

NF- κ B 在大肠腺癌组织中的表达与 大肠腺癌浸润及转移关系的研究

侯峰 郑淑芳 秦晓静 何滔 时丽芳

作者单位:266001 青岛市,青岛大学医学院附属医院(侯峰)

300162 天津市,武警医学院附属医院(郑淑芳 秦晓静 何滔 时丽芳)

通讯作者:郑淑芳, E-mail: zhengshf@126.com

【摘要】 目的 研究核因子- κ B(nuclear factor of κ B, NF- κ B)及核因子- κ B 抑制蛋白(inhibition of κ B, I κ B)在大肠腺癌、大肠管状腺瘤、正常大肠肠黏膜组织中的表达情况,探讨其在大肠腺癌发生、浸润、转移中的作用。**方法** 应用免疫组织化学方法检测 60 例大肠腺癌、23 例大肠管状腺瘤、26 例正常肠黏膜组织中 NF- κ B 蛋白表达情况。应用逆转录聚合酶链法检测 40 例大肠腺癌、15 例正常肠黏膜组织中 I κ B mRNA 的表达情况。**结果** NF- κ B 蛋白在大肠腺癌组织中的阳性表达明显高于大肠管状腺瘤和正常肠黏膜组织,且差异均具有统计学意义(P 均 <0.05);NF- κ B 蛋白表达癌组织侵犯浆膜组显著高于侵犯肌层组,有淋巴结转移组显著高于无淋巴结转移组,且差异均具有统计学意义(P 均 <0.05);I κ B mRNA 在大肠腺癌组织中的表达量显著高于正常肠黏膜,且二者差异有统计学意义($P<0.01$);I κ B mRNA 表达量癌组织侵犯浆膜组显著高于侵犯肌层组,有淋巴结转移组显著高于无淋巴结转移组,且差异均有统计学意义(P 均 <0.01);NF- κ B 蛋白的活化程度和 I κ B mRNA 表达量呈高度正相关($r=0.732, P<0.01$)。**结论** NF- κ B 是大肠腺癌的相关因子,在大肠腺癌的发生、发展及浸润、转移过程中有重要作用。

【关键词】 核因子- κ B;核因子- κ B 抑制蛋白;大肠腺癌;浸润;转移

The research of NF- κ B expression and its relationship with invasion and metastasis in colorectal adenocarcinoma

HOU Feng¹, ZHENG Shu-fang², QIN Xiao-jing², et al. ¹Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University, Qingdao 266001, China ²Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Medical College of the Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China

【Abstract】 Objective To detect the expression of nuclear factor of κ B(NF- κ B) and inhibition of κ B(I κ B) in colorectal adenocarcinoma, large intestine canalicul adenoma and normal intestinal mucosa and to evaluate their roles in carcinogenesis, invasion and metastasis in colorectal adenocarcinoma. **Methods** The expression of NF- κ B was detected by immunohistochemical method in 60 cases of colorectal adenocarcinoma, 23 cases of colorectal adenoma and 26 cases of normal colorectal mucosa. The expression of I κ B mRNA was detected by RT-PCR in 40 cases of colorectal adenocarcinoma and 15 cases of normal colorectal mucosa. **Results** The positive expression of NF- κ B in the colorectal adenocarcinoma were obviously higher than those in the colorectal adenoma and the normal colorectal mucosa and the differences all had statistical significance ($P<0.05$). The positive expression of NF- κ B in infiltrated into chorion were obviously higher than those infiltrated into the muscular layer and in colorectal adenocarcinoma with lymphnode metastasis were obviously higher than those without lymphnode metastasis and the differences all had statistical significance ($P<0.05$). The expression quantity of I κ B mRNA in the colorectal adenocarcinoma were obviously higher than those in the normal colorectal mucosa and the difference had statistical significance ($P<0.01$). The expression quantity of I κ B mRNA in infiltrated into chorion were obviously higher than those infiltrated into the muscular layer and in colorectal adenocarcinoma with lymphnode metastasis were obviously higher than those without lymphnode metastasis and the differences all had statistical significance($P<0.01$). There was positive correlation between the active degree of NF- κ B and expression quantity of I κ B mRNA ($r=0.732, P<0.01$). **Conclusion** NF- κ B is a correlative factor of colorectal adenocarcinoma and may play an important role in tumorigenesis progression, infiltration and metastasis.

【Key words】 NF- κ B; I κ B; Colorectal adenocarcinoma; Invasion; Metastasis

大肠腺癌是最常见的恶性肿瘤之一, 在我国的发生率呈明显上升趋势, 其致死的主要原因是癌细胞的广泛浸润和转移。因此了解大肠腺癌浸润、转移相关的分子调控机制并进行早期干预, 对大肠腺癌治疗疗效的提高、降低其死亡率具有重要意义。

核因子- κ B(nuclear factor of κ B, NF- κ B)是近年来发现的一种分布和作用均十分广泛的真核细胞转录因子。通常以同源或异源二聚体形式与核因子- κ B 抑制蛋白(inhibition of κ B, I κ B)形成复合物, 以非活性的形式存在于胞质中, 当其在相应的活化因素作用下被激活后进入细胞核与相应的靶基因结合, 参与炎症反应、免疫应答、细胞增殖与凋亡等多种病理、生理过程^[1]。本文从蛋白质水平和 mRNA 水平探讨了 NF- κ B 与大肠腺癌发生、浸润、转移的关系, 为大肠腺癌的早期发现、早期干预治疗提供可靠的依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集我院及武警医学院附属医院 2006 年 1 月至 2007 年 5 月间手术切除的大肠腺癌患者(包括结肠腺癌、直肠腺癌)新鲜标本 60 例, 其中男性 35 例, 女性 25 例, 年龄 35~84 岁, 中位年龄 63 岁。同期选取上述大肠腺癌患者距癌组织 6 cm 以远的正常肠黏膜组织 26 例(经病理切片证实无增生性及肿瘤性病变)及手术、内窥镜切除的大肠管状腺瘤 23 例, 立即以 10% 的中性缓冲福尔马林固定, 用于 HE 染色和免疫组化检测。在收集上述福尔马林固定的大肠腺癌标本过程中同时选择手术切除后 30 min 内无污染的新鲜癌组织 40 例, 其中男性 20 例, 女性 20 例, 年龄 40~84 岁, 中位年龄 60.5 岁, 同时留取距癌组织 6 cm 以远的正常肠黏膜组织 15 例(经病理切片证实无增生性及肿瘤性病变), 立即液氮冷冻后移至 -70℃ 冰箱保存备做 RT-PCR 检测。

1.2 方法 取上述福尔马林固定的标本, 常规脱水、包埋、石蜡切片, 分别行 HE 染色、SP 法免疫组化染色(兔抗人 NF- κ B 多克隆一抗为美国 Santa Cruze 公司生产, 二抗为北京中山金桥生物技术公司产品); 取保存于 -70℃ 的新鲜冷冻组织 0.5 g 于无 RNA 酶的 1.5 ml EP 管中, 加入 800 μ l RNA 酶, 用研磨棒将其彻底匀浆, 加入 160 μ l 氯仿, 混匀, 静置, 离心, 上层水相加入等体积的异丙醇, 离心, 去掉上清, 加入乙醇, 离心, 弃上清, 静置后超纯水溶解, 测量 OD 值并保存于 -70℃ 冰箱用于逆转录反应。引物序列设计如下: I κ B cDNA 引物序列: 上游: 5'-CTGTGATCCTGAGCTCCGAGAC-3'; 下游: 5'-GCCC-

CACACTTCAACAGGAGT-3', 扩增片段长度: 321 bp。内参 GAPDH cDNA 引物序列: 上游: 5'-TCATGGGTGTGAACCATGAGAA-3'; 下游: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3', 扩增片段长度: 145 bp。琼脂糖凝胶电泳后通过凝胶成像系统得出电泳带图像。

1.3 结果判定 免疫组化结果判定: NF- κ B 阳性主要表达于肿瘤细胞胞浆和胞核中, 呈黄色细颗粒状。本文主要研究对象是完成核转位、被激活的 NF- κ B, 因此只计数核的阳性表达。阳性判断标准: 每张切片于肿瘤区域随机选取 10 个高倍镜视野($\times 400$, 避开大血管和神经组织), 每个视野按白细胞计数法计数 100 个细胞, 分别按其着色强度与着色细胞数赋分并求其均值。按着色强度: 所计数细胞无着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分; 按阳性细胞所占百分比: 所计数细胞中阳性细胞数 < 5% 为 0 分, 6%~25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, > 76% 为 4 分。两者积分相乘为 0 者为阴性(-), ≥ 1 者为阳性, 其中 1~3 为弱阳性(+), 4~7 为阳性(++), 8~12 为强阳性(+++)^[2-4]。

I κ B mRNA 结果判定: I κ B RT-PCR 产物凝胶电泳后经凝胶成像分析系统处理出现 321 bp 的泳动条带, 相应内参 GAPDH 出现 145 bp 的泳动条带。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。免疫组织化学结果进行秩和检验; RT-PCR 实验结果行独立样本 t 检验, NF- κ B 蛋白的活化程度与 I κ B mRNA 的表达量相关性采用 Spearman 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 60 例大肠腺癌常规 HE 染色结果 60 例大肠腺癌中高中分化 42 例, 低分化 18 例; 侵达肌层 19 例, 侵达浆膜层 41 例; 有淋巴结转移的 29 例, 无淋巴结转移的 31 例。

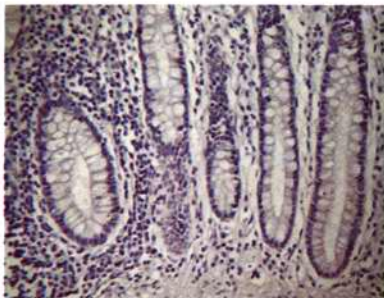
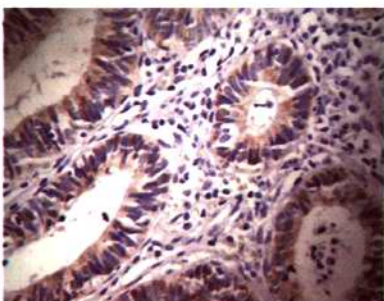
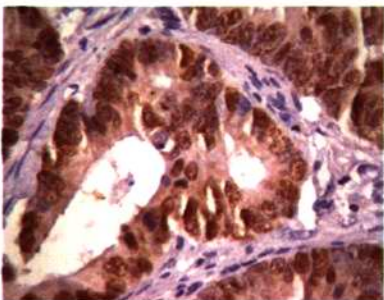
2.2 免疫组织化学结果 NF- κ B 蛋白在大肠腺癌组、大肠管状腺瘤组和正常肠黏膜组中的表达总体比较差异有统计学意义(H 值为 30.742, $P < 0.01$)。其中大肠腺癌较大肠管状腺瘤、正常肠黏膜组织表达显著增高, 差异均有统计学意义(P 均 < 0.05); 大肠管状腺瘤较正常肠黏膜组织表达增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1、图 1-3。

2.3 NF- κ B 蛋白在大肠腺癌中的表达与临床病理的关系 表 2 所示, 60 例大肠腺癌中, NF- κ B 的表达与患者的年龄、性别、癌组织分化程度无关(P 均 >

表 1 NF- κ B 蛋白在不同组织中的表达

组别	例数	NF- κ B			平均秩次	P 值
		-	+	++		
大肠腺癌组(a)	60	9	34	17	67.38	0.019*
大肠管状腺癌组(b)	23	9	11	3	51.22	0.017**
正常肠黏膜组(c)	26	19	6	1	29.77	0.000***

注:* 为 a 与 b 比较;** 为 b 与 c 比较;*** 为 a 与 c 比较

图 1 NF- κ B 蛋白在正常组织中的表达(200 $\times$)图 2 NF- κ B 蛋白在大肠管状腺癌组织中的表达(200 $\times$)图 3 NF- κ B 蛋白在大肠腺癌组织中的表达(400 $\times$)

0.05),但与癌组织浸润深度、淋巴结转移情况有关,即侵达浆膜组和有淋巴结转移组 NF- κ B 蛋白的表达明显高于侵达肌层组和无淋巴结转移组,且差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。

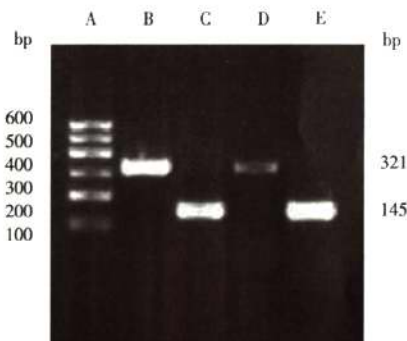
2.4 I κ B mRNA 在大肠腺癌与正常肠黏膜组织中的表达比较 如表 3 所示,大肠腺癌 I κ B mRNA 表达量明显高于正常肠黏膜组织,两组比较差异有统计学意义($P<0.01$),见表 3、图 4-6。

表 2 NF- κ B 蛋白在大肠腺癌中的表达与临床病理的关系

组别	例数	NF- κ B			平均秩次	Z 值	P 值
		-	+	++			
男性	35	6	19	10	30.10	-0.236	0.814
女性	25	3	15	7	31.06		
< 63 岁	30	6	16	8	29.00	-0.748	0.455
≥ 63 岁	30	3	18	9	32.00		
高中分化程度	42	8	24	10	28.48	-1.541	0.123
低分化程度	18	1	10	7	35.22		
浸润达肌层	19	6	10	3	24.08	-2.196	0.028
浸润达浆膜层	41	3	25	13	33.48		
淋巴结有转移	29	1	16	12	36.31	-2.801	0.005
淋巴结无转移	31	8	18	5	25.06		

表 3 I κ B mRNA 在大肠腺癌与正常肠黏膜组织中的表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	I κ B mRNA 表达量	t 值	P 值
大肠腺癌组	40	0.763 $\pm$ 0.317	2.644	0.001
正常肠黏膜组	15	0.518 $\pm$ 0.269		

图 4 I κ B mRNA 在大肠腺癌组织与正常肠黏膜组织中的表达

注:A 为 marker;C、E 为内参 GAPDH mRNA 在腺癌组织、正常黏膜组织中的表达,泳动条带为 145 bp;B、D 为 I κ B mRNA 在腺癌组织、正常黏膜组织中的表达,泳动条带为 321 bp

2.5 I κ B mRNA 在大肠腺癌中的表达与临床病理的关系 表 4 所示,40 例大肠腺癌中,I κ B mRNA 的表达量与患者的性别、年龄、癌组织分化程度无关(P 均 >0.05),但与癌组织浸润深度、淋巴结转移情况有关,即癌组织侵达浆膜组和有淋巴结转移组 I κ B mRNA 的表达量显著高于癌组织侵达肌层组和无淋巴结转移组,且差异均具有统计学意义(P 均 <0.01)。

2.6 NF- κ B 蛋白表达的活化程度与 I κ B mRNA 表达的关系 如表 5 所示,在 40 例大肠腺癌组织中,

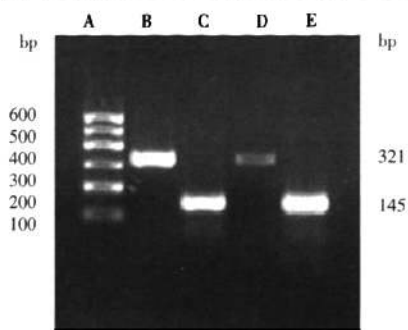


图 5 IkB mRNA 在淋巴结转移组与无淋巴结转移组中的表达

注: A 为 marker; C、E 为内参 GAPDH mRNA 在有淋巴结转移组、无淋巴结转移组中的表达, 泳动条带为 145 bp; B、D 为 IkB mRNA 在有淋巴结转移组、无淋巴结转移组中的表达, 泳动条带为 321 bp

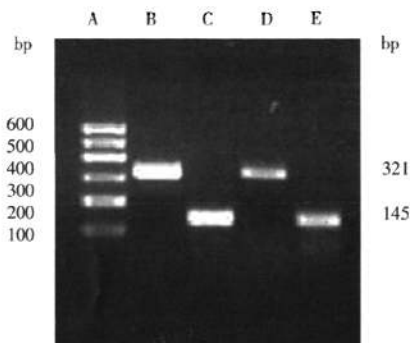


图 6 IkB mRNA 在侵达浆膜组与侵达肌层组中的表达

注: A 为 marker; C、E 为内参 GAPDH mRNA 在侵达浆膜组、肌层组中的表达, 泳动条带为 145 bp; B、D 为 IkB mRNA 在侵达浆膜组、肌层组中的表达, 泳动条带为 321 bp

随着 NF- κ B 蛋白核表达量的增加, 即 NF- κ B 蛋白活化程度的增高, IkB mRNA 表达量也逐渐增加, 经 Spearman 等级相关分析, 结果显示 NF- κ Bp65 蛋白的活化程度和 IkB mRNA 表达量呈高度正相关 ($r=0.732, P<0.01$)。

3 讨论

核因子 NF- κ B 系统由 NF- κ B 家族和其抑制体 IkB 家族组成, 通常情况下, 两者结合以无活性的复合物形式存在于胞浆中。当细胞受到肿瘤坏死因子-1、放射线等生物或理化因素的刺激, 导致 IkB 被降解, 使 NF- κ B 从复合物中解离出来并转位于细胞核, 与 DNA 相应的靶基因结合, 从而启动相应基因的转录^[1]。同时 IkB 本身也是一个 NF- κ B 的反应基因, 当胞质中 IkB 被降解导致浓度降低, 这一负反馈信号作用于入核的 NF- κ B 使其上调 IkB 基因转录生成 IkB mRNA, 因此 IkB mRNA 的合成与 NF-

表 4 IkB mRNA 在大肠腺癌中的表达与临床病理的关系

临床病理指标	例数	IkB mRNA 表达量 ($\bar{x} \pm s$)	t 值	P 值
男性	20	0.814 $\pm$ 0.251	0.006	0.995
女性	20	0.815 $\pm$ 0.202		
≤ 61 岁	20	0.816 $\pm$ 0.218	0.049	0.961
> 61 岁	20	0.813 $\pm$ 0.238		
中高分化程度	24	0.788 $\pm$ 0.218	0.898	0.375
低分化程度	16	0.854 $\pm$ 0.236		
浸润达肌层	18	0.679 $\pm$ 0.223	4.093	0.000*
浸润达浆膜层	22	0.926 $\pm$ 0.158		
淋巴结有转移	19	0.954 $\pm$ 0.119	4.576	0.000*
淋巴结无转移	21	0.689 $\pm$ 0.226		

注: * 为浸润达肌层组与浸润达浆膜层组比较; 淋巴结有转移组与淋巴结无转移组比较

表 5 40 例大肠腺癌组织中 NF- κ Bp65 蛋白的活化程度与 IkB mRNA 表达量的关系

NF- κ Bp65 蛋白 表达的活化程度	例数	IkB mRNA 表达量($\bar{x} \pm s$)	r 值	P 值
-	8	0.483 $\pm$ 0.142		
+	20	0.846 $\pm$ 0.152	0.732	< 0.01
++	12	0.982 $\pm$ 0.121		

κ B 活化入核的量呈平行或正比的关系, 通过检测 IkB mRNA 的表达可准确反映入核活化的 NF- κ B 的量^[5]。

本文研究结果发现 NF- κ B 蛋白在大肠腺癌组织中的阳性表达明显高于大肠管状腺瘤和正常肠黏膜组织 (P 均 < 0.05), 癌组织侵达浆膜层组显著高于侵达肌层组 ($P<0.05$), 有淋巴结转移组显著高于无淋巴结转移组 ($P<0.05$); IkB mRNA 在大肠腺癌组织中的表达量显著高于正常肠黏膜组织 ($P<0.01$), 癌组织侵达浆膜层组显著高于侵达肌层组 ($P<0.01$), 有淋巴结转移组显著高于无淋巴结转移组 ($P<0.01$); 经相关性分析: NF- κ B 蛋白的活化程度和 IkB mRNA 表达量呈高度正相关 ($r=0.732, P<0.01$)。IkB mRNA 表达量可以从分子水平上反映 NF- κ B 的活化水平。上述结果提示 NF- κ B 是大肠腺癌的相关因子, 在大肠腺癌的发生发展、浸润、转移过程中发挥重要作用。这与周宇等^[6]应用凝胶电泳迁移率方法检测结肠直肠癌组织、结肠腺瘤、正常结肠组织中 NF- κ B 的活化情况是一致的。

关于 NF- κ B 如何参与大肠癌发生, 其机制可能是: (1) 促进细胞增殖。有研究^[7,8]发现细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1) 启动子上存在 NF- κ B 结合位点, NF-

κB 活化入核后上调 CyclinD1 基因的表达进而促进细胞由 G0/G1 期向 S 期的转化, 促进细胞异常增殖, 从而导致肿瘤的发生。另外 Joyce 等^[9]研究发现细胞周期蛋白 A 基因的转录也能被 NF-κB 激活, 导致细胞异常增殖。(2)抑制细胞凋亡。这可能是 NF-κB 活化后与抗凋亡基因 Bcl-xl 上的位点结合, 上调抗凋亡基因和蛋白的表达, 抑制细胞凋亡, 促进肿瘤生成^[10]。

NF-κB 可能通过以下机制促进大肠腺癌细胞浸润转移:(1)通过上调细胞外基质的降解酶类基因的表达来促进肿瘤的浸润转移。已知基质金属蛋白酶类(matrix metalloprotease, MMPs)、尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase type-plasminogen activator, u-PA)是重要的细胞外基质降解酶类, MMPs 基因启动子区域-600、-615 上有 NF-κB 的结合位点^[11], u-PA 基因启动子区域也有 3 个 NF-κB 的结合位点:-1596~-1588 区, -1865 区, -1835 区^[12], 当 NF-κB 过度活化可更多的与这些位点上的 κB 序列结合, 上调其表达, 进而加速胞外基质的降解, 有利于肿瘤细胞的浸润转移。(2)促进肿瘤血管的生成。有研究^[13,14]表明用 IκB 抑制癌细胞系中 NF-κB 活性, 血管内皮细胞生成因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及 IL-8 的表达量下调, 这提示 NF-κB 活化能促进 VEGF、IL-8 等的表达, 促进肿瘤血管的生成, 从而加速肿瘤的生长、浸润、转移。

总之, 大肠腺癌的发生、发展、浸润、转移是一个极其复杂的演变过程, 涉及多途径多基因的改变。本文通过研究分析核转录因子 NF-κB 与大肠腺癌生物学行为的关系, 探讨其作用机制, 为大肠腺癌的早期发现、早期治疗提供可靠的实验依据, 并期望为其靶向治疗寻找可能的治疗靶点。

4 参考文献

- 1 Xiao CW, Yan X, Li Y, et al. Resistance of human ovarian cancer cells to tumor necrosis factor alpha is a consequence of nuclear factor kappaB-mediated induction of Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-like inhibitory protein. *Endocrinology*, 2003, 144:623-630.
- 2 Agui T, McConkey DJ, Tanigawa N. Comparative study of various biological parameters, including expression of survivin, between primary and metastatic human colonic adenocarcinomas. *Anticancer Res*, 2002, 22:1769-1776.
- 3 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准. *中国癌症杂志*, 1996, 6:229-231.
- 4 Friedmann Y, Vlodavsky I, Aingorn H, et al. Expression of heparanase in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa and stroma: evidence for its role in colonic tumorigenesis. *Am J Pathol*, 2000, 157:1167-1175.
- 5 Beckhove P, Helmke BM, Ziouta Y, et al. Heparanase expression at the invasion front of human head and neck cancers and correlation with poor prognosis. *Clin Cancer Res*, 2005, 8:2899-2906.
- 6 周宇, 叶文桃, 麦海妍. 核因子-κB 活化与结肠直肠癌临床病理关系研究. *实用肿瘤杂志*, 2004, 19:336-338.
- 7 Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, et al. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol*, 1999, 19:5785-5799.
- 8 Hinz M, Krappmann D, Eichten A, et al. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol*, 1999, 19:2690-2698.
- 9 Joyce D, Bouzazh B, Fu M, et al. Integration Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through an NF-kB dependent pathway. *J Biol Chem*, 1999, 274:25245-25249.
- 10 Herrmann JL, Behan AW, Sarkiss M, et al. Bcl-2 suppresses apoptosis resulting from disruption of the NF-kB survival pathway. *Exp Cell Res*, 1997, 237:101-109.
- 11 Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, et al. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kB. *FEBS Lett*, 1998, 435:29-34.
- 12 Tanaka Y, Kobayashi H, Suzuki M, et al. Transforming growth factor-beta1-dependent urokinase upregulation and promotion of invasion are involved in Src MAPK dependent signaling in human ovarian cancer cells. *Biol Chem*, 2004, 279:8567-8576.
- 13 Ichikura T, Tomimatsu S, Ohkura E, et al. Prognostic significance of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in gastric carcinoma. *J Surg Oncol*, 2001, 78:132-137.
- 14 Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost*, 2000, 26:561-569.

(收稿日期:2011-01-26)

(本文编辑:杨军)