论著

文章编号:1000-5404(2014)19-2010-06

PLCε基因通过NF-κB/p65途径抑制肾癌786-0细胞的增殖

杨 雪[1],欧俐苹[1],王晓荣[1],王 胤[1],吴小候[2],罗春丽[1] (400016 重庆,重庆医科大学:检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室[1],附属第一医院泌尿外科[2])

[摘要] **目的** 探讨RNA干扰技术沉默人源磷脂酶Cε(PLCε)基因对肾癌786-0细胞p65核转位的调控,对786-0细胞增殖的影响及其机制。**方法** 用携带PLCε shRNA基因的真核表达质粒pGenesil-PLCε转染786-0细胞,克隆形成实验检测786-0细胞的增殖,RT-PCR检测PLCε、c-Myc和COX-2 mRNA的表达,Western blot检测PLCε、c-Myc、COX-2和p65总蛋白及p65在细胞核的表达,细胞免疫荧光检测p65在细胞核与细胞质的定位。同时应用p65特异的抑制剂BAY11-7082处理786-0细胞,Western blot检测c-Myc和COX-2蛋白的表达。**结果** 转染pGenesil-PLCε质粒的786-0细胞生长明显受抑制;转染pGenesil-PLCε质粒细胞中PLCε、c-Myc和COX-2 mRNA和蛋白表达水平均较对照组pGenesil-NP明显下调($P<0.01$),且抑制核中p65蛋白的表达($P<0.01$),细胞免疫荧光结果显示转染pGenesil-PLCε质粒组p65在细胞核中的表达较对照组pGenesil-NP明显下降;BAY11-7082抑制c-Myc和COX-2蛋白的表达($P<0.01$),且呈时间浓度依赖性。**结论** 沉默PLCε基因后可能是通过抑制p65的核转位及c-Myc、COX-2的表达抑制786-0细胞的增殖。

[关键词] 786-0细胞;增殖;磷脂酶Cε;p65核转位;c-Myc;COX-2
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R737.11 [文献标志码] A

Knockdown of PLCε gene inhibits proliferation in human 786-0 renal cancer cells *via* NF-κB/p65 pathway

Yang Xue[1], Ou Liping[1], Wang Xiaorong[1], Wang Yin[1], Wu Xiaohou[2], Luo Chunli[1] ([1]Key Laboratohry of Diagnostics Medicine of Ministry of Education, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Urinary Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of silencing phospholipase Cε (PLCε) gene by RNA interference on the nuclear translocation of p65 and cell proliferation in human 786-0 renal cancer cells. **Methods** A PLCε specific shRNA expression vector pGenesil-PLCε was transfected into 786-0 cells by Lipofectamine 2000. Colony cell survival assay were used to determine effects on cellular proliferation ability after transfection. The expression of PLCε, c-Myc and COX-2 was detected by RT-PCR. The expression of PLCε, c-Myc, COX-2, total p65 and p65 in the nucleus were detected by Western blotting. Immunofluorescence assay was used to detect the location of p65. The expression of c-Myc and COX-2 was also measured by Western blotting after BAY11-7082, an inhibitor of p65, treatment with different doses for different time periods. **Results** 786-0 cells proliferation was inhibited after PLCε shRNA treatment *in vitro*. In 786-0 renal cancer cells, the expression of PLCε, transcription factor p65 in the nucleus and its downstream gene c-Myc and COX-2 was decreased using PLCε specific shRNA ($P<0.01$). Immunofluorescence assay results showed that p65 translocated to the nucleus was suppressed after PLCε shRNA transfection. The expression of c-Myc and COX-2 at protein level were inhibited by BAY11-7082 in a dose- and time-dependent manner ($P<0.01$). **Conclusion** Silencing PLCε inhibits 786-0 cell proliferation *via* inhibiting nuclear translocation of p65 and expression of c-Myc and COX-2.

[**Key words**] 786-0 cells; proliferation; phospholipase Cε; p65 nuclear translocation; c-Myc; COX-2

Supported by the Project of Scientific and Technological Research of Chongqing Committee of Education (KJ080306). Corresponding author: Luo Chunli, Tel: 86-23-68584890, E-mail: luochunli79@126.com

[基金项目] 重庆市教委科学技术研究项目(KJ080306)
[通信作者] 罗春丽,电话:(023)68584890,E-mail:luochunli79@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140807.1604.015.html(2014-08-07)

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是泌尿系统常见的恶性疾病,其发病率占全身恶性肿瘤的2%~3%,目前肾癌发病的分子机制研究仍是泌尿系肿瘤研究的重要课题。磷脂酶Cε(PLCε)是近年来新发现的一种PLC亚型,与其他PLC亚型相比有独特的CDC25结构域和RA结构域,可以被各种小G蛋白调控,包括Ras、Rho和Rap[1]。Bai等[2]报道PLCε$^{-/-}$基因敲除的小鼠在TPA刺激下基底层细胞增殖和表皮的增殖均减弱。NF-κB是一个转录因子家族,包括5个成员,分别是RelA(p65)、RelB、NF-κB1(p50/p105)、NF-κB2(p52/p100)和c-Rel。NF-κB蛋白能够形成同源或异源二聚体,p65/p50最早被发现而且也是存在最广泛的二聚体形式。近年来报道在黑色素瘤[3]和乳腺癌[4]中均发现NF-κB活性增加。在肾细胞癌患者癌组织中NF-κB/p65的表达明显高于癌旁组织,且与肿瘤的分级分期有关[5]。以上研究表明PLCε与NF-κB均与肿瘤的发生、发展有关。因此,本研究将从PLCε与NF-κB/p65核转位的路径,用携带PLCε shRNA基因的真核表达质粒pGenesil-PLCε转染786-0细胞,沉默PLCε基因的表达,深入探讨肾癌细胞发生的分子机制,旨在为肾癌的特异分子靶点治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和质粒 人肾透明细胞癌786-0细胞株由本实验室保存;阴性对照质粒pGenesil-NP、空载质粒pGenesil-EV及PLCε干扰质粒pGenesil-PLCε均由本课题组自行设计、构建及保存[6]。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清购自美国Gibco公司;RPMI1640培养液购自美国Gibco公司;TRIzol和逆转录试剂盒购自TaKaRa公司;Lipofectamine™ 2000购自美国Invitrogen公司;BAY11-7082、蛋白提取及Western blot相关试剂购自上海碧云天公司;PLCε单克隆抗体、p65单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司;环氧化酶-2(COX-2)、c-Myc抗体购自美国Immunoway公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 786-0细胞用含10%胎牛血清的RPMI1640培养液,置37 ℃,含有5% CO_2的细胞培养箱中培养。待细胞融合率达80%~90%时,按Lipofectamine™ 2000转染说明书进行操作。实验分为5组,各组加入试剂分别为:阳性质粒组(pGenesil-PLCε)、阴性质粒组(pGenesil-NP)、空载组(pGenesil-EV)、试剂对照组(等量Lipofectamine™ 2000)和空白对照组。

1.2.2 RT-PCR 用TRIzol提取786-0细胞总RNA,RNA的浓度和纯度用Nanodrop1000 micro-spectrophotometer检测。根据浓度逆转录成cDNA,取1 μL cDNA为模板进行PCR反应。PCR反应条件为:预变性95 ℃ 5 min,变性95 ℃ 30 s,退火54~58 ℃ 30 s,延伸72 ℃ 1 min,30个循环。最后延伸72 ℃ 5 min。取5 μL PCR产物加入1.5%琼脂糖凝胶进行电泳。引物序列见表1。

表1 RT-PCR引物序列及产物长度

基因名称	引物序列(5′→3′)	产物长度(bp)
β-actin	上游 GGGACCTGACTGACTACCTC	543
	下游 ACGAGACCACCTTCAACTCCATC	
PLCε	上游 CATGGAAGGATAAGCGTTGGT	395
	下游 CCCAAGTCCCGTGTTAAGA	
NF-κB	上游 AGCACAGATACCACCAAGACC	415
	下游 GGGCACGATTGTCAAAGAT	
COX-2	上游 TCAAAACCGAGGTGTAT	163
	下游 GTGGGTAAGTATGTAGTGA	
c-Myc	上游 CCTACCCTCTCAACGACAGC	251
	下游 CTCTGACCTTTTGCCAGGAG	

1.2.3 Western blot 质粒转染72 h提取细胞总蛋白,BCA法测蛋白浓度,加入5×Loading buffer煮沸5 min使蛋白变性。取100 μg蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳,转膜至PVDF膜,5%的脱脂奶粉37 ℃封闭1 h,加入相应的一抗4 ℃孵育过夜,TBST洗膜3次,每次8 min,加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗,37 ℃孵育1 h,TBST洗膜3次,每次8 min,之后进行化学发光。

1.2.4 克隆形成实验 786-0细胞以400/孔的密度接种于6孔板,加入含有10%胎牛血清的RPMI1640培养基培养14 d左右,每3天换1次培养基。当6孔板中出现肉眼可见的克隆时,终止培养。弃去上清液,用PBS洗2次,甲醇固定15 min,Giemsa染色30 min。然后用流水缓慢洗去染色液,空气干燥。在显微镜下计数>50个细胞的克隆数,计算克隆形成率:克隆形成率=(克隆数/接种细胞数)×100%。

1.2.5 细胞免疫荧光 将786-0细胞铺于24孔板细胞爬片,设置空白对照组、阳性质粒组(pGenesil-PLCε)和阴性质粒组(pGenesil-NP)。细胞培养48 h后,用-20 ℃预冷的甲醇固定细胞20 min。1% TritonX-100透膜20 min。10%正常山羊血清封闭1 h,用封闭液以1∶200比例稀释p65一抗,4 ℃过夜。用封闭液以1∶200比例稀释荧光二抗,避光37 ℃孵育1 h。在避光的条件下加入DAPI染色15 min,在正置荧光显微镜下观察结果并照相。

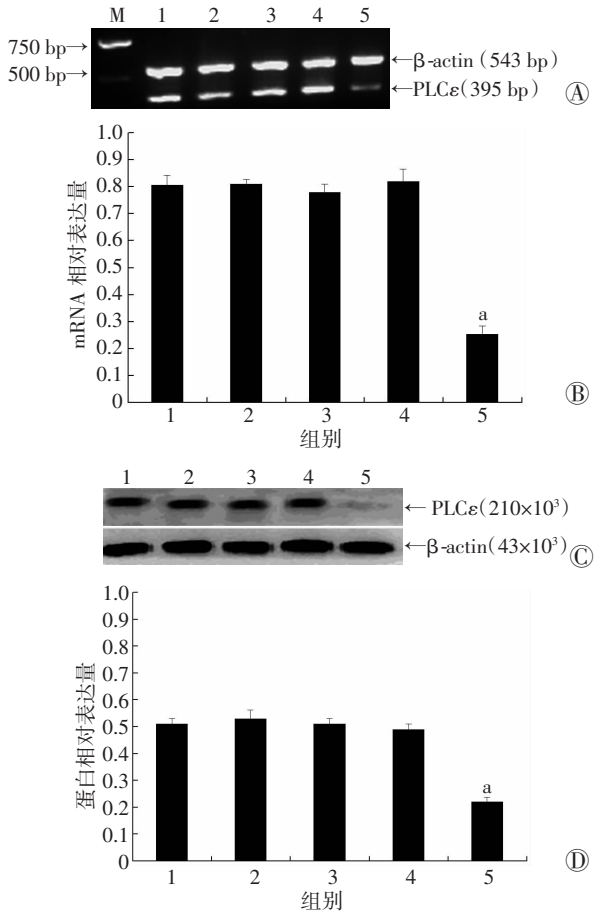
1.3 统计学分析

所有实验重复3次,结果以$\bar{x} \pm s$表示。采用SPSS 17.0统计软件对数据进行单因素方差分析和SNK-q检验。

2 结果

2.1 转染PLCε特异的干扰质粒抑制内源性PLCε mRNA和蛋白水平的表达

转染pGenesil-PLCε组PLCε mRNA和蛋白表达水平显著低于pGenesil-NP组($P<0.01$)。PLCε mRNA和蛋白表达水平均显示空白对照组、pGenesil-EV组、pGenesil-NP组和Lipofectamine™ 2000组无统计学差异($P>0.05$,图1)。

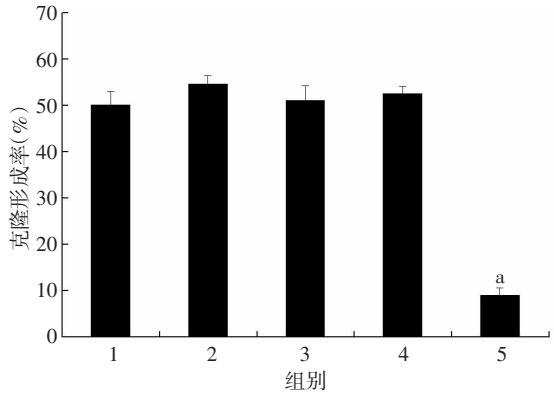


A:RT-PCR 检测结果;B:半定量分析结果;C:Western blot 检测结果;D:半定量分析结果 M:标准;1:空白对照组;2:pGenesil-EV 组;3:Lipofectamine™ 2000 组;4:pGenesil-NP 组;5:pGenesil-PLCε 组 a:$P<0.01$,与 pGenesil-NP 组比较

图1 转染 PLCε 特异的干扰质粒 pGenesil-PLCε 对内源性 PLCε mRNA 和蛋白表达的影响

2.2 转染 PLCε 特异的干扰质粒抑制 786-0 细胞增殖

786-0 细胞分别转染 pGenesil-PLCε 质粒、pGenesil-NP 质粒和 pGenesil-EV 质粒后,克隆形成实验显示转染 PLCε 特异的 pGenesil-PLCε 质粒抑制 786-0 细胞的增殖,克隆形成率 pGenesil-PLCε 组为 9.08%,明显低于 pGenesil-NP 组(52.6%,$P<0.01$),克隆形成率 pGenesil-NP 组、空白对照组(50.09%)、pGenesil-EV 组(54.6%)、Lipofectamine™ 2000 组(51.09%)比较无统计学差异($P>0.05$,图2)。显微镜还观察到每个克隆的细胞数在 pGenesil-PLCε 组明显少于其他组(图3),进一步证明了转染 pGenesil-PLCε 后明显抑制 786-0 细胞的增殖。



1:空白对照组;2:pGenesil-EV 组;3:Lipofectamine™ 2000 组;4:pGenesil-NP 组;5:pGenesil-PLCε 组 a:$P<0.01$,与 pGenesil-NP 组比较

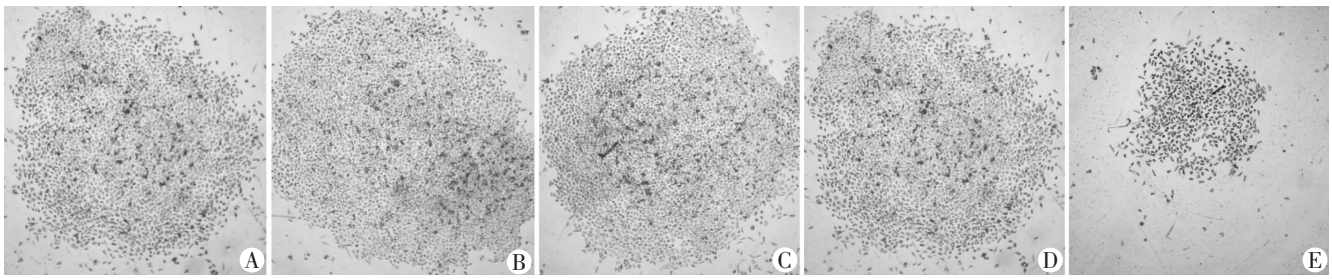
图2 克隆形成实验检测各种质粒转染对 786-0 细胞克隆形成率的影响

2.3 转染 PLCε 特异的干扰质粒抑制了 p65 在细胞核中的表达

786-0 细胞分别转染 pGenesil-PLCε 质粒、pGenesil-NP 质粒和 pGenesil-EV 质粒,72 h 后提取细胞的总蛋白和核蛋白,Western blot 检测总 p65 及细胞核中 p65 的表达。发现转染 pGenesil-PLCε 质粒组 p65 细胞核的表达水平/p65 总的表达水平与转染 pGenesil-NP 组比较明显下调($P<0.01$),结果表明下调 PLCε 的表达能抑制核 p65 的水平,从而抑制转录活性(图4)。

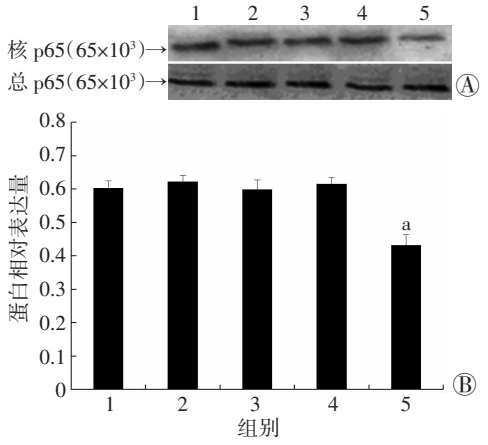
2.4 转染 PLCε 特异的干扰质粒抑制 p65 的核转位

细胞免疫荧光技术检测干扰 PLCε 基因后 p65 在细胞内核浆分布的变化。结果显示,pGenesil-PLCε 组与空白对照组及 pGenesil-NP 组比较细胞核 p65 表达明显受到抑制。表明 PLCε 可以抑制 786-0 细胞 p65 的核转位(图5)。



A:空白对照组;B:pGenesil-EV 组;C:Lipofectamine™ 2000 组;D:pGenesil-NP 组;E:pGenesil-PLCε 组

图3 显微镜观察各组每个克隆的细胞数量 (×40)



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 1:空白对照组;2:pGenesil-EV 组;3:Lipofectamine™ 2000 组;4:pGenesil-NP 组;5:pGenesil-PLCε 组 a:$P<0.01$,与 pGenesil-NP 组比较

图 4 转染 PLCε 特异的干扰质粒 pGenesil-PLCε 对 p65 核转位的影响

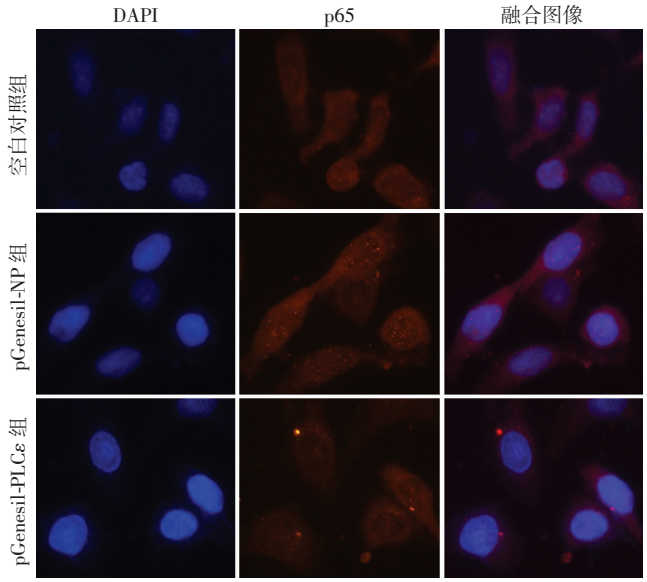
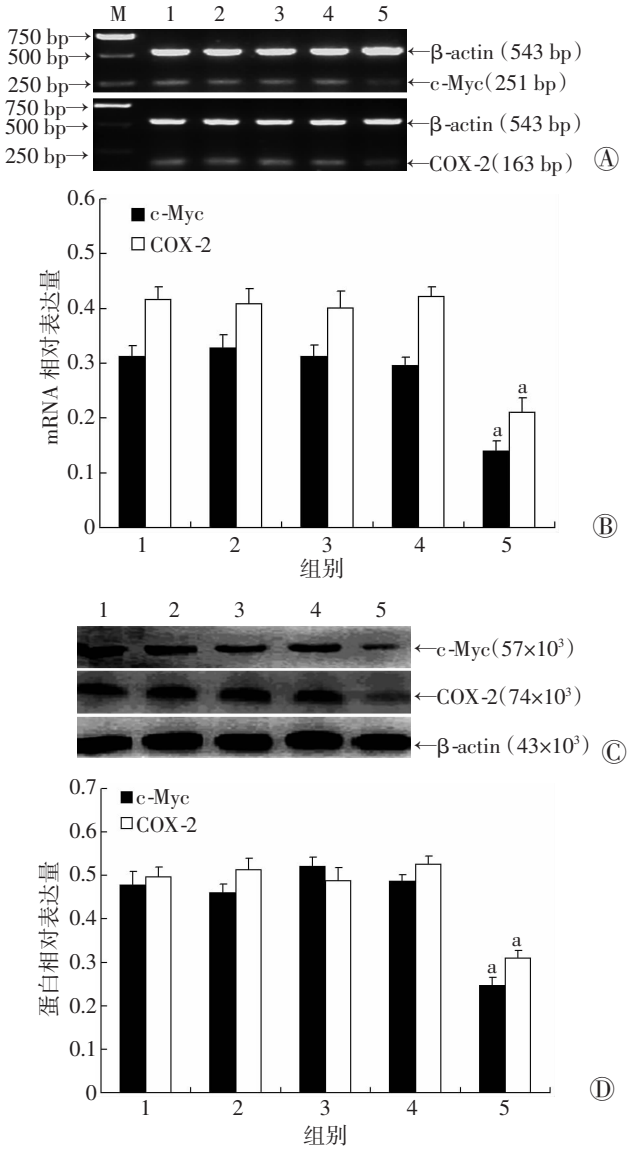


图 5 细胞免疫荧光检测转染 PLCε 特异的干扰质粒 pGenesil-PLCε 后 p65 在胞核和胞质的表达 (荧光显微镜 ×400)

2.5 转染 PLCε 特异的干扰质粒抑制 c-Myc、COX-2 mRNA 和蛋白水平的表达

786-0 细胞分别转染 pGenesil-PLCε 质粒、pGenesil-NP 质粒和 pGenesil-EV 质粒,48~72 h 后分别提取细胞总 RNA 和总蛋白,RT-PCR 和 Western blot 检测转染后 c-Myc 和 COX-2 mRNA 和蛋白的表达。结果显示:转染 pGenesil-PLCε 组 c-Myc 和 COX-2 mRNA 和蛋白显著低于 pGenesil-NP 组($P<0.01$)。c-Myc 和 COX-2 的 mRNA 和蛋白水平均显示空白对照组、pGenesil-EV 组、pGenesil-NP 组和 Lipofectamine™ 2000 组表达无统计学差异($P>0.05$,图 6)。

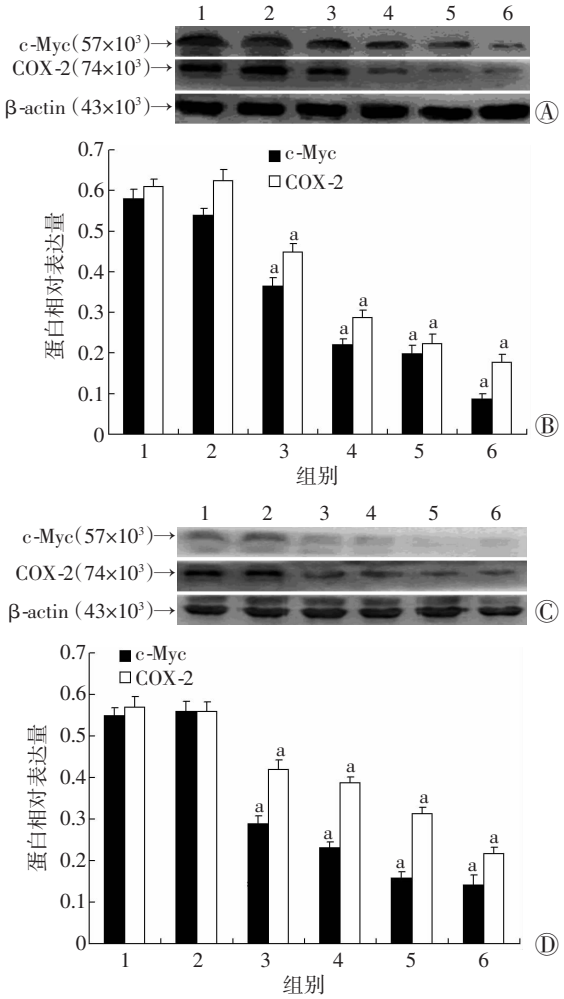


A:RT-PCR 检测结果;B:半定量分析结果;C:Western blot 检测结果;D:半定量分析结果 M:标准;1:空白对照组;2:pGenesil-EV 组;3:Lipofectamine™ 2000 组;4:pGenesil-NP 组;5:pGenesil-PLCε 组 a:$P<0.01$,与 pGenesil-NP 组比较

图 6 转染 PLCε 特异的干扰质粒 pGenesil-PLCε 对 c-Myc、COX-2 mRNA 和蛋白表达的影响

2.6 p65 特异的抑制剂 BAY11-7082 抑制 c-Myc 和 COX-2 的表达

为了检测 c-Myc 和 COX-2 是否参与 p65 信号通路,本实验使用 p65 特异的抑制剂 BAY11-7082 在不同的时间(6、12、24、48 h)与不同的浓度(2、5、7.5、10 μmol/L)处理 786-0 细胞。结果显示 BAY11-7082 处理 6 h 和 2 μmol/L 的浓度时,c-Myc 和 COX-2 的表达明显下调($P<0.01$),而且呈时间浓度依赖性(图 7)。



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 1:空白对照组;2:DMSO 组;3~6:分别为 2、5、7.5、10 μmol/L BAY11-7082 处理 48 h 组;C:Western blot 检测结果;D:半定量分析结果 1:空白对照组;2:DMSO 组;3~6:分别为 10 μmol/L BAY11-7082 处理 6、12、24、48 h 组 a:$P<0.01$,与 DMSO 组比较

图 7 BAY11-7082 对 c-Myc 和 COX-2 蛋白表达的影响

3 讨论

Ras 信号通路的活化是重要的致癌机制之一,Ras 可以通过活化各种信号通路与各种信号分子作用诱导肿瘤发生、发展和侵袭转移。研究证明 PLCε 是 Ras 直接的下游信号分子,PLCε 被激活后水解磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸生成 2 种第二信使:三磷酸肌醇和二酯酰甘油,前者引起细胞内储存钙离子的释放,后者激活蛋白激酶 C(PKC),而后引起细胞内一系列靶蛋白的丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化,从而促进细胞的增殖和分化[7]。研究显示在心肌细胞中,核周围的 PLCε 在心肌肥厚的刺激下在核膜周围产生二酯酰甘油,进而调控核 PKD 的活化和心肌肥厚相关的信号通路[8]。本课题组前期研究发现沉默 PLCε 基因抑制肾细胞癌血管生成[9]。沉默 PLCε 基因抑制膀胱癌 BIU-87 细胞的生长[10],诱导膀胱癌 T24、BIU-87 细胞凋亡[11]。

NF-κB 家族中 p65 的含量最丰富,可以调控下游多种靶基因的转录活性,参与细胞多种重要的生命活动。细胞在静息状态下,细胞质中的 p50/p65 与 IκB 结合成三聚体,处于无活性状态。当细胞受到某些细胞因子、内毒素、有丝分裂原、病毒及其代谢产物等信号刺激时,IKKβ 亚单位被磷酸化,而后引起 IκBα 磷酸化发生降解,p50/p65 释放出来进入细胞核中,与基因上 κB 结合位点特异性结合,进而调控细胞的增殖和分化[12]。有报道显示在结肠直肠癌患者中 KRas 突变可以诱导 NF-κB 活化,KRas 突变和 NF-κB 活化预示着对化疗药物耐受和预后不良[13]。在卵巢癌细胞中溶血磷脂酸(LPA)以 Ras-Raf 依赖的途径活化 NF-κB[14]。在食管鳞状细胞癌患者中 PLCE1 的高表达与 NF-κB 相关蛋白的高表达呈显著正相关,尤其是 IKKβ 和 p50[15]。最近的研究显示凝血酶诱导野生型星形胶质细胞核 NF-κB/p65 升高,而这升高在 PLCε 基因敲除的星形胶质细胞中没有发现[16]。这些结果说明了 PLCε 与 NF-κB/p65 存在一定的关系,提示我们 PLCε 可能通过作用于 NF-κB 进一步调控相关基因的转录。

c-Myc 是 MYC 癌基因家族中最重要的一员,其编码产物 c-Myc 蛋白属核蛋白类,主要通过调控靶基因的转录发挥作用,在细胞周期、细胞增殖、细胞凋亡、肿瘤转移等病理生理过程中发挥重要作用。有研究证实在肾透明细胞癌组织中 MYC 表达上调,用 MYC 特异的干扰 RNA 沉默 MYC 表达明显抑制了肾透明细胞癌细胞增殖能力[17]。COX-2 是催化花生四烯酸转为前列腺素和血栓素的限速酶,它参与机体的各种生理病理过程并且调控细胞生长和增殖。近年来有文献报道 COX-2 在肾细胞癌组织表达明显高于正常组织[18],而且与肿瘤的分期分级及肿瘤大小有关[19]。总之,c-Myc 和 COX-2 均是调控肿瘤细胞生长和增殖重要的基因。BAY11-7082 是 IκB 激酶(IKK)的抑制剂,具有药理学活性包括抗癌、神经保护和抗炎的作用[20]。Bay11-7082 是有效的 IKK 抑制剂,而对 IKK1 和 IKK2 的抑制没有选择性[21]。本实验选择 Bay11-7082 作为 p65 的

抑制剂,观察 Bay11-7082 对 786-0 细胞中 COX-2 和 c-Myc 的作用,进一步探讨下调 PLCε 对 786-0 细胞增殖的影响及其可能的机制。结果显示 Bay11-7082 处理细胞后,COX-2 和 c-Myc 的表达下调并且呈时间浓度依赖性。进一步证实了沉默 PLCε 基因抑制 786-0 细胞的增殖,具体机制可能是沉默 PLCε 基因抑制 p65 的核转位,进而抑制 COX-2 和 c-Myc mRNA 和蛋白的表达。

本研究结果表明 PLCε 基因与肾癌发生、发展密切相关。应用 RNA 干扰技术进一步研究了 PLCε 对肾细胞癌增殖的影响及其可能的机制。研究表明 PLCε 基因沉默具有抑制 786-0 细胞增殖的作用,这一作用机制可能与抑制 p65 核转位及降低 COX-2 和 c-Myc 的表达有关。因此,对 PLCε 基因影响肾癌细胞增殖机制的深入研究,为肾癌的基因治疗提供了新的思路,PLCε/p65 有望成为肾癌新的治疗靶点。

参考文献:

[1] Smrcka A V, Brown J H, Holz G G. Role of phospholipase Cε in physiological phosphoinositide signaling networks[J]. Cell Signal, 2012, 24(6): 1333-1343.

[2] Bai Y, Edamatsu H, Maeda S, *et al*. Crucial role of phospholipase Cepsilon in chemical carcinogen-induced skin tumor development[J]. Cancer Res, 2004, 64(24): 8808-8810.

[3] Janjetovic Z, Brozyna A A, Tuckey R C, *et al*. High basal NF-κB activity in nonpigmented melanoma cells is associated with an enhanced sensitivity to vitamin D3 derivatives[J]. Br J Cancer, 2011, 105(12): 1874-1884.

[4] El-Shinawi M, Mohamed H T, El-Ghonaimy E A, *et al*. Human cytomegalovirus infection enhances NF-κB/p65 signaling in inflammatory breast cancer patients[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55755.

[5] Ozbek E, Aliskan T, Otunctemur A, *et al*. Comparison of tumor grade and stage with nuclear factor kappa b and p38 mitogene activated protein kinase expressions in renal cell cancer[J]. Arch Ital Urol Androl, 2012, 84(2): 53-60.

[6] 郭永灿, 罗春丽, 颜令, 等. PLCε shRNA 质粒构建及功能鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(17): 1657-1660.

[7] Bunney T D, Katan M. Phospholipase C epsilon: linking second messengers and small GTPases[J]. Trends Cell Biol, 2006, 16(12): 640-648.

[8] Zhang L, Malik S, Pang J, *et al*. Phospholipase Cε hydrolyzes perinuclear phosphatidylinositol 4-phosphate to regulate cardiac hypertrophy[J]. Cell, 2013, 153(1): 216-227.

[9] 王春远, 罗春丽, 杨淑哲, 等. PLCε 调节肾细胞癌血管生成的作用机制[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(4): 443-448.

[10] Cheng H, Luo C, Wu X, *et al*. shRNA targeting PLCε inhibits bladder cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*[J]. Urology, 2011, 78(2): 474.e7-474.e11.

[11] Zhang Y, Yan L, Zhao Y, *et al*. Knockdown of phospholipase C-epsilon by short-hairpin RNA-mediated gene silencing induces apoptosis in human bladder cancer cell lines[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2013, 28(3): 233-239.

[12] Huang B, Yang X D, Lamb A, *et al*. Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway[J]. Cell Signal, 2010, 22(9): 1282-1290.

[13] Lin G, Zheng X W, Li C, *et al*. KRAS mutation and NF-κB activation indicates tolerance of chemotherapy and poor prognosis in colorectal cancer[J]. Dig Dis Sci, 2012, 57(9): 2325-2333.

[14] Li H, Ye X, Mahanivong C, *et al*. Signaling mechanisms responsible for lysophosphatidic acid-induced urokinase plasminogen activator expression in ovarian cancer cells[J]. J Biol Chem, 2005, 280(11): 10564-10571.

[15] Cui X B, Pang X L, Li S, *et al*. Elevated expression patterns and tight correlation of the PLCE1 and NF-κB signaling in Kazakh patients with esophageal carcinoma[J]. Med Oncol, 2014, 31(1): 791.

[16] Dusaban S S, Purcell N H, Rockenstein E, *et al*. Phospholipase C epsilon links G protein-coupled receptor activation to inflammatory astrocytic responses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(9): 3609-3614.

[17] Tang S W, Chang W H, Su Y C, *et al*. MYC pathway is activated in clear cell renal cell carcinoma and essential for proliferation of clear cell renal cell carcinoma cells[J]. Cancer Lett, 2009, 273(1): 35-43.

[18] Mungan M U, Gurel D, Canda A E, *et al*. Expression of COX-2 in normal and pyelonephritic kidney, renal intraepithelial neoplasia, and renal cell carcinoma[J]. Eur Urol, 2006, 50(1): 92-97.

[19] Tuna B, Yorukoglu K, Gurel D, *et al*. Significance of COX-2 expression in human renal cell carcinoma[J]. Urology, 2004, 64(6): 1116-1120.

[20] Lee J, Rhee M H, Kim E, *et al*. BAY 11-7082 is a broad-spectrum inhibitor with anti-inflammatory activity against multiple targets[J]. Mediators Inflamm, 2012, 2012: 416036.

[21] Rauert-Wunderlich H, Siegmund D, Maier E, *et al*. The IKK inhibitor Bay 11-7082 induces cell death independent from inhibition of activation of NF-κB transcription factors[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59292.

(**收稿**:2014-03-28;**修回**:2014-05-15)

(编辑 张 维)