论著

文章编号:1000-5404(2008)02-0150-03

NF-κB及bcl-xL在口腔鳞癌引流淋巴结中的表达及意义

余太平,李 勇,王 涛,季 平 (重庆医科大学附属口腔医院口腔颌面外科,重庆 400015)

摘 要:**目的** 研究核转录因子κB(nuclear transcription factor kappaα, NF-κB)及其靶基因bcl-xL在口腔鳞癌引流淋巴结(炎性淋巴结、转移性淋巴结)中的表达及意义。**方法** 将所选口腔鳞癌病例引流淋巴结石蜡标本按病检结果分为炎性淋巴结组、转移性淋巴结组,应用免疫组织化学S-P法,检测NF-κB(p65)及bcl-xL在两组间的表达差异。**结果** NF-κB(p65)在炎性淋巴结、转移性淋巴结中的阳性表达率分别为30.8%、76.9%,两组有显著性差异($P<0.01$);bcl-xL在炎性淋巴结、转移性淋巴结中的阳性表达率分别为33.3%、73.1%,两组有显著性差异($P<0.01$)。**结论** 口腔鳞癌引流淋巴结从炎性淋巴结向转移性淋巴结的转变可能和NF-κB、bcl-xL表达变化有关。

关键词:免疫组织化学;淋巴结;NF-κB;bcl-xL

中图法分类号:R394.3;R730.23;R739.8 **文献标识码**:A

Expressions of NF-κB and bcl-xL in draining lymph nodes of oral squamous cell carcinoma

YU Tai-ping, LI Yong, WANG Tao, JI Ping (Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Stomatology Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400015, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions and the significance of NF-κB and its target gene bcl-xL in the draining lymph nodes of oral squamous cell carcinoma (OSCC). Methods Thirteen paraffin specimens of draining lymph nodes were divided into inflammatory lymph nodes and metastatic lymph nodes by pathological diagnosis. Immunohistochemistry (S-P method) was used to detect the expressions of NF-κB (p65) and bcl-xL. Results The positive rate of NF-κB (p65) was 30.8% in inflammatory lymph nodes, 76.9% in metastatic lymph nodes ($P<0.01$). The positive rate of bcl-xL was 33.3% in inflammatory lymph nodes, 73.1% in metastatic lymph nodes ($P<0.01$). Conclusion The progression from inflammatory lymph nodes of OSCC to metastatic ones may involve the expressions of NF-κB and bcl-xL.

Key words: immunohistochemistry; lymph nodes; NF-κB; bcl-xL

NF-κB是近年来发现的一种多向性的核转录因子,在机体的免疫应答、炎症反应及细胞生长等方面发挥重要作用[1,2]。NF-κB几乎存在于所有细胞中,是由Rel家族构成的二聚体蛋白,故也称为NF-κB Rel家族。在正常情况下,NF-κB与抑制蛋白I-κB结合,以无活性状态存在于细胞质中,但在致炎因子的作用下,I-κB磷酸化而水解,继而NF-κB被激活进入核内,调控其下游抗凋亡基因的生物活性如:bcl-xL的转录和表达,从而抑制肿瘤细胞的凋亡,促进癌症的发生、发展。在炎症相关癌症中NF-κB的这种作用已有很多文献报道,但NF-κB(p65)、bcl-xL在口腔鳞癌炎性引流淋巴结和转移性淋巴结作用的报道不多,因此开展该方面的研究有助于了解口腔鳞癌的转移机制,为生物学治疗提供初步的实验基础。本研究采用免疫组化技术,检测口腔鳞癌引流淋巴结炎性、转移性淋巴结中NF-κB(p65)和bcl-xL蛋白的表达变化,并探讨其在口腔鳞癌从炎性引流淋巴结向转移性淋巴结发展过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取术后病理确诊为口腔鳞状细胞癌且其引流淋巴结包括炎性淋巴结、转移性淋巴结病例13例,其中舌癌7例、颊癌3例、牙龈癌3例;男性8例、女性5例;年龄42~70岁,中位年龄50岁,病例均来自我院病理科2005年10月至2006年10月病理检查标本。

1.2 检测试剂

NF-κB(p65)、bcl-xL单克隆抗体均购自Santa Cruz公司,

基金项目:重庆市自然科学基金([2004]54号)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2004-54)

作者简介:余太平,男,四川省乐山市人,硕士研究生,医师,主要从事口腔颌面外科方面的研究。电话:13883364887, E-mail: ytp8899@yahoo.com.cn

通信作者:李 勇,电话:13062363130

收稿日期:2007-06-04;修回日期:2007-09-09

DAB 和 S-P 免疫组化试剂盒购自北京中山生物技术公司。

1.3　实验方法

NF-κB(p65) bcl-xL 的检测采用免疫组织化学 S-P 法，按 NF-κB(p65)、bcl-xL 产品说明书进行实验操作。将所选病例引流淋巴结石蜡块按手术后病检结果分为炎性淋巴结组、转移性淋巴结组，每组各 13 个石蜡块，每个石蜡块选取切片 12 张，其中 6 张用作 NF-κB(p65)研究、6 张用作 bcl-xL 研究。分别将整个石蜡块全部连续切片，切片厚度为 4 μm，脱蜡水化，3% H_2O_2 去除内源性过氧化物酶，0.01 moL/L 柠檬酸缓冲液微波修复抗原，加一抗 2～8 ℃冰箱过夜，加二抗 37 ℃恒温箱孵育，DAB 显色，苏木精复染，干燥，封片。

1.4　结果判定

bcl-xL 和 NF-κB(p65) 阳性表达：光镜下，阳性细胞的细胞质为棕黄色或棕褐色，细胞着色越深该蛋白的表达越强。bcl-xL 主要定位于淋巴细胞的细胞质内，少部分定位于细胞核，NF-κB(p65)定位于淋巴细胞细胞质和细胞核。结果评估参照 Fromowitz[3] 的综合计分方法，以高倍显微镜计数 5 mm×10 mm 网格微尺内的阳性和阴性细胞数。计数 5 个高倍视野，求出平均每个高倍视野网格内阳性细胞百分率，阳性细胞数＜25% 为阴性(－)；25%～50% 为弱阳(＋)；50%～70 % 为中等阳性(＋＋)；将阳性细胞表达 70% 以上归为强阳性(＋＋＋)，数据处理时将(－)、(＋)记为阴性；(＋＋)、(＋＋＋)记为阳性，分别计算炎性淋巴结、转移性淋巴结中 NF-κB(p65) bcl-xL 的阳性表达率。

1.5　统计学分析

对阳性率采用 SPSS 10.0 统计软件作 χ^2 检验。

2　结果

2.1　NF-κB(p65)和 bcl-xL 在口腔鳞癌引流淋巴结中的表达情况

NF-κB(p65)和 bcl-xL 在多数转移性淋巴结中的阳性表达细胞较炎性淋巴结中的阳性表达细胞多(图 1～4)。为排除淋巴结微转移对实验结果的影响，在读片时若炎性淋巴结中发现转移癌细胞要求重做直到未发现转移癌细胞为止，转移性淋巴结中没有发现转移癌细胞要求重做直到发现转移癌细胞为止。最后符合要求的转移性淋巴结组共 78 张切片中有 60 张 NF-κB(p65)表达阳性，阳性率为 76.9%，符合要求的炎性淋巴结组共 78 张切片中 NF-κB(p65)有 24 张表达阳性，阳性率为 30.8%。符合要求的转移性淋巴结组共 78 张切片中 bcl-xL 有 57 张表达阳性，阳性率为 73.1%，符合要求的炎性淋巴结组共 78 张切片中 bcl-xL 有 26 张表达阳性，阳性率为 33.3%。

分别对炎性淋巴结组和转移性淋巴结组中的 NF-κB(p65)、bcl-xL 阳性表达率差异显著($P<0.01$)，F-κB(p65)、bcl-xL 在转移性淋巴结组中阳性表达率高于炎性淋巴结组($P<0.01$)。见表 1、2。

表 1　NF-κB(p65) 在口腔鳞癌引流淋巴结中的表达情况

病理类型	NF-κB (p65)(＋)	NF-κB (p65)(－)	合计
炎性淋巴结	24	54	78
转移性淋巴结	60[a]	18[a]	78
合计	84	72	156

a：$P<0.01$，与炎性淋巴结组比较

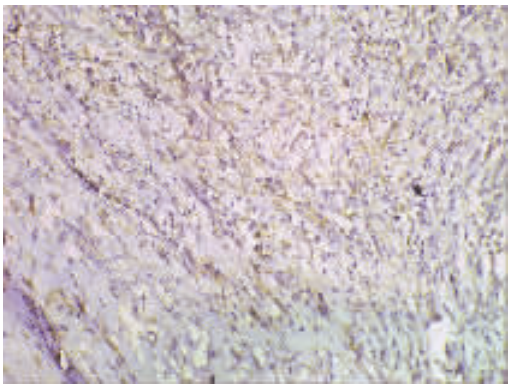


图 1　NF-κB(p65)在转移性淋巴结中的表达　(S-P×400)

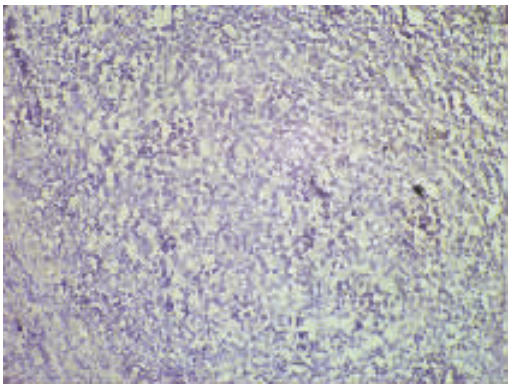


图 2　NF-κB(p65)在炎性淋巴结中的表达　(S-P×400)

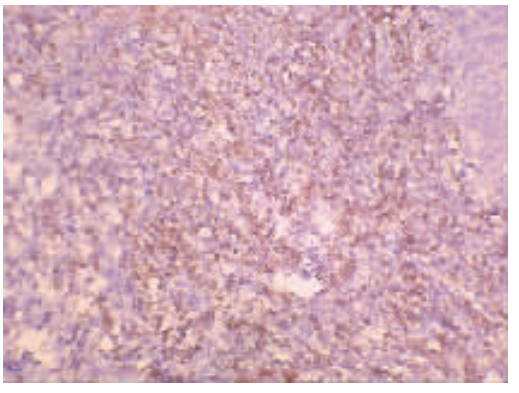


图 3　bcl-xL 在转移性淋巴结中的表达(S-P×400)

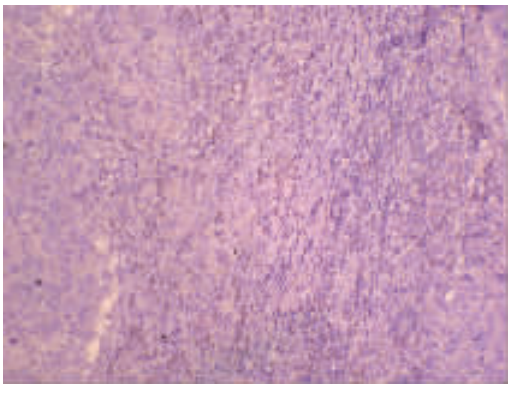


图 4　bcl-xL 在炎性淋巴结中的表达(S-P×400)

表2 bcl-xL 在口腔鳞癌引流淋巴结中的表达情况

病理类型	bcl-xL(+)	bcl-xL(-)	合计
炎性淋巴结	26	52	78
转移性淋巴结	57[a]	21[a]	78
合计	83	73	156

a: $P<0.01$,与炎性淋巴结组比较

3 讨论

Ishigami 等[4]研究发现抗原递呈细胞(树突状细胞)在摄取癌抗原后离开癌组织,迁移至局部淋巴结,将抗原提呈给 T 淋巴细胞并使之激活,启动抗肿瘤免疫应答产生保护性炎性反应,防止肿瘤细胞转移。Bonizz 等[5]研究发现参与免疫应答的细胞因子、细胞黏附因子能激活 NF-κB[6,7]。NF-κB 激活后通过阻断细胞凋亡,促进细胞的增殖,研究表明 NF-κB 在抑制肿瘤细胞凋亡中起到调解作用,除肿瘤细胞外,NF-κB 在多种细胞中都有抗凋亡作用,如 B 细胞、T 细胞等[8]。NF-κB 抑制凋亡的作用可能是通过激活转录其下游抗凋亡基因实现的,如 bcl-xL 是一典型的 NF-κB 靶基因[9],抑制 NF-κB 活化,可大大减少 bcl-xL 的表达。另外,NF-κB 能够调控细胞周期蛋白(比如 cyclin D1 和 CDK2 激酶)的表达,从而影响细胞循环[6,10]。NF-κB 引起肿瘤增生的另一种机制是持续性的活化,NF-κB 的活化发生在抑制性亚基(IκB)降解之后,它从细胞质进入细胞核,在细胞核内 NF-κB 与 DNA 上的 κB 位点结合,调节许多参与机体应激反应的蛋白表达,这些表达最终导致肿瘤的形成[11]。NF-κB 的这些效应使肿瘤细胞增殖和凋亡失衡并向有利于肿瘤细胞积聚的方向倾斜,这样肿瘤细胞就可能在淋巴结内积累、进行繁殖,这可能和口腔鳞癌淋巴结从炎性淋巴结向转移性淋巴结的转变有关。目前还不清楚为何免疫反应既能阻止癌症发展,又能促进癌症发展[11]。

流行病学调查发现炎症和某些癌症密切相关如:肝炎患者肝癌发病率较高、直肠结肠炎患者直肠结肠癌变率较高,据估计有 15% 的癌症是由慢性炎症发展而成。为了找到炎症促进癌症发生、发展的证据,Greten[9]和 Karin 等[1]以结肠炎相关癌症(colitis associated cancer, CAC)小鼠模型研究发现:抑制 NF-κB 活化可以控制小鼠结肠癌的发生、发展。Arsura 等[7]研究发现上皮细胞转移所需的上皮-间质转化需要 NF-κB 蛋白质的作用。对这些实验结果进一步分析显示[2,5] NF-κB 是一种 DNA 连接蛋白,正常情况下位于细胞质中并与抑制物 I-κB (inhiBitor kappa B, IκB)结合因而没有活性,在细胞受到促炎细胞因子和趋化因子刺激后活化,通过抑制细胞凋亡又或引入更多免疫细胞维持炎症、促使血管增生等促进癌症的发生、发展。这些研究提示炎症向癌症发展过程中 NF-κB 产生了重要作用。

NF-κB 家族包括 p50、p52、C-ReL、p65 (ReLA)、ReLB 5 种[12,13],经典 NF-κB 激活途径中 NF-κB (p65)/ p50 的转录能力最强。本实验结果显示口腔鳞癌引流淋巴结转移性淋巴结组中淋巴细胞 NF-κB (p65)和 bcl-xL 表达增强,且可见部分细胞核表达 NF-κB(p65)。这可能和参与抗肿瘤免疫应答的细胞因子、细胞黏附因子激活 NF-κB,使其从细胞质进入到细胞核启动其靶基因如 bcl-xL 的表达增强有关。也可能和活化的 NF-κB 可以促使淋巴细胞如:T 细胞、B 细胞激活和增值有关[13]。Pearson 列联系数分析:NF-κB (p65)、bcl-xL 在炎性淋巴结组、转移性淋巴结组中 r 值分别为 0.937、0.96,提示 NF-κB(p65) 和 bcl-xL 的阳性率与炎性淋巴结、转移性淋巴结有关。提示口腔鳞癌在从炎性淋巴结阶段向转移性淋巴结阶段发展过程中可能与 NF-κB 和 bcl-xL 表达增强有关,这为进一步探讨口腔鳞癌从炎性淋巴结阶段向转移性淋巴结阶段发展过程提供了初步的实验基础。

参考文献:

[1] Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression [J]. Nature, 2006, 441(7092): 431-436.

[2] Marx J. Cancer research. Inflammation and cancer: the link grows stronger[J]. Science, 2004, 306(5698): 966-968.

[3] Fromowitz F B, Viola M V, Chao S, *et al*. Ras p21 expression in the progression of breast cancer[J]. Hum Pathol, 1987, 18(12): 1268-1275.

[4] Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, *et al*. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma[J]. Cancer, 2000, 88(3): 577-583.

[5] Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity[J]. Trends Immunol, 2005, 25(6): 280-288.

[6] Mitchell B S. The proteasome--an emerging therapeutic target in cancer [J]. N Engl J Med, 2003, 348(26): 2597-2598.

[7] Arsura M, Wu M, Sonenshein G E. TGF beta 1 inhibits NF-kappa B/Rel activity inducing apoptosis of B cells: transcriptional activation of I kappa B alpha[J]. Immunity, 1996, 5(1): 31-40.

[8] Chen C, Edelstein L C, Gelinas C. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor bcl-xL [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(8): 2687-2695.

[9] Greten F R, Eckmann L, Greten T F, *et al*. IKKbeta Links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer [J]. Cell, 2004, 118(3): 285-296.

[10] Garg A, Aggarwal B B. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development[J]. Leukemia, 2002, 16(6): 1053-1068.

[11] 候 力, 吕 申, 凌茂英. 细胞凋亡与肿瘤转移[J]. 国外医学:生理、病理科学与临床分册, 2000, 20(3): 207-209.

[12] Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle [J]. cell, 2002, 109(Suppl): S81-S96.

[13] 秦红霞, 马丽华, 韩 冰, 等. 人口腔黏膜白斑和鳞状细胞癌组织中 Caspase-3 的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2006, 41(5): 924-926.

[14] Sha WC. Regulation of immune responses by NF-kappa B/Rel transcription factor[J]. J Exp Med, 1998, 187(2): 143-146.

(编辑 栾 嘉)