO_3 (20 mmol/L) 和抗生素 ($1 \times 10^5 \text{ U/L}$ 青霉素和 100 mg/L 链霉素), 置 37 °C 5% CO_2 混合气体的孵箱中培养, 细胞换液时间为 1–2 d, 传代 3–5 d, 传代前用 0.25% 胰酶消化。

3.2 质粒转染

采用 lipofectin 为转染试剂。方法如下: ① PC-3 细胞 1×10^5 cells/well 接种 6 孔培养板, 常规培养过夜。② 无菌 Eppendorf 小管中, 用无抗

生素无血清的 RPMI-1640 培养基, 稀释 2–25 μL 的 lipofectin 脂质体至 100 μL 。将 2 μL (配制浓度 1 g/L) 质粒加入另一 Eppendorf 管中, 同样条件的培养基稀释至 100 μL , 室温放置 10 min。③ 将上述两管中液体混合, 并用加样器轻轻打匀, 室温放置 15–45 min, 使之形成质粒脂质体复合体。然后加入 0.8 mL 无抗生素无血清的 RPMI-1640 培养基, 使总转染体积达到 1 mL。④ 用 4 °C 无血清培养基洗涤 6 孔板中细胞 3 次, 最后 1 次洗涤用无抗生素的培养基, 吸尽残存的培养基, 将质粒脂质复合体逐滴加进 6 孔培养板的细胞中, 轻轻旋转培养板, 确保转染液均匀分布, 然后放回孵箱, 继续在 5% CO_2 、37 °C 条件下培养。⑤ 6 h 后, 吸去含有寡核苷酸脂质体的培养基, 加进 2 mL 新鲜的 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基继续常规培养 24–48 h。

4 方法

4.1 免疫组织化学检测肿瘤组织中 NF- κB 和 COX-2 的表达

采用过氧化物酶复合物 (peroxidase anti-peroxidase complex, PAP) 法, I 抗体分别为鼠抗人 NF- κB (p65) 单克隆抗体 (1:100) 和兔抗人 COX-2 多克隆抗体 (1:100), II 抗分别为羊抗鼠 IgG-HRP (1:200) 和羊抗兔 IgG-HRP (1:200), 每批染色均设立 NF- κB 和 COX-2 表达的阳性和阴性对照。

4.2 RT-PCR 检测肿瘤组织中 $\text{IkB}\alpha$ 、NF- κB 和 COX-2 mRNA 的变化

PC-3 细胞 1×10^5 接种于 6 孔培养板中, 常规培养过夜后, 按上述方法转染 $\text{IkB}\alpha$ 质粒, 实验分 4 组: 对照组, I₁ 组 (转染后 12 h), I₂ 组 (转染后 24 h) 和 I₃ 组 (转染后 48 h)。实验结束后, 采用 Trizol 提取肿瘤细胞总 RNA。 $\text{IkB}\alpha$ 引物序列: 上游: 5'-TGAGGACCAGCAGTGTCTTG-3', 下游: 5'-CATCGTTGATCACAAAGTCGG-3', 扩增片段大小 203 bp, 退火温度为 58 °C。NF- κB 引物序列: 上游: 5'-ATGCTTACTGGGTGCCAAAC-3', 下游: 5'-GGCAAGTCACTCAGCCCTTTC-3', 扩增片段大小 125 bp, 退火温度为 58 °C。COX-2 引物序列: 上游 5'-TCAAGTCCCTGAGCATCTAC-3', 下游 5'-CATTCC-TACCACCAGCAACC-3', 大小 488 bp, 退火温度 58 °C。选取 GAPDH 为内参照, 引物序列: 上游: 5'-GGTGAAGGTCCGGTGTGAACGGA-3', 下游: 5'-TGT-TAGTGGGTCTCGCTCCTG-3', 扩增片段大小 223 bp, 退火温度为 60 °C。所有引物均由上海生工公司合成, 采用美国 GeneGenius 凝胶电泳成像系统观测成像情况。

4.3 Western blotting 检测肿瘤细胞 NF- κB 和 COX-2 蛋白的变化

PC-3 细胞 2.5×10^6 接种于 250 mL 的培养瓶, 常规培养 12 h, 转染 $\text{IkB}\alpha$ 质粒。实验

分3组:对照组(0 h组) 24 h组和48 h组, I κ B α 质粒取每瓶6 μ g, 转染体积为3 mL。实验结束后, 采用悬浮缓冲液(0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris-HCl, 0.001 mol/L EDTA, 1 mg/L aprotinin, 100 mg/L PMSF)提取细胞总蛋白。湿式转膜方式检测NF- κ B和COX-2蛋白的表达, I抗分别为鼠抗人NF- κ B(p65)单克隆抗体和兔抗人COX-2多克隆抗体, II抗为羊抗鼠IgG-HRP和羊抗兔IgG-HRP, 采用ECL自显影技术。

结 果

1 免疫组织化学检测肿瘤组织中NF- κ B和COX-2的表达

免疫组织化学染色显示, NF- κ B和COX-2蛋白在胰腺癌PC-3细胞中均有表达。阳性产物呈黄

色, 为细胞胞浆和核的混合性着色, COX-2表达以胞浆为主, 而NF- κ B则以胞核较为明显, 阳性染色强度在细胞间存在差异(见图1)。

2 RT-PCR检测肿瘤组织中I κ B α 、NF- κ B和COX-2 mRNA水平的变化

RT-PCR结果显示, 随着I κ B α 转染时间的延长, 细胞I κ B α mRNA的表达量逐步上调, 而NF- κ B和COX-2 mRNA的表达量则出现不同程度的下调表现(图3), 呈现一定的时间依赖性关系。

3 Western blotting检测肿瘤细胞NF- κ B和COX-2蛋白的变化

通过Western blotting方法检测肿瘤细胞中NF- κ B和COX-2蛋白的变化, 结果表明, I κ B α 质粒转染胰腺癌PC-3细胞株后, NF- κ B和COX-2蛋白的表达均有不同程度的下调。

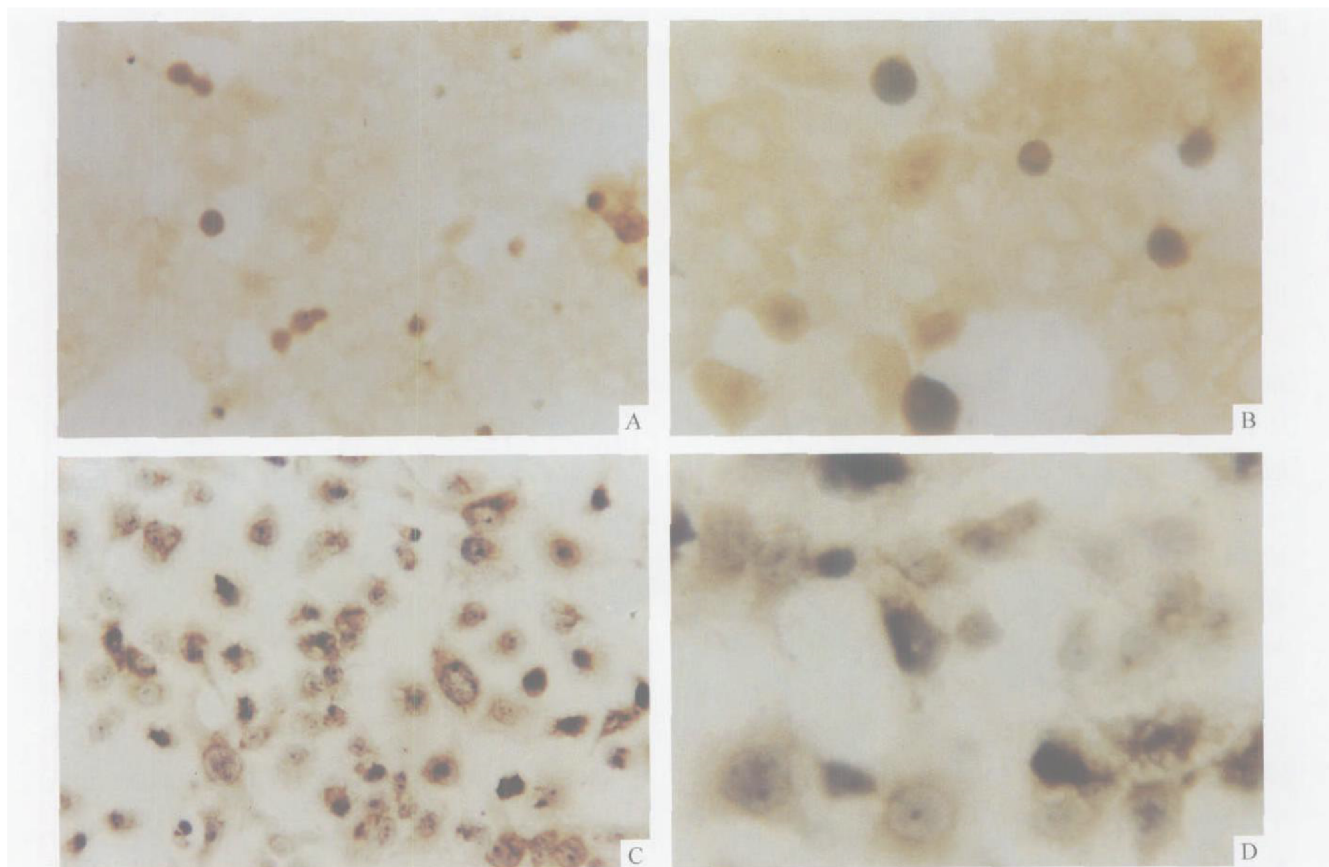


Fig 1 Staining of NF- κ B and COX-2 by immunohistochemistry for PC-3 cell strains.
 A: The expression of NF- κ B in PC-3 cell strains by immunohistochemistry ($\times 200$);
 B: The expression of NF- κ B in PC-3 cell strains by immunohistochemistry ($\times 400$);
 C: The expression of COX-2 in PC-3 cell strains by immunohistochemistry ($\times 200$);
 D: The expression of COX-2 in PC-3 cell strains by immunohistochemistry ($\times 400$);

图1 胰腺癌PC-3细胞NF- κ B和COX-2免疫组化染色

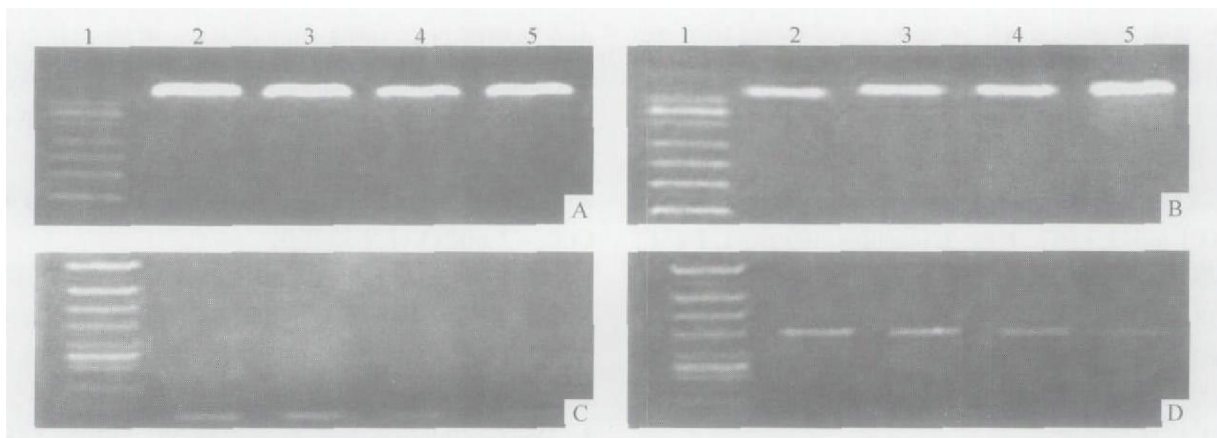


Fig 2 The expression of IκBα mRNA, NF-κB mRNA and COX-2 mRNA after IκBα plasmid's being transfected into pancreatic carcinoma PC-3 cell lines. A: the expression of GAPDH (223 bp); B: the expression of IκBα mRNA (203 bp) in PC-3 cell strains after IκBα plasmid's transfection; C: the expression of NF-κB mRNA (125 bp) in PC-3 cell strains after IκBα plasmid's transfection; D: the expression of COX-2 mRNA (488 bp) in PC-3 cell strains after IκBα plasmid's transfection; 1: DNA marker; 2: control group; 3: I₁ group (12 h after IκBα plasmid's transfection); 4: I₂ group (24 h after IκBα plasmid's transfection); 5: I₃ group (48 h after IκBα plasmid's transfection).

图 2 IκBα 质粒转染后, PC-3 细胞中 IκBα、NF-κB 和 COX-2 mRNA 表达情况

故名为 NF-κB。NF-κB 是 REL 蛋白家族成员,在哺乳动物中有 5 个 REL 成员,包括 C-Rel、NF-κB1 (p50)、NF-κB2 (p52)、RelA (p65) 和 RelB。Rel/NF-κB 转录因子多形成带有不同 DNA 联结点特异性和 DNA 联结亲和力的同源和异源二聚体,但绝大多数形式为一个 p50/p65 异二聚体。已有资料表明, NF-κB 与肿瘤的发生发展及转移有着较为密切的关系,多种肿瘤中存在着 NF-κB 的高表达现象^[3,4]。环氧合酶则是花生四烯酸代谢过程中前列腺素合成的限速酶,目前已经知道其至少存在两种亚型, COX-1 和 COX-2。COX-1 属结构型 (constitutive) 酶,在多种组织中呈微量表达,其催化产物主要参与维持细胞结构的完整性^[5]; COX-2 属诱导型 (inducible) 酶,正常组织中很少表达,在各种刺激因素如细胞因子、炎性介质以及促癌剂等作用下,其表达则迅速上调^[6,7]。近来研究表明,高脂饮食尤其是 6-n 簇多不饱和脂肪酸的摄入增加可能与胰腺癌的发病率上升有关^[8,9],而有 COX-2 途径导致的脂质代谢紊乱可能是促进消化系统肿瘤发生和发展的重要原因之一。实验中,我们应用免疫组化的方法检测了 NF-κB 和 COX-2 在胰腺癌 PC-3 细胞中的表达情况,结果表明,与其他肿瘤细胞类似,胰腺癌细胞中同样也存在着 NF-κB 和 COX-2 的高表达,而且 NF-κB 表达以胞核为主,COX-2 则以胞浆表达为主。

目前知道,在非激活条件下, NF-κB 在大多数细胞类型的细胞浆内与其抑制蛋白 IκB 家族紧密结合而呈无活性状态,它可以被许多刺激剂(如细胞因

子,促有丝分裂因子、病毒、氧化脂质体、紫外线和纤维蛋白原等)激活,被激活的 NF-κB 与 IκB 解离,转入核内与靶基因的 κB 基序结合,增强该靶基因(如编码细胞因子、生长因子、急性期反应蛋白、免疫受体、病毒蛋白和凋亡调节子等的基因)表达。实验中我们发现,转染显性失活的 IκB 质粒后, PC-3 细胞 IκB 的表达呈现上调趋势,且体现出一定的时效关系,而 NF-κB 则随着 IκB 表达的增高,其表达相应下调。这可能与 IκB 质粒成功转染细胞后,导致 IκB 活性增加,表达上调,这种作用在 24h 达到高峰,48h 后仍维持较高水平。IκB 活性增加后,可进一步结合胞浆内的 NF-κB,造成 NF-κB 大量失活,抑制其易位入核,导致 NF-κB 表达的下调。

资料表明, NF-κB 可能是肿瘤中 COX-2 高表达的一个重要调节因素,这可能与 COX-2 蛋白上存在着 NF-κB 的表达受体有关^[1,2]。我们进一步观察了 IκB 质粒转染细胞后,细胞中 COX-2 mRNA 和蛋白的表达情况,结果显示,随着 IκB 表达水平的增高, COX-2 表达亦相应下调,与 NF-κB 的变化趋势相一致。这种结论在其他实验中也得到了进一步证实^[10]。

总之,由于肿瘤中存在着 NF-κB 和 COX-2 的高表达,且 NF-κB 可能在 COX-2 的高表达中起着一定的介导作用,提高细胞中 IκB 或者降低 NF-κB 的表达浓度,有可能同时降低细胞中 COX-2 的表达,这对肿瘤的治疗无疑是有利的。但值得注意的是,肿瘤中 COX-2 高表达可能是一个多因素参与的

复杂过程^[1],我们重视 NF- κ B 在肿瘤 COX-2 高表达中介导作用,但同样不应忽视其因素在诱导肿瘤 COX-2 高表达中的作用。

[参 考 文 献]

- [1] Lim JW, Kim H, Kim KH. Nuclear factor- κ B regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells[J]. *Lab Invest*, 2001, 81(3): 349-360.
- [2] Kojima M, Morisaki T, Izuhara K, et al. Lipopolysaccharide increases cyclooxygenase-2 expression in a colon carcinoma cell line through nuclear factor kappa B activation[J]. *Oncogene*, 2000, 19(9): 1225-1231.
- [3] Bian X, Oipari AW Jr, Rantanproeksa AB, et al. Constitutively active NF kappa B is required for the survival of S-type neuroblastoma[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(44): 42144-42150.
- [4] Segev DL, Ha TU, Tran TT, et al. Mullerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NF kappa B-mediated pathway[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(37): 28371-28379.
- [5] Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenase) - 1 and - 2[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(52): 33157-33160.
- [6] Eberhart CE, Dubois RN. Eicosanoids and the gastrointestinal tract[J]. *Gastroenterology*, 1995, 109(1): 285-301.
- [7] Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, et al. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(7): 2692-2696.
- [8] Bueno de Mesquita HB, Maisonneuve P, Runia S, et al. Intake of foods and nutrients and cancer of the exocrine pancreas: a population-based case-control study in the Netherlands[J]. *Int J Cancer*, 1991, 48(4): 540-549.
- [9] Wenger FA, Jacobi CA, Kilian M, et al. Dose dietary alpha-linolenic acid promote live metastases in pancreatic carcinoma initiated by BOP in Syrian hamster[J]. *Ann Nutr Metab*, 1999, 43(2): 121-126.
- [10] Charalambous MP, Maihofner C, Bhambra U, et al. Upregulation of cyclooxygenase-2 is accompanied by increased expression of nuclear factor kappa B and I kappa B kinase-alpha in human colorectal cancer epithelial cells[J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(10): 1598-1604.
- [11] Liu W, Reinmuth N, Stoeltzing O, et al. Cyclooxygenase-2 is up-regulated by interleukin-1 beta in human colorectal cancer cells via multiple signaling pathways[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(13): 3632-3636.

《微循环学》出版

由著名微循环学专家田牛教授所著的《微循环学》一书,已于近期由原子能出版社正式出版发行。全书共分为六大部分:(1)总论(1~5章),(2)微循环的基础(6~13章),(3)器官微循环(14~31章),(4)微循环的改变(32~36章),(5)临床微循环(37~42章),(6)主要疾病的微循环的改变(43~56章)。全书共140万字,反映了作者近40年来的研究成果,资料丰富全面,论断合理有据,并有多幅实拍的珍贵微循环图像,是一部比较系统、完整的微循环学专著,可供微循环专业人员阅读,也可作为临床、基础医学的有关专家、研究生、大专院校师生参考。该书大16开本,定价280元,邮寄费30元。邮购款请邮至北京2108信箱发行部收,邮编:100037,电话:010-68417733转2153。联系人:封春瑞。转帐开户行:北京银行紫竹支行,帐号:01091049400120109003266,户名:原子能出版社。