

人单核细胞对煤焦沥青烟提取物诱导人永生化支气管上皮细胞 *c-Jun* mRNA 表达的影响

刘文佳, 宋金燕, 杨维超, 晋乐飞, 王威, 姚武, 吴卫东, 吴逸明, 燕贞

摘要: [目的] 探讨人单核细胞对煤焦沥青烟提取物(CTPE)处理人永生化支气管上皮细胞中 *c-Jun* mRNA 表达的影响。[方法] 用 3 $\mu\text{g/mL}$ CTPE 刺激人永生化支气管上皮细胞(CTPE 组), 及人单核细胞共培养的人永生化支气管上皮细胞(CC 组), 设立二甲基亚砷对照组; 分别收集各组 1、5、10、15、20 代细胞。将 CC 组第 9 代细胞分别常规培养至 10 代(CC10 组)、15 代(CC15 组), 加入 100 $\mu\text{g/mL}$ 肿瘤坏死因子- α 中和抗体培养至 15 代(中和抗体组)。应用实时荧光定量聚合酶链式反应检测各组细胞中 *c-Jun* mRNA 的表达水平。[结果] 15、20 代 CC 组人永生化支气管上皮细胞 *c-Jun* mRNA 相对表达水平高于 CTPE 组和二甲基亚砷对照组(均 $P < 0.05$); 中和抗体组 *c-Jun* mRNA 的相对表达水平高于 CC10 组, 低于 CC15 组(均 $P < 0.05$)。[结论] 人单核细胞可能通过肿瘤坏死因子- α 调控 CTPE 诱导人永生化支气管上皮细胞 *c-Jun* mRNA 的表达。

关键词: 煤焦沥青烟提取物; *c-Jun* mRNA; 人单核细胞; 肿瘤坏死因子- α

Effect of Human Acute Monocytic Leukemia Cells on Coal Tar Pitch Extract-Induced *c-Jun* mRNA Expression in Human Bronchial Epithelial Cells LIU Wen-jia, SONG Jin-yan, YANG Wei-chao, JIN Yue-fei, WANG Wei, YAO Wu, WU Wei-dong, WU Yi-ming, YAN Zhen (Department of Occupational Health, College of Public Health, Zhengzhou University, Henan 450001, China). Address correspondence to YAN Zhen, E-mail: yanzhen@zzu.edu.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To explore the effect of human acute monocytic leukemia cells (THP-1) on *c-Jun* mRNA expression induced by coal tar pitch extract (CTPE) in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). [Methods] BEAS-2B cells (CTPE group) and co-cultured BEAS-2B and THP-1 cells (CC group) were both simulated by 3 $\mu\text{g/mL}$ CTPE, and dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as vehicle control. The cells were collected at passage 1, 5, 10, 15, and 20. The co-cultured cells at passage 9 were further cultured to passage 10 (CC10 group) and passage 15 (CC15 group), and added 100 $\mu\text{g/mL}$ tumor necrosis factor- α (TNF- α) neutralizing antibody and further cultured to passage 15 (neutralizing antibody group). The expression of *c-Jun* mRNA was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction. [Results] The expression levels of *c-Jun* mRNA in BEAS-2B cells at passage 15 and 20 in the CC group were both increased compared with those in the CTPE and DMSO control group ($P < 0.05$). The expression level of *c-Jun* mRNA after adding TNF- α neutralizing antibody was increased compared with the CC10 group and decreased compared with the CC15 group ($P < 0.05$). [Conclusion] THP-1 could regulate the expression of *c-Jun* mRNA induced by CTPE through TNF- α in the BEAS-2B cells.

Key Words: coal tar pitch extract; *c-Jun* mRNA; human acute monocytic leukemia; tumor necrosis factor- α

煤焦沥青(coal tar pitch)是炼焦工业产生的副产物,其烟气主要通过呼吸道和皮肤对机体造成毒性损害。流行病学调查和动物实验已经证实煤焦沥青具有致癌性,职业接触煤焦沥青能增加肺癌和其他癌症的危险^[1]。有研究证实慢性炎症和肿瘤的发生发展

有重要关联^[2],炎症在肿瘤的发生中主要通过免疫细胞的浸润发挥作用。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)是炎症早期中最早出现的炎症因子,并且存在于整个炎症过程,可以调控其他炎症因子的活化及合成,对炎症的发生与发展有重要意义^[3]。在慢性炎症中, TNF- α 的长期表达可以启动肿瘤的发生^[4]。课题组前期实验表明人单核细胞(human acute monocytic leukemia cells) THP-1 可促进煤焦沥青烟提取物(coal tar pitch smoke extracts, CTPE)诱导人永生化支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cells) BEAS-2B 的恶性转化,且 TNF- α 的表达水平明显升高,

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2015.14516

[基金项目] 国家自然科学基金(编号: 81001240, 81001239)

[作者简介] 刘文佳(1988—),男,硕士生;研究方向:职业肿瘤学;

E-mail: 540671357@qq.com

[通信作者] 燕贞, E-mail: yanzhen@zzu.edu.cn

[作者单位] 郑州大学公共卫生学院劳动卫生学教研室,河南 450001

提示TNF- α 在细胞的恶性转化过程中发挥重要调节作用^[5]。激活蛋白(activity protein-1, AP-1)是早期编码的核转录因子,是由*c-Jun*与*c-Fos*形成具有生物活性的二聚体,在细胞受到刺激时能最先表达,是细胞对外界刺激和内部生化改变的中介物,在炎症诱发肿瘤的发生发展过程中发挥着重要作用^[6]。有研究显示,在肿瘤组织中转录因子AP-1的活性高于正常组织^[7],且*c-Jun*在肿瘤的发生发展过程中发挥重要调节作用^[8]。有研究证实TNF- α 作为一个重要的调节开关可以调控AP-1通路,调节细胞的恶性变程度。此外,细胞的传代次数对细胞因子的成熟以及分泌也具有较为重要的影响。随着传代次数的增加,细胞因子的成分发生改变。有研究表明,随着成纤维细胞传代次数的增加,细胞内活性氧水平升高,不同代数的细胞对刺激物浓度的应激反应存在着差异。本实验拟通过构建不同代数THP-1细胞与BEAS-2B细胞的共培养模型,检测THP-1细胞对CTPE诱导BEAS-2B细胞*c-Jun* mRNA表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

RPMI-1640培养基、胎牛血清(美国Hyclone公司),MX3000P Real-time PCR仪(美国Stratagene公司),RNAios Plus试剂、反转录试剂盒、Power 2 $\times$ SYBR Real-Time PCR Premixture试剂盒(大连宝生物公司)。CTPE用课题组前期处理方法制备^[5]。

1.2 细胞培养

THP-1、BEAS-2B细胞均购于美国模式菌种收集中心。细胞用含胎牛血清体积分数为10%的RPMI-1640培养液进行培养,3~4 d传代1次。培养环境:37 $^{\circ}$ C恒温,CO₂ 5%,湿度95%。

1.3 分组与染毒处理

CC组(BEAS-2B与THP-1细胞按30:1比例共培养)与BEAS-2B组(单独BEAS-2B细胞)分别用3 μ g/mL的CTPE染毒^[9],并设立二甲基亚砜(DMSO)对照组。细胞常规培养传代,分别收集1、5、10、15、20代BEAS-2B细胞。

将CC组第9代细胞分为3组:第1组长满后收集BEAS-2B细胞,记为CC10组;第2组常规培养至15代,记为CC15组;第3组每代加入TNF- α 中和抗体,终浓度为100 μ g/mL,培养至15代收集BEAS-2B细胞,记为中和抗体组。另同步培养BEAS-2B细胞作

为对照组。

1.4 mRNA表达量

采用Real-time PCR法,根据Genbank中的*c-Jun*、 *β -actin*的基因序列由上海英骏生物技术有限公司合成设计特异性引物。引物序列:*c-Jun*上游5'-AAC GAC CTT CTA TGA CGA TGC CCT C-3';下游3'-GCC AAC CCC TCC TGC TCA TCT GTC-5'; *β -actin*上游5'-AAT CTT GCG TGA CAT TAA GGA GAA-3';下游3'-CAG GAA GGA AGG CTG GAA GAG T-5'。收集各组BEAS-2B细胞,参照RNAios Plus试剂说明书提取总RNA,取2 μ g总RNA反转录为cDNA。PCR反应体系为:2 $\times$ Premix 10 μ L, ROX 0.4 μ L, cDNA 1 μ L,上下游引物各0.4 μ L,用灭菌蒸馏水补至20 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性2 min;95 $^{\circ}$ C变性20 s、60 $^{\circ}$ C退火20 s、72 $^{\circ}$ C延伸45 s;共40个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min。以 β -actin作为内参照,计算*c-Jun* mRNA表达量。

1.5 统计学分析

采用SPSS 12.0软件进行统计分析,数据以均数加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用最小显著差法,对传代次数和不同处理因素间的交互作用采用析因设计分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 不同传代次数、处理因素对*c-Jun* mRNA表达的影响

对同一处理因素不同传代次数的*c-Jun* mRNA表达水平进行单因素方差分析,对于CTPE组,15、20代BEAS-2B细胞*c-Jun* mRNA的表达水平均明显高于1、5、10代;但20代和15代之间细胞*c-Jun* mRNA表达水平的差异没有统计学意义($P=0.087$);对于CC组,10、15、20代BEAS-2B细胞*c-Jun* mRNA相对表达水平分别高于1、5代(均 $P<0.05$);且随着传代次数增加,BEAS-2B细胞*c-Jun* mRNA表达水平明显升高(*c-Jun* mRNA表达水平:20代>15代>10代)。见表1。

对相同传代次数不同处理因素的数据进行分析,各代CC组和CTPE组BEAS-2B细胞*c-Jun* mRNA相对表达水平均高于DMSO组,差异具有统计学意义(均 $P<0.05$)。在1代和5代中,CTPE组与CC组BEAS-2B细胞*c-Jun* mRNA相对表达水平差异均没有统计学意义(均 $P>0.05$),在10、15、20各代中CC组*c-Jun* mRNA相对表达水平均高于CTPE组($P=0.003$, $P=0.001$, $P=0.004$)。见表1。

表1 各组细胞 *c-Jun* mRNA 相对表达水平 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

代数	DMSO 对照组	CTPE 组	CC 组	<i>F</i>	<i>P</i>
1	1.02 ± 0.02	1.12 ± 0.05 [△]	1.15 ± 0.05 [△]	7.481	0.010
5	1.00 ± 0.06	1.15 ± 0.02 [△]	1.19 ± 0.04 [△]	20.615	0.002
10	1.00 ± 0.03	1.21 ± 0.02 [△]	1.34 ± 0.04 ^{▲△}	86.338	0.001
15	1.02 ± 0.03	1.44 ± 0.03 ^{※△}	1.89 ± 0.05 ^{※▲△}	367.886	0.001
20	1.06 ± 0.10	1.53 ± 0.10 ^{※△}	2.15 ± 0.12 ^{※▲△}	73.843	0.001
<i>F</i>	0.819	33.884	133.114	—	—
<i>P</i>	0.542	0.001	0.001	—	—

[注]不同传代次数, #: 与其他各代比较, $P<0.05$; ※: 与 1、5、10 代比较, $P<0.05$ 。不同处理因素, ▲: 与 CTPE 组比较, $P<0.05$; △: 与 DMSO 组比较, $P<0.05$ 。

进一步对细胞传代次数和不同处理因素间进行析因分析, 结果表明二者呈正相关($r=0.902, P=0.001$)。随着细胞传代次数的增加, CTPE 组和 CC 组 BEAS-2B 细胞 *c-Jun* mRNA 表达水平随之升高($P=0.001$), 且 CC 组 *c-Jun* mRNA 表达水平高于 CTPE 组, 代数和处理因素之间存在交互作用($P=0.001$), 见表 2。

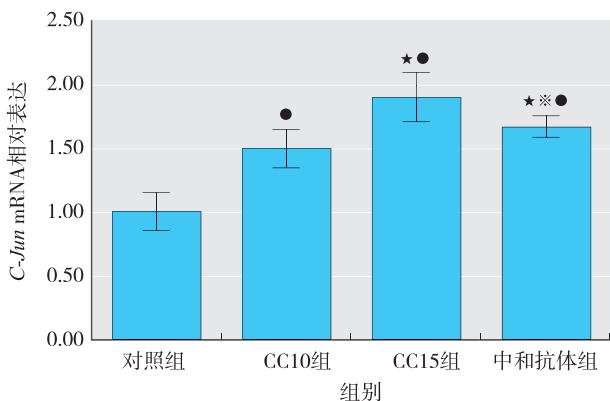
表2 不同代数与不同处理因素间的析因分析

源	<i>F</i>	<i>P</i>
代数	14.046	0.001
处理因素	22.850	0.001
代数 × 处理因素	5.722	0.001

[注] $r=0.902$ 。

2.2 中和抗体组 *c-Jun* mRNA 相对表达水平

与对照组比较, CC10、CC15 与中和抗体组 *c-Jun* mRNA 的相对表达量均升高($P<0.05$)。中和抗体组 *c-Jun* mRNA 相对表达水平均高于 CC10 组, 低于 CC15 组细胞, 差异均有统计学意义($P=0.004, P=0.001$), 见图 1。



[注]●: 与对照组细胞比较, $P<0.05$; ★: 与 CC10 代细胞比较, $P<0.05$; ※: 与 CC15 代细胞比较, $P<0.05$ 。

图1 各组细胞 *c-Jun* mRNA 相对表达水平

3 讨论

TNF- α 是一种由多核巨细胞分泌的具有广泛生物活性的细胞因子。作为重要的炎症因子, 其可以通过活化其他炎症因子来促进炎症的发展, 而炎症的发展又能促进 TNF- α 的活化^[10]。TNF- α 一方面具有调节机体免疫功能的作用, 另一方面可以介导炎症过程、组织损伤等病理生理反应。TNF- α 可以通过 JNK/*c-Jun* 信号通路调节 AP-1 的表达水平^[11]。AP-1 作为重要的核转录激活因子, 在肿瘤的发生和发展过程中具有重要意义^[12]。在体内体外实验中均证实细胞的恶性增殖和转化与 *c-Jun/c-Fos* 过表达有关联, 抑制 AP-1 的过表达可成为某些肿瘤治疗的方法之一。

在本课题中, 建立 THP-1 与 BEAS-2B 细胞的共培养模型。CTPE 刺激后, 1、5、10、15、20 代 CC 组 BEAS-2B 细胞中 *c-Jun* mRNA 的相对表达水平均高于 DMSO 对照组, 10、15 代 CC 组高于 CTPE 组。提示在同代细胞中, THP-1 细胞与 BEAS-2B 细胞共培养能够上调 *c-Jun* mRNA 的表达水平。

CTPE 组 15 代和 20 代 BEAS-2B 细胞 *c-Jun* mRNA 表达水平的差异无统计学意义; 在 CTPE 组和 CC 组中, 15、20 代 BEAS-2B 细胞 *c-Jun* mRNA 的表达水平均高于 1、5、10 代细胞, 差异均具有统计学意义。提示随着代数的增长, 细胞恶性变的程度可能增加。为了明确细胞传代数对处理因素有无干扰作用, 本研究进行了析因分析, 结果显示代数与处理因素之间不存在交互作用($P<0.001$), 传代数对处理因素的干扰可以忽略不计。

课题组前期试验中已证实, CTPE 刺激 THP-1 后可分泌大量 TNF- α 。加入 TNF- α 中和抗体后, 中和抗体组 BEAS-2B 细胞 *c-Jun* mRNA 的表达水平低于 CC15 组, 而高于 CC10 组, 说明 TNF- α 可以促使 *c-Jun* mRNA 表达水平的上升, 表明 THP-1 细胞上调了 CTPE 处理 BEAS-2B 细胞产生 *c-Jun* mRNA 的表达水平。THP-1 细胞受到刺激时可以分泌大量的促炎细胞因子 TNF- α , TNF- α 作为信号分子激活下游 JNK, 从而使 *c-Jun* 表达水平上调^[13]。

本实验还存在着不足之处, 虽然实验结果提示 TNF- α 对 *c-Jun* mRNA 的表达水平的具有调控作用, 但其具体调控机制有待于进一步的探讨和验证。

综上所述, CTPE 可诱导 BEAS-2B 细胞 *c-Jun* mRNA 的表达, THP-1 细胞可能通过 TNF- α 上调 CTPE 诱导的 *c-Jun* mRNA 表达水平。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] 吴逸明, 李卫民, 李卓炜, 等. 大鼠肺癌发生发展动物模型的构建[J]. 河南医科大学学报, 2000, 35(3): 232-235.
- [2] Proctor MJ, Morrison DS, Talwar D, et al. An inflammation-based prognostic score (mGPS) predicts cancer survival independent of tumor site: a Glasgow Inflammation Outcome Study[J]. Br J Cancer, 2011, 104(4): 726-734.
- [3] Wu Y, Zhou B P. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion[J]. Br J Cancer, 2010, 102(4): 639-644.
- [4] Elinav E, Nowarski R, Thaiss C A, et al. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumors, immune cells and microorganisms[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(11): 759-771.
- [5] 周凡静, 张少峰, 冯斐斐, 等. 单核巨噬细胞在煤焦沥青烟提取物诱导永生化人支气管上皮细胞恶变中的作用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2012, 30(4): 241-245.
- [6] Shaulian E. AP-1—The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise?[J]. Cell Signal, 2010, 22(6): 894-899.
- [7] Peterziel H, Müller J, Danner A, et al. Expression of podoplanin in human astrocytic brain tumors is controlled by the PI3K-AKT-AP-1 signaling pathway and promoter methylation[J]. Neuro Oncol, 2012, 14(4): 426-439.
- [8] Li Y, Kundu P, Seow S W, et al. Gut microbiota accelerate tumor growth via *c-Jun* and STAT3 phosphorylation in APCMin/+ mice[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(6): 1231-1238.
- [9] 李智涛, 燕贞, 赵勇, 等. 煤焦沥青烟提取物致支气管上皮细胞系恶性转化细胞中 Bub1 和 Mad2 表达水平改变[J]. 中国职业医学, 2010, 37(6): 454-457.
- [10] 夏娟, 李冬, 郑伟萍, 等. 炎症与肿瘤的关系研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(1): 63-65.
- [11] Wagner E F. Bone development and inflammatory disease is regulated by AP-1 (Fos/Jun)[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69 (Suppl 1): i86-i88.
- [12] Duan G J, Zhu J, Wan J Y, et al. A synthetic MD-2 mimetic peptide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses *in vivo* and *in vitro*[J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10(9): 1091-1100.
- [13] 王静波, 惠延年, 关娟, 等. 肿瘤坏死因子上调人视网膜色素上皮细胞 *c-Jun* 的表达[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(1): 51-53.

(收稿日期: 2014-08-04)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 丁瑾瑜)

【告知栏】

《环境与职业医学》杂志再次入选中文核心期刊

依据文献计量学的原理和方法, 经研究人员对相关文献的检索、统计和分析, 以及学科专家评审, 《环境与职业医学》杂志入编《中文核心期刊要目总览2014年版》之预防医学、卫生学类的核心期刊, 即连续第七次入选中文核心期刊。

《环境与职业医学》杂志(<http://jeom.scdc.sh.cn:8081>), 原名《劳动医学》, 创刊于1984年, 由上海市卫生和计划生育委员会主管, 上海市疾病预防控制中心、中华预防医学会主办, 系中华预防医学会系列杂志。国际连续出版物号: ISSN 2095-9982; CODEN HYZYAZ; 国内统一连续出版物号: CN 31-1879/R。

《环境与职业医学》杂志衷心感谢各位编委、审稿专家、作者和读者对本刊的支持! 热忱希望广大读者、作者、专家一如既往支持本刊工作, 踊跃投稿!