

bFGF 经 Akt 信号转导通路诱导胃癌 BGC-823 中 COX-2 和 NF-κB 表达研究

聂海祺¹, 孙黎光^{1Δ}, 叶丽平²

(1. 中国医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室 辽宁 沈阳 110001; 2. 辽宁省血液中心)

[摘要] 目的:在胃癌 BGC-823 细胞中,经 bFGF 诱导后观察 COX-2 和 NF-κB 蛋白表达,探讨 bFGF 通过 Akt 途径抑制凋亡促进细胞增殖的信号转导机制。方法:胃癌 BGC-823 细胞传代培养。MTT 方法检测 bFGF 对胃癌 BGC-823 细胞的促增殖的作用。Western blotting 检测 Akt 酶的活性和不同处理 BGC-823 中 COX-2 和 NF-κB 的表达。结果:25 ng/ml bFGF 能够激活 BGC-823 细胞中 Akt 磷酸化,p-Akt 在 10 min 表达最多,进而促进 COX-2 和 NF-κB 蛋白的表达,这种表达具有时间依赖性,能够促进 BGC-823 细胞的增殖。Akt 抑制剂 wortmannin 可抑制 bFGF 的这些作用。结论:bFGF 经 Akt 细胞信号转导通路能够诱导 BGC-823 细胞中 COX-2 和 NF-κB 的表达。Akt 信号转导通路、COX-2 和 NF-κB 与 BGC-823 细胞的增殖密切相关。

[关键词] Akt 信号转导通路;成纤维细胞生长因子;胃癌 BGC-823 细胞;环氧合酶 2;核转录因子 κB

[中图分类号] R735.2 [文献标识码] A [文章编号] 0258-4646(2007)02-0116-03

Expression of COX-2 and nuclear factor-kappa B protein induced by bFGF via Akt signal transduction pathway

NIE Hai-qi¹, SUN Li-guang^{1Δ}, YE Li-ping²

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. The Blood Center of Liaoning Province)

[Abstract] Objective: To study the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and nuclear factor-kappa B (NF-κB) protein in gastric carcinoma BGC-823 cells treated with basic fibroblast growth factor (bFGF), and to explore whether bFGF inhibits the apoptosis and promotes the proliferation of BGC-823 cells via Akt signal transduction pathway. Methods: Gastric carcinoma BGC-823 cells were cultured for serial passage and then treated with bFGF. The proliferation of BGC-823 cells was detected by MTT assay, and the activity of Akt and the expression of COX-2 and NF-κB protein were determined by Western blotting. Results: In BGC-823 cells treated with 25 ng/ml bFGF, Akt phosphorylation was activated, and the expression of p-Akt reached the peak at 10 minutes. The expression of COX-2 and NF-κB increased in a time-dependent manner and promoted the proliferation of BGC-823 cells. All the effects of bFGF were inhibited by wortmannin, an inhibitor of Akt. Conclusion: bFGF could induce the expression of COX-2 and NF-κB protein in gastric carcinoma BGC-823 cells via Akt signal transduction pathway, in which COX-2 and NF-κB closely correlate with the proliferation of BGC-823 cells.

[Key words] Akt signal transduction; basic fibroblast growth factor; gastric carcinoma; BGC-823 cell; cyclooxygenase-2; nuclear factor-kappa B

Akt 或蛋白激酶 B(Akt/ PKB)信号转导通路的异常经常出现在人类的一些恶性肿瘤中,与肿瘤进展密切相关。核转录因子 κB(nuclear factor-κB, NF-κB)受到各种外界刺激活化后,进入细胞核内,结合环氧合酶 2(cyclooxygenase-2, COX-2)启动子上 5'-GGGACTTTCC-3'序列,促进 COX-2)转录^[1]。但是外界刺激经何种细胞信号转导通路来促进胃癌细胞中 NF-κB 和 COX-2 表达研究的很少。本研究采用外源性碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)直接作用于胃癌 BGC-823 细胞,观察其对 BGC-823 细胞中 COX-2 和

NF-κB 表达的影响,探讨 bFGF 通过 Akt 途径抑制凋亡促进细胞增殖的信号转导机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

胃癌 BGC-823 来自中国医科大学生物化学与分子生物学实验室,细胞在含 10%胎牛血清,50 u/L 庆大霉素的 DMEM 培养液中,在 37℃,饱和湿度及 5% CO₂ 的孵育箱内传代培养。

1.2 细胞处理

将对数生长期细胞 1 × 10⁵/ml,接种于培养瓶,达 70%融合时换无血清 DMEM 培养液过夜,随机分组施加处理因素。wortmannin 溶于二甲基亚砷溶液预处理:终浓度 100nmol/L 的 wortmannin 孵育 1h,加 bFGF。

1.3 试剂

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39870384);辽宁省教育厅基金资助项目(2004D173)

[作者简介] 聂海祺(1976-),男,主管检验师,医学硕士。

ΔCorresponding Author's E-mail: ydslg@163.com

扶济复(北京双鹭药业),DMEM、wortmannin、MTT、PI(Sigma公司)胎牛血清、胰蛋白酶、兔抗人COX-2多克隆抗体、ECL试剂盒(北京中山公司),NF- κ B p65单克隆抗体、磷酸化Akt抗体均为Santa cruz公司产品。

1.4 方法

1.4.1 MTT法:取处于对数生长期的BGC-823细胞接种于96孔培养板,每孔 1×10^4 个细胞。按分组要求加入bFGF和wortmannin及培养液,使各孔终体积均为200 μ l,继续培养,3 d后每孔加入MTT溶液(5 g/L)20 μ l,继续孵育4 h,每孔加入150 μ l DMSO,振荡10 min,用酶联免疫检测仪读取每孔OD值(测量波长630 nm,参考波长570 nm)。根据公式 $B/A \times 100\%$ 计算细胞的增殖比(A,B分别为对照组和实验组的光密度值)。

1.4.2 Western印迹分析:细胞样品超声粉碎,4 $^{\circ}$ C,12 000 \times g,离心1 h,取上清。Lowery法测定蛋白。35 μ g总蛋白上样于10%SDS-PAGE,电泳分离后电转移至硝酸纤维膜,5%脱脂奶粉溶液封闭过夜。分别加入一抗(1:400),二抗(1:5 000),室温孵育2 h,ECL法发光、X线扫描成像,Image图像分析软件对图中印迹区带进行定量分析。

1.5 统计学分析

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS11.0统计软件进行方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 bFGF对Akt活性的影响

不同浓度bFGF诱导BGC-823细胞Akt活性增高,25 ng/ml bFGF诱导后p-Akt表达量最大(图1),25 ng/ml bFGF与BGC-823细胞共同孵育5,10,30,60 min,Akt活性在bFGF作用5 min时开始升高,作用10 min时达到高峰,其后活性开始下降,但均高于空白对照(图2),各bFGF处理组与对照组之间差异显著($P < 0.05$)。经wortmannin预处理后,BGC-823

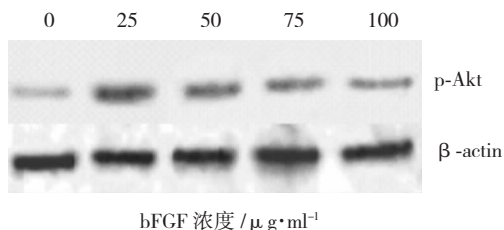
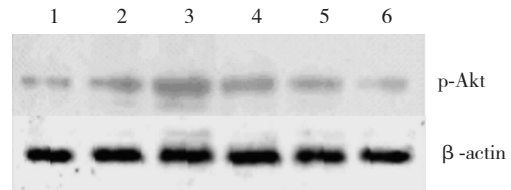


图1 不同浓度的bFGF诱导BGC-823细胞Akt磷酸化
Fig.1 Akt phosphorylation induced by different concentrations of bFGF in BGC-823 cells

细胞Akt活性与未经预处理组相比降低,差异显著($P < 0.05$)。



1: 对照;2~5:25 ng/ml bFGF分别处理5,10,30,60 min;6:wortmannin预处理1 h加25 ng/ml bFGF处理10 min

图2 25 ng/ml bFGF处理不同时间点BGC-823细胞Akt磷酸化情况

Fig.2 Akt phosphorylation in BGC-823 cells treated with 25 ng/ml bFGF at different times

2.2 bFGF促进BGC-823细胞的增殖

BGC-823细胞经bFGF处理后细胞增殖比明显增加,bFGF浓度为25 ng/ml时细胞增殖比为150%,bFGF处理组与对照组比较,差异显著($P < 0.05$)。wortmannin预处理后细胞增殖比增加受到抑制,bFGF处理组与wortmannin预处理组比较差异显著($P < 0.05$)。

2.3 bFGF对COX-2表达的影响

Western印迹分析显示,bFGF能时、量效地诱导BGC-823细胞的COX-2蛋白表达量增加,24 h达到高峰(图3),各bFGF作用6,12,24 h与对照比较差异显著($P < 0.05$),3 h与对照比较差异不显著。bFGF处理后24 h与wortmannin预处理后,加bFGF处理24 h比较差异显著($P < 0.05$)。

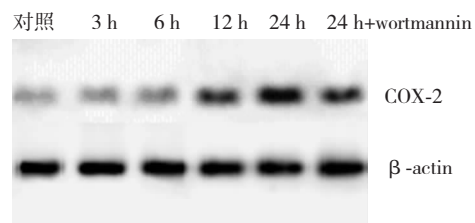


图3 25 ng/ml bFGF处理不同时间点BGC-823细胞COX-2表达
Fig.3 Expression of COX-2 in BGC-823 cells treated with 25 ng/ml bFGF at different times

2.4 bFGF对NF- κ B表达的影响

Western印迹分析显示,bFGF能时、量效地诱导BGC-823细胞的NF- κ B蛋白表达量增加,12 h达到高峰,24 h时蛋白表达量开始减少(图4),与12 h比较差异显著($P < 0.05$),bFGF作用时间点:3,6,12 h与对照比较差异显著($P < 0.05$)。bFGF处理后12 h与wortmannin预处理后加bFGF处理12 h比较差异显著($P < 0.05$)。

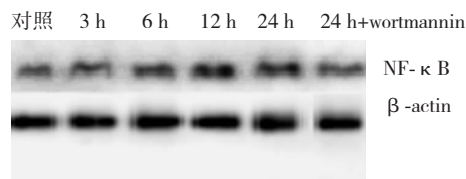


图 4 25 ng/ml bFGF 处理不同时间点 BGC-823 细胞 NF-κ B 表达
Fig.4 Expression of NF-κ B in BGC-823 cells treated with 25 ng/ml bFGF at different times

3 讨论

COX 有 COX-1 (又称 PGHS-1) 和 COX-2 (又称 PGHS-2) 两种亚型。其中 COX-2 为诱导型酶, 一般不表达或低表达, 在受到各种刺激时表达迅速上调, 参与多种病理生理过程。NF-κ B 作为一种重要的核转录因子, 调节着多种基因的表达, 并参与免疫反应、细胞凋亡、肿瘤发生等多种生物学进程。两者之间存在着密切的关系。本实验结果显示, 经 bFGF 刺激后 BGC-823 中 COX-2、NF-κ B 表达量增加之间成正相关, 且其表达量可以被 Akt 抑制剂 wortmannin 所抑制, 提示 bFGF 可以通过 Akt 细胞信号转导途径来促进 NF-κ B 和 COX-2 的表达。

活化的 Akt 在介导细胞生长和增殖、细胞运动和侵袭、细胞凋亡和抵抗化疗、放疗方面有重要作用。Akt 的活化与肿瘤的发生发展密切相关, 生长因子等因素可刺激 Akt 的活化。活化的 Akt 能够增加 NF-κ B 的转录活性 [2], NF-κ B 同时能上调 COX-2 的表达, 有助于细胞侵袭的发生。同时活化的 Akt 也能引起 Iκ B 磷酸化, NF-κ B 水平提高上调 COX-2 表达。

Akt 作为细胞生存通路 PI3K/ Akt 的关键分子, 在促进细胞生长、增殖, 促进细胞运动、侵袭, 抑制细胞凋亡, 促进血管生成, 抵抗化疗和放疗中起核心作用。现已证实, Akt /PKB 通过多种机制抗凋亡。其中通过 NF-κ B 能促进抗凋亡基因转录。Akt/PKB 还可正性调节 NF-κ B。NF-κ B 协同一系列生长因子和细胞因子调节细胞增生、凋亡和生存。许多研究证明它在肿瘤发生中有重要作用。NF-κ B 主要通过其抑制剂 I-κ B 发挥调节作用。通常 I-κ B 使 NF-κ B 定位于胞质中, I-κ B 被上游激酶 IKKs 磷酸化后降解, 使 NF-κ B 移位到核内, 促进靶基因如 COX-2 的转录。活化的 Akt /PKB 可以直接磷酸化 IKKa, 使

IKK 激活, 调节 NF-κ B 活性。现已证实 Akt/PKB 对于 IKK 介导的 I-κ B 降解和 NF-κ B 激活是必需的 [3]。实验结果中加入 Akt 抑制剂 wortmannin 后 NF-κ B 和 COX-2 的表达均受到抑制证实了这点。所以 Akt /PKB 是 NF-κ B 依赖的基因转录的重要调节因素, 对刺激癌细胞的生长有重要作用。

实验结果中 NF-κ B 的表达量在 bFGF 处理 12 h 达到最大可能与 bFGF 持续活化 Akt 有关, 活化的 Akt 引起持续 Iκ B 磷酸化, Iκ Bα 的氨基末端第 32、36 位丝氨酸残基及 Iκ Bβ 的第 19、23 位丝氨酸能够被 Iκ B 蛋白激酶 (IKKα - IKKβ) 磷酸化, 磷酸化的 Iκ Bs 被泛素化, 进一步被蛋白酶降解, 使 NF-κ B 从 NF-κ B-Iκ Bs 复合物中解离出并转位于细胞核, 与相应的靶基因结合。并且抑制了 IKKβ 活性, 也降低了 NF-κ B 与 DNA 结合能力 [4]。12 h 之后 NF-κ B 表达量开始下降是因为 Iκ Bs 在被降解后又迅速地再合成, 并能进入细胞核与 NF-κ B 结合, 而 NF-κ B-Iκ Bs 复合物的形成使 NF-κ B 从其结合的 DNA κ B 位点上脱离, 并重新转位于细胞质, 由此实现 NF-κ B 活化与失活的循环, 完成 NF-κ B 作为一种核转录因子而调控基因转录的功能 [5]。

参考文献:

- [1] ANDREAKOS E, SMITH C, KIRIAKIDIS S, et al . Heterogeneous requirement of I kappa B kinase 2 for inflammatory cytokine and matrix metalloproteinase production in rheumatoid arthritis: implications for therapy [J]. Arthritis Rheum, 2003 , 48(7): 1901-1912.
- [2] LEE HC, PARK IC, PARK MJ, et al . Sulindac and its metabolites inhibit invasion of glioblastoma cells via down-regulation of Akt/PKB and MMP-2 [J]. J Cell Biochem, 2005 , 94(3): 597-610.
- [3] SHIMAMURA H, TERADA Y, OKADO T, et al . The PI3-kinase-Akt pathway promotes mesangial cell survival and inhibits apoptosis in vitro via NF-kappa B and Bad [J]. J Am Soc Nephrol, 2003 , 14(6): 1427-1434.
- [4] ICHIKAWA H, TAKADA Y, MURAKAMI A, et al . Identification of a novel blocker of I kappa B alpha kinase that enhances cellular apoptosis and inhibits cellular invasion through suppression of NF-kappa B-regulated gene products [J]. J Immunol, 2005 , 174(11): 7383-7392.
- [5] LESSARD L, BEGIN LR, GLEAVE ME , et al . Nuclear localisation of nuclear factor-kappa B transcription factors in prostate cancer: an immunohistochemical study [J]. Br J Cancer, 2005, 93 (9): 1019-1023.

[收稿日期] 2006-08-30