维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)06-0749-03

喉癌 NF-κB 信号转导通路的免疫组化研究

朱 江[1], 胡国华[1], 孙余才[2]

(1.重庆医科大学临床学院耳鼻咽喉科,重庆 400016;2.山东省济宁医学院附属医院耳鼻咽喉科,山东 272129)

【摘 要】目的:探讨 NF-κB 信号转导通路中的 IKK、IκB、NF-κB P65 在喉癌组织中的表达情况及意义。方法:采用免疫组织化学染色 S-P 法检测 40 例喉癌组织、20 例正常喉粘膜组织的 IKKα、IκBα、NF-κB P65 的表达水平。结果:喉癌组织中 IKKα、NF-κB P65 的表达水平明显高于正常组织,IκBα 的表达水平明显低于正常组织($P<0.05$)。有颈淋巴结转移的喉癌组织中 IKKα、NF-κB P65 表达水平比无转移的喉癌组织表达明显增强、IκBα 表达水平则明显下降($P<0.05$)。结论:NF-κB 信号转导通路可能在喉癌的发生、发展及转移中发挥重要作用。

【关键词】喉癌;IKK;IκB;NF-κB;免疫组织化学

【中国图书分类法分类号】R739.65 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-03-22

Immunohistochemical study of NF-κB signal transduction pathway in laryngeal carcinoma

ZHU Jiang, et al

(*Department of Otolaryngology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the expression and significance of IKK, IκB and NF-κB P65 of NF-κB signal transduction pathway in laryngeal carcinoma patients. *Methods*: The expression of IKKα, IκBα, NF-κB P65 was examined by immunohistochemical S-P method in laryngeal carcinoma tissues of 40 cases and normal laryngeal tissues of 20 cases. *Results*: The expression of IKKα and NF-κB P65 in laryngeal carcinoma tissue was higher compared with normal laryngeal tissue, while the expression of IκBα was lower ($P<0.05$). The expression of IKKα and NF-κB P65 in the carcinoma tissue with neck lymph node metastasis was higher than that without neck lymph node metastasis, but the expression of IκBα was lower ($P<0.05$). *Conclusion*: NF-κB signal transduction pathway may play an important role in occurrence, development and metastasis of laryngeal carcinoma.

【Key words】Laryngeal carcinoma; IKK; IκB; NF-κB; Immunohistochemistry

细胞信号转导是 20 世纪 90 年代以来生命科学研究领域的热点和前沿,该过程是由一系列信息分子参与完成的有序的级联反应。细胞信号转导过程发生障碍或异常,就必然会导致细胞生长、分化、代谢和生物学行为的异常,引起各种疾病,乃至肿瘤的发生。本研究就是采用免疫组化方法,检测喉癌组织中 NF-κB 信号转导通路中 IKKα、IκBα、NF-κB P65 的表达,探讨其在肿瘤中的作用。

1 材料和方法

1.1 一般资料

40 例喉癌组织石蜡标本取自重庆医科大学临床学院 1998~2001 年喉癌患者手术切除标本,其中 13 例发生颈部淋巴结转移。40 例喉癌中男性 37 例,女性 3 例,年龄 45~76 岁,平均 62.5 岁。所有病例均经病理检查证实为鳞状细胞癌,并且未行放疗、化疗。取 20 例喉正常粘膜组织作对照,其中男性 18 例,女性 2 例,年龄 40~73 岁,平均 53 岁。

1.2 试剂与方法

1.2.1 试剂 IKKα 抗体购自美国 Santcloz 公司;IκBα 抗体购自北京中山公司;NF-κB P65 抗体购自武汉博士德生物工程公司;SP 试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司。

1.2.2 方法 采用 S-P 法免疫组化染色技术。主要步骤为:①石蜡切片脱蜡水化;②抗原修复:IKKα 抗体石蜡切片、NF-κB P65 抗体石蜡切片采用 pH=8.0 的 EDTA 组织抗原修复液以水浴加热(94℃~100℃,15~20min)修复,IκBα 抗体石蜡切片应用 pH=6.0 的 0.01mol/L 柠檬酸钠缓冲液采用高温高压法(2 min)修复;③加入过氧化酶阻断溶液后,

作者介绍:朱 江(1968-),男,主治医师,硕士,主要研究方向:头颈部肿瘤基础与临床。

维普资讯 http://www.cqvip.com

室温下孵育 10 min;④PBS 液缓冲后,加入非免疫性动物血清,室温下孵育 10min;⑤加入 1 抗,4℃过夜;⑥加入生物素标记 II 抗体后,室温下孵育 10min。

1.3　结果观察与判断

IKKα、IκBα、NF－κB P65 阳性表达定位于细胞浆,呈黄色颗粒。三者阳性表达水平采用染色强度评分 X 阳性细胞面积评分的积分表示[1]。染色强度分为 4 级。0 级:完全阴性,与背景色一致;1 级:弱阳性染色,淡黄色,略高于背景色;2 级:阳性染色,黄色,明显高于背景色;3 级,强阳性染色,棕褐色。阳性细胞面积分为 4 级。阳性细胞面积/细胞总面积<11% 为 0 级,阳性细胞面积/细胞总面积 11%－50% 为 1 级,阳性细胞面积/细胞总面积 51%－79% 为 2 级,阳性细胞面积/细胞总面积≥80% 为 3 级。两者定性积分表达≥3 分为阳性表达。

1.4　统计学处理

应用统计学软件 SPSS 10.0 处理实验结果,采用秩和检验两样本分析($P<0.05$ 有统计学意义)。

2　结　果

2.1　IKKα 免疫组化染色结果

喉癌组织染色积分阳性 31 例(0 分 8 例,2 分 1 例,3 分 2 例,4 分 5 例,6 分 14 例,9 分 10 例);正常组织染色积分阳性 4 例(0 分 8 例,1 分 4 例,2 分 4 例,3 分 2 例,4 分 2 例)。癌组织与正常组织间表达具有显著性差异($P<0.05$)(见图 1、图 2)。

2.2　IκBα 免疫组织化学染色结果

喉癌组织染色积分阳性 4 例(0 分 10 例,1 分 10 例,2 分 16 例,3 分 2 例,6 分 1 例,9 分 1 例);正常组织染色积分阳性 14 例(0 分 3 例,1 分 1 例,2 分 2 例,3 分 4 例,4 分 2 例,6 分 5 例,9 分 3 例)。癌组织与正常组织间表达有显著性差异($P<0.05$)(见图 3、图 4)。

2.3　NF－κB P65 蛋白免疫组织化学染色结果

喉癌组织染色积分阳性 40 例(6 分 19 例,9 分 21 例);正常组织染色积分阳性 0 例(0 分 10 例,1 分 5 例,2 分 5 例)。癌组织与正常组织间表达有显著性差异($P<0.05$)(见图 5、图 6)。

2.4　喉癌组织 IKKα、IκBα、NF－κB P65 表达与颈淋巴结转移的关系

IKKα 在颈淋巴结转移组中,6 分 8 例,9 分 5 例;在非颈淋巴结转移组中 0 分 8 例,2 分 1 例,3 分 2 例,4 分 5 例,6 分 6 例,9 分 5 例。IκBα 在颈淋巴结转移组中 0 分 7 例,1 分 4 例,2 分 1 例,3 分 1 例;在非颈淋巴结转移组中,0 分 3 例,1 分 6 例,2 分 15 例,3 分 1 例,6 分 1 例,9 分 1 例。NF－κB P65 在颈淋巴结转移组中 6 分 3 例,9 分 10 例,在非颈淋巴结转移组中,6 分 16 例,9 分 11 例。喉癌组织 IKKα、IκBα、NF－κB P65 表达在颈淋巴结转移组和非颈淋巴结转移组有显著性差异($P<0.05$)。

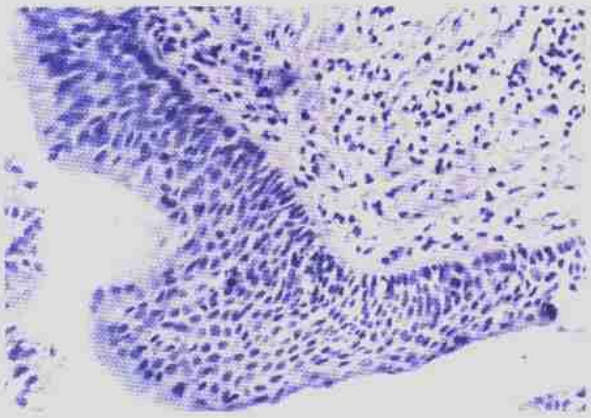


图 1　喉正常鳞状上皮组织中 IKKα 的阴性表达
(免疫组化 SP 法 ×200)

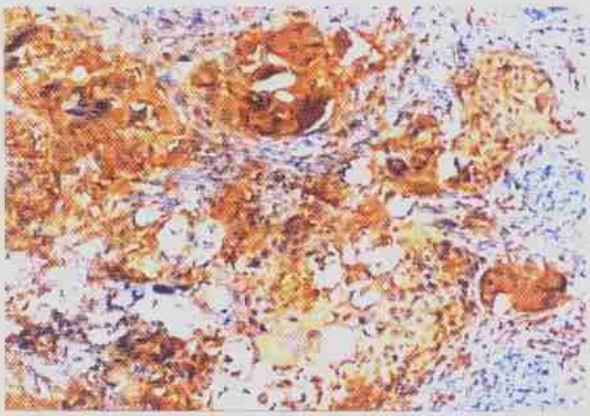


图 2　喉鳞癌组织中 IKKα 的阳性表达
(免疫组化 SP 法 ×100)

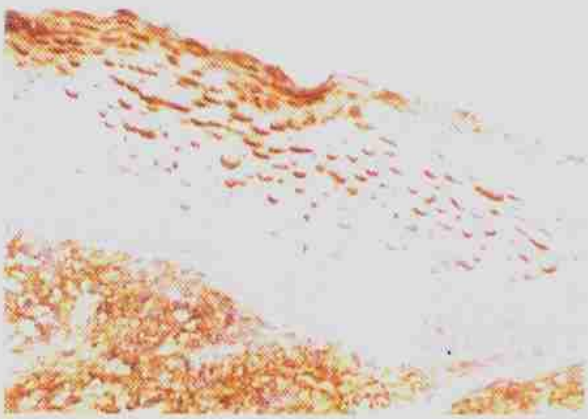


图 3　喉正常鳞状上皮组织中 IκBα 的阳性表达
(免疫组化 SP 法 ×100)

维普资讯 http://www.cqvip.com

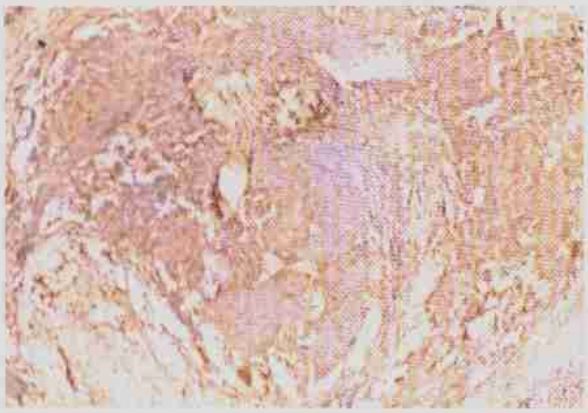


图 4 喉鳞癌组织中 IκBα 的阴性表达
(免疫组化 SP 法 × 100)

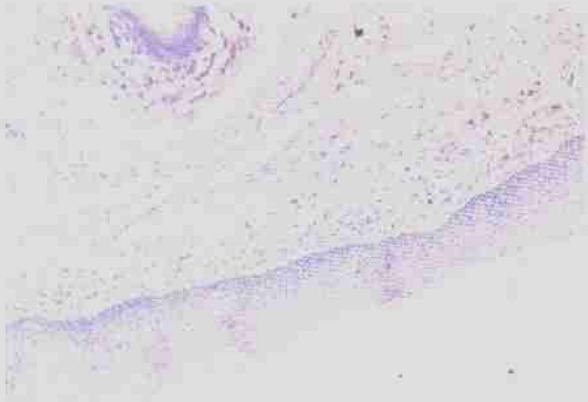


图 5 喉正常鳞状上皮组织中 NF-κB P65 的阴性表达
(免疫组化 SP 法 × 100)



图 6 喉鳞癌组织中 NF-κB P65 的阳性表达
(免疫组化 SP 法 × 200)

3 讨 论

细胞内信号转导通路与肿瘤密切相关,信号转导通路的异常在肿瘤的形成与发展中起着重要作用。NF-κB 信号转导通路是目前研究得较多的一种信号转导通路,它由 IKK、IκB、NF-κB 构成[2,3]。NF-κB 的主要存在形式为 p50 和 p65 组成的二聚体,IκB 是 NF-κB 的抑制蛋白,IκBα 和 IκBβ 为主要与 p50 和 p65 作用的抑制蛋白。在静息状态下,NF-κB 和 IκB 以无活性形式存在于细胞浆中。IKK 是 IκB 激酶,IKK 包括 IKKα、IKKβ、IKKγ。当细胞受到某些细胞外信号刺激时,通过信号转导激活 NF-κB 诱导性激酶(NIK),NIK 激活 IKK,活化的 IKK 通过对 IκB 的磷酸化而使 IκB 与 NF-κB 二聚体解离,致使 NF-κB 释放出来并迅速核易位与相应的 κB 序列结合,从而启动或增强某些基因转录。

肿瘤的发生、发展与 NF-κB 关系密切,目前的研究显示 NF-κB 与肿瘤有以下几方面的关系:(1)癌基因通过 NF-κB 介导的的途径被激活而致癌。(2)NF-κB 通过抑制凋亡途径而致癌。(3)NF-κB 涉及多种生长因子的转录调节,而这些生长因子与肿瘤细胞生长密切相关。(4)NF-κB 参与细胞周期调控,引起细胞周期阻滞,促进细胞增殖,最终使细胞恶性转化癌变。(5)NF-κB 可能激活肿瘤多种耐药基因,使肿瘤细胞逃避有效化疗,进而使肿瘤发展。NF-κB 是 NF-κB 信号转导通路中的关键环节,NF-κB 信号转导通路中的其余环节,包括 IKK、IκB 在肿瘤发生、发展过程中也起重要作用。胞外刺激使 NF-κB 信号转导通路活化,促进肿瘤发生、发展及转移,是肿瘤恶性生物行为的分子基础。现已有较多体外实验证实在恶性肿瘤细胞系 NF-κB 信号转导通路的活化[4-7]。近年来,在人体恶性肿瘤组织中,也有 NF-κB 信号转导通路活化的报道。Nakayama 等[8] 采用免疫组化方法分析 36 例口腔鳞癌病人和 15 例口腔粘膜白斑病人,发现 IKKα、NF-κB P65 在几乎所有口腔鳞癌组织中强阳性表达,并且发现阳性染色强度与癌的侵犯、转移成正相关,而在癌旁组织和口腔粘膜白斑组织中无表达。Nair 等[9] 用 Westernblot 方法分析人宫颈癌组织,发现 IκBα 在癌组织中不能检测到,而在正常组织中能够检测到,并用 EMSA 方法发现 NF-κB DNA 结合活性随着宫颈癌的恶性程度的增加而增加。Tai 等[10] 采用免疫组化、Westernblot、EMSA 等方法也发现 NF-κB P65 表达、NF-κB DNA 结合活性在肝癌组织中比正常组织明显增加,而 IκBα 表达在癌组织中比正常组织明显减少。

本研究采用免疫组化证实在喉癌组织中,NF-κB 信号转导通路的 IKKα、NF-κB P65 的表达较正常喉组织明显增高,IκBα 的表达较正常组织明显降低,说明 NF-κB 信号转导通路的(下转第 758 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

便宜,实验用药剂量小,这可以大大降低科研成本。(3)建立了并行带瓣双静脉自体移植的动物模型。以上发现及技术特点国内外尚未见报道。

尽管原发性下肢深静脉瓣膜关闭不全有多种手术治疗方案,但远期疗效均不是十分理想。该研究设计了一种全新的静脉瓣膜移植的方法,理论上可克服继往手术方式的缺点,并从实验上初步证实了其可行性。使并行带瓣双静脉可能成为下肢慢性静脉功能不全病人的一种可行且很有希望的瓣膜重建的手术方式。我们将进一步从病理、超微结构、生物力学和血液流变学等方面进行研究,为其临床应用奠定理论和实验基础。

参 考 文 献

[1] Raju S, Fredericks R. Valve reconstruction procedures for nonobstructive venous insufficiency: Rationale, techniques, and results in 107 procedures with two - to eight - year follow - up [J]. Vasc Surg, 1988;7:301 - 310.

[2] Tawes RL, Barton ML, Coello AA, et al. Optimal therapy for advanced chronic venous insufficiency[J]. Vasc Surg, 2003; 38(2):411.

[3] Taheri SA, Elias SM. Indications and results of vein valve transplant[J]. Cardiovasc Surg (Torino), 1986;27:163 - 168.

[4] Raju S, Hardy JD. Technical options in venom valve reconstruction[J]. Am J Surg, 1997;173:301.

[5] Hasaniya NW. Phlebology[M]. United Kingdom, 2002; 16/4:142 - 144.

[6] Bush HL Jr, Nabseth DC. Autogenous venous valve transplantation in the dog [J]. J Surg Res, 1982;32(4):313 - 321.

(上接第 751 页)活化与喉癌的发生有关。胞外刺激可能使 IKK 活化,IKK 使 IκB 磷酸化、降解,从而使 NF - κB 活化,促进了肿瘤的发生、发展。本研究还证实了有颈淋巴结转移的喉癌组织 IKKα、NF - κB P65 表达高于无颈淋巴结转移的喉癌组织,IκBα 的表达则相反,提示 NF - κB 信号转导通路可能涉及喉癌的浸润、转移。本研究表明:IKKα 激活/IκB 降解/NF - κB 活化的通路效应可能是喉癌发生、发展的重要机制,NF - κB 信号转导通路可能在喉癌的发生、发展及转移中发挥重要作用。

参 考 文 献

[1] Remmele W, Stegner HE. Immunhistochmischer nachweisvon östrogenrezeptoren (ERICA) in mammakarzinomgewebe: vorschlag zur einheitlichen formulierung des untersuchungsb efundes[J]. Dtsch Arztebl, 1986;83:3362 - 3364.

[2] Baldwin AS Jr. The NF - kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights [J]. Annu Rev Immunol, 1996;14:649 - 683.

[3] Karin M. The beginning of the end: IκB kinase(IKK)and NF - κ B activation[J]. Biol Chem, 1999;274:27339 - 27342.

[4] Gasparian Av, Yao YJ, Kowalczyk D, et al. The role of IKK in constitutive activation of NF - kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells[J]. J Cell Sci, 2002;115:141 - 151.

[5] Tamatani T, Azuma M, Aota K, et al. Enhanced IkappaB kinase activity is responsible for the augmented activity of NF - kappaB in human head and neck carcinoma cells[J]. Cancer - Lett, 2001;171:165 - 172.

[6] Romieu - Mourez R, Landesman - Bollag E, Seldin DC, et al. Roles of IKKkinases and protein kinase DK2 in activation of nuclear factor - kappaB in breast cancer [J]. Cancer - Res, 2001;61:3810 - 3818.

[7] Bancroft C C, Chen Z, Dong G, et al. Coexpression of proangiogenic factors IL - 8 and VEGF by human head and neck squamous cell carcinoma involves coactivation by MEK - MAPK and IKK - NF - kappa B signal pathways[J]. Clin Cancer Res, 2001;7:435 - 442.

[8] Nakayama H, Ikebe T, Beppu M, et al. High expression levels of nuclear factor kappaB, IkappaB kinase alpha and Akt kinase in squamous cell carcinoma of the oral cavity[J]. Cancer, 2001;92:3037 - 3044.

[9] Nair A, Venkatraman M, Maliekal TT, et al. NF - kappa B is constitutively activated in high - grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix[J]. Oncogene, 2003;22:50 - 58.

[10] Tai DI, Tsai SL, Chang YH, et al. Constitutive activeation of nuclear factor kappa B in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer, 2000;89:2274 - 2281.