论著

文章编号:1000-5404(2011)17-1820-03

连环蛋白P120与NF-κB在肝细胞癌中的表达及其临床意义

张 毅[1],曾 严[1],刘 预[2],邓和军[1],李庆东[1],张杰峰[1],张艳林[1],李伟道[1] (400030 重庆,重庆市肿瘤研究所:肝胆外科[1],中心实验室[2])

[摘要] **目的** 检测肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)中P120ctn的表达与NF-κB活性,分析二者联系及与临床病理因素间的关系。**方法** 采用免疫组化法和Western blot技术分别检测50例HCC中P120ctn的表达及NF-κB活性。**结果** 在HCC中有高比例的NF-κB的激活和P120ctn表达下调(分别为72%和66%);NF-κB的激活与P120ctn表达下调密切相关($r=0.399$,$P<0.05$);二者均与HCC的血管侵犯、有无卫星灶、包膜形成等相关($P<0.05$)。**结论** HCC中存在较高比例的P120ctn表达下调和NF-κB的活性增高,二者有相关性,且均与HCC恶性程度有关。

[关键词] P120ctn;NF-κB;HCC;浸润和转移

[中图法分类号] R735.7; R341; R730.23 [文献标志码] A

Expression of NF-κB and p120ctn in hepatocellular carcinoma and its clinical significance

Zhang Yi[1], Zeng Yan[1], Liu Yu[2], Deng Hejun[1], Li Qindong[1], Zhang Jiefeng[1], Zhang Yanling[1], Li Weidao[1] ([1]Department of Hepatobiliary Surgery, Chongqing Tumor Institute, [2]Central Laboratory, Chongqing Tumor Institute, Chongqing, 400030, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect the p120ctn expression and NF-κB activation in hepatocellular carcinoma (HCC) and analyze their relation with the clinicopathological factors for HCC. **Methods** NF-κB activation and p120ctn expression in 50 patients with HCC were detected by immunohistochemistry and Western blotting, respectively. **Results** The NF-κB activation was up-regulated while the p120ctn expression was down-regulated in HCC (72% *vs* 66%). The NF-κB activation was closely related with the down-regulated p120ctn expression ($r=0.399$, $P<0.05$). The NF-κB activation and p120ctn expression were related with the blood vessel invasion, satellite foci and tumor encapsulation ($P<0.05$). **Conclusion** The up-regulated NF-κB activation is related with the down-regulated p120ctn expression in HCC as well as with the malignancy severity of HCC.

[**Key words**] P120ctn; NF-κB; hepatocellular carcinoma; invasion and metastasis

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2009JJ1298). Corresponding author:Zhang Yi,Tel:86-23-65303859,E-mail:;zhangyi023@yahoo.com.cn.

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)恶性程度很高,早期即可发生血管侵犯和肝内外转移,但相关机制仍不十分清楚。已证实上皮钙粘素(E-cadherin)介导的细胞间黏附在肝癌转移的过程中起着关键作用,它主要通过维持细胞间黏附而抑制肿瘤的转移[1]。连环蛋白P120(P120ctn)目前被认为是调控E-cadherin功能的关键,其缺失会导致E-cadherin被迅速降解[2]。我们在既往的研究中发现,P120ctn表达减少与HCC的侵袭和转移密切相关[3]。新近又发现P120ctn很可能参与NF-κB的活性调节[4]。NF-κB是一类具有多向转录调节作用的核蛋白因子,激活后参与许多基因的转录调控,在感染、炎症反应、肿瘤转移等过程中发挥作用[5]。HCC中也存在着NF-κB的异常激活[6]。据此,我们推测HCC中NF-κB的活性增高与P120ctn的缺失表达可能有关。本研究主要通过免疫组化、Western blot技术探讨HCC中P120ctn表达与NF-κB活性增高是否存在关联,以及二者与HCC不同病理特征如肿瘤大小、分期、转移等之间的关系,为探索HCC的侵袭转移机制提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 临床资料

随机收集重庆市肿瘤医院2008-2010年HCC的手术切除

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2009JJ1298)

[通信作者] 张 毅,电话:(023)65302894,E-mail:zhangyi023@yahoo.com.cn

标本 50 例,男性 38 例,女性 12 例,年龄 31 ~ 65 岁。均经病理确诊,术前未行放化疗。分期依据国际抗癌联盟(UICC)制定的 TNM 分期。肿瘤体积以直径 5 cm 为界分为 2 类。并以同期手术切除的 5 例正常肝组织标本作为阴性对照(男性 3 例,女性 2 例,年龄 22 ~ 48 岁,原发病为肝血管瘤、肝腺瘤、肝胆管结石等),均病理切片证实无癌变。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化检测 P120ctn 表达　采用非生物素化辣根酶标记染色法:鼠抗人 P120ctn 蛋白单克隆抗体购自 BD Clontech(工作浓度 1∶50);PV9000 免疫组化试剂盒、DAB 试剂均为北京中山生物制品公司产品。操作步骤严格按照 PV9000 试剂盒说明书进行,以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2.2 Western blot 检测 NF-κB 活性　参照 Santa Cruz 公司说明书,以其缓冲液分别裂解肝癌组织、癌旁肝组织与正常肝组织得到组织总蛋白。采用 BCA 法进行蛋白定量后,每例标本取总蛋白 50 μg,10% 聚丙烯凝胶电泳分离后电转移到硝酸纤维素膜上,封闭后先加兔抗人 NF-κB P65 多克隆抗体(Santa Cruz),再加辣根过氧化物酶结合的驴抗兔多克隆抗体(Amersham)。用化学发光试剂盒(Amersham)检测杂交信号。

1.3 阳性结果判断

P120ctn 染色评估:评估标准参考文献[7]:显微镜下以细胞膜出现连续棕黄色染色作为阳性判断标准,每例组织切片在 5 个高倍视野下各计数 200 个细胞:①正常表达:膜染色强度与正常肝细胞相同,阳性细胞 >90%;②异常表达:膜表达缺失,或膜阳性细胞 <90%。

NF-κB 活性评估:P65 单克隆抗体只能检测出与 IκB 分离的有活性的 P65 表达,故可用于 NF-κB 活性评估。用密度扫描仪测定条带的面积和灰度值,得出积分灰度值。以积分灰度值代表蛋白的表达量。再计算肿瘤/正常肝组织灰度比值,比值大于 1 表示表达增高,反之则为降低。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行 t 检验和 χ^2 检验,相关性分析采用 Spearman 等级相关分析。

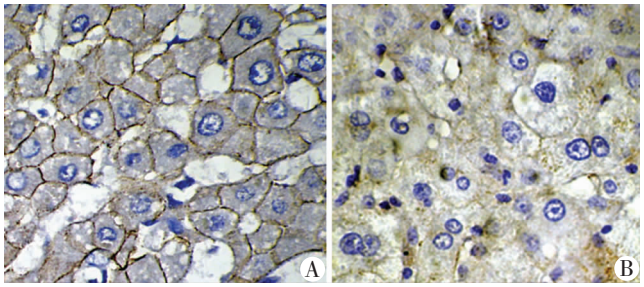
2 结果

2.1 P120ctn 和 NF-κB 在 HCC、正常肝组织的表达情况

免疫组化显示:50 例 HCC 标本有 36 例(72%)P120ctn 膜表达减弱,5 例正常肝组织 P120ctn 均表达正常(图 1)。Western blot 检测结果(图 2)显示:5 例正常肝组织 P65 积分光密度值为(622.09 ± 107.28),以其作为对照,50 例 HCC 标本中 P65 阳性者为 33 例(66%),积分光密度值为(3 224.67 ± 266.15)。两样本 t 检验显示,差异有显著性(P <0.05)。

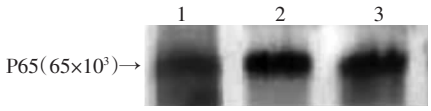
2.2 HCC 中 P120ctn 和 NF-κB 表达的相互关系

由表 1 可见,50 例 HCC 标本中,同时有 P120ctn 表达异常和 NF-κB 活性增高者有 28 例,同时阴性者有 9 例,仅 NF-κB 活性增高者 5 例,仅 P120ctn 表达异常者 8 例。采用 Spearman 相关分析,表明 NF-κB 的激活与 P120ctn 表达下调密切相关(r = 0.399,P <0.05)。



A:正常肝组织;B:HCC 组织

图 1　正常肝组织和 HCC 组织的 P120ctn 免疫组化检测　(PV9000 ×400)



1:正常肝组织;2、3:HCC 组织

图 2　Western blot 检测各种组织 NF-κB P65 蛋白表达

表 1　P120ctn 和 NF-κB 表达的关系

NF-κB 活性	P120 表达		合计
	正常	异常	
增高	5(15.2%)	28(84.8%)	33
正常	9(58.8%)	8(41.2%)	17
合计	14	36	50

2.3 P120ctn 和 NF-κB 的表达与 HCC 的临床病理特征关系

由表 2 可见,P120ctn 的表达下调及 NF-κB 活性增高与 HCC 的卫星灶形成、有无包膜、是否血管侵犯等相关,而与性别、年龄、肿瘤直径、TNM 分期、淋巴浸润等无关。

表 2　P120ctn 和 NF-κB 表达与 HCC 临床病理因素关系

临床病理参数	例数	P120ctn(%)		NF-κB(%)	
		异常表达	P 值	活性增高	P 值
性别					
男	38	28(73.7)	0.637	24(63.0)	0.450
女	12	8(66.7)		9(75.0)	
年龄(岁)					
<50	28	17(61.0)	0.020	16(57.0)	0.136
≥50	22	19(86.0)		17(77.3)	
肿瘤直径					
<5 cm	11	7(64.0)	0.484	6(54.5)	0.364
≥5 cm	39	29(74.0)		27(69.2)	
包膜					
有	19	10(52.6)	0.017	9(47.4)	0.029
无	31	26(83.9)		24(77.4)	
淋巴浸润					
有	15	13(76.9)	0.131	12(80.0)	0.171
无	35	23(62.5)		21(60.0)	
卫星灶					
有	27	23(85.2)	0.024	22(81.5)	0.012
无	23	13(56.5)		11(47.8)	
血管侵犯					
有	29	24(82.8)	0.046	25(86.2)	0.000
无	21	12(57.1)		8(66.7)	
分期					
Ⅰ/Ⅱ	19	11(57.9)	0.082	9(54.5)	0.162
Ⅲ/Ⅳ	31	25(80.6)		24(72.2)	

3 讨论

作为 E-cadherin 复合体的一员,已证实 P120ctn 重要功能之一就是在蛋白质水平维持 E-cadherin 的数量[8]。同时 P120ctn 还是 SRC 激酶的底物,SRC 家族的 EGF、VEGF 等均能使之磷酸化[9]。这些膜受体涉及促有丝分裂信号转导过程,因而 P120ctn 的表达及功能状态改变很可能带来与肿瘤转移相关的多种下游效应。

最近就证实 P120ctn 参与 NF-κB 的活性调节。P120 基因敲除小鼠出现脱发、皮肤慢性炎性改变,原因被证实为 NF-κB 的激活,而应用 NF-κB 抑制剂可以逆转小鼠的上述异常病理改变[10]。在支气管上皮细胞中,P120 还可通过降低 NF-κB 活性抑制脂多糖诱导的炎性反应[11]。

NF-κB 包含 P50 和 P65 两个亚基,静息状态下,二者与抑制蛋白 IκB 结合成无活性的三聚体[12]。当细胞受到致癌物等细胞外信号刺激时,蛋白激酶被激活,IκB 磷酸化并降解,从而释放 NF-κB 二聚体,使其得以转位进入细胞核中,参与许多基因的转录调控,在感染、炎症反应、细胞凋亡等过程中发挥作用[13]。已经证实包含 HCC 在内的多种肿瘤组织中存在着 NF-κB 的异常激活[14]。

因此,在本次实验中,我们探讨 P120ctn 异常表达与 NF-κB 激活是否相关,以及二者与 HCC 临床病理特征之间的联系。在本组 50 例 HCC 组织标本中,我们发现在 HCC 中有高比例的 NF-κB 的激活和 P120ctn 表达下调(分别为 72% 和 66%),经 Spearman 相关分析,二者有显著的相关性($P<0.05$)。据此,我们推测 HCC 中 NF-κB 的活性增高可能与 P120ctn 的缺失表达有关,多种细胞内外刺激信号可能通过 P120ctn 参与 NF-κB 的调节,其表达减少可能是肿瘤细胞 NF-κB 活性增高的重要原因。

NF-κB 的激活和 P120ctn 表达下调均与 HCC 的卫星灶形成、有无包膜、是否血管侵犯等相关($P<0.05$)。表明此 2 项指标有预测 HCC 转移和判断预后的潜在价值。而肿瘤分期越晚、分化越低,及伴随淋巴结转移者,NF-κB 的激活和 P120ctn 表达下调亦更常见,尽管尚无统计学意义,我们推测可能是统计样本量较小造成。

P120ctn 在 E-cadherin 介导的细胞黏附和信号转导起着至关重要的调节作用,与其结合或有功能联系的蛋白都属于肿瘤相关基因,如 Src 家族激酶、受体酪氨酸激酶等,提示 P120ctn 与肿瘤关系密切。NF-κB 的激活机制是一个复杂的过程,多种细胞外刺激信号可激活 NF-κB,如细胞因子 IL-1、TNF-α、脂多糖、病毒、活性氧自由基等等。进一步探讨 P120ctn 异常表达与 NF-κB 激活之间的关系,以及在 HCC 转移过程中扮演何种角色显然具有十分重要的意义。

参考文献:

[1] Lee H J, Su Y, Yin P H, *et al*. PPAR(gamma)/PGC-1(alpha) pathway in E-cadherin expression and motility of hepG2 cells[J]. Anticancer Res, 2009, 29(12): 5057-5063.

[2] Davis M A, Ireton R C, Reynolds A B. A core function for P120-catenin in cadherin turnover [J]. J Cell Biol, 2003, 163(3): 525-534.

[3] 张毅, 朱谨, 杨占宇, 等. 连环蛋白 P120 在肝细胞癌中的表达及其意义[J]. 消化外科, 2006, 5(6): 431-434.

[4] Perez-Moreno, Davis M A, Wong E, *et al*. P120-catenin mediates inflammatory responses in the skin[J]. Cell, 2006, 124(6): 631-644.

[5] Kearns J D, Hoffmann A. Integrating computational and biochemical studies to explore mechanisms in NF-kappaB signaling [J]. J Biol Chem, 2009, 284(2): 5439-5443.

[6] Arsura M, Cavin L G. Nuclear factor-kappaB and liver carcinogenesis [J]. Cancer Lett, 2005, 229(2): 157-169.

[7] Yap A S. The morphogenetic role of cadherin cell adhesion molecules in human cancer: a thematic review[J]. Cancer Invest, 1998, 16(4): 252-261.

[8] Soto E, Yanagisawa M, Marlow L A, *et al*. p120 catenin induces opposing effects on tumor cell growth depending on E-cadherin expression [J]. J Cell Biol, 2008, 183(4): 737-749.

[9] Dohn M R, Brown M V, Reynolds A B. An essential role for p120-catenin in Src- and Rac1-mediated anchorage-independent cell growth [J]. J Cell Biol, 2009, 184(3): 437-450.

[10] Perez-Moreno M, Song W, Pasolli H A, *et al*. Loss of p120 catenin and links to mitotic alterations, nflammation, and skin cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(40): 15399-15404.

[11] Wang M, Li N, Li J, *et al*. Involvement of p120 in LPS-induced NF-kappaB activation and IL-8 production in human bronchial epithelial cells[J]. Toxicol Lett, 2010, 195(1): 75-81.

[12] Gadjeva M, Tomczak M F, Zhang M, *et al*. A role for NF-kappa B subunits p50 and p65 in the inhibition of lipopolysaccharide-induced shock [J]. J Immunol, 2004, 173(9): 5786-5793.

[13] Simmonds R E, Foxwell B M. Signalling, inflammation and arthritis: NF-kappaB and its relevance to arthritis and inflammation[J]. Rheumatology (Oxford), 2008, 47(5): 584-590.

[14] Biswas S K, Lewis C E. NF-kappaB as a central regulator of macrophage function in tumors[J]. J Leukoc Biol, 2010, 88(5): 877-884.

(收稿:2011-03-31;修回:2011-04-14)

(编辑 汪勤俭)