恶性肿瘤实验室研究专题·论著　DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.15.001

肿瘤坏死因子-α诱导对膀胱癌细胞株 NF-κB 信号通路分子表达及细胞增殖水平的影响*

路　蔓[1],付　强[2],张　静[1△]

空军军医大学第二附属医院:1.检验科;2.泌尿外科,陕西西安 710038

摘　要:目的　探讨肿瘤坏死因子-α(TNF-α)诱导对膀胱癌细胞株细胞核因子-κB(NF-κB)通路分子表达及细胞增殖水平的影响,为临床提供参考,以提高膀胱癌的治疗水平。**方法**　选取膀胱癌细胞株 T24、5637 作为研究对象,根据处理的情况分为对照组和 TNF-α 处理组,其中对照组未采用 TNF-α 处理,TNF-α 组经 TNF-α 处理,比较 TNF-α 处理对不同膀胱癌细胞株 RelA、RelB 基因的表达情况及膀胱癌细胞增殖活性的影响。**结果**　TNF-α 处理 T24 细胞株后,TNF-α 处理组的 RelA、RelB 基因表达均高于对照组($P<0.05$);TNF-α 处理 5637 细胞株后,RelA 基因表达水平在作用 3 h 后明显上升($P<0.05$),但是 RelB 基因表达水平与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。对照组、TNF-α 处理组 T24 和 5367 细胞株的存活率相比,差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论**　TNF-α 可诱导膀胱癌细胞 NF-κB 信号通路 RelA、RelB 基因的表达,对于细胞增殖的活性尽管有一定的影响,但是不明显。

关键词:膀胱癌;　肿瘤坏死因子-α;　核因子-κB;　细胞增殖

中图法分类号:R737.14　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1672-9455(2021)15-2145-04

Effects of tumor necrosis factor-α induction on molecular expression of NF-κB signaling pathway and cell proliferation level in bladder cancer cell lines*

LU Man[1], *FU Qiang*[2], *ZHANG Jing*[1△]

1. *Department of Clinical Laboratory*; 2. *Department of Urological Surgery*, *Second Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University*, *Xi'an*, *Shaanxi* 710038, *China*

Abstract: Objective　To investigate the effect of tumor necrosis factor-α (TNF-α) induction on the molecular expression of nuclear factor-κB (NF-κB) pathway and cell proliferation level in bladder cancer cell lines so as to provide reference for clinic and improve the treatment level of bladder cancer. **Methods**　Bladder cancer cell lines T24 and 5637 were selected as the research objects and divided into the control group and TNF-α treatment group according to the treatment conditions. The control group was not treated with TNF-α, and the TNF-α group was treated with TNF-α. The effects of TNF-α treatment on the expression levels of RelA and RelB in different bladder cancer cell lines and the cell proliferation activities were compared between the two groups. **Results**　After TNF-α treatment in T24 cell lines, the levels of RelA and RelB gene expression in the TNF-α treatment group were higher than those in the control group ($P<0.05$). After TNF-α treatment in 5637 cell lines, the RelA gene level after 3 h of treatment was significantly increased ($P<0.05$), but the RelB gene level had no statistically significant difference compared with that in the control group ($P>0.05$). There was no statistically significant difference in the survival rate of T24 and 5367 cell lines between the control group and TNF-α treatment group ($P>0.05$). **Conclusion**　TNF-α can induce the expression of the RelA and RelB genes in the NF-κB signaling pathway of bladder cancer cells, although which has a certain influence on the cellular proliferation activity, but which is unobvious.

Key words: bladder cancer;　tumor necrosis factor-α;　nuclear factor-κB;　cell proliferation

---

*　**基金项目:**陕西省重点研发计划一般项目-社会发展领域(S2020-YF-YBSF-0590)。

作者简介:路蔓,女,主管技师,主要从事医学免疫、医学检验方面的研究。　△　**通信作者**,E-mail:49081285@qq.com。

本文引用格式:路蔓,付强,张静.肿瘤坏死因子-α诱导对膀胱癌细胞株 NF-κB 信号通路分子表达及细胞增殖水平的影响[J].检验医学与临床,2021,18(15):2145-2147.

目前,越来越多的研究证实,恶性肿瘤的发生与炎症密切相关[1]。膀胱癌患者普遍存在炎性反应,肿瘤坏死因子-α(TNF-α)是一种常见的炎性反应指标,有研究表明 TNF-α 水平与恶性肿瘤的进展相关[2]。有研究发现,在肝细胞肝癌、前列腺癌、膀胱癌等恶性肿瘤中,核因子-κB(NF-κB)信号通路存在异常激活的现象,并且该因子直接影响着炎症与癌症的关系[3]。本研究拟了解 TNF-α 诱导对膀胱癌细胞 NF-κB 通路分子表达及细胞增殖水平的影响,现报道如下。

1　材料与方法

1.1　材料　人膀胱癌细胞 2 株,即 T24 和 5637,均统一由中科院广州研究所提供。

1.2　仪器与试剂　酶标仪(Bio-Rad 680,美国伯乐公司);实时荧光 PCR 仪(ABI 7500,德国 Eppendorf 公司);RPMI 1640 培养基(批号:8114641,上海信帆生物科研所);胎牛血清(批号:56H4627,上海江林生物科技有限公司);重组人 TNF-α 试剂(批号:CYT-233-a,默克生命科学);CCK-8 试剂盒(批号:WZ736,上海酶联生物科技有限公司)。

1.3　方法

1.3.1　培养并处理膀胱癌细胞　选取人膀胱癌细胞株 T24 和 5637,采用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基进行培养,在 37.5 ℃、5%二氧化碳(CO_2)条件下培养至对数生长期。观察培养的情况,待以一定浓度铺板生长后,对 T24 和 5637 进行处理。需要注意的是,在处理之前必须要同步化处理,具体操作要求为使用无胎牛血清培养液进行饥饿处理。根据不同的处理方法,分为两组,TNF-α 处理组采用 50 ng/mL TNF-α 处理,对照组采用同等体积的磷酸盐缓冲液(PBS)处理。

1.3.2　实时荧光定量 PCR 检测　将对数生长期的细胞株,以(2～3)×10^7/mL 的水平接种于 24 孔板中,同步化处理之后,将细胞分成 3 个不同的组,每组设置 3 个复孔,且独立重复 3 次。采用 TNF-α 分别作用 1、3、6 h,然后进行细胞的收集。提取细胞总 RNA 的方法为 Trizol 法,反转录合成 cDNA 备用。实时荧光定量 PCR 反应体系参照文献[4]操作进行。各基因的检测结果按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。

1.3.3　癌细胞增殖活性的检测　采用 CCK-8 法对膀胱癌细胞(T24、5637)的增殖活性进行检测:取对数生长期的细胞,以(1～2)×10^7/L 的水平将其接种于细胞培养液(96 孔)中,使用含 10%胎牛血清的 1640 培养液进行常规培养,持续 24 h。同步化处理:处理完成之后,设置 TNF-α 处理组和对照组,每孔设置 5 个复孔,独立重复 5 次。处理 24 h,检测膀胱癌细胞的增殖活性,检测时严格参照 CCK-8 试剂盒要求和说明进行操作。需要注意的是,为提高检测的质量,在检测前应更换培养液,每孔加入 100 μL 培养液和 10 μL 的 CCK-8 试剂,继续培养 2 h。采用酶标仪对 450 nm 波长处各孔的吸光度进行检测,并计算细胞存活率。按照以下方法计算细胞存活率:细胞存活率=($A_{处理组}$ − $A_{空白对照组}$)/($A_{阴性对照组}$ − $A_{空白对照组}$)×100%。

1.4　观察指标　分析 TNF-α 处理对不同膀胱癌细胞株 NF-κB 信号通路中 RelA、RelB 两种基因表达的影响。比较 TNF-α 处理对不同膀胱癌细胞株细胞增殖能力的影响。

1.5　统计学处理　采用 SPSS23.0 软件处理,计量资料以 $\overline{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　TNF-α 对膀胱癌 T24 细胞株 NF-κB 信号通路的影响　TNF-α 处理 T24 细胞株后,TNF-α 处理组的 RelA、RelB 基因表达水平均高于对照组($P<0.05$),且 TNF-α 处理后,不同时间 RelA、RelB 基因表达水平比较差异有统计学意义($P<0.05$),随着时间的延长基因表达水平不断上升。见表 1。

2.2　TNF-α 对膀胱癌 5637 细胞株 NF-κB 信号通路的影响　TNF-α 处理 5637 细胞株后,RelA 基因表达水平在作用 3 h 后明显上升,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$),但是 RelB 基因表达水平与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 1　TNF-α 对膀胱癌 T24 细胞株 NF-κB 信号通路的影响($\overline{x} \pm s$)

组别	RelA			RelB		
	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h
对照组	1.00±0.02	1.00±0.02	1.00±0.02	1.00±0.02	1.00±0.02	1.00±0.02
TNF-α 处理组	1.25±0.05	1.50±0.10	1.85±0.12	1.18±0.04	1.40±0.12	1.69±0.15
t	6.565	6.934	6.934	3.162	4.650	3.430
P	0.022	0.020	0.020	0.037	0.043	0.046

2.3　TNF-α处理对不同膀胱癌细胞株增殖活性的影响　膀胱癌细胞株 T24 和 5367 经 TNF-α处理后,对照组、TNF-α处理组的细胞存活率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 2　TNF-α对膀胱癌 5637 细胞株 NF-κB 信号通路的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	RelA			RelB		
	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h
对照组	1.00±0.02	1.00±0.02	1.00±0.02	1.00±0.02	1.00±0.02	1.00±0.02
TNF-α处理组	1.10±0.04	1.40±0.12	1.60±0.15	1.10±0.04	1.15±0.06	0.95±0.01
t	3.162	4.650	3.430	3.162	3.354	3.162
P	0.087	0.043	0.076	0.087	0.079	0.087

表 3　两组不同膀胱癌细胞株细胞存活率的比较($\bar{x}\pm s$,%)

组别	T24 细胞存活率	5637 细胞存活率
对照组	99.01±9.50	99.85±9.61
TNF-α处理组	100.00±10.00	99.13±9.54
t	0.152	0.107
P	0.903	0.918

3　讨　论

根治性膀胱全切除术是膀胱癌治疗的重要手段,科学、合理地制订手术方案,将病灶予以切除,有利于提高患者的生存质量,延长患者的生存期[5]。但是,对于膀胱癌的根治性手术治疗,必须要建立在对该恶性肿瘤全面了解的基础上,以便能够最大限度地提高治疗水平,满足患者的治疗需求。因此,有必要加强对膀胱癌发病机制、原因的分析。

随着临床对膀胱癌研究的不断深入,人们发现炎性反应与其发生、发展密切相关[6]。研究表明,在肿瘤微环境中,经常能够检测到高水平的炎性细胞因子或缺氧现象的存在,而细胞因子和缺氧应激均是 NF-κB 信号通路激活的刺激物,NF-κB 信号是连接炎症与肿瘤的关键通路之一[4,7]。TNF-α是重要的促炎细胞因子,高度参与了相关炎性反应,并且也参与了 NF-κB 信号通路的激活,从而"嫁接"起 NF-κB 信号通路和恶性肿瘤,使二者保持密切联系[8-10]。为此,本研究以膀胱癌细胞株 T24 和 5637 为研究对象,对 TNF-α这一促炎因子对 NF-κB 信号通路的影响展开分析。本研究结果显示,TNF-α处理 T24 细胞株后 RelA 基因的表达水平均有所上调,而 5637 细胞株在处理 3 h 后有明显上升($P<0.05$)。但 RelB 基因的表达与 RelA 基因不同,在 TNF-α作用 1 h 后显著上调,可仅局限于 T24 细胞株,5637 细胞株在各作用时间点均无明显变化($P>0.05$)。进一步分析发现,在 TNF-α作用时间不断延长的情况下,T24 细胞株 RelB 基因的表达上调幅度逐渐下降,这一结果提示 TNF-α对 NF-κB 信号的非经典通路可能存在负反馈调节机制来维持微环境的稳定[2,10-11]。需要注意的是,TNF-α在作用 6 h 后,T24 细胞株的 RelB 基因表达水平上调,5367 细胞株的 RelB 基因表达水平则下调。由此可以看出,TNF-α作用前后的 2 个信号通路基因表达水平改变并不是完全一致,这在很大程度上表明了 TNF-α对 NF-κB 信号的经典和非经典通路的作用机制具有选择性,作用的过程可能不同。分析 TNF-α处理对膀胱癌细胞增殖活性的影响,结果显示无论是作用于 T24 细胞株还是 5367 细胞株,差异均无统计学意义($P>0.05$),因此从这一结果可以认为 TNF-α可能对膀胱癌细胞株的增殖活性无较大影响。

综上所述,TNF-α可诱导膀胱癌细胞 NF-κB 信号通路 RelA、RelB 基因的表达,并且主要作用于早期阶段,但对细胞株增殖活性的影响甚微。

参考文献

[1]　陈楠楠,戴德.慢性炎症在恶性肿瘤中的作用研究进展[J].中国医学创新,2020,17(14):174-177.

[2]　周平,周莲莲,沈默.TNF-α对膀胱癌细胞株 NF-κB 信号通路分子表达及细胞增殖水平的影响[J].中国卫生检验杂志,2016,26(15):2222-2225.

[3]　XU Y,HUO R,CHEN X,et al.Diabetes mellitus and the risk of bladder cancer:A PRISMA-compliant meta-analysis of cohort studies[J].Medicine (Baltimore),2017,96(46):e8588.

[4]　梁涛,房杰群,詹前策.miR-381 通过调控 NF-κB 影响膀胱癌细胞增殖及凋亡[J].广东医科大学学报,2018,10(3):251-255.

[5]　周莲莲,林向阳,沈默.淋巴毒素β受体活化对膀胱癌细胞 NF-κB 信号通路及细胞增殖的影响[J].中华全科医学,2017,15(2):220-223.

[6]　宫雪,于柳,张西岭,等.Rab11 通过 NF-κB 信号通路调控膀胱癌细胞的增殖和侵袭[J].现代肿瘤医学,2018,12(7):1008-1011.

[7]　GONEN-KORKMAZ C,SEVIN G,GOKCE G,et al.Analysis of tumor necrosis factor α-induced(下转第 2151 页)

OPN水平与VEGF均呈正相关,提示在AML的发生和发展中血清sPD-L1、OPN、VEGF有相互促进以及协同作用。VEGF为AML的发生、发展提供合适的环境,促进分泌sPD-L1,血清sPD-L1帮助逃避抗肿瘤免疫,促进了疾病进展,因此sPD-L1与VEGF相互促进[14]。OPN可激活VEGF,且是正反馈的信号通路,可对VEGF抗体的负反馈信号起到拮抗作用。OPN能够上调VEGF,二者协同刺激形成管腔以及促进内皮细胞的迁移,而VEGF可诱导OPN表达,二者协同促进新血管生成,并促进肿瘤的生长以及转移[15]。

综上所述,AML患者血清sPD-L1、OPN、VEGF水平均呈异常高表达,且疗效越差其水平越高,故血清sPD-L1、OPN对疗效具有一定的评估价值。

参考文献

[1] JONGEN-LAVRENCIC M,GROB T,HANEKAMP D,et al. Molecular minimal residual disease in acute myeloid leukemia[J]. N Eng J Med,2018,378(13):1189-1199.

[2] OKUMA Y,WAKUI H,UTSUMI H,et al. Soluble programmed cell death ligand-1 (sPD-L1) as a novel biomarker for nivolumab therapy for non-small cell lung cancer[J]. Clin Lung Cancer,2018,19(5):410-417.

[3] SONG M,WANG H,YE Q. Increased circulating vascular endothelial growth factor in acute myeloid leukemia patients:a systematic review and meta-analysis[J]. Syst Rev,2020,9(1):103-106.

[4] NAKATSUKA Y,SHIBA M,NISHIKAWA H,et al. Acute-phase plasma osteopontin as an independent predictor for poor outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. Mol Neurobiol,2018,55(8):6841-6849.

[5] 黄晓兵,李成龙,王春森,等.异基因造血干细胞移植治疗急性髓系白血病单中心临床疗效分析[J].重庆医学,2018,47(3):302-305.

[6] 宣丽,范志平,张钰,等.索拉非尼联合化疗、供者淋巴细胞输注挽救性治疗FLT3阳性急性髓系白血病异基因造血干细胞移植后复发[J].中华内科杂志,2018,57(5):351-354.

[7] 郑正,夏徐.不同诱导方案对成人急性髓系白血病的应用效果及安全性研究[J].检验医学与临床,2020,17(1):69-72.

[8] 张纯,董航,赵悦荣,等.急性髓系白血病患者血清中sPD-L1、VEGF的表达及意义[J].海南医学院学报,2018,24(4):85-87.

[9] 沈照华,张曦,曾东风,等.骨桥蛋白在急性髓系白血病的表达[J].中国输血杂志,2015,28(11):1314-1315.

[10] 陈文婷,姚红霞,吴从明,等.TGF-β1及VEGF基因在急性髓系白血病患者中的表达水平及其临床预后价值[J].中国实验血液学杂志,2020,28(1):130-135.

[11] 王改锋,张琰,王升,等.急性髓细胞白血病患者联合检测血清VEGF和sPD-L1对疗效及预后评估价值的研究[J].感染·炎症·修复,2019,20(1):41-45.

[12] ABDULRAHMAN N,JASPARD-VINASSA B,FLIEGEL L,et al. Na^+/H^+ exchanger isoform 1-induced osteopontin expression facilitates cardiac hypertrophy through P90 ribosomal S6 kinase[J]. Physiol Genomics,2018,50(5):332-342.

[13] 李宏,何萌,黎亮,等.参芪扶正注射液联合地西他滨对急性髓系白血病患者血清HGF、VEGF与LDH水平的影响[J].现代生物医学进展,2018,18(6):1085-1088.

[14] 吴福群,阴常欣,邓绍团,等.急性髓系白血病患者血清sPD-L1、VEGF表达及相关性[J].中国医药导报,2019,16(20):76-79.

[15] 于韦韦,王海,张捷,等.骨桥蛋白、基质金属蛋白酶2和血管内皮生长因子在胃癌组织中的表达及其预后价值[J].肿瘤研究与临床,2019,31(6):390-394.

(收稿日期:2020-10-12　修回日期:2021-05-14)

(上接第2147页)

and nuclear factor κB-silenced LNCaP prostate cancer cells by RT-qPCR[J]. Exp Ther Med,2014,8(6):1695-1700.

[8] PRASAD S,RAVINDRAN J,AGGARWAL B B. NF-kappaB and cancer:how intimate is this relationship[J]. Mol Cell Biochem,2010,336(1/2):25-37.

[9] CUI X,SHEN D,KONG C,et al. NF-κB suppresses apoptosis and promotes bladder cancer cell proliferation by upregulating survivin expression in vitro and in vivo[J]. Sci Rep,2017,7(8):40723-40728.

[10] 赵旭,王晓寒,广东,等.NF-κB对肺癌细胞生长,细胞周期及肿瘤坏死因子-α分泌的影响[J].中国老年学杂志,2018,38(17):4223-4226.

[11] SUNG M H,BAGAIN L,CHEN Z,et al. Dynamic effect of bortezomib on nuclear factor-B activity and gene expression in tumor cells[J]. Mol Pharmacol,2008,12(6):415-420.

(收稿日期:2020-12-22　修回日期:2021-05-13)