

## 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 通过激活 NF- $\kappa$ B 信号通路 加快肝细胞周期进程\*

杨季云<sup>1)</sup> 张思仲<sup>1)\*\*</sup> 郭红<sup>2)</sup> 曾祥元<sup>3)</sup> 马布仁<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 四川大学华西医院医学遗传研究室, 生物治疗国家重点实验室疾病基因组学研究室, 成都 610041;

<sup>2)</sup> 四川大学生物治疗国家重点实验室基因工程小鼠中心, 成都 610041; <sup>3)</sup> 成都军区总医院临床实验科, 成都 610083)

**摘要** 在慢性炎症部位有易发肿瘤的倾向, 大约有 20% 的恶性肿瘤发生与慢性炎症相关, 肝细胞癌是世界第三大癌症死亡病因, 其患者多数有慢性炎症病史, 当炎症慢性迁延, 肝细胞癌发生率明显增加. 但慢性炎症与肿瘤发生与发展的细胞和分子机制仍然不清楚. 利用人肝细胞株 L-02 细胞, 研究肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 对细胞周期的影响及其机制, 并探讨核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 和 ERK1/2 活化对细胞周期的影响, 以期能更确切地阐明炎症介质 TNF- $\alpha$  在肝细胞癌发生发展中的作用. 发现 TNF- $\alpha$  能促进肝细胞从 G0/G1 期向 S 期转换. 蛋白质印迹检测表明, TNF- $\alpha$  能以剂量依赖方式诱导 cyclin D1 表达, 而对 cyclin E 的表达无明显影响. 同时 TNF- $\alpha$  能激活 NF- $\kappa$ B, ERK1/2, 抑制 NF- $\kappa$ B 活化降低了 TNF- $\alpha$  诱导的 cyclin D1 表达, 导致细胞周期阻滞于 G0/G1 期. 抑制 ERK1/2 活化则对细胞周期和 cyclin D1 表达无显著影响. 结果提示, TNF- $\alpha$  通过活化 NF- $\kappa$ B 信号通路, 诱导 cyclin D1 表达, 加快细胞周期进程, 这可能是促进肿瘤的发生发展重要机制. 针对 TNF- $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B 的治疗可能延长慢性炎症相关性肿瘤的潜伏期和抑制肿瘤的发展.

**关键词** 肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), 胞外信号调节激酶(ERK), 细胞周期, 慢性炎症, 肿瘤发生

**学科分类号** R73

散发肿瘤的病因很难确认, 但是, 致癌物的作用和慢性炎症是肿瘤发生发展的重要基础. 在慢性炎症部位有易发肿瘤的倾向, 大约有 20% 的恶性肿瘤发生与慢性炎症相关<sup>[1]</sup>. 肝细胞癌是世界第三大癌症死亡病因, 其患者多数有慢性炎症病史, 当炎症慢性迁延, 肝细胞癌发生率明显增加<sup>[2]</sup>. 运用抗炎药物可延长晚期肝癌病人生存期<sup>[3]</sup>. 因此, 慢性炎症是肝细胞癌发生和发展的重要因素<sup>[2,4]</sup>. 但炎症与肝细胞癌发生与发展的细胞和分子机制仍然不清楚.

在炎症过程中, 炎症细胞分泌多种炎症因子, 如肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-1、IL-6 和 IL-8 等. 它们通过促进细胞增生, 迁移和血管生成参与组织损伤与修复. 肿瘤坏死因子  $\alpha$  是一种主要由活化的巨噬细胞分泌的多功能炎症因子, 也可由肿瘤细胞产生, 有广泛的生物学功能. 在临床中发现, TNF- $\alpha$  在乳腺癌、前列腺癌, 膀胱癌、结肠癌、肝癌、淋巴瘤和白血病的肿瘤细胞和基质细胞中都有表达, 其阳性的患者预后较差<sup>[4]</sup>. 抑制炎症细胞因子分泌减慢了乳头状瘤的发展. 而腹腔注射 TNF- $\alpha$  则促进乳头状瘤的生

长和肿瘤组织内的血管生成<sup>[5]</sup>. 在化学致癌物诱导的皮肤癌中, TNF- $\alpha$  促进了恶性肿瘤发生, 而敲出 TNF- $\alpha$  及其受体基因的小鼠表现出对化学致癌物的耐受<sup>[6,7]</sup>. 用致癌物处理肝干细胞, 可诱导细胞增生和肿瘤坏死因子分泌, 而敲出了 TNFR I 基因的小鼠肝干细胞增生和肿瘤形成明显降低<sup>[8]</sup>. 因此, 炎症细胞分泌的肿瘤坏死因子可能作为肿瘤促进因子, 参与了肿瘤的发生发展.

在肿瘤的发生发展中, 细胞异常增生是一个重要的特征, 表现为细胞周期调节紊乱. 因此, 本文利用人肝细胞株 L-02 细胞, 观察 TNF- $\alpha$  对细胞周期的影响, 并探讨核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), 胞外信号调节激酶(ERK)1/2 活化对细胞周期的影响, 以期能更确切地阐明炎症介质 TNF- $\alpha$  在肝细胞癌发生发展中的作用.

\*国家重点基础研究发展规划项目(2004CB518805), 国家自然科学基金(30470960, 30371491)资助项目.

\*\*通讯联系人. Tel: 028-85164009, E-mail: szzhang@mcwcums.com

收稿日期: 2006-11-17, 接受日期: 2007-01-17

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

L-02 肝细胞株由成都军区总医院临床实验科提供; 抗 P-ERK1/2、抗 Total ERK1/2、抗 NF- $\kappa$ B p65、抗 cyclin E 兔多克隆抗体和抗 cyclin D1 鼠单克隆抗体购于 SANTA CRUZ 公司; 羊抗兔 IgG 和羊抗鼠 IgG 购于深圳晶美生物技术有限公司; TPCK 和 PD98059 购于 Sigma 公司; RPMI-1640、胎牛血清(FCS)购于 Invitrogen 公司; 重组人 TNF- $\alpha$  购于 R&D 公司; ECL 检测试剂盒购于 Pierce 公司; BCA 蛋白检测试剂盒购于北京百泰克生物技术公司; Envision 检测试剂盒和 DAB 染液购于 DAKO 公司, TransAM NF $\kappa$ B Family Transcription Factor Assay Kit 和 Nuclear Extract Kit 购于 Active Motif 公司。

### 1.2 细胞周期测定

细胞接种于六孔细胞培养板, 细胞贴壁后, 弃去培养基, Hank's 液洗涤 2 次, 无血清培养基培养 24 h 使细胞周期同步化, 换为含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基. 并分成对照组(0 h 和 12 h)、TNF- $\alpha$  组(10  $\mu$ g/L TNF- $\alpha$  培养 12 h)、PD98059 组(20  $\mu$ mol/L 培养 12 h)、TNF- $\alpha$  +PD98059 组(20  $\mu$ mol/L PD98059 预处理 30min, 加入 10  $\mu$ g/L TNF- $\alpha$  培养 12 h)、TPCK 组(20  $\mu$ mol/L TPCK 培养 12 h)、TNF- $\alpha$ +TPCK 组(20  $\mu$ mol/L TPCK 预处理 30 min, 加入 10  $\mu$ g/L TNF- $\alpha$  培养 12 h). 0.25% 胰酶消化, 收集细胞, PBS 洗涤细胞 2 次, 1% 多聚甲醛固定. PBS 洗涤细胞 2 次, 用 PBS 配制  $1 \times 10^6$  /ml 的细胞悬液; 将等体积的细胞悬液和 PI 染液混合, 4 $^{\circ}$ C 避光放置 30 min; 以 488 nm 波长为激发光, 流式细胞仪检测细胞周期分布. 每组 4 个标本。

### 1.3 蛋白质印迹

0.25% 胰酶消化, 收集细胞, 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS (0.01 mol/L pH 7.2~7.3) 洗涤 3 次, 加 200  $\mu$ l RIPA 裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, and 1% NP-40, 5 mg/L leupeptin, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mmol/L NaF), 冰上充分裂解 30 min, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 g 离心 5 min. BCA 试剂盒蛋白质定量, 加入 5 $\times$ 上样缓冲液, 沸水中煮 5 min. 20  $\mu$ g 总蛋白上样, 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 电泳结束后, 于 4 $^{\circ}$ C, 90 V 电压, 2 h 将蛋白转

到 PVDF 膜. 3% BSA 封闭 1 h, 分别加入一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBS-T 洗涤 10 min, 重复 3 次, 加二抗, 室温孵育 1 h, TBS-T 洗涤 10 min, 重复 3 次. 加 ECL, X 光片曝光。

### 1.4 NF- $\kappa$ B 活化的转录因子活性 ELISA 检测

**1.4.1** 细胞核蛋白的提取. 细胞接种于 75  $\text{cm}^2$  培养瓶, 细胞生长至 80% 融合度时用于实验. 先弃去培养基, Hank's 液洗涤 2 次, 分别加入 0、10、20、50 和 100  $\mu$ g/L TNF- $\alpha$  刺激细胞 2 h. a. 弃去培养液, 5 ml PBS(含磷酸酶抑制剂)洗涤 1 次, 加入 10 ml PBS(含磷酸酶抑制剂), 细胞刮收集细胞, 转移到离心管中, 4 $^{\circ}$ C, 500 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 放置于冰上. b. 使用 50  $\mu$ l 裂解缓冲液重悬细胞, 高速涡旋 10 s. c. 重悬液放置在冰上, 摇床 150 r/min 孵育 30 min. d. 高速涡旋 30 s, 4 $^{\circ}$ C, 14 000 g 离心 10 min, 吸取上清转移到离心管, Bradford 法检测蛋白质浓度, 保存于 -80 $^{\circ}$ C, 避免反复冻融。

**1.4.2** ELISA 测定核蛋白中 NF- $\kappa$ B 活性. a. 每孔加入 30  $\mu$ l 结合缓冲液, 再分别加入 20  $\mu$ l 样品(含 10  $\mu$ g 蛋白, 裂解缓冲液稀释), 阳性对照孔加入 5  $\mu$ g Raji 细胞核提取物, 空白对照孔加入 20  $\mu$ l 裂解缓冲液. b. 盖子密封, 室温, 摇床 100 r/min, 孵育 1 h, 200  $\mu$ l 1 $\times$  洗涤缓冲液洗涤 3 次. c. 每孔加 100  $\mu$ l NF- $\kappa$ B 抗体(1:1000), 盖子密封, 室温, 孵育 1 h, 200  $\mu$ l 1 $\times$  洗涤缓冲液洗涤 3 次. d. 每孔加 100  $\mu$ l HRP-IgG (1:1000), 盖子密封, 室温孵育 1 h, 200  $\mu$ l 1 $\times$  洗涤缓冲液洗涤 4 次. e. 每孔加 100  $\mu$ l 显色液(预先复温至室温), 室温避光孵育 5 min. f. 每孔加 100  $\mu$ l 终止液, 450 nm 波长比色. 以所测定的 A 值作为细胞中 NF- $\kappa$ B 活化的指标。

### 1.5 NF- $\kappa$ B 活化的免疫细胞化学检测

细胞生长至 80% 融合度时用于实验. 细胞处理同 1.4. 每组 6 个标本. 免疫细胞化学染色, 检测转录因子 NF- $\kappa$ B 核转位. 操作步骤见试剂说明书。

### 1.6 统计分析

所有数据均采用 SPSS11.0 统计软件进行方差分析和 t 检验. 全部结果用( $\bar{x} \pm s$ )表示。

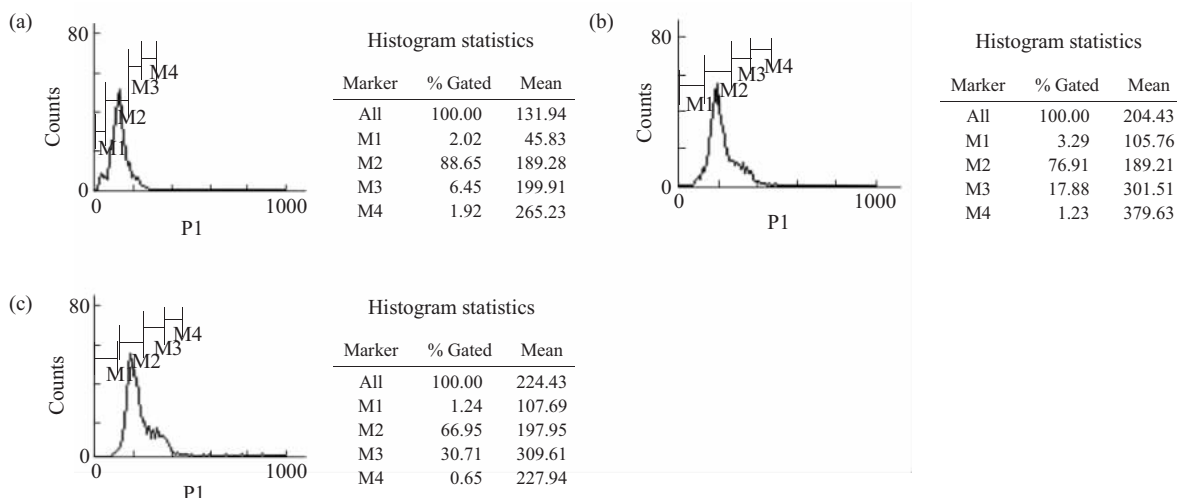
## 2 结果

### 2.1 TNF- $\alpha$ 加快肝细胞从 G0/G1 期到 S 期的细胞周期进程

经过 24 h 无血清培养, G0/G1 期细胞为 88.65%, S 期细胞为 6.45%, 细胞周期同步化于

G0/G1期. 加入含 10%胎牛血清, 继续培养 12 h, G0/G1 期细胞为 76.91%, S 期细胞为 17.88%. 10 μg/L TNF-α 处理的细胞, G0/G1 期细胞为

66.95%, S 期细胞为 30.71%, 与对照组有显著差异, 表现为 G0/G1 期缩短, 细胞周期进程加快 (图 1). 表明 TNF-α 能促进肝细胞的周期转换.

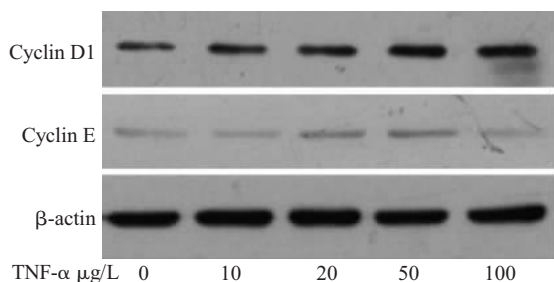


**Fig. 1 Effect of TNF-α on the cell cycle of the human hepatic cell line L-02**

(a) The cell cycle distribution of L-02 cells synchronized by incubation with free-serum medium for 24 h. (b) The cell cycle distribution of L-02 cells after incubation with RPMI 1640 medium containing 10% FCS for 12 h. (c) The cell cycle distribution of L-02 cells after incubation with RPMI 1640 medium containing 10 μg/L TNF-α and 10% FCS for 12 h. M2,M3 and M4 respectively represented the G0/G1,S and G2/M period of cell cycle.

### 2.2 TNF-α 诱导肝细胞 cyclin D1 表达增加

采用蛋白质印迹方法检测 cyclin D1 的表达, 发现 10 μg/L 的 TNF-α 能诱导细胞 cyclin D1 表达, 随着剂量的增加, cyclin D1 表达量也随之增加. 而另外一个调控细胞 G0/G1 期向 S 期转换的细胞周期素 cyclin E 的表达则无明显变化(图 2). 结果提示, TNF-α 主要通过诱导 cyclin D1 表达, 促进 L-02 细胞 G0/G1 期向 S 期转换.



**Fig.2 Analysis of cyclin D1 and cyclin E expression in L-02 cells with TNF-α treatment by Western blot**

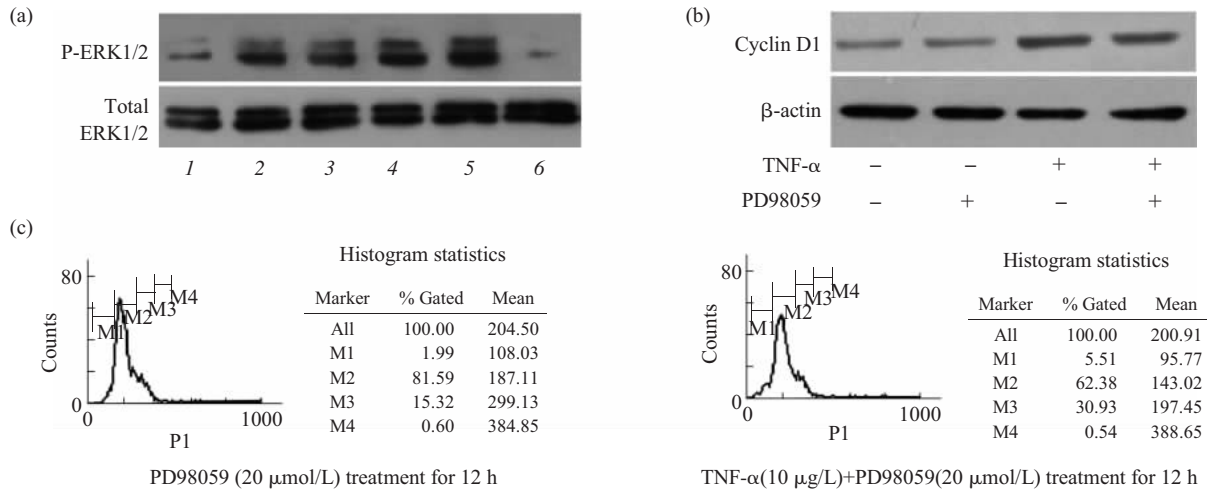
After treatment with 0,10,20,50,100 μg/L TNF-α for 24 h, whole cell protein extracts were prepared and examined by immunoblotting for cyclin D1, cyclin E.

### 2.3 ERK1/2 对 TNF-α 诱导的肝细胞周期的影响

为了确定 ERK1/2 对 TNF-α 诱导的细胞周期转换的影响, 检测了 TNF-α 对 ERK1/2 磷酸化水平的影响. 结果发现, TNF-α 能诱导 ERK1/2 活化, 随剂量的增加, ERK1/2 磷酸化水平也明显增高(图 3a). 但是, 使用 ERK1/2 活化的特异性抑制剂 PD98059 抑制 ERK1/2 磷酸化, TNF-α 处理细胞 12 h 后, G0/G1 期细胞为 62.38%, S 期细胞为 30.93%, 与 TNF-α 处理组无显著差异(图 3c). 同时, 抑制 ERK1/2 磷酸化对 TNF-α 诱导的 cyclin D1 表达并没有显著影响(图 3b). 结果表明, ERK1/2 在 TNF-α 诱导肝细胞的细胞周期转换中没有显著的作用.

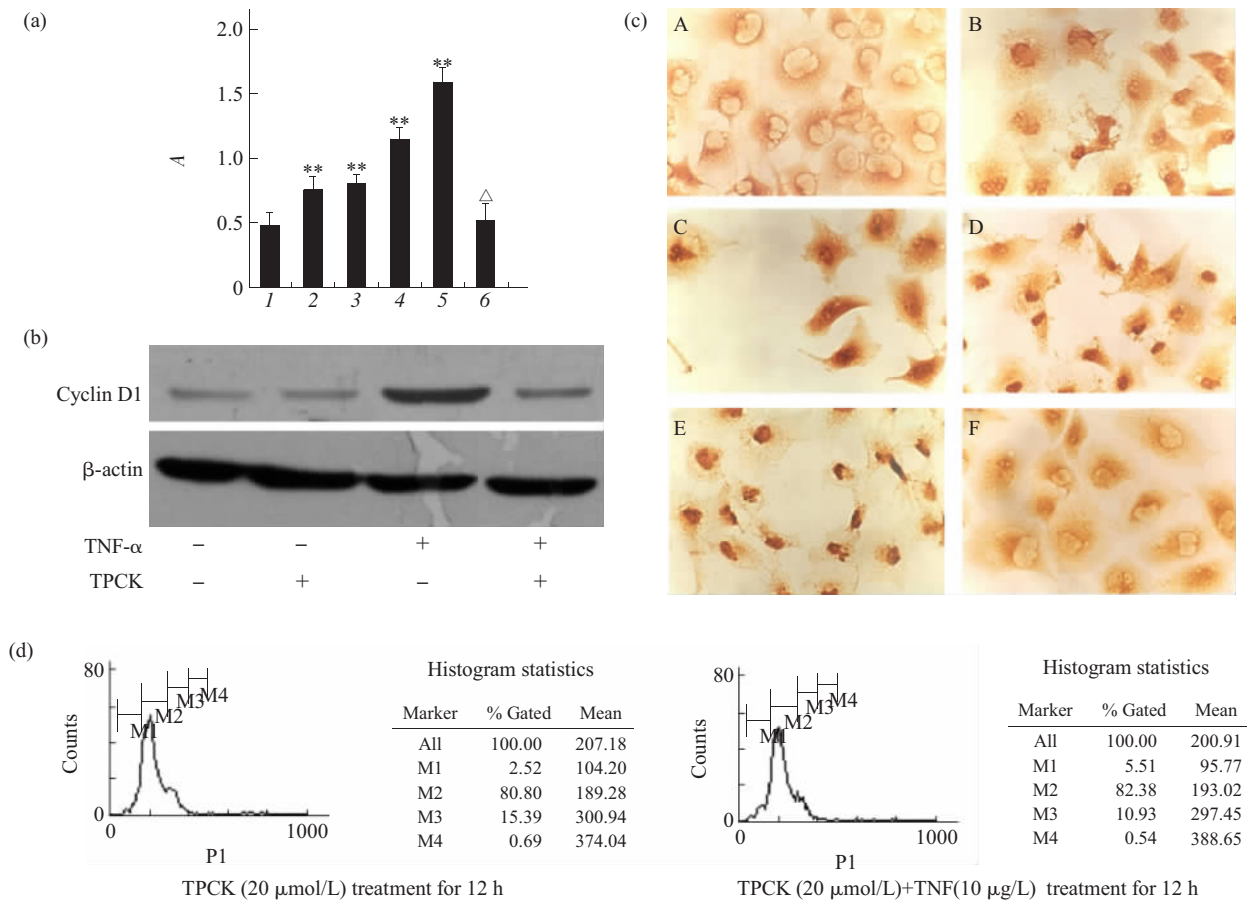
### 2.4 NF-κB 对 TNF-α 诱导的肝细胞周期的影响

运用转录因子活性 ELISA 法检测 NF-κB 活化程度, 10 μg/L TNF-α 能诱导肝细胞 NF-κB 活化, 与对照组有显著差异( $P < 0.05$ ). NF-κB 活化程度随 TNF-α 剂量增加而随之增加(图 4a). NF-κB 亚基 p65 免疫细胞化学结果显示, 未受 TNF-α 作用的肝细胞中的 NF-κB 处于非活化状态, p65 主要定位于细胞浆中. TNF-α 刺激能诱导 NF-κB 活化, 导致



**Fig. 3 Role of ERK1/2 in cell cycle progression after TNF- $\alpha$  treatment**

(a) Analysis of ERK1/2 phosphorylation in L-02 cells with TNF- $\alpha$  treatment by Western blot. Cells were respectively treated with 0, 10, 20, 50, 100  $\mu$ g/L TNF- $\alpha$ , indicated as lane 1~5. And lane 6 represented treatment with TNF- $\alpha$  (10  $\mu$ g/L)+PD98059 (20  $\mu$ mol/L). (b) Analysis of cyclin D1 expression in L-02 cells with TNF- $\alpha$  treatment after inhibiting ERK1/2 activation by Western blot. (c) TNF- $\alpha$ -induced cell cycle distribution of L-02 cells after inhibition of ERK1/2 activation.



**Fig. 4 Role of NF- $\kappa$ B in cell cycle progression after TNF- $\alpha$  treatment**

(a) NF- $\kappa$ B activation of L-02 cell with TNF- $\alpha$  treatment by ELISA. Cells were respectively treated with 0, 10, 20, 50, 100  $\mu$ g/L TNF- $\alpha$ , indicated as column 1~5. And the column 6 represented treatment with TNF- $\alpha$  (10  $\mu$ g/L)+TPCK (20  $\mu$ mol/L). \*\*  $P < 0.01$  versus the column 1.  $\Delta$   $P < 0.01$  versus the column 2. (b) Analysis of cyclin D1 expression in L-02 cells with TNF- $\alpha$  treatment after inhibiting NF- $\kappa$ B activation. (c) NF- $\kappa$ B activation of L-02 cell with TNF- $\alpha$  treatment by immunohistochemistry (DAB staining,  $\times 400$ ). Cells were respectively treated with 0, 10, 20, 50, 100  $\mu$ g/L TNF- $\alpha$ , indicated as Figure A~E. And Figure F represented treatment with TNF- $\alpha$  (10  $\mu$ g/L)+TPCK (20  $\mu$ mol/L). (d) TNF- $\alpha$  induced cell cycle distribution of L-02 cells after inhibition of NF- $\kappa$ B activation.



p65亚基转位到细胞核内. p65 亚基的核转位也呈 TNF- $\alpha$  剂量依赖性, 直观地验证了转录因子活性 ELISA 实验的结果(图 4c).

TPCK(20  $\mu\text{mol/L}$ )可特异地抑制 TNF- $\alpha$  诱导的抑制 NF- $\kappa\text{B}$  活化. 抑制 NF- $\kappa\text{B}$  活化后, 再经过 TNF- $\alpha$  处理, G0/G1 期细胞为 82.38%, S 期的细胞为 10.93%, 与 TNF- $\alpha$  处理组比较, 细胞周期阻滞在 G0/G1 期(图 4d). 同时, 抑制 NF- $\kappa\text{B}$  活化后, cyclin D1 表达明显降低(图 4b). 结果表明, TNF- $\alpha$  通过激活 NF- $\kappa\text{B}$ , 促进 cyclin D1 表达, 从而加快细胞从 G0/G1 期向 S 期转换.

### 3 讨 论

TNF- $\alpha$  主要由活化的巨噬细胞分泌产生, 也可由肿瘤细胞产生. TNF- $\alpha$  的生物学作用是通过结合细胞表面的可溶性三聚体受体而启动, 它有 2 个不同的 TNF 受体, TNFR1(55 ku)和 TNFR2(75 ku), 2 种受体在大多数细胞表面都有表达. 在炎症过程中, TNF- $\alpha$  对组织损伤和修复都发挥了重要作用, 可诱导病变细胞凋亡, 同时也诱导成纤维母细胞增生, 在损伤血管同时, 也诱导多种血管生成因子表达<sup>[9]</sup>. 高剂量 TNF- $\alpha$  局部治疗肿瘤可选择性地破坏肿瘤组织血管, 从而发挥抗肿瘤作用<sup>[10]</sup>. 然而, TNF- $\alpha$  也可使培养的上皮细胞发生转化<sup>[11]</sup>. TNF- $\alpha$  在肿瘤发生发展中表现出矛盾的生物学功能. 在本实验中, 发现 TNF- $\alpha$  能缩短 G0/G1 期时相, 加快细胞周期进程.

真核细胞周期分为 G0/G1, S, G2 和 M 4 期. 各期存在一系列关键的检测点, 如 G1/S、G2/M 检测点. 各检测点功能正常保证细胞周期顺利进行. 其中, 主要调控点在 G1 期, G1/S 检测点在细胞周期进程中起关键作用, 决定细胞周期能否启动进行细胞增殖细胞. 细胞周期调控的核心蛋白分子是细胞周期素 cyclin, 不同分子的 cyclin、CDK、CDKI 及其他相关调控蛋白精确地调控细胞周期的每一个时相. cyclin D 和 cyclin E 分别与 CDK4/6 和 CDK2 形成复合物, 促使细胞从 G0/G1 期进入 S 期. 一旦细胞通过 G1/S 检测点, 细胞就能完成整个细胞周期. 因此, cyclin D 和 cyclin E 是引起细胞增殖的关键性因素<sup>[12,13]</sup>. 研究表明, cyclin D1 和 cyclin E 过表达能缩短 G1 期时相, 加快细胞周期进程和细胞增殖, 导致肿瘤发生发展<sup>[14]</sup>. 本实验结果表明, TNF- $\alpha$  能以剂量依赖方式诱导 L-02 细胞表达 cyclin D1, 而对 cyclin E 的表达则没有影响, 结果

提示 cyclin D1 表达增加是 TNF- $\alpha$  加快细胞周期进程的主要因素. Cyclin D1 启动子区包含多个调节元件的结合靶点, 如 Ras、TRE、E2F、Oct、SP1、CRE 和 NF- $\kappa\text{B}$  结合的靶点. 因此, 多种转录因子可能参与调节 cyclin D1 表达<sup>[15]</sup>. 在肿瘤细胞中, 抑癌基因 PTEN 通过下调 ERK1/2 活性, 降低 cyclin D1 的转录, 导致细胞周期阻滞在 G1 期<sup>[16]</sup>. 低剂量电离辐射作用于肿瘤细胞时, 激活 ERK1/2, 导致 cyclin D1 表达增加, 促进细胞从 G0/G1 期进入 S 期<sup>[17]</sup>. 本实验中, TNF- $\alpha$  能以剂量依赖的方式激活 ERK1/2. 然而, 抑制 ERK1/2 磷酸化对 TNF- $\alpha$  诱导的 cyclin D1 表达没有影响. 同时, 抑制 ERK1/2 磷酸化对 TNF- $\alpha$  诱导的细胞周期进程也没有影响. 表明在肝细胞株 L-02 细胞中, ERK1/2 信号通路没有参与 TNF- $\alpha$  诱导的细胞周期转换.

非活化状态的 NF- $\kappa\text{B}$  通常与其抑制物 I $\kappa\text{B}$  聚合形成三聚体, 存在于细胞浆中. 在多种因素如 LPS、细胞因子、病毒、氧化剂、异种抗原及紫外线照射等 NF- $\kappa\text{B}$  活化信号的刺激下, 通过不同的信号转导途径, 激活 NF- $\kappa\text{B}$  诱导激酶(NF- $\kappa\text{B}$ -inducing kinase, NIK)或活化途径中的其他激酶, 使 I $\kappa\text{B}$  磷酸化、泛素化并降解, 从而暴露 NF- $\kappa\text{B}$  的核定位信号, 转移至细胞核内与特定基因启动子结合, 介导相关基因表达. 在乳腺癌细胞中, NF- $\kappa\text{B}$  活化加快了细胞周期进程, 导致细胞增生. 抑制 NF- $\kappa\text{B}$  活化, 降低了 cyclin D1 表达, 导致细胞周期阻滞于 G0/G1 期<sup>[18]</sup>. 在 G1 期, NF- $\kappa\text{B}$  可以调节 cyclin D1 表达水平和活性. 抑制 NF- $\kappa\text{B}$  活性可导致 cyclin D1 相关激酶活性下降, 延迟 Rb 蛋白(retinoblastoma protein)磷酸化, 导致细胞发生细胞周期阻滞<sup>[19]</sup>. 因此, NF- $\kappa\text{B}$  信号传导通路是细胞周期调控的途径之一. 本研究结果表明: TNF- $\alpha$  能以剂量依赖方式诱导肝细胞株 L-02 细胞 NF- $\kappa\text{B}$  活化. 免疫细胞化学方法检测 NF- $\kappa\text{B}$  p65 亚基也证实了这结果. 抑制 NF- $\kappa\text{B}$  活化, 可降低 TNF- $\alpha$  诱导的 cyclin D1 表达水平, 导致细胞周期阻滞于 G0/G1 期. 表明 TNF- $\alpha$  通过激活 NF- $\kappa\text{B}$ , 转录调节 cyclin D1 表达, 促进细胞周期从 G0/G1 期向 S 期转换.

实验结果提示, 在慢性炎症中, 炎症细胞分泌的 TNF- $\alpha$  通过激活 NF- $\kappa\text{B}$ , 转录调节 cyclin D1 表达, 加快细胞周期从 G0/G1 期向 S 期转换, 导致细胞周期调节紊乱. 这可能是慢性炎症中 TNF- $\alpha$  促进肿瘤发生发展的机制之一. 针对 TNF- $\alpha$  和 NF- $\kappa\text{B}$  的治疗可能延长慢性炎症相关性肿瘤的潜伏期和抑

制肿瘤的发展, 值得进一步的研究.

### 参 考 文 献

- 1 Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 2001, **357** (9255): 539~545
- 2 Block T M, Mehta A S, Fimmel C J, *et al.* Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2003, **22** (33): 5093~5107
- 3 Kawata S, Yamasaki E, Nagase T, *et al.* Effect of pravastatin on survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma. A randomized controlled trial. *Br J Cancer*, 2001, **84** (7): 886~891
- 4 Coussens L M, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*, 2002, **420** (6917): 860~867
- 5 Robertson F M, Ross M S, Tober K L, *et al.* Inhibition of pro-inflammatory cytokine gene expression and papilloma growth during murine multistage carcinogenesis by pentoxifylline. *Carcinogenesis*, 1996, **17** (8): 1719~1728
- 6 Moore R J, Owens D M, Stamp G, *et al.* Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med*, 1999, **5** (7): 828~831
- 7 Suganuma M, Okabe S, Marino M W, *et al.* Essential role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha-deficient mice. *Cancer Res*, 1999, **59** (18): 4516~4518
- 8 Knight B, Yeoh G C, Husk K L, *et al.* Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knockout mice. *J Exp Med*, 2000, **192** (12): 1809~1818
- 9 Kollias G, Douni E, Kassiotis G, *et al.* On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev*, 1999, **169**: 175~194
- 10 Lejeune F J, Ruegg C, Lienard D. Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr Opin Immunol*, 1998, **10** (5): 573~580
- 11 Huang C, Li J, Ma W Y, *et al.* JNK activation is required for JB6 cell transformation induced by tumor necrosis factor-alpha but not by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *J Biol Chem*, 1999, **274** (42): 29672~29676
- 12 Jacks T, Weinberg R A. Cell-cycle control and its watchman. *Nature*, 1996, **381** (6584): 643~644
- 13 Evan G I, Vousden K H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 2001, **411** (6835): 342~348
- 14 Ioachim E, Michael M, Stavropoulos N E, *et al.* Expression patterns of cyclins D1, E and cyclin-dependent kinase inhibitors p21 (Waf1/Cip1) and p27 (Kip1) in urothelial carcinoma: correlation with other cell-cycle-related proteins (Rb, p53, Ki-67 and PCNA) and clinicopathological features. *Urol Int*, 2004, **73** (1): 65~73
- 15 Herber B, Truss M, Beato M, *et al.* Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter. *Oncogene*, 1994, **9** (4): 1295~1304
- 16 Chung J H, Ostrowski M C, Romigh T, *et al.* The ERK1/2 pathway modulates nuclear PTEN-mediated cell cycle arrest by cyclin D1 transcriptional regulation. *Hum Mol Genet*, 2006, **15** (17): 2553~2559
- 17 Caron R W, Yacoub A, Mitchell C, *et al.* Radiation-stimulated ERK1/2 and JNK1/2 signaling can promote cell cycle progression in human colon cancer cells. *Cell Cycle*, 2005, **4** (3): 456~464
- 18 Tanaka A, Muto S, Konno M, *et al.* A new IkappaB kinase beta inhibitor prevents human breast cancer progression through negative regulation of cell cycle transition. *Cancer Res*, 2006, **66** (1): 419~426
- 19 Guttridge D C, Albanese C, Reuther J Y, *et al.* NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (8): 5785~5799

## TNF- $\alpha$ Promotes Cell Cycle Progression by Activating NF- $\kappa$ B Signal Pathway in Hepatic Cell Line L-02\*

YANG Ji-Yun<sup>1</sup>, ZHANG Si-Zhong<sup>1)\*</sup>, GUO Hong<sup>2</sup>, ZENG Xiang-Yuan<sup>3</sup>, MA Bu-Ren<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Genetics, West China Hospital, Sichuan University, Division of Human Morbid Genomics, State Key Laboratory of Biotherapy, Chengdu 610041, China; <sup>2</sup>Mouse Gene Engineering Center, State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; <sup>3</sup>The Department of Clinical Experimental, Chendu Army General Hospital, Chengdu 610083, China)

**Abstract** A causal relationship between inflammation and cancer has long been suspected. It was demonstrated the presence of leukocytes in malignant tissues and claimed that tumors arise from regions of chronic inflammation. Hepatocellular carcinoma (HCC), the third leading cause of cancer mortality worldwide, commonly develops in the background of chronic hepatitis. The molecular and cellular mechanisms linking chronic inflammation to tumorigenesis remain largely unresolved. To investigate the roles of TNF- $\alpha$  on the formation and development of HCC, cell cycle, cyclin D1 and cyclin E was measured after treatment with TNF- $\alpha$ . Meanwhile, phosphorylated ERK1/2 and NF- $\kappa$ B activation were also assessed. After blocking the activation of ERK1/2 and NF- $\kappa$ B, the distribution of cell cycle and cyclin D1 expression was measured. It was found that G0/G1-to-S-phase transition was accelerated in human hepatic cell line L-02 treated by TNF- $\alpha$  treatment. Also TNF- $\alpha$  treatment can induce cyclin D1 expression in dose dependent but not cyclin E expression. Simultaneously, inhibition of NF- $\kappa$ B but not inhibition of ERK1/2 caused TNF- $\alpha$ -induced cell cycle arrest at G0/G1 and the increased levels of cyclin D1 expression. These result suggest that TNF- $\alpha$  promotes cell cycle progression by increasing expression of cyclin D1 due to NF- $\kappa$ B activation in human hepatic cell line L-02. Therefore, it enhances formation and progression of hepatocellular carcinoma. Suppression of a major signalling factor of inflammation, such as NF- $\kappa$ B or TNF- $\alpha$ , could thus be a tool to prolong the premalignant phase and inhibit tumour progression in chronic inflammatory diseases with high cancer risk.

**Key words** tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), extracellular signal-regulated kinase (ERK), cell cycle, chronic inflammation, tumorigenesis

---

\*This study was supported by grants from National Basic Research Program of China (2004CB518805) and The National Natural Science Foundation of China (30470960, 30371491).

\*\*Corresponding author . Tel: 86-28-85164009, E-mail: szzhang@mcwcums.com

Received: November 17, 2006 Accepted: January 17, 2007