

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00271

## 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 通过核因子 $\kappa$ B 促进肝癌细胞上皮间质转化

寇兴瑞<sup>1,2</sup>, 井莹莹<sup>2</sup>, 喻国锋<sup>1,2</sup>, 吴孟超<sup>2</sup>, 卫立辛<sup>2\*</sup>

1. 苏州大学研究生院, 苏州 215006
2. 第二军医大学东方肝胆外科医院肿瘤免疫与基因治疗中心, 上海 200438

**[摘要]** **目的** 研究肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 对肝癌细胞上皮间质转化 (EMT) 的影响并探讨其分子机制。**方法** 用 TNF- $\alpha$  处理人肝癌细胞株 (Hep3B 和 SMMC-7721) 24 h, 倒置显微镜下观察处理前后细胞形态的变化, 采用荧光定量 RT-PCR 和蛋白质印迹分析方法检测细胞中上皮细胞标记物上皮性钙黏蛋白 (E-cadherin) 和  $\beta$ -连环素 ( $\beta$ -catenin)、间质细胞标记物波形蛋白 (Vimentin) 和神经性钙黏蛋白 (N-cadherin) 以及转录调控因子 Twist 的表达变化, Transwell 及划痕实验分析细胞的侵袭能力。随后采用荧光素酶报告基因系统和细胞免疫荧光评估 TNF- $\alpha$  对核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 的激活作用; 蛋白质印迹分析检测 I $\kappa$ B $\alpha$  及 p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达水平。TNF- $\alpha$  联合应用 NF- $\kappa$ B 抑制剂后, 检测细胞 EMT 表型变化。**结果** Hep3B 和 SMMC-7721 细胞用 TNF- $\alpha$  处理后, 表现 EMT 的表型; 细胞的划痕愈合率明显大于未处理组 ( $P < 0.05$ ), Transwell 实验显示细胞穿透膜的数量亦显著增多 ( $P < 0.05$ )。TNF- $\alpha$  能有效激活 NF- $\kappa$ B 报告基因, 促进 NF- $\kappa$ B p65 核转位及 I $\kappa$ B $\alpha$  的磷酸化。应用 NF- $\kappa$ B 抑制剂 BAY11-7082 能够逆转 TNF- $\alpha$  诱导 EMT 的作用 ( $P < 0.05$ )。**结论** TNF- $\alpha$  通过 NF- $\kappa$ B 依赖性途径诱导肝癌细胞发生 EMT, 进而促进肝癌的侵袭转移。

**[关键词]** 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 肝细胞癌; 上皮间质转化; 肿瘤浸润; NF- $\kappa$ B

**[中图分类号]** R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)03-0271-06

### TNF- $\alpha$ induces epithelial-mesenchymal transition through NF- $\kappa$ B in hepatocellular carcinoma

KOU Xing-rui<sup>1,2</sup>, JING Ying-ying<sup>2</sup>, YU Guo-feng<sup>1,2</sup>, WU Meng-chao<sup>2</sup>, WEI Li-xin<sup>2\*</sup>

1. Graduate Department of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu, China
2. Tumor Immunology and Gene Therapy Center, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of hepatocellular carcinoma (HCC) cells and the related mechanism. **Methods** HCC cell lines Hep3B and SMMC-7721 were treated with TNF- $\alpha$  for 24 h; then the cell morphological changes were observed by microscope and the expressions of the epithelial markers (E-cadherin and  $\beta$ -catenin), mesenchymal markers (Vimentin and N-cadherin), and EMT associated transcriptional factor Twist were examined by RT-PCR and Western blotting analysis. The invasion and metastasis ability was evaluated by Transwell and wound healing assay. Luciferase reporter assay and immunofluorescence were used to determine NF- $\kappa$ B transcriptional activity; Western blotting analysis was used to examine the expression levels of I $\kappa$ B $\alpha$  and p-I $\kappa$ B $\alpha$  protein. Cells were also incubated with TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B inhibitor (BAY11-7082) together, and then the phenotype of EMT was detected by microscope, RT-PCR and Western blotting analysis. **Results** Hep3B and SMMC-7721 cells had EMT phenotype after treated with TNF- $\alpha$ . Wound healing assay showed that the wound healing rate of cells exposed to TNF- $\alpha$  was significantly increased compared with the non-treated group ( $P < 0.05$ ), and Transwell assay showed that more cells penetrating the membrane after treatment with TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ). TNF- $\alpha$  effectively promoted I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and the subsequent NF- $\kappa$ B nuclear translocation. We also found that TNF- $\alpha$ -mediated EMT could be converted by NF- $\kappa$ B inhibitor (BAY11-7082) ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** TNF- $\alpha$  induces EMT of HCC cells through NF- $\kappa$ B-dependent pathways, and subsequently promotes the invasion and metastasis of HCC.

**[Key words]** tumor necrosis factor- $\alpha$ ; hepatocellular carcinoma; epithelial-mesenchymal transition; neoplasm invasiveness; NF- $\kappa$ B

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(3): 271-276]

**[收稿日期]** 2012-11-06 **[接受日期]** 2013-02-05

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81201584, 31171321). Supported by National Natural Science Foundation of China (81201584, 31171321).

**[作者简介]** 寇兴瑞, 硕士生. E-mail: kouxingrui@gmail.com

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81875331, E-mail: weilixin@yahoo.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)严重威胁人类身体健康,侵袭与转移是其治疗失败和患者死亡的主要原因。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是促进肿瘤转移的重要因素之一,许多肿瘤的原位存在 EMT 现象<sup>[1-4]</sup>。局部炎症微环境对肿瘤转移也起着不可忽视的作用,肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )参与其中并发挥了重要作用<sup>[5-6]</sup>。近年研究发现,在某些肿瘤如肾癌、结肠癌及乳腺癌等肿瘤中, TNF- $\alpha$ 可以促进 EMT 的发生<sup>[2-3,7-9]</sup>。本研究旨在探讨 TNF- $\alpha$ 对肝癌 EMT 的影响及其可能机制,为进一步阐明肝癌细胞侵袭转移的分子机制提供新的理论依据和治疗靶点。

## 1 材料和方法

1.1 材料 Hep3B 和 SMMC-7721 肝癌细胞株为第二军医大学东方肝胆外科医院肿瘤免疫与基因治疗中心保存; TNF- $\alpha$  购自 PeproTech 公司; DMEM 高糖培养基、胎牛血清、青霉素、链霉素和 0.25% 胰蛋白酶购自 Invitrogen 公司; NF- $\kappa$ B 抑制剂 BAY11-7082 购自 Sigma 公司; 兔抗人上皮性钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、转录调控因子 Twist 多克隆抗体、 $\beta$ -连环素( $\beta$ -catenin)、神经性钙黏蛋白(N-cadherin)购自 Abcam 公司; 兔抗人 I $\kappa$ B $\alpha$  和 p-I $\kappa$ B $\alpha$  抗体购自 Cell Signaling 公司; NF- $\kappa$ B p65 抗体购自 Abcam 公司; AMV 第一链合成试剂盒 cDNA 及高保真 PCR 试剂盒均购自 Thermo 公司; 真核细胞膜蛋白提取试剂盒购自碧云天生物工程公司; NF- $\kappa$ B 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司; 标记 HRP 的羊抗兔二抗购自杭州华安生物技术有限公司; 引物由上海吉玛制药技术有限公司合成; Lipofectamine 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司。

1.2 细胞培养及药物处理 人肝癌细胞株 Hep3B 和 SMMC-7721 分别培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 其中加入青霉素和链霉素(终浓度为 100 U/mL)。培养液于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养, 0.25% 胰酶消化, 2~3 d 消化传代一次, 生长至对数生长期。TNF- $\alpha$  用过滤的超纯水稀释到 1  $\mu$ g/mL, 置于 -20℃ 保存, 使用前稀释到工作浓度(10 ng/mL); 以不加 TNF- $\alpha$  的处理组为对照。NF- $\kappa$ B 抑制剂(BAY11-7082)与 TNF- $\alpha$  同时加入, 工作浓度为 10  $\mu$ mol/L。倒置显微镜下观察细胞的生

长状态。

### 1.3 细胞中 E-cadherin、Vimentin、Twist、 $\beta$ -catenin 和 N-cadherin 的表达检测

1.3.1 荧光定量 RT-PCR 将准备好的各处理组细胞按照 TRIzol 试剂一步法提取细胞总 RNA。按照 mRNA 反转录试剂盒将 2  $\mu$ g 总 RNA 反转录为 cDNA, 再以 cDNA 为模板, 根据荧光定量 PCR 检测试剂盒的操作说明建立反应体系(cDNA 4  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 5  $\mu$ L、MasterMix 10  $\mu$ L、引物 1  $\mu$ L), 以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参, 设定循环数为 40, 进行熔解曲线分析, 以确定无特异性扩增。目的基因 *E-cadherin* 上游引物为 5'-TTT GTA CAG ATG GGG TGT TGC-3', 下游引物为 5'-CAA GCC CAC TTT TCA TAG TTC C-3'; *Vimentin* 上游引物为 5'-CTT CCG CGC CTA CGC CA-3', 下游引物为 5'-GCC CAG GCG AGG TAC TCC-3'; *Twist* 上游引物为 5'-CGG GAG TCC GCA GTC TTA-3', 下游引物为 5'-CCC ATG TGA TTC GAT GCG T-3';  *$\beta$ -catenin* 上游引物为 5'-ATT GTC CAC GCT GGA TTT TC-3', 下游引物为 5'-TCG AGG ACG GTC GGA CT-3'; *N-cadherin* 上游引物为 5'-GTG CCA TTA GCC AAG GGA ATT CAG C-3', 下游引物为 5'-GCG TTC CTG TTC CAC TCA TAG GAG G-3'。所有的 PCR 均设 3 个复孔, 并同时扩增内参照 GAPDH。

1.3.2 蛋白质印迹分析 消化收获各处理组的细胞, 采用真核细胞膜蛋白提取试剂盒抽提细胞膜蛋白, 用 200  $\mu$ L RIPA 裂解液充分裂解提取蛋白, 蛋白样品 100℃ 煮沸 5 min, 与蛋白加样缓冲液混合后上样, 采用 10% 的 SDS-PAGE 分离, 转至 PVDF 膜。5% 脱脂奶室温封闭 2 h 或 4℃ 过夜, 加入兔抗人一抗: E-cadherin (1 : 1 000)、Vimentin (1 : 1 000)、Twist (1 : 50)、 $\beta$ -catenin (1 : 2 000) 和 N-cadherin (1 : 600), 4℃ 过夜, TBST 液漂洗 3 次, 二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体, 1 : 10 000) 室温孵育 1 h, TBST 液漂洗 3 次。配置新鲜 ECL 试剂, 将膜孵育 3 min, 暗室 X 线片曝光 30 s 至 5 min, 显影 30 s, 定影 30 s 成像。采用 IPP 软件对目的条带进行灰度分析。实验重复 3 次。

### 1.4 细胞侵袭能力检测

1.4.1 细胞划痕实验 将 Hep3B 细胞及 SMMC-7721 细胞接种到 6 孔板中, 待细胞长满单层, 弃去培养液, 用无血清培养液漂洗 1 次, 均用灭菌的 10  $\mu$ L

吸头的尖部在6孔板中划出一条宽度约1 mm的无细胞的痕迹,用无血清培养液漂洗2次,继续培养,分时段(0 h和24 h)在倒置显微镜下拍照,测量划痕愈合的相对距离,计算划痕愈合率。划痕愈合率(%)=(0 h划痕距离-24 h划痕距离)/0 h划痕距离 $\times$ 100%。

1.4.2 Transwell小室侵袭实验 Hep3B细胞及SMMC-7721细胞贴壁后分组,换液后加入各处理因素培养24 h,用胰酶消化,离心洗涤并重悬于无血清的DMEM培养液中,调整细胞密度为 $5 \times 10^5$ /mL。将Transwell小室置于24孔板内,取基质胶铺于微孔滤膜的嵌套上室,嵌套下室加入500  $\mu$ L含10%胎牛血清的DMEM培养液,上室加入200  $\mu$ L细胞悬液,37 $^{\circ}$ C培养箱内孵育24 h,用棉拭子将小室内面的基质胶擦去,结晶紫染色20 min,PBS冲洗3次,400倍光镜下计数随机5个不同视野的穿膜细胞数,取均值,计算迁移细胞的相对数目。

## 1.5 NF- $\kappa$ B活性检测

1.5.1 荧光素酶报告基因检测 将正常培养的Hep3B和SMMC-7721细胞接种于24孔板中,24 h后将NF- $\kappa$ B荧光报告质粒、内参照质粒分别与pcDNA载体重组后共转染细胞,转染方法参照Lipofectamine试剂盒说明书。转染后24 h应用TNF- $\alpha$ 处理24 h,处理结束后每孔加入100  $\mu$ L细胞裂解液,离心。取30  $\mu$ L裂解液上清与等体积荧光素酶底物混合,于荧光素酶活性检测仪上检测荧光值。应用酶标仪检测每孔细胞的转染效率。每孔细胞的荧光素酶活性为测定的荧光值与转染效率的比值。

1.5.2 免疫荧光检测 将约 $10^4$ 个细胞接种于48孔板上。待细胞贴壁后加入TNF- $\alpha$ 孵育24 h,PBS冲洗2次,4%多聚甲醛固定30 min,PBS冲洗2次,0.1% Triton X-100破膜6 min,PBS冲洗2次,10%山羊血清封闭30 min,PBS冲洗2次后加入稀释的一抗(NF- $\kappa$ B p65,1:1 000)孵育过夜,PBS冲洗2次,加入二抗37 $^{\circ}$ C避光孵育30 min,PBS冲洗2次,DAPI染色10 min,PBS冲洗2次,荧光显微镜下观察。

1.5.3 蛋白质印迹分析 采用蛋白质印迹分析检测细胞中I $\kappa$ B $\alpha$ 和p-I $\kappa$ B $\alpha$ 的表达,兔抗人I $\kappa$ B $\alpha$ 抗体工作浓度为1:500,p-I $\kappa$ B $\alpha$ 抗体工作浓度为1:1 000。检测方法同前。

1.6 统计学处理 应用SPSS 20.0统计软件进行结果分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用Student's *t*检验,检验水平( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 TNF- $\alpha$ 促进Hep3B和SMMC-7721细胞发生EMT Hep3B和SMMC-7721细胞用TNF- $\alpha$ 处理24 h后,倒置显微镜下观察发现对照组的细胞呈多角形的上皮形态,细胞间排列紧密,而TNF- $\alpha$ 处理组的细胞形态均发生了不同程度的改变,细胞呈类圆或仿锤体状,细胞间空隙增大(图1A)。RT-PCR及蛋白质印迹分析结果显示TNF- $\alpha$ 处理组细胞中*E-cadherin*与 *$\beta$ catenin*下调,而*Vimentin*、*Twist*及*N-cadherin*上调( $P < 0.05$ ,图1B、1C)。结果表明,TNF- $\alpha$ 可促进Hep3B和SMMC-7721细胞发生EMT。

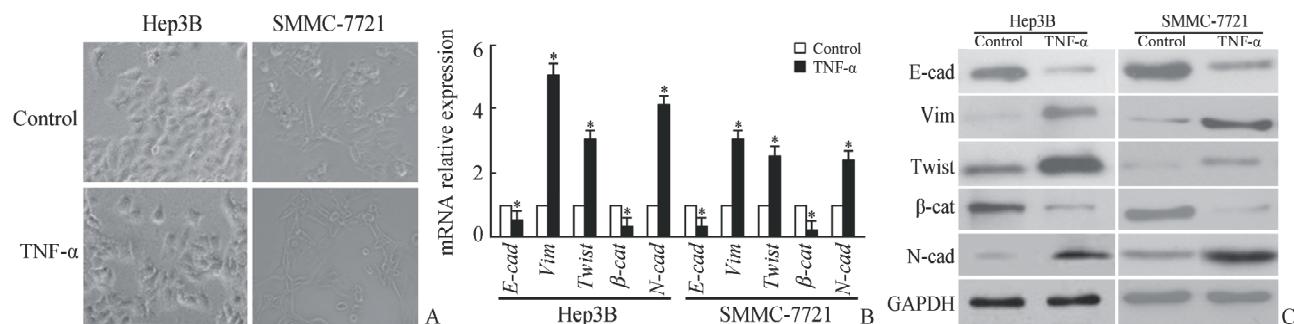


图1 TNF- $\alpha$ 体外诱导EMT表型

Fig 1 TNF- $\alpha$  induced the phenotype of EMT *in vitro*

EMT: Epithelial-mesenchymal transition; E-cad: E-cadherin; Vim: Vimentin;  $\beta$ -cat:  $\beta$ -catenin; N-cad: N-cadherin. A: Morphological change in Hep3B and SMMC-7721 cells treated with or without TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) for 24 h. Original magnification:  $\times 200$ ; B: mRNA expression of *E-cad*, *Vim*, *Twist*,  *$\beta$ cat* and *N-cad* was detected by RT-PCR (\* $P < 0.05$  vs control;  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ ); C: Protein expression of *E-cad*, *Vim*, *Twist*,  *$\beta$ -cat* and *N-cad* was detected by Western blotting analysis

2.2 TNF- $\alpha$  增强 Hep3B 和 SMMC-7721 细胞的侵袭能力 倒置显微镜下 24 h 时划痕伤口愈合情况见图 2A, TNF- $\alpha$  处理组 [Hep3B: (60.64  $\pm$  1.39)%, SMMC-7721: (67.6  $\pm$  1.38)%] 与对照组 [Hep3B: (8.67  $\pm$  0.84)%, SMMC-7721: (15.33  $\pm$  1.32)%] 相比, 划痕愈合率明显升高, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Transwell 小室侵袭实验结果显示, 对

照组 Hep3B 细胞与 SMMC-7721 细胞穿透到滤膜下的细胞数分别为 (30  $\pm$  8) 个、(50  $\pm$  6) 个, TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) 处理组 Hep3B 与 SMMC-7721 细胞穿透数增加, 分别为 (80  $\pm$  5) 个、(130  $\pm$  5) 个, 与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 2B)。结果提示 TNF- $\alpha$  能够增强肝癌细胞系 Hep3B 和 SMMC-7721 的侵袭能力。

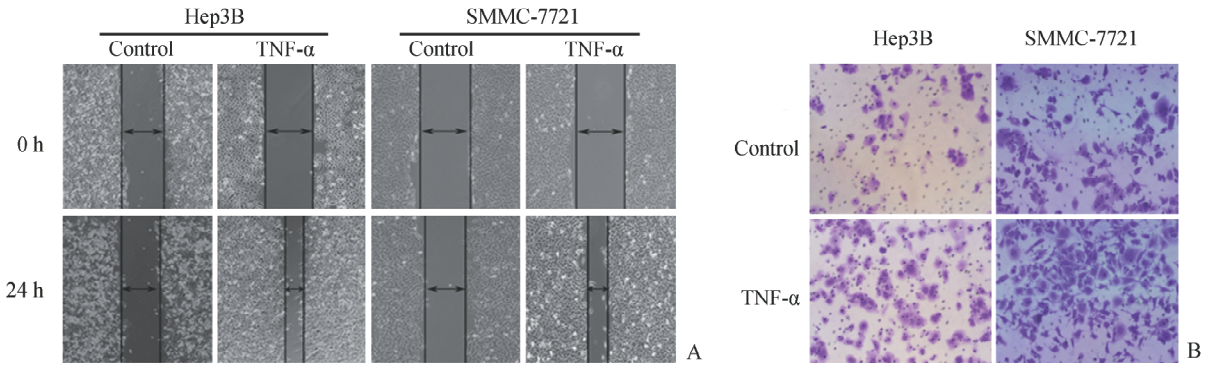


图 2 细胞划痕愈合实验及 Transwell 侵袭实验

Fig 2 Wound healing assay and Transwell invasion assay

A: Images were captured immediately after wounding (0 h) and 24 h post wounding; B: TNF- $\alpha$  promoted the motility and invasion capacity of Hep3B and SMMC-7721 cells. Original magnification:  $\times 200$

2.3 TNF- $\alpha$  上调 Hep3B 和 SMMC-7721 细胞 NF- $\kappa$ B 活性 荧光素酶报告基因检测结果显示 Hep3B 和 SMMC-7721 细胞应用 TNF- $\alpha$  处理 24 h 后, NF- $\kappa$ B 报告基因的活性明显强于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 3A); 免疫荧光检测显示

TNF- $\alpha$  显著增强 NF- $\kappa$ B 核转位 (图 3B); 蛋白质印迹检测结果显示 TNF- $\alpha$  处理后, I $\kappa$ B $\alpha$  表达显著下调, 同时 p-I $\kappa$ B $\alpha$  表达上调 (图 3C)。表明应用 TNF- $\alpha$  可明显上调 Hep3B 和 SMMC-7721 细胞的 NF- $\kappa$ B 活性。

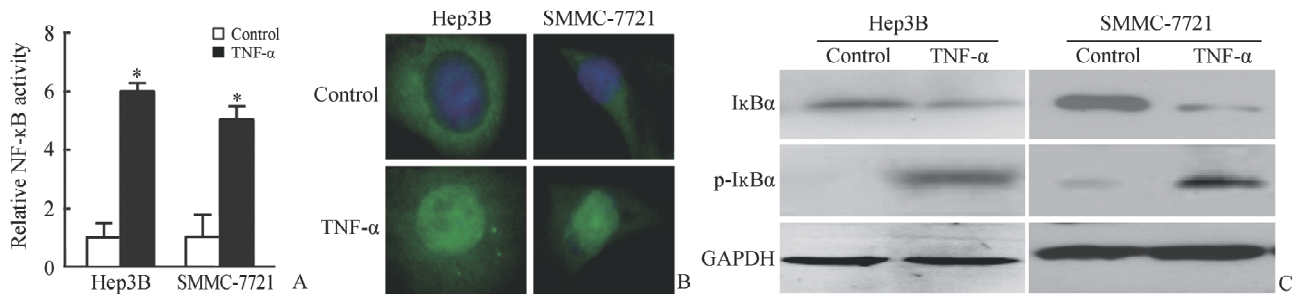


图 3 TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) 激活细胞 NF- $\kappa$ B 活性

Fig 3 TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) induced NF- $\kappa$ B activation

A: Luciferase reporter assay was performed 24 h after adding TNF- $\alpha$  (\*  $P < 0.05$  vs control;  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ ); B: NF- $\kappa$ B p65 transcriptional activity of cells was evaluated by immunofluorescence (The p65 subunit of NF- $\kappa$ B in the cytosol was stained green and the nuclei were stained blue with DAPI). Original magnification:  $\times 400$ ; C: Expression of I $\kappa$ B $\alpha$  and p-I $\kappa$ B $\alpha$  was detected by Western blotting analysis after treatment with TNF- $\alpha$

2.4 NF- $\kappa$ B 抑制剂 (BAY11-7082) 抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 EMT 倒置显微镜下观察发现, TNF- $\alpha$  处理组的细胞呈类圆或仿锤体状的间质表型, 细胞间排

列疏松, 而 NF- $\kappa$ B 抑制剂 (BAY11-7082) + TNF- $\alpha$  处理组的细胞均发生了不同程度的改变, 细胞呈多角形的上皮表型, 细胞间排列紧密 (图 4A)。RT-

PCR及蛋白质印迹分析结果显示,与TNF- $\alpha$ 处理组比较,NF- $\kappa$ B抑制剂+TNF- $\alpha$ 处理组细胞中E-cadherin与 $\beta$ -catenin明显上调,而Vimentin、Twist及N-cadherin明显下调( $P < 0.05$ ,图4B、4C)。结果

表明,NF- $\kappa$ B抑制剂(BAY11-7082)可显著抑制TNF- $\alpha$ 诱导的Hep3B和SMMC-7721细胞发生EMT。

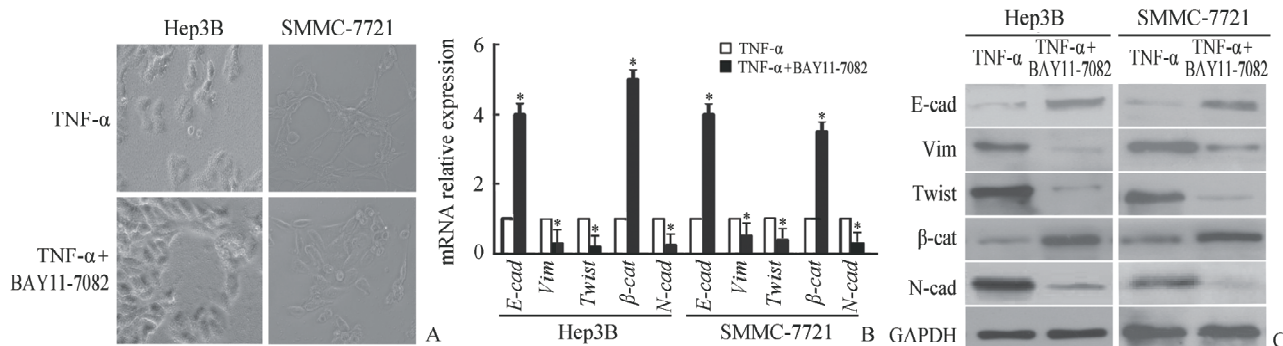


图4 BAY11-7082抑制TNF- $\alpha$ 诱导的EMT

Fig 4 EMT induced by TNF- $\alpha$  could be inhibited by BAY11-7082

EMT: Epithelial-mesenchymal transition; E-cad: E-cadherin; Vim: Vimentin;  $\beta$ -cat:  $\beta$ -catenin; N-cad: N-cadherin. A: Morphological changes in Hep3B and SMMC-7721 cells treated with TNF- $\alpha$  in absence or presence of BAY11-7082 for 24 h. Original magnification:  $\times 200$ ; B: mRNA expression of *E-cad*, *Vim*, *Twist*,  *$\beta$ cat* and *N-cad* was detected by RT-PCR ( $* P < 0.05$  vs TNF- $\alpha$  group;  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ ); C: Protein expression of E-cad, Vim, Twist,  $\beta$ -cat and N-cad was detected by Western blotting analysis

### 3 讨论

众所周知,TNF- $\alpha$ 是一种具有广泛生物学活性的细胞因子,其主要由单核细胞和巨噬细胞产生。TNF- $\alpha$ 通过形成天然的同源三聚体发挥生物学效应,它在杀伤和抑制肿瘤细胞、自身免疫病的病理损伤、促进免疫细胞的分化和功能的发挥以及促进细胞增殖等方面发挥重要作用。近年来众多研究表明TNF- $\alpha$ 不仅在多种肿瘤中(包括卵巢癌、人类黑色素瘤等)具有促进肿瘤浸润、侵袭和转移的作用<sup>[5-6]</sup>,而且在某些肿瘤如肾癌、结肠癌及乳腺癌等肿瘤中可以促进EMT的发生<sup>[7-9]</sup>,但TNF- $\alpha$ 对肝癌EMT的影响尚不清楚。本研究发现,肝癌细胞Hep3B及SMMC-7721应用TNF- $\alpha$ 处理后,EMT的表型增强,同时细胞的侵袭能力也相应增加。说明TNF- $\alpha$ 能够促进人肝癌细胞发生EMT及增强其侵袭能力,但是具体机制尚不明确。

NF- $\kappa$ B是一类功能广泛的核转录调控元件,起初被认为是机体应对病原体 and 病毒的调节因子,后来发现NF- $\kappa$ B在人类肿瘤中是激活的,而且可以通过调控其靶基因的表达进而促进肿瘤形成<sup>[10]</sup>。细胞处于静息状态时,NF- $\kappa$ B与它的抑制因子I $\kappa$ B结合在一起,以无活性的形式存在于细胞质中,当细

胞受到外界刺激时,与NF- $\kappa$ B结合的I $\kappa$ B $\alpha$ 发生磷酸化而被解离,NF- $\kappa$ B被释放出来进入细胞核内,在核内,NF- $\kappa$ B与靶基因的顺式调节元件 $\kappa$ B位点结合,并调节这些基因的转录<sup>[11-14]</sup>。NF- $\kappa$ B与相应基因的启动子结合后,可以促进多种基因的表达,其中包括促进EMT相关基因的表达<sup>[15-16]</sup>。有文献报道NF- $\kappa$ B可以通过蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)上调Snail表达而促进肿瘤EMT的发生,另外,NF- $\kappa$ B还可以通过抑制E-cadherin蛋白表达并上调ZEB1、ZEB2因子而促进肿瘤EMT的发生<sup>[17]</sup>。本实验中,TNF- $\alpha$ 处理Hep3B及SMMC-7721细胞24 h后,NF- $\kappa$ B p65活性上调并且I $\kappa$ B $\alpha$ 表达下调,说明外源性TNF- $\alpha$ 可以显著增强NF- $\kappa$ B p65活性和I $\kappa$ B $\alpha$ 的降解。提示TNF- $\alpha$ 可能通过NF- $\kappa$ B信号转导通路诱导EMT的发生。为了进一步验证,我们随后用NF- $\kappa$ B抑制剂BAY11-7082处理细胞,结果显示TNF- $\alpha$ 诱导人肝癌细胞发生EMT的作用明显被抑制,由此我们推测TNF- $\alpha$ 可能通过激活NF- $\kappa$ B信号转导通路从而促进Hep3B及SMMC-7721细胞发生EMT,同时显著增强肿瘤细胞的侵袭能力,其具体机制有待进一步研究。

本研究证实了TNF- $\alpha$ 促进肝癌细胞株Hep3B及SMMC-7721发生EMT,同时增强肝癌细胞的侵

袭能力,为肝癌侵袭、转移的预防及治疗提供了新的理论依据。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Bates R C, DeLeo M J 3rd, Mercurio A M. The epithelial-mesenchymal transition of colon carcinoma involves expression of IL-8 and CXCR-1-mediated chemotaxis [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 299: 315-324.
- [2] Dong R, Wang Q, He X L, Chu Y K, Lu J G, Ma Q J. Role of nuclear factor kappa B and reactive oxygen species in the tumor necrosis factor-alpha-induced epithelial-mesenchymal transition of MCF-7 cells [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2007, 40: 1071-1078.
- [3] Ho M Y, Tang S J, Chuang M J, Cha T L, Li J Y, Sun G H, et al. TNF- $\alpha$  induces epithelial-mesenchymal transition of renal cell carcinoma cells via a GSK3 $\beta$ -dependent mechanism [J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10: 1109-1119.
- [4] Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 442-454.
- [5] Kulbe H, Thompson R, Wilson J L, Robinson S, Hagemann T, Fatah R, et al. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 585-592.
- [6] Zhu N, Lalla R, Eves P, Brown T L, King A, Kemp E H, et al. Melanoma cell migration is upregulated by tumour necrosis factor-alpha and suppressed by alpha-melanocyte-stimulating hormone [J]. *Br J Cancer*, 2004, 90: 1457-1463.
- [7] Chuang M J, Sun K H, Tang S J, Deng M W, Wu Y H, Sung J S, et al. Tumor-derived tumor necrosis factor-alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99: 905-913.
- [8] Rivas M A, Carnevale R P, Proietti C J, Rosembli C, Beguelin W, Salatino M, et al. TNF alpha acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF-kappa B-dependent pathways [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314: 509-529.
- [9] Wu S T, Sun G H, Hsu C Y, Huang C S, Wu Y H, Wang H H, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces epithelial-mesenchymal transition of renal cell carcinoma cells via a nuclear factor kappa B-independent mechanism [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011, 236: 1022-1029.
- [10] Wu C S, Chen M F, Lee I L, Tung S Y. Predictive role of nuclear factor-kappaB activity in gastric cancer: a promising adjuvant approach with caffeic acid phenethyl ester [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2007, 41: 894-900.
- [11] Liu Z G, Hsu H, Goeddel D V, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death [J]. *Cell*, 1996, 87: 565-576.
- [12] Yeh W C, Shahinian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, et al. Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice [J]. *Immunity*, 1997, 7: 715-725.
- [13] Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra N H, Winoto A. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1 [J]. *Nature*, 1998, 392: 296-300.
- [14] Kelliher M A, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger B Z, Leder P. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal [J]. *Immunity*, 1998, 8: 297-303.
- [15] Karin M, Greten F R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5: 749-759.
- [16] Luo J L, Kamata H, Karin M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death—a new approach to cancer therapy [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115: 2625-2632.
- [17] Ahmad A, Aboukameel A, Kong D, Wang Z, Sethi S, Chen W, et al. Phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor mediates epithelial-mesenchymal transition regulated by miR-200 in breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2011, 71: 3400-3409.

[本文编辑] 孙岩