基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1654-04

喉鳞癌中 NFκB p65 和 PTEN 的表达及临床意义

黄 闯[1],姜振东[2],冯亚瑾[2],王洪鹏[1],陈鸿雁[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016;2.第三军医大学附属西南医院耳鼻咽喉科,重庆 400038)

【摘 要】目的:探讨核因子 κBp65(Nuclear factor-κB p65,NFκB p65)和第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因(Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosometen,PTEN)在喉鳞癌组织中的表达及意义。方法:采用免疫组化法检测 52 例喉鳞癌组织及 30 例癌旁正常组织中 NFκB p65 和 PTEN 的表达。结果:喉鳞癌中 NFκB p65 表达明显高于癌旁正常组织($P<0.01$),NFκB p65 的表达水平与喉鳞癌的 T 分期、淋巴结转移及临床分期密切相关($P<0.05$)。喉鳞癌中 PTEN 表达明显低于癌旁正常组织($P<0.01$),PTEN 的表达水平与喉鳞癌的 T 分期、淋巴结转移及临床分期密切相关($P<0.05$)。NFκB p65 和 PTEN 蛋白在不同年龄、不同性别、不同临床分型及不同病理分级的喉鳞癌组织中表达差异无统计学意义($P>0.05$)。NFκB p65 和 PTEN 在喉鳞癌中的表达呈负相关($r_s=-0.580$,$P<0.01$)。结论:NFκB p65 的高表达及 PTEN 的缺失表达与喉鳞癌的发生、发展有关,二者有可能成为判断喉鳞癌侵袭能力及预后评估的参考指标。

【关键词】喉肿瘤;免疫组织化学;NFκB p65;PTEN

【中国图书分类法分类号】R246.81 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-02-18

Expression and clinicopathological significance of NF κ B p65 and PTEN in laryngeal squamous cell carcinoma

HUANG Chuang, et al

(*Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of NFκB p65 and PTEN in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) and their clinical significance. *Methods*: Immunohistochemical staining was used to examine the expression of NFκB p65 and PTEN in 52 cases of LSCC and 30 cases of adjacent normal tissues. *Results*: The expression positive rates of NF κ B p65 in LSCC were obviously higher than those in adjacent normal tissues($P<0.01$), the positive intensities of NFκB p65 was associated with T Stage, lymph node metastasis and clinical stage($P<0.05$).The expression positive rates of PTEN in LSCC were obviously lower than those in adjacent normal tissues($P<0.01$); the positive intensities of PTEN was associated with T Stage, lymph node metastasis and clinical stage($P<0.05$). The positive expression of NFκB p65 and PTEN were not related with the age, gender, primary site, and differentiation of LSCC patients($P>0.05$). The Spearman analysis indicated that the expression level of NFκB p65 was negatively correlated with that of PTEN significantly($r_s=-0.580$, $P<0.01$). *Conclusion*: The higher expression of NFκB p65 and PTEN loss are associated with pathogenesis and development of LSCC. The two markers may be useful for predicting invasion and metastasis ability and prognosis of LSCC.

【Key words】Laryngeal neoplasms; Immunohistochemistry; NFκB p65; PTEN

核因子 κBp65(Nuclear factor-κB p65,NFκB p65)是一类广泛存在于细胞中的多显性核转录因子,可调控细胞增殖、分化、凋亡及恶性转化[1]。第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因(Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten,

作者介绍:黄 闯(1980-),男,硕士,研究方向:头颈肿瘤。

通讯作者:陈鸿雁,女,教授,E-mail:cqchenhongyan@126.com。

参 考 文 献

[1] 廖子君.现代肿瘤药物治疗学[M].第 1 版.西安:世界图书出版公司,2002,103-112.

[2] Chami M, Prandini A, Campanella M, et al. Bcl-2 and Bax exert opposing effect on Ca^{2+} signaling, which do not depend on their putative pore-forming region [J]. J Biol Chem,2004,279(52):54581.

[3] Linjawi A,Kontogiannea M,Halwani F,et al.Prognostic significance of p53, Bcl-2, and Bax expression in early breast cancer[J].J Am Coll Surg,2004,198(1):83.

[4] 王晓薇,郭炳麟,商中华.bcl-2 和 bad 蛋白表达与乳腺癌相关性研究[J].中华普通外科杂志,2004,19(9):56.

[5] Tanabe K, Kim R, Inoue H, et al. Isense Bcl-2 and HER-2 oligonucleotide treatment of breast cancer cells enhances their sensitivity to anticancer drugs[J].Int J Oncol, 2003,22(8):875-881.

(责任编辑:冉明会)

PTEN)是迄今发现的第 1 个具有双向特异性磷酸酶活性的抑癌基因，在细胞生长、增殖、分化、粘附、凋亡及细胞周期进展等过程中发挥着重要作用，与肿瘤的发生发展和临床预后等密切相关[2]。喉癌是头颈部常见恶性肿瘤，关于喉鳞癌中 NFκB p65、PTEN 表达情况的联合研究，国内外少见报道。我们采用免疫组化法检测喉鳞癌组织中 NFκB p65 和 PTEN 蛋白的表达情况，以探讨二者在喉鳞癌发生发展中的作用及其与患者临床病理参数之间的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

有明确病理学诊断的 52 例喉鳞状细胞癌组织和相应的 30 例癌旁正常组织，随机取自重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科 2000 年 1 月 ~2002 年 12 月住院手术病人。所有病例均是首次手术，术前均未行放、化疗。其中男 48 例，女 4 例，年龄 40 ~ 79 岁，平均 61.4 岁。按 1997 年国际抗癌联盟（International union against cancer）临床分期标准，T_1 期 11 例，T_2 期 18 例，T_3 期 16 例，T_4 期 7 例；有颈部淋巴结转移者 19 例，无颈部淋巴结转移者 33 例；Ⅰ期 7 例，Ⅱ期 14 例，Ⅲ期 22 例，Ⅳ期 9 例；声门上型 12 例，声门型 24 例，声门下型 5 例，跨声门型 11 例；高分化鳞癌 31 例，中分化鳞癌 12 例，低分化鳞癌 9 例。所有切除手术标本均置 10%甲醛固定后常规石蜡包埋。

1.2 主要试剂

兔抗人 PTEN 多克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。兔抗人 NFκB p65 多克隆抗体、即用型 SABC 免疫组化试剂盒（SA1022）及 DAB 显色剂均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 免疫组化染色

将已石蜡包埋的样本组织 4 μm 厚度连续切片，经常规脱蜡水化后，3%H_2O_2 去除内源性过氧化物酶，高温高压抗原修复，其余步骤严格按照 SABC 试剂盒说明书进行，DAB 显色，苏木精对比染色，光学显微镜观察。用已知 *NFκB p65* 阳性和 PTEN 阳性的乳腺癌组织切片作阳性对照，PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定

NFκB p65 蛋白阳性信号定位于细胞质，少数位于细胞核，呈棕黄色。PTEN 蛋白阳性信号定位于细胞质，呈棕黄色。随机选择 10 个高倍视野，计数 1 000 个细胞，计算 NFκB p65、PTEN 阳性细胞百分率。无阳性细胞为 -；阳性细胞数≤25%为 +；阳性细胞数 25% ~ 50%为 ++；阳性细胞数>50%为 +++。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理，等级资料采用 Mann-Whitney U 检验和 Kruskall-Wallis 检验，因素相关性分析用 Spearman 等级相关分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 喉鳞癌组织及癌旁正常组织中 NFκB p65 和 PTEN 蛋白的表达（表 1，图 1~4）

本实验 52 例喉鳞癌组织中，*NFκB* p65 阳性表达率为 78.8%（41/52），30 例癌旁正常组织中 NFκB p65 阳性表达率为 20.0%（6/30），喉鳞癌组织中 NFκB p65 的阳性率显著高于癌旁正常组织（$P<0.01$）。52 例喉鳞癌组织中，PTEN 阳性表达率为 55.8%（29/52），30 例癌旁正常组织中 PTEN 阳性

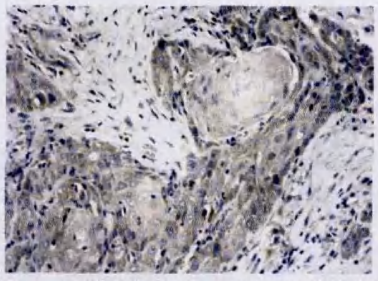


图 1 喉鳞癌组织中 NFκB p65 强阳性表达（SABC×400）

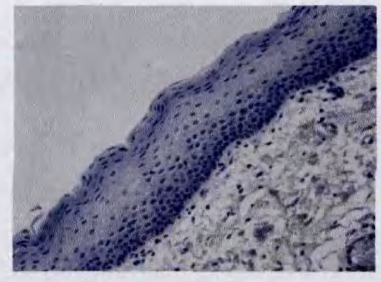


图 2 癌旁正常组织中 NFκB p65 阴性表达（SABC×400）

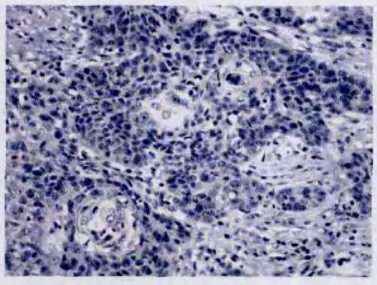


图 3 喉鳞癌组织中 PTEN 弱阳性表达（SABC×400）

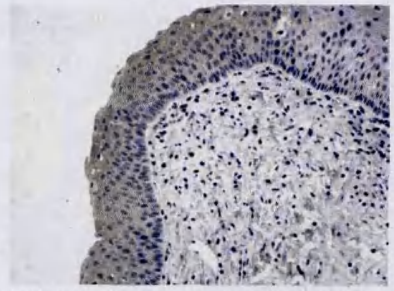


图 4 癌旁正常组织中 PTEN 强阳性表达（SABC×400）

表 1 NFκB p65 和 PTEN 在喉鳞癌组织和癌旁正常组织中的表达及与临床病理特征的关系

临床病理特征	n	NFκB p65				P值	PTEN				P值
		−	+	++	+++		−	+	++	+++	
喉鳞癌组织	52	11	6	13	22	0.000	23	16	9	4	0.000
癌旁正常组织	30	24	4	2	0		1	5	10	14	
年龄											
≥60	24	6	3	7	8	0.274	11	7	5	1	0.799
<60	28	5	3	6	14		12	9	4	3	
性别											
男	48	10	6	11	21	0.704	21	15	8	4	0.812
女	4	1	0	2	1		2	1	1	0	
临床分型											
声门型	24	6	2	6	10	0.875	13	7	3	1	0.306
声门上型	12	2	3	2	5		6	2	3	1	
声门下型	5	2	0	1	2		1	2	0	2	
跨声门型	11	1	1	4	5		3	5	3	0	
病理分级											
高分化	31	7	4	8	12	0.824	15	7	6	3	0.874
中分化	12	2	2	2	6		4	5	3	0	
低分化	9	2	0	3	4		4	4	0	1	
T 分期											
T_1+T_2	29	9	5	5	10	0.037	9	10	6	4	0.018
T_3+T_4	23	2	1	8	12		14	6	3	0	
颈淋巴结转移											
无	33	10	5	8	10	0.007	10	13	7	3	0.020
有	19	1	1	5	12		13	3	2	1	
临床分期											
Ⅰ+Ⅱ	21	7	4	4	6	0.028	6	7	5	3	0.032
Ⅲ+Ⅳ	31	4	2	9	16		17	9	4	1	

表达率为 96.7%(29/30)，喉鳞癌组织中 PTEN 的阳性率显著低于癌旁正常组织(P<0.01)。

2.2 喉鳞癌中 NFκB p65 和 PTEN 蛋白的表达与喉鳞癌临床病理特征的关系(表 1)

NFκB p65 在 T_1~T_2 期喉癌组织表达明显低于 T_3~T_4 期喉癌组织表达(P<0.05)，在无淋巴结转移组表达明显低于有淋巴结转移组(P<0.01)，在临床Ⅰ~Ⅱ期的表达明显低于临床Ⅲ~Ⅳ的表达(P<0.05)。PTEN 在 T_1~T_2 期喉癌组织表达明显高于 T_3~T_4 期喉癌组织表达(P<0.05)，在无淋巴结转移组表达明显高于有淋巴结转移组(P<0.05)，在临床Ⅰ~Ⅱ期的表达明显高于临床Ⅲ~Ⅳ的表达 (P<0.05)。NFκB p65 和 PTEN 蛋白在不同年龄、不同性别、不同临床分型及不同病理分级的喉鳞癌组织中表达差异无统计学意义(P>0.05)。

2.3 NFκB p65 和 PTEN 在喉鳞癌中的相关性分析(表 2)

Spearman 相关分析示 NFκB p65 和 PTEN 在喉鳞癌中的表达呈负相关(P<0.01)。

3 讨 论

NF-κB 是一种核转录因子，它调控的靶基因包括免疫相关受体、细胞因子、炎症因子、粘附分子和急性期蛋白等[3]，在调控免疫细胞的激活、T、B 淋巴细胞的发育、细胞凋亡、肿瘤形成、炎症反应及自身多种免疫性疾病方面发挥重要作用。NF-κB 家族成员主要包括 RelA(p65)、c-Rel、RelB、NF-κB1(p50)和 NF-κB2(p52)，各成员通常以同源或异源二聚体的非活性形式存在于几乎所有细胞的胞质中，其中在哺乳动物中最常见的是 p50p65 二聚体，只有当二聚体被激活后，才从细胞质转位于细胞核发挥重要的作用[4]。多种因素可激活 NF-κB，如肿瘤坏死因子、白介素、生长因子、病毒或细菌及其产物等。活化的 NF-κB 在肿瘤发生发展中的作用机制与它抗

表 2 NFκB p65 与 PTEN 在喉鳞癌组织中表达的相关性

PTEN	NFκB p65				合计
	-	+	++	+++	
-	1	2	7	13	23
+	1	3	5	7	16
++	6	0	1	2	9
+++	3	1	0	0	4
合计	11	6	13	22	52

r_s=-0.580, P=0.000 1

凋亡及促进细胞生长等有关,在一些恶性肿瘤如乳腺癌、结肠癌、头颈鳞癌等发现 NF-κB 的活化[5-7]。

我们的研究显示 NFκB p65 在喉鳞癌中的表达明显高于癌旁正常组织,提示 NFκB p65 的异常表达与喉鳞癌的发生、发展有关,NF-κB 可能通过提高促进细胞增殖和抑制凋亡基因的表达,引起细胞恶性转化。我们的研究还发现 NFκB p65 的表达水平与喉鳞癌的 T 分期、淋巴结转移及临床分期密切相关,表明 NF-κB 的活化可能参与了癌细胞的浸润和转移,其有可能成为癌变风险和癌检测的一个敏感标志物。

PTEN 是目前发现的第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因。通过促进细胞周期终止在 G_1 期或诱导加速细胞凋亡参与细胞生长调节,并在肿瘤细胞浸润、血管发生及肿瘤转移中起一定抑制作用。人体多种正常组织中均可检测出 PTEN 基因蛋白的表达,PTEN 基因在人类肿瘤中的缺失率和突变率与 p53 基因相似[8]。许多肿瘤如恶性胶质瘤、原发性乳腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、鼻咽癌和肝癌等,均发现有 PTEN 的异常,主要表现为基因突变、缺失或甲基化而失活,其 mRNA 或蛋白表达水平降低,甚至不表达[9]。

我们的研究结果显示,PTEN 在喉鳞癌中的表达明显低于癌旁正常组织,表明在喉鳞癌的发生、发展过程中伴随着抑癌基因 PTEN 的表达缺失。我们的研究还发现 PTEN 的表达水平与喉鳞癌的 T 分期、淋巴结转移及临床分期密切相关,提示 PTEN 的失活或突变有助于肿瘤细胞浸润和转移的发生。

本组研究结果亦表明,NFκB p65 与抑癌基因 PTEN 在喉鳞癌中的表达呈负相关。Gustin 等[10]研究发现,PTEN 可抑制磷脂酰肌醇-3-羟基激酶的功能,减少肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor,TNF)对丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt)和 IκB 激酶复合物(IkappaB kinase complex,IKK)的激活,进而抑制 NF-κB DNA 结合和转录。也有研究[11]认为 PTEN 可直接抑制 NFκB p65 的转录激活活性而抑制促细胞增殖和抗凋亡基因的转录,从而抑制细胞增殖和促进细胞凋亡。

综上所述,NFκB p65 和 PTEN 在喉鳞癌的发生、发展过程中起着不同的作用。联合检测 NFκB p65 和 PTEN,可能有助于对喉鳞癌侵袭转移能力作出评估及预后分析提供依据。

参 考 文 献

[1] Mayo M W, Baldwin A S.The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1470(2): M55-62.

[2] Hopkin K. A surprising function for the PTEN tumor suppressor[J]. Science, 1998, 282(5391): 1027, 1029-1030.

[3] Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle[J]. Cell, 2002, 109(2): S81-96.

[4] Inoue J, Gohda J, Akiyama T, et al. NF-kappaB activation in development and progression of cancer[J].Cancer Sci, 2007, 98(3): 268-274.

[5] Sovak M A, Bellas R E, Kim D W, et al.Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer[J]. J Clin Invest, 1997, 100(12): 2952-2960.

[6] Kojima M, Morisaki T, Sasaki N, et al.Increased nuclear factor-kB activation in human colorectal carcinoma and its correlation with tumor progression[J]. Anticancer Res, 2004, 24(2B): 675-681.

[7] Ondrey F G, Dong G, Sunwoo J, et al.Constitutive activation of transcription factors NF- (kappa)B, AP-1, and NF-IL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines[J]. Mol Carcinog, 1999, 26(2): 119-129.

[8] Cantley L C, Neel B G. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase /AKT pathway[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(8): 4240-4245.

[9] Parsons R. Human cancer, PTEN and the PI-3 kinase pathway[J]. Semin Cell Dev Biol, 2004, 15(2): 171-176.

[10] Gustin J A, Maehama T, Dixon J E, et al.The PTEN tumor suppressor protein inhibits tumor necrosis factor-induced nuclear factor kappa B activity[J]. J Biol Chem, 2001, 276(29): 27740-27744.

[11] Mayo M W, Madrid L V, Westerheide S D, et al. PTEN blocks tumor necrosis factor-induced NF-kappa B-dependent transcription by inhibiting the transactivation potential of the p65 subunit [J]. J Biol Chem, 2002, 277(13): 11116-11125.

(责任编辑:关蕴良)