

# Rel mRNA 和 NF- B2 mRNA 在人肝细胞癌中的表达及其临床意义

陈远能<sup>1</sup>, 曹 骥<sup>2</sup>, 苏建家<sup>2</sup>, 李 瑗<sup>2</sup>, 朱振宇<sup>3</sup>

( 1. 广西医科大学附属第一医院消化内科 广西南宁 520021; 2. 广西医科大学附属肿瘤医院实验研究部, 广西南宁 520021; 3. 中山大学中山医学院生化教研室, 广东 广州 510080 )

**摘 要:** 【目的】探讨 Rel 及 NF- B2 的 mRNA 在人肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC) 组织中的表达及其临床意义。【方法】用逆转录聚合酶链反应检测 55 例 HCC 患者癌组织及癌旁肝组织中 Rel mRNA 和 NF- B2 mRNA 的表达情况。【结果】Rel mRNA 及 NF- B2 mRNA 在肝癌组织中的表达水平均明显低于其癌旁组织(分别为  $0.315 \pm 0.142$  对  $0.505 \pm 0.225$ ;  $0.273 \pm 0.141$  对  $0.491 \pm 0.242$ , 均  $P < 0.05$ )。这两种因子在肝癌组织中的表达水平与临床分期及肝外转移明显有关, 而与门静脉癌栓、术后复发、肿瘤数目、肿瘤直径及血清 AFP 水平等无明显关系。【结论】提示 Rel、NF- B2 可能与肝癌的发生、发展有关。

关键词: Rel mRNA; NF- B2 mRNA; 肝细胞癌

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

文章编号: 1672- 3554(2006)06- 0677- 04

## Expression and Significance of Rel mRNA and NF- B2 mRNA in Hepatocellular Carcinoma

CHEN Yuan-neng<sup>1</sup>, CAO Ji<sup>2</sup>, SU Jian-jia<sup>2</sup>, LI Yuan<sup>2</sup>, ZHU Zhen-yu<sup>3</sup>

(1. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Department of Experimental Research, The Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3. Department of Biochemistry, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】The aims of the present study were to explore the expression of the Rel mRNA and NF- B2 mRNA in human hepatocellular carcinoma (HCC) and their clinical significance. 【Methods】Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was employed to determine the expression of Rel mRNA and NF- B2 mRNA in 55 cases of HCC and their adjacent liver tissues. 【Results】The expression level of Rel mRNA and NF- B2 mRNA in the HCC tissues were significantly lower than that in the adjacent liver tissues ( $0.315 \pm 0.142$  vs  $0.505 \pm 0.225$  and  $0.273 \pm 0.141$  vs  $0.491 \pm 0.242$ , respectively,  $P < 0.05$ ). The expression level of Rel mRNA and NF- B2 mRNA in the HCC tissue were significantly correlated with the clinical stage and the presence of extrahepatic metastasis, but not correlated with the tumor thrombus of portal vein, the tumor recurrence, the number of tumor focus, the tumor diameter and the level of serum alpha-fetoprotein (AFP). 【Conclusion】The results suggest that NF- B2 and Rel may be involved in the development of HCC.

Keywords: NF- B2 mRNA; Rel mRNA; hepatocellular carcinoma

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(6):677- 680]

核因子 B(nuclear factor B, NF- B) 作为一种转录刺激因子, 最初是在 1986 年由 Sen 和 Baltimore<sup>[1]</sup>首先报道的。NF- B 可因一些细胞因子、氧化剂、蛋白激酶、脂多糖等的刺激而激活, 而活化的 NF- B 又可诱导细胞因子、趋化因子、免

疫因子受体和转录因子等多种物质的表达。因此在炎症反应、肿瘤及血液性疾病等的病理生理过程中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。NF- B/Rel 家族有 5 种不同的 NF- B/Rel 蛋白; P65(RelA)、P50(NF- B1)、P52(NF- B2)、C-rel(Rel) 和 RelB<sup>[3]</sup>。有研究表明 NF-

收稿日期: 2006-05-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39860072); 广西壮族自治区回国人员自然科学基金资助项目(199817137)

作者简介: 陈远能(1964-), 男, 广西平南人, 副教授, 硕士生导师; 苏建家, 通讯作者。Email: jianjiasu2002@yahoo.com

B 信号转导途径与多种肿瘤发生密切相关<sup>[4-6]</sup>,但在 mRNA 水平上研究 Rel 及 NF- $\kappa$ B 基因与肝癌关系目前鲜见报道。为此本文应用 RT-PCR 方法检测肝癌患者癌组织及癌旁组织中 Rel-mRNA 和 NF- $\kappa$ B2-mRNA 的表达情况,并探讨两者与肝癌发生发展、复发转移等方面的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

选择我院 1999 年 7 月至 2002 年 7 月手术切除并经病理证实的 HCC 55 例(男 43 例、女 12 例),年龄 22~68 岁,中位年龄 45 岁。患者术前均未进行任何抗癌治疗。每例均取癌及相应癌旁肝组织(距离癌边缘 2 cm 以上),将新鲜组织置液氮速冻后存于 -80℃ 冰箱备用。随访 1 年期间,出现术后复发共 15 例。

### 1.2 试剂与仪器

TRIzol 总 RNA 提取液为美国 GIBCOBRL 公司产品;逆转录试剂盒及 DNA 聚合酶均为立陶宛 MBI 公司产品。

### 1.3 引物

引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。Rel mRNA 上游引物 5'-tca tcc tca tga ttt agt tgg a-3',下游引物 5'-tcc tta att ctg cag tat ttg g-3'。NF- $\kappa$ B2 mRNA 上游引物 5'-tgc cca cag tct ggt ggg caa g-3',下游引物 5'-cct cat aga acc gaa cct caa tg-3'。内参照基因  $\beta$ -actin mRNA 上游引物 5'-aac tcc atc atg aag tgt ga-3',下游引物 5'-act cct gct tgc tga tcc ac-3'。

### 1.4 方法

1.4.1 总 RNA 抽提 按试剂说明书操作。

1.4.2 逆转录反应 按试剂说明书操作。取约 3  $\mu$ g RNA,加 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L Oligo (dT)<sub>18</sub> 1.0  $\mu$ L,加 DEPC 处理水至 12  $\mu$ L,70℃ 水浴 5 min,立即冰浴,然后加 5 $\times$ Reaction buffer 4.0  $\mu$ L,10 mmol/L dNTPs 2.0  $\mu$ L,200 U/ $\mu$ L 逆转录酶 1.0  $\mu$ L,20 U/ $\mu$ L RNA 酶抑制剂 1.0  $\mu$ L,混匀后 42℃ 水浴 1 h,70℃ 10 min,合成 cDNA 第一链。

1.4.3 PCR 反应 25  $\mu$ L 反应总体积,取 cDNA 约 0.1  $\mu$ g,加 10 $\times$ PCR buffer 2.5  $\mu$ L,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5  $\mu$ L,10 mmol/L dNTP 0.5  $\mu$ L,5 U/ $\mu$ L

DNA 聚合酶 0.2  $\mu$ L,Rel(或 NF- $\kappa$ B) mRNA 及  $\beta$ -actin mRNA 上下游引物各 0.5  $\mu$ L,加灭菌水至 25  $\mu$ L。反应条件:95℃ 5 min 预变性;95℃ 45 s,55℃ 45 s,72℃ 45 s,35 个循环;72℃ 10 min 末延伸。Rel、NF- $\kappa$ B 及  $\beta$ -actin 的 PCR 产物大小分别为 341 bp、479 bp、及 247 bp。

1.4.4 PCR 产物鉴定 取 PCR 扩增产物 10  $\mu$ L,上样于 17 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/mL 溴乙锭),100 V 电压电泳 45 min,然后将凝胶放入凝胶电泳成像系统仪,在紫外光下自显影,经计算机扫描成像来判定结果。用目的基因/内参照基因两电泳条带的单位面积内的灰度比值来反映目的基因的相对表达水平。目的基因相对表达水平=(目的基因灰度值-背景灰度值)/(内参照基因灰度值-背景灰度值)

### 1.5 统计学分析

资料数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较用 t 检验。应用 SPSS10.0 软件进行分析,检验水准 = 0.05。

## 2 结果

### 2.1 Rel mRNA 及 NF- $\kappa$ B2 mRNA 的表达

Rel mRNA 及 NF- $\kappa$ B2 mRNA 在肝癌组织中的表达水平均明显低于其癌旁组织,分别为 0.315  $\pm$  0.142 对 0.505  $\pm$  0.225 及 0.273  $\pm$  0.141 对 0.491  $\pm$  0.242,均 P < 0.05)。见图 1,2。

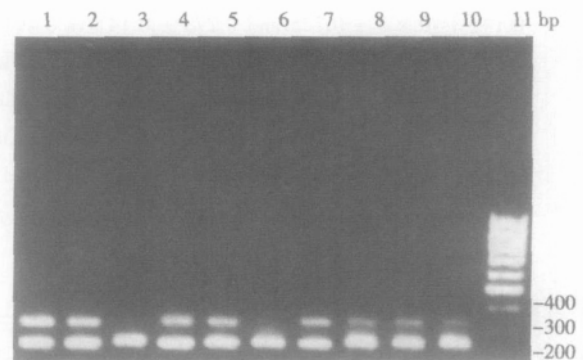


图 1 肝癌组织及其癌旁组织中 Rel mRNA 的电泳

Fig.1 Electrophoregram of Rel mRNA of human hepatocellular carcinoma tissues and adjacent non-cancerous liver tissues

Lane 1, 3, 5, 7, 9: HCC tissues; Lane 2, 4, 6, 8, 10: adjacent non-cancerous liver tissues; Lane 11: DNA marker; Rel: 341 bp;  $\beta$ -actin: 247 bp

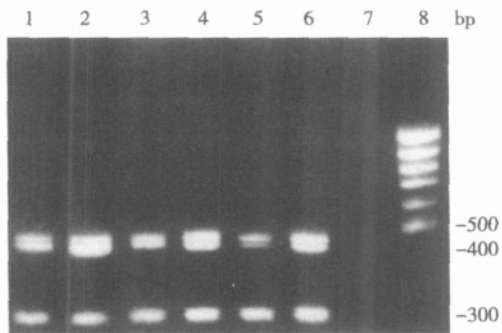


图 2 肝癌组织及其癌旁组织中 NF- B2-mRNA 的电泳图  
Fig.2 Electrophoregram of NF- B2-mRNA of human hepatocellular carcinoma tissues and adjacent non-cancerous liver tissues

Lane 1, 3, 5: hepatocellular carcinoma tissues; Lane 2, 4, 6: adjacent non-cancerous liver tissue; Lane 7: blank control; Lane 8: DNA marker; NF- B2: 479 bp;  $\beta$ -actin: 247 bp

## 2.2 Rel mRNA 及 NF- B2 mRNA 表达水平与临床参数的关系

由表 1 可见, Rel mRNA 及 NF- B2 mRNA 在肝癌组织中的表达水平与临床分期及肝外转移明显有关, 而与门静脉癌栓、术后复发、肿瘤数目、肿

瘤直径及血清 AFP 水平等无明显关系。

## 3 讨 论

NF- B 通常是与其抑制物 I $\kappa$ B 聚合的三聚体形式存在于胞浆中, 处于非活化状态。在多种因素如细胞因子、病毒、氧化剂、异种抗原及紫外线照射等 NF- B 活化信号的刺激下, 通过不同的信号转导途径, 激活 NF- B 诱导激酶 (NF- B inducing kinase, NIK), 或活化途径中的其他激酶, 使 I $\kappa$ B 发生降解, 从而使 NF- B 发挥调控作用。受 NF- B 调节转录的基因非常多, 主要包括与炎症反应和免疫应答相关的基因。此外 NF- B 还能促进干扰素基因的表达从而发挥其抗病毒的功能。在大部分类型的细胞中, NF- B 的激活能使细胞抗凋亡, 但在少数特定类型的细胞中 NF- B 的激活却能促进凋亡<sup>[7]</sup>。

有研究表明 Rel/NF- B 信号转导途径与肺癌、乳腺癌、结肠癌、恶性黑色素瘤、骨髓瘤及淋巴瘤等<sup>[4-6, 8-10]</sup>肿瘤发生密切相关, 该转导途径主要是

表 1 Rel mRNA 及 NF- B2 mRNA 在肝癌组织中表达水平与临床参数的关系

Tabel 1 Relationship between Expression of Rel mRNA and NF- B2 mRNA in Hepatocellular Carcinoma Tissues and Various Clinical Parameters

	n	Rel mRNA	P	NF- B2 mRNA	P
Clinical Stage					
I - II	37	0.25 $\pm$ 0.12		0.25 $\pm$ 0.11	
III	18	0.35 $\pm$ 0.15	<0.05	0.36 $\pm$ 0.13	<0.01
Portal vein thrombosis					
Present	12	0.31 $\pm$ 0.14		0.29 $\pm$ 0.09	
Absent	43	0.32 $\pm$ 0.16	>0.05	0.28 $\pm$ 0.14	>0.05
Extrahepatic metastasis					
Present	9	0.36 $\pm$ 0.15		0.36 $\pm$ 0.15	
Absent	46	0.21 $\pm$ 0.11	<0.01	0.25 $\pm$ 0.13	<0.05
Recurrence					
Present	15	0.27 $\pm$ 0.13		0.30 $\pm$ 0.16	
Absent	40	0.34 $\pm$ 0.16	>0.05	0.28 $\pm$ 0.14	>0.05
Tumor size					
$\geq$ 5 cm	29	0.33 $\pm$ 0.16		0.33 $\pm$ 0.16	
< 5 cm	26	0.31 $\pm$ 0.14	>0.05	0.26 $\pm$ 0.14	>0.05
Tumor foci					
n = 1	43	0.30 $\pm$ 0.14		0.29 $\pm$ 0.14	
n = 2	12	0.38 $\pm$ 0.20	>0.05	0.22 $\pm$ 0.11	>0.05
Serum AFP level					
$\geq$ 400 $\mu$ g/L	31	0.32 $\pm$ 0.19		0.24 $\pm$ 0.12	
< 400 $\mu$ g/L	24	0.32 $\pm$ 0.15	>0.05	0.24 $\pm$ 0.12	>0.05

通过对相关基因的转录调控,推进细胞周期演进并抑制凋亡,从而在细胞癌变过程中发挥重要作用。而本研究发现 Rel- mRNA 和 NF- B2- mRNA 在肝癌组织中的表达水平均明显低于癌旁组织,提示 Rel/NF- B 在肝细胞癌致癌过程中,其机制可能有别于其他肿瘤。推测由于 C- rel、NF- B2 表达下降导致肝细胞凋亡减少,肝细胞生长活跃过渡,从而导致或参与肝癌的形成。有报道 Rel/ NF- B 转录因子对 B 细胞和 T 细胞的发育以及免疫系统的功能起重要作用,缺乏 Rel/NF- B 转录因子则会导致 T 细胞和 B 细胞的发育受阻和免疫系统功能受损<sup>[11]</sup>。本实验中,C- rel 和 NF- B2 基因在肝癌组织中表达下降,导致其免疫系统功能受损,肿瘤细胞逃脱免疫监视可能是导致肿瘤发生的因素之一。

本研究中,在临床 期及发生肝外转移的患者,其 Rel 和 NF- B2 的 mRNA 表达水平均明显高于 ~ 期及无肝外转移的患者;这说明随着肿瘤的发展,Rel 和 NF- B2 的表达有上升的趋势;而恶性肿瘤细胞与内皮细胞的相互作用是恶性肿瘤细胞沿血管发生远处组织器官转移或沿淋巴管发生淋巴转移的先决条件,由于 E- selectin、ICAM- 1、VCAM- 1 等细胞粘附分子在恶性肿瘤细胞与内皮细胞相互作用中起决定性作用,而这些粘附分子的表达又取决于 NF- B 因子的活化,所以当 Rel 和 NF- B2 的表达增加时,将促进肿瘤发生转移。本研究中 Rel- mRNA 及 NF- B- 2 mRNA 在肝癌组织中的表达水平与肝外转移明显有关,而与门静脉癌栓无明显关系。这表明肿瘤发生转移和癌栓形成是个多步骤、多因素、多阶段的复杂过程,两者发生的机理可能不尽相同,有待进一步研究。

发现通过上调 NF- B 或者下调 NF- B 的抑制因子 I B 都可以抑制肝癌细胞株 SMMC 7721 生长,联合使用阿霉素时效果更明显,从而证明了肝癌细胞的生长与 NF- B 有密切的关系,为肝癌基因治疗开辟了一条新的路线<sup>[12]</sup>。但另有学者则发现阻断 NF- B 的抑制因子却反而促进肿瘤细胞生长<sup>[13]</sup>。这说明 NF- B 与肿瘤的关系很复杂,即可以促进也可以抑制肿瘤的发展,在不同的阶段可能发挥不同的作用。NF- B 活化在肿瘤治疗中的作用是一把双刃剑,仍需进一步探讨。

#### 参考文献:

[1] SEN R, BALTIMORE D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf- kappa B

by a posttranslational mechanism [J]. Cell, 1986, 47(6): 921- 928.

- [2] PORCILE C, PICCIOLI P, STANZIONE S, et al. Proteasome inhibitors induce cerebellar granule cell death: inhibition of nuclear factor- kB activation [J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 973(1): 402- 413.
- [3] HIDEHIMA T, CHAUHAN D, RICHARDSON P, et al. NF- kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma [J]. J Biol Chem, 2002, 277(19): 16639- 16647.
- [4] CHEN G, BHOJANI M S, HEAFORD A C, et al. Phosphorylated FADD induces NF- kappaB, perturbs cell cycle, and is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(35): 12507- 12512.
- [5] ZHU Y, SINGH B, HEWITT S, et al. Expression patterns among interferon regulatory factor- 1, human X- box binding protein -1, nuclear factor kappa B, nucleophosmin, estrogen receptor - alpha and progesterone receptor proteins in breast cancer tissue microarrays [J]. Int J Oncol, 2006, 28(1): 67- 76.
- [6] GRETEN F R, ECKMANN L, GRETEN T F, et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis- associated cancer [J]. Cell, 2004, 118(3): 285- 296.
- [7] 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(10): 2625- 2632.
- [8] UEDA Y, RICHMOND A. NF- kappaB activation in melanoma [J]. Pigment Cell Res, 2006, 19 (2): 112- 124.
- [9] FEINMAN R, SIEGEL D S, BERENSON J. Regulation of NF- kB in multiple myeloma: therapeutic implications [J]. Clin Adv Hematol Oncol, 2004, 2(3):162- 166.
- [10] FARINHA P, GASCOYNE R D. Molecular pathogenesis of mucosa- associated lymphoid tissue lymphoma [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(26): 6370- 6378.
- [11] GERONDAKIS S, GRUMONT R, ROURKE I, et al. The regulation and roles of Rel/NF- B transcription factors during lymphocyte activation [J]. Curr Opin Immunol, 1998, 10(3): 353- 359.
- [12] WANG J, HUANG Q, CHEN M. The role of NF- kappaB in hepatocellular carcinoma cell [J]. Chin Med J (Engl), 2003, 116(5):747- 752.
- [13] PIKARSKY E, BEN - NERIAH Y. NF - kappaB inhibition: A double- edged sword in cancer?[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(6): 779- 784.

(编辑 黄小延)