

NF- κ B 在砷诱导人正常膀胱上皮细胞 COX-2 表达中的作用

席淑华, 王惠惠, 王菲, 刘盛男, 孙贵范

(中国医科大学公共卫生学院地球化学性疾病研究室, 辽宁省砷生物学作用与砷中毒重点实验室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 目的 观察 NF- κ B 核转录因子在砷诱导人正常膀胱上皮细胞 (SV-HUC-1) 环氧酶-2 (COX-2) 表达中的作用。方法 在细胞培养液中加入不同浓度的 NaAsO₂, 24 h 后提取细胞总 RNA 和核蛋白, 用 RT-PCR 和 Western blot 方法分别分析 COX-2 mRNA 表达和 NF- κ B 蛋白水平; 选择 COX-2 高表达的 NaAsO₂ 处理组, 再用 NF- κ B 抑制剂 (PDTC) 处理, 观察 COX-2 mRNA 表达水平的变化。结果 4、8 μ mol/L NaAsO₂ 处理细胞后, COX-2 mRNA 表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$); 4 μ mol/L NaAsO₂ 处理组细胞 NF- κ B 蛋白水平也显著提高, 高于对照组, 而 10 μ mol/L NaAsO₂ 处理组细胞 NF- κ B 蛋白水平低于对照组 ($P < 0.05$); 同时用 4 μ mol/L NaAsO₂ 和 PDTC 共同处理细胞后, COX-2 mRNA 表达水平降低, 显著低于单纯用 4 μ mol/L NaAsO₂ 处理细胞的 COX-2 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$)。结论 低剂量的砷能够诱导人正常膀胱上皮细胞 COX-2 mRNA 和 NF- κ B 蛋白表达水平的增高, 砷诱导的核转录因子 NF- κ B 活化在砷诱导的 COX-2 表达水平增高中起一定作用。

关键词: 砷; 人膀胱上皮永生细胞 (SV-HUC-1); 环氧酶-2 (COX-2); 核转录因子 NF- κ B

中图分类号: R99 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2011)05-0327-04

Effects of NF- κ B on COX-2 expression in arsenite exposed SV-HUC-1 cells

XI Shu-hua, WANG Hui-hui, WANG Fei, LIU Sheng-nan, SUN Gui-fan

(Department of Biogeochemical Disease, School of Public Health, China Medical University; Liaoning Provincial Key Laboratory for Arsenic Biology and Arsenic Poisoning, Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective To explore the effects of NF- κ B on COX-2 mRNA expression in SV-HUC-1 cells exposed to arsenite. **Methods** Cells were cultured in medium contained 0, 1, 2, 4, 8 and 10 μ mol/L arsenite or PDTC, the inhibitor of NF- κ B for 24 h, then the expressions of COX-2 mRNA and nuclear protein NF- κ B were determined by RT-PCR and Western blot, respectively. **Results** Compared with those in control group, the expressions of COX-2 mRNA in cells exposed to 4 and 8 μ mol/L arsenite and the expressions of NF- κ B in cells exposed to 4 μ mol/L arsenite were increased significantly ($P < 0.05$), while expressions of NF- κ B nuclear protein in the cells exposed to 10 μ mol/L arsenite were decreased significantly. On the other hand, expressions of COX-2 mRNA in cells exposed to both 4 μ mol/L arsenite and PDTC were lower significantly than those in the cells only exposed to 4 μ mol/L arsenite ($P < 0.05$). **Conclusion** Findings from this study suggested that low dose of arsenic could induce the expression of COX-2 mRNA and NF- κ B in SV-HUC-1 cells, while the activation of NF- κ B induced by arsenic might play some role in the process mentioned above.

Key words: arsenite; SV-human urothelial cells-1 (SV-HUC-1); cyclooxygenase-2 (COX-2); nuclear factor κ B (NF- κ B)

砷是自然界广泛存在的环境毒物, 不仅能够引起机体产生急慢性中毒及皮肤损害, 而且还与多种癌症的发生有关。在孟加拉、智利、中国台北和大陆等国家和地区均有调查显示, 饮水砷暴露可引起肺癌、膀胱癌、肝癌等恶性肿瘤死亡率增加^[1-4], 特别是台湾西部黑脚病地区, 饮水砷所致的膀胱癌死亡率与其他内脏癌比较为最高^[5], 并随改水措施的实施, 砷暴露水平下降, 膀胱癌的死亡率也下降^[6]。尽管人们已认识到砷暴露可增加膀胱癌的发病危险, 但对砷致膀胱癌的机理尚不清楚。目前国内外均有报道膀胱癌

患者的癌组织和尿脱落细胞中有环氧酶-2 (COX-2) 表达, 特别是与膀胱移行细胞癌的分级、分期和预后具有显著相关性^[7-10]。COX-2 可通过促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、促进血管形成、增加肿瘤细胞浸润转换等参与肿瘤的发生发展。人的 COX-2 基因启动子上有 2 个 NF- κ B 结合位点, 称为 NF- κ B 调控元件, 当刺激因子作用后, 胞质内的 NF- κ B 可活化而转入细胞核, 与 DNA 结合, 诱导 COX-2 中 NF- κ B 结合元件活化, 从而增加 COX-2 的表达。有研究显示, 各种因素作用所产生的活性氧自由基是激活 NF- κ B 的主要物质^[11, 12]。我们的研究已发现砷可显著增加人正常膀胱上皮细胞活性氧、自由基水平, 那么砷是否可通过激活 NF- κ B 而增加 COX-2 表达, 本文对此进行了研究。

收稿日期: 2011-06-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81072244); 辽宁省教育厅科学技术研究项目 (2009A756): 砷致膀胱癌机制研究

作者简介: 席淑华 (1963-), 女, 教授, 研究方向: 砷、氟中毒发病机制, Email: shxi@mail.cmu.edu.cn.

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和仪器

亚砷酸钠 (NaAsO₂) 分析纯, 美国 Fluka 公司; F12K 培养基, 美国 Sigma 公司; 胎牛血清, 德国 Biochrom 公司; 胰蛋白酶, 美国 Hyclone 公司; TRIzol, 琼脂糖, 美国 Invitrogen 公司; Easy RT-PCR 试剂盒, 北京全式金生物技术有限公 司; 核蛋白提取试剂盒, 南京凯基生物有限公 司; NF-κB 一抗, 山羊抗兔二抗, 中杉金桥生物试剂公司; NF-κB 抑制剂, 美国 CALBIOCHEM 公司。

超净工作台, 江苏苏净集团公 司; 150 型二氧化碳恒温培养箱, 荷兰 Heraeus 公司; PCR 仪, 美国 ABI 公司; 电泳仪, 上海天能科技有 限公司; 凝胶成像仪扫描成像系 统, 美国 Alpha Innotech 公司; 3K18 型超速低温离心机, 美国 Sigma 公司。

1.2 细胞培养与染毒

人膀胱上皮细胞系 SV-HUC-1 购自美国典型菌种保藏中心 (ATCC, 编号: CRL-9520), 5% CO₂、37 °C 条件下常规培养于 F12K 完全培养基 (10% 胎牛血清, 100 U/ml 青霉素, 100 μg/ml 链霉素) 中, 隔日换液, 待细胞生长至 85% ~ 90% 融合后, 以 0.25% 胰蛋白酶消化传代。染毒时, 细胞以 1 × 10⁵ 个/ml 的密度接种至各规格培养板或培养皿, 待细胞进入对数生长期至 80% 融合后, 以 F12K 完全培养基配制 0、1、2、4、8、10 μmol/L NaAsO₂ 溶液, 进行细胞染毒。

1.3 NF-κB 核蛋白表达

1.3.1 核蛋白提取 细胞达到染毒终点后, 弃去培养液, PBS 清洗, 裂解, 离心, 收集上清, 测定核蛋白浓度。

1.3.2 Western blot 制备胶板, 蛋白电泳, 转膜, 封闭, 抗体结合, 显色, 拍照, 用 Quantity One 软件分析蛋白条带, 其光密度值作为 NF-κB 表达的相对水平。

1.4 RNA 提取及 RT-PCR 检测

应用 TRIzol (Invitrogen) 法进行细胞总 RNA 提取, 260/280 nm 进行 RNA 质量的评价, 提纯后的 RNA 溶解于 DEPC 水中, 置于 -80 °C 保存备用。按照 Easy RT-PCR 试剂盒说明书操作, 将 1 μg 总 RNA 合成 cDNA 并扩增为 DNA, 以 β-actin 作为内参, 对 COX-2 的 RNA 水平进行半定量分析。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 5 min, 接着 30 个循环 (94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s), 最后 72 °C 延伸 5 min。反应完成后取 10 μl PCR 产物, 加 2 μl Genefinder 染色,

进行琼脂糖凝胶电泳, 应用凝胶成像仪扫描成像。COX-2 引物序列: 上游 5'-TGAAACCCACTCCAAACA-CAG-3', 下游 5'-TCATCAGGCACAGGAGGAAG-3', 片段长度为 232 bp; β-actin 引物序列: 上游 5'-GTC-CACCTTCCAGCAGATGTG-3', 下游 5'-GCATTTGCCG-GTGGACGAT-3', 片段长度为 76 bp。

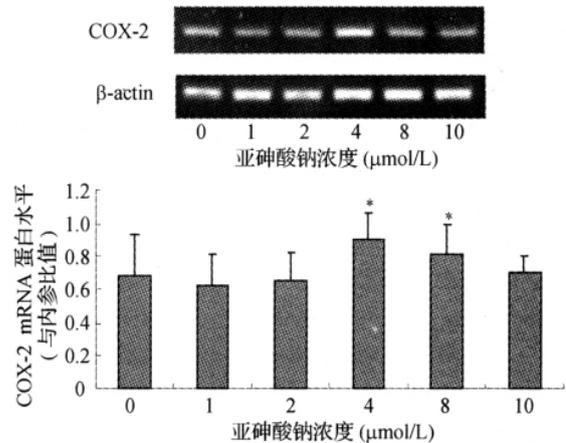
1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 for Windows 软件进行数据的统计分析。采用单因素方差分析 (ANOVA) 比较各实验组与对照组间的统计学差异, 组间两两比较采用 LSD 检验, 以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 砷对人正常膀胱上皮细胞 COX-2 mRNA 表达水平的影响

SV-HUC-1 细胞用砷处理 24 h 后, 4、8 μmol/L NaAsO₂ 处理组细胞 COX-2 mRNA 表达水平显著升高, 高于对照组 (P < 0.05), 见图 1。



注: 与 0 μmol/L NaAsO₂ 组相比, * P < 0.05。

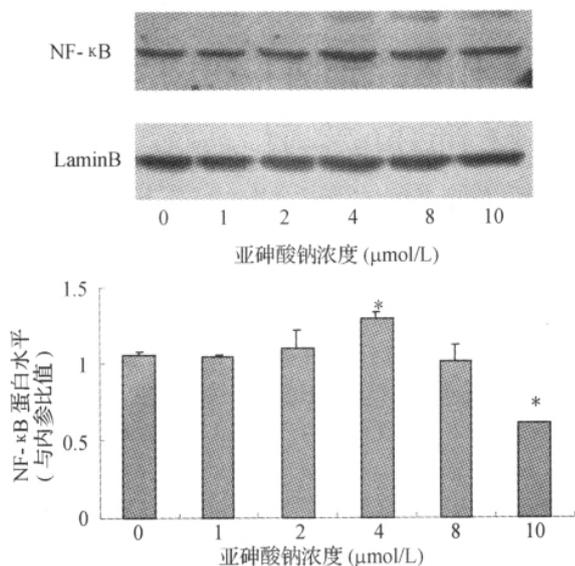
图 1 不同浓度亚砷酸钠处理 SV-HUC-1 细胞后 COX-2 mRNA 表达水平

2.2 砷对人正常膀胱上皮细胞核转录因子 NF-κB 蛋白表达水平的影响

分别用 0、1、2、4、8、10 μmol/L NaAsO₂ 处理细胞 24 h 后, 观察细胞核蛋白 NF-κB 表达情况, 发现 4 μmol/L NaAsO₂ 处理的 SV-HUC-1 细胞核蛋白 NF-κB 表达水平增高, 而 10 μmol/L NaAsO₂ 处理的细胞 NF-κB 蛋白的表达水平降低, 低于对照组 (P < 0.05), 其表达趋势与 COX-2 mRNA 表达趋势基本相同, 见图 2。

2.3 NF-κB 抑制剂对砷诱导人正常膀胱上皮细胞 COX-2 mRNA 表达的影响

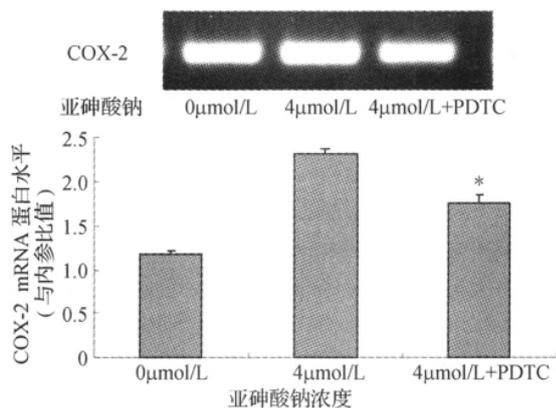
对 4 μmol/L NaAsO₂ 处理的 SV-HUC-1 细胞用 NF-κB 抑制剂 (PDTC) 处理, 发现 PDTC 能够降低



注: 与 0 μmol/L NaAsO₂ 组相比, * P < 0.05。

图2 不同浓度亚砷酸钠处理 SV-HUC-1 细胞后 NF-κB 核蛋白表达情况

砷诱导的 COX-2 mRNA 表达水平 (P < 0.05), 说明 NF-κB 在砷诱导的 COX-2 表达中起一定的作用, 见图 3。



注: 与 4 μmol/L NaAsO₂ 组相比, * P < 0.05。

图3 NF-κB 抑制剂 (PDTC) 对砷诱导的 COX-2mRNA 表达水平的影响

3 讨论

COX-2 是前列腺素合成的一个限速酶, 哺乳动物的 COX 有两种亚型, COX-1 和 COX-2。COX-1 是正常细胞的组成蛋白, 在大部分的组织中都有稳定表达; 而 COX-2 在大部分正常组织中无表达, 受到一定因素如细胞因子、生长因子、致癌物等诱导后方有表达, 被做为肿瘤生物标志物成为近几年肿瘤研究的热点。NF-κB 为核转录因子, 调控多种基因的表达, 其中有 COX-2。NF-κB 在没有外界刺激时与其抑制蛋白 IκB 结合, 呈不具活性的状态存在于胞质中。当刺激因子作用后, 如细胞因子、氧自由基、紫外线辐射

等, IκB 激酶 (IKK) 激活, 使 IκB 磷酸化, 被蛋白酶体降解, NF-κB 脱落活化而转入细胞核, 与 DNA 结合, 诱导 COX-2 中 NF-κB 结合元件活化, 从而活化 COX-2 的表达。

本研究显示, 低剂量的砷不仅能够诱导人正常膀胱上皮细胞 COX-2 mRNA 表达增加, 也可增加核转录因子 NF-κB 蛋白的表达升高, 与他人的研究结果一致^[13, 14]。然而, 当砷浓度达到一定剂量 (10 μmol/L) 反而开始抑制 COX-2 mRNA 表达和 NF-κB 蛋白的表达。COX-2 具有促进增殖、抑制凋亡作用, 本结果说明小剂量的砷会在促进膀胱上皮细胞增殖中起一定作用, 可能是砷致膀胱癌发生的一个因素。然而, 砷剂量加大后, COX-2 mRNA 表达水平和 NF-κB 蛋白的表达均又下降, 低于对照组, 可能与砷的促凋亡作用有关。在用 NF-κB 抑制剂处理后, COX-2 表达水平明显下降, 可以推测砷诱导的 COX-2 表达在一定程度上与砷引起核转录因子 NF-κB 活化有关。

参考文献:

- [1] Yu Chen. Cancer burden from arsenic in drinking water in Bangladesh [J]. Am J Public Health, 2004, 95 (5): 741-744.
- [2] 梁秀芬, 张玉敏, 岱沁, 等. 土默特地区三个自然村居民饮水砷暴露与恶性肿瘤 [J]. 中国慢性病预防与控制, 2001, 9 (5): 216-218.
- [3] Chen C, Chuang Y, You S, et al. A retrospective study on malignant neoplasms of bladder, lung and liver in blackfoot disease endemic area in Taiwan [J]. Br J Cancer, 1986, 53 (3): 399-405.
- [4] Smith A H, Goycolea M, Haque R, et al. Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of Northern Chile due to arsenic in drinking water [J]. Am J Epidemiol, 1998, 147 (7): 660-669.
- [5] Hung-YI Chiou, Yu-Mei Hsueh, Kuen-Fu Liaw, et al. Incidence of internal cancers and ingested inorganic arsenic: a seven-year follow-up study in Taiwan [J]. Cancer Research, 1995, 55 (3): 1296-1300.
- [6] Yang C Y, Chiu H F, Chang C C, et al. Bladder cancer mortality reduction after installation of a tap-water supply system in an arsenic-endemic area in southwestern Taiwan [J]. Environ Res, 2005, 98 (1): 127-132.
- [7] Shariat S F, Matsumoto K, Kim J, et al. Correlation of cyclooxygenase-2 expression with molecular markers, pathological features and clinical outcome of transitional cell carcinoma of the bladder [J]. Urol, 2003, 170 (3): 985-989.
- [8] 王勤章, 丁国富, 周四维, 等. 膀胱癌中环氧化酶-2 的表达与肿瘤增殖的关系 [J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21 (2): 245.
- [9] 杨明山, 马庆铮. 环氧化酶-2 基因在膀胱移行细胞癌组织中的表达及其意义 [J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21 (2): 163-164.
- [10] 崔平书, 霍红旭, 黑兰荪, 等. 环氧化酶-2 在膀胱组织及尿脱落细胞中的表达和意义 [J]. 肿瘤防治研究, 2005, 32 (5): 299-301.

(下转第 356 页)

- [6] Di palma F, Holomerh R H, Bryda E C, *et al.* Mutations in Cdh23, encoding a new type of cadherin, causes tereocilia disorganization in-waltzer, the mouse model for Usher syndrome type 1D [J]. *Nat Genet*, 2001, 27 (1): 103-107.
- [7] 杨杪, 谭皓, 郑建如, 等. 钙粘蛋白 23 基因多态性与噪声性听力损失易感性的关系研究 [J]. *卫生研究*, 2006, 35 (1): 19-22.
- [8] 杨震宇, 肖勇梅, 肖启华, 等. 钙黏素 23 基因多态性与噪声性听力损失易感性关系研究 [J]. *中国职业医学*, 2006, 33 (5): 358-360.
- [9] Fridberger A, Flock A, Uifendahl M, *et al.* Acoustic overstimulation increases outer hair cell Ca^{2+} concentrations and causes dynamic contractions of the hearing organ [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95: 7127-7132.
- [10] Yamoah E N, Lumpkin E A, Dumont R A, *et al.* Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase extrudes Ca^{2+} from hair cell stereocilia [J]. *J Neurosci*, 1998, 18: 610-624.
- [11] Kozel P J, Friedman R A, Erway L C, *et al.* Balance and hearing deficits in mice with a null mutation in the gene encoding plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 2 [J]. *Biol Chem*, 1998, 273: 18693-18696.
- [12] Kozel P J, Davis R R, Krieger E F, *et al.* Deficiency in plasma membrane calcium ATPase isoform 2 increases susceptibility to noise induced hearing loss in mice [J]. *Hear Res*, 2002, 164 (1-2): 231-239.
- [13] 杨杪, 谭皓, 郑建如, 等. 质膜 Ca^{2+} -ATP 酶异构体 2 基因多态性与噪声性听力损失易感性的关系 [J]. *中国工业医学杂志*, 2005, 18 (1): 19-22.
- [14] Yamane H, Nakai Y, Takayama M, *et al.* Appearance of free radicals in the guinea pig inner ear after noise-induced acoustic trauma [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 1995, 252: 504-508.
- [15] Ohlemiller K K, Wright J S, Dugan L L. Early elevation of cochlear reactive oxygen species following noise exposure [J]. *Audiol Neurotol*, 1999, 4: 229-236.
- [16] Yamasoba T, Nuttall A L, Harris C, *et al.* Role of glutathione in protection against noise-induced hearing loss [J]. *Brain Res*, 1998, 784 (1-2): 82-90.
- [17] Kawamoto K, Sha S H, Minoda R, *et al.* Antioxidant gene therapy can protect hearing and hair cells from ototoxicity [J]. *Mol Ther*, 2004, 9 (2): 173-181.
- [18] Rabinowitz P M, Pierce J S R, Hurmoba B, *et al.* Antioxidant status and hearing function in noise exposed workers [J]. *Hear Res*, 2002, 173 (1-2): 164-171.
- [19] Fortunato G, Marciano E, Zarilli F, *et al.* Paraoxonase and superoxide dismutase gene polymorphisms and noise-induced hearing loss [J]. *Clin Chem*, 2004, 50: 2012-2018.
- [20] Konings A, Van laer L, Pawelczyk M, *et al.* Association between variations in CAT and noise-induced hearing loss in two independent noise exposed populations [J]. *Hum Mol Genet*, 2007, 16: 1872-1883.
- [21] 杨杪, 谭皓, 郑建如, 等. 谷胱甘肽硫转移酶 M1 和 T1 基因多态性与噪声性听力损失易感性的关系研究 [J]. *卫生研究*, 2005, 36 (4): 647-649.
- [22] 刘移民, 杨震宇, 肖勇梅, 等. GSTM1 和 GSTT1 基因多态性与噪声性听力损失易感性的关系 [J]. *中国职业医学*, 2006, 33 (5): 343-346.
- [23] Liu Y M, Li X D, Guo X, *et al.* Association between polymorphisms in SOD1 and noise-induced hearing loss in Chinese workers [J]. *Acta Otolaryngol*, 2010, 130 (4): 477-486.
- [24] Liu Y M, Li X D, Guo X, *et al.* SOD2 V16A SNP in the mitochondrial targeting sequence is associated with noise induced hearing loss in Chinese workers [J]. *Dis Markers*, 2010, 28 (3): 137-147.
- [25] Cheng yu Lin, Jiunn liang Wu, Tung sheng SHih, *et al.* Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms as susceptibility factors for noise-induced temporary threshold shift [J]. *Hearing Res*, 2009, 257: 8-15.
- [26] 李庆忠, 王秋菊. 钾离子通道基因与耳蜗听觉功能 [J]. *国际耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2006, 30 (4): 222-225.
- [27] Van Laer L, Carlsson P I, Ottschytch N, *et al.* The contribution of genes involved in potassium-recycling in the inner ear to noise-induced hearing loss [J]. *Hum Mutat*, 2006, 27 (8): 786-795.
- [28] Carlsson P I, Borg E, Grip L, *et al.* Variability in noise susceptibility in a Swedish population: the role of 35 delG mutation in the Connexin 26 (GJB2) gene [J]. *Audiol Med*, 2004, 2: 123-130.
- [29] Pawelczyk M, Van Laer L, Frasen E, *et al.* Analysis of gene polymorphisms associated with K^+ ion circulation in the inner ear of patients susceptible and resistant to noise-induced hearing loss [J]. *Ann Hum Gene*, 2009, 73: 411-412.
- [30] Lim H H, Jenkins O H, Mayers M W, *et al.* Detection of HSP72 synthesis after acoustic overstimulation in rat cochlea [J]. *Hear Res*, 1993, 69: 146.
- [31] 汪绪武, 王希军, 宋江顺, 等. 噪声诱导豚鼠耳蜗应激蛋白表达的研究 [J]. *中国耳鼻咽喉-颅底外科杂志*, 1999, 5 (1): 17.
- [32] Yang M, Tan H, Yang Q, *et al.* Association of hsp 70 polymorphisms with risk of noise-induced hearing loss in Chinese automobile workers [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2006, 11: 233-239.
- [33] Konings A, Van Laer L, Michel S, *et al.* Variations in HSP70 genes associated with noise-induced hearing loss in two independent populations [J]. *Euro J Hum genet*, 2009, 17 (3): 329-335.

(上接第 329 页)

- [11] Baeuerle P A, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system [J]. *Annu Rev Immunol*, 1994, 12: 141-179.
- [12] Schmidt K N, Traenker E B M, Meier B, *et al.* Induction of oxidative stress by okadaic acid is required for activation of transcription factor NF- κ B [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270 (45): 27136-27142.
- [13] Tsai S H, Liang Y C, Chen L, *et al.* Arsenite stimulates cyclooxygenase-2 expression through activating IKappaB kinase and nuclear factor KappaB in primary and ECV 304 endothelial cells [J]. *J Cell Biochem*, 2002, 84 (4): 750-758.
- [14] Bredfeldt T G, Eblin K E, Buffington S, *et al.* Mitogenic signal transduction caused by monomethylarsonous acid in human bladder cells: role in arsenic-induced carcinogenesis [J]. *Toxicol Sci*, 2007, 95 (2): 321-330.