

Correlation of NF- κ B and COX-2 Expressions in Cervical Cancer with HPV16 Infection

NF- κ B、COX-2 在宫颈癌组织中的表达及其与 HPV16 感染的关系

LIN Qiao-ai¹, CHEN Xiang-min², XIA Ke-dong¹,
DONG Hai-yan¹, CHEN Shao¹, ZHANG Li-fang¹

(1. Department of Microbiology and Immunology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, Zhejiang, China;

2. Central Laboratory of Biology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, Zhejiang, China)

林巧爱¹/陈向敏²/夏克栋¹/

董海燕¹/陈韶¹/张丽芳¹

(1. 温州医学院微生物学与免疫学教研室, 浙江温州 325027; 2. 温州医学院生物实验中心, 浙江温州 325027)

【摘要】背景与目的: 探讨宫颈癌组织中 NF- κ B、COX-2 的表达及其与 HPV16 感染的关系。材料与方法: 采用免疫组织化学 PowerVision™ 二步法对 46 例宫颈癌和 31 例正常宫颈组织进行 NF- κ B、COX-2 蛋白检测, 用 PCR 技术对组织标本的 HPV16 DNA 进行检测。结果: NF- κ B、COX-2 在宫颈癌组织中的表达率显著高于正常对照组 ($P < 0.01$), NF- κ B、COX-2 的表达与 HPV16 型的感染具有相关性 ($P < 0.05$)。结论: 宫颈癌组织中 NF- κ B、COX-2 呈高表达。NF- κ B 的活化及 COX-2 的高表达可能与 HPV16 感染有关。

【关键词】 宫颈癌; 细胞核因子 κ B; 环氧合酶 -2; 人乳头瘤病毒 16 型

中图分类号: R752.5

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2007)02-0113-03

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To explore the relationship between expressions of NF- κ B and COX-2 in tissue of cervical cancer and HPV16 infection. MATERIALS AND METHODS: The expressions of NF- κ B and COX-2 were assessed by immunohistochemical staining in 46 specimens of cervical cancer and 31 specimens of normal cervical tissue. The infection of HPV16 DNA were determined by PCR. RESULTS: The expression rates of NF- κ B and COX-2 in cervical cancer appeared significantly higher than that in normal cervical tissue ($P < 0.01$). The expressions of NF- κ B and COX-2 in HPV DNA positive group were significantly higher than that in negative group ($P < 0.05$) of cervical cancer. CONCLUSION: There were higher expressions of NF- κ B and COX-2 in cervical cancer tissues. The activation of NF- κ B and overexpression of COX-2 may be related to HPV 16 infection.

【KEY WORDS】 cervical cancer; NF- κ B; cyclooxygenase-2; HPV16

宫颈癌是最常见的妇女恶性肿瘤之一, 其发生与高危型的人乳头瘤病毒 (HPV) 感染有关。Xavier 等^[1]报道 NF- κ B 在肿瘤中高度表达, 能抑制肿瘤细胞的凋亡, 促进肿瘤的发生、发展。但关于宫颈癌组织中 NF- κ B、COX-2 的表达以及其与 HPV16 感染的相关性报道较少。本研究采用免疫组化技术, 检测宫颈癌组织中 NF- κ B (p50)、COX-2 蛋白的表达。并探讨其与 HPV16 感染的关系, 以期进一步了解宫颈癌的发生机制, 为宫颈癌治疗提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 临床资料 宫颈癌患者 46 例, 中位年龄 51 岁 (34 ~ 70 岁), 根据国际妇产科联盟 (FIGO) 分期, 其中原位癌 (0 期) 8 例, I 期 17 例, II 期 21 例; 正常对照组 31 例, 中位年龄 49 岁 (35 ~ 70 岁), 为子宫肌瘤患者手术切除的正常宫颈组织。标本来源于温州医学院附属第一、二医院妇产科手术病例。各标本均经组织病理学确诊。

1.2 主要试剂 NF- κ B (p50) 单克隆抗体购自 Santa Cruze 公司; 兔抗人 COX-2 多克隆抗体购自武汉博

收稿日期: 2006-03-22; 修订日期: 2006-11-15

基金项目: 浙江省教育厅基金资助项目 (SJY02012)

作者简介: 林巧爱 (1963-), 女, 浙江省温州人, 副教授, 硕士, 研究方向: 性传播疾病病原体与相关肿瘤的研究。

Tel: 0577-86689910, E-mail: qiaailin@yahoo.com.cn

士德公司, PowerVision™ 二步法免疫组化检测试剂为 Power Vision 公司产品, DAB 底物试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。通用型 PCR 试剂盒由北京大学医学院分子病理学实验室提供, HPV16 型试剂盒为 MBI fermentas 产品。

1.3 实验方法 组织标本经中性甲醛固定,石蜡包埋,所有标本连续切片 5 张,厚为 4 μm(玻片先用多聚赖氨酸处理,以防止脱片),分别进行 HE 染色和免疫组织化学染色。NF-κB、COX-2 的检测采用免疫组织化学 PowerVision™ 二步法。具体步骤参照试剂说明书进行。NF-κB 和 COX-2 一抗的工作液稀释度分别为 1:50 和 1:100。以已知阳性反应的乳腺癌组织和前列腺组织分别作为 NF-κB 和 COX-2 的阳性对照;以正常宫颈组织为阴性对照;PBS 替代一抗做空白对照。宫颈癌组织和正常对照组织 HPV 通用型、16 型 DNA 的检测采用常规的 PCR 法,同时以 PBS 代替模板作为空白对照。

1.4 结果判定 免疫组化染色在资深病理科医师指导下进行分析判断,以细胞浆或细胞核染成黄色或棕褐色为阳性。应用 PAS9000 网络病理系统(购自无锡朗珈医学工程有限公司)进行图像分析。选择 5 个以上高倍视野,计数不少于 500 个细胞进行计数及评分。根据染色显色强度与阳性细胞比例相结合法进行分析评定^[2]:①根据着色深浅打分:无色或蓝色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;②着色细胞占计数细胞百分率:≤5% 为 0 分,>5%~25% 为 1 分,>25%~50% 为 2 分,>50% 为 3 分;③染色分值判断:阳性细胞着色深浅分值(①与②的乘积),结果 0 分为阴性,1~3 分为+,4~6 分为++,9 分为+++。

1.5 统计学方法 各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 统计软件计算。NF-κB、COX-2 在宫颈癌组织中的表达分析采用确切概率法。两分类变量研究分析采用 Spearman 等级关联分析。

2 结果

2.1 NF-κB、COX-2 在宫颈癌组织中的表达 免疫组化结果显示,NF-κB 的阳性表达为细胞浆和细胞核着色(图 1A);COX-2 的阳性表达为细胞浆着色而核无着色(图 1B),二者的表达均主要在癌组织中。宫颈癌细胞中 NF-κB 和 COX-2 的阳性率与对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.01$)(表 1)。

2.2 宫颈癌组织中 NF-κB 与 COX-2 蛋白表达的相关性 结果见表 2, Spearman 等级相关分析显示 NF-κB 的表达与 COX-2 的表达呈明显的正相关($r_s = 0.522, P = 0.000$)。

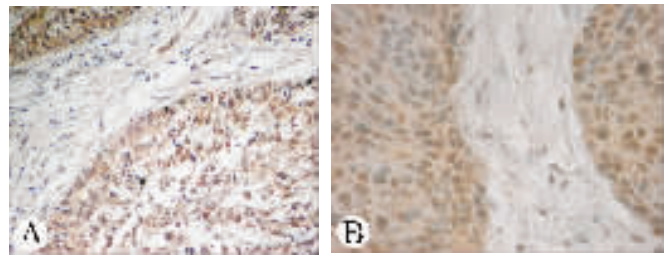


图 1 A: NF-κB 在宫颈癌细胞中的表达,胞浆、胞核均着色,棕黄色颗粒($\times 200$); B: COX-2 在宫颈癌细胞中的表达,定位于细胞浆,棕黄色颗粒($\times 400$)

Figure 1 A: Cytoplasmic and nuclear immunoreactivity for NF-κB in cervical cancer($\times 200$); B: Cytoplasmic immunoreactivity for COX-2 in cervical cancer($\times 400$)

表 1 NF-κB、COX-2、HPV 及 HPV16 在宫颈癌和正常宫颈组织中的表达
Table 1 Expressions of NF-κB, COX-2, HPV and HPV16 in cervical cancer and normal cervical tissue

Groups	n	NF-κB	COX-2	HPV	HPV-16
		+ (%)	+ (%)	+ (%)	+ (%)
Cervical cancer	46	28(60.9) ^①	31(67.4) ^②	28(60.9) ^③	23(50.0) ^④
Normal cervical	31	7(22.6)	2(6.5)	13(41.9)	6(19.4)

Compared with normal cervical group, ① $\chi^2 = 10.951, P = 0.001$; ② $\chi^2 = 28.083, P = 0.000$; ③ $\chi^2 = 2.667, P = 0.102$; ④ $\chi^2 = 7.408, P = 0.006$

表 2 NF-κB 与 COX-2 在宫颈癌组织中表达的相关性分析
Table 2 Relationship between expressions of NF-κB and COX-2

NF-κB	COX-2			
	-	+	++	+++
-	11	5	1	1
+	3	3	5	2
++	1	2	2	3
+++	0	3	2	2

2.3 NF-κB、COX-2 在宫颈癌组织的表达与病理分期的关系 结果见表 3。采用 Spearman 关联分析 NF-κB 与临床病理分期相关系数无统计学意义($r_s = -0.284, P < 0.05$),COX-2 表达与临床病理分期相关($r_s = -0.366, P < 0.05$)。

表 3 NF-κB、COX-2 在宫颈癌组织的表达与病理分期的关系
Table 3 Relationship between expressions of NF-κB and COX-2 and differentiation degree in cervical cancer

Differentiation degree (FIGO)	n	NF-κB [*]	COX-2 [△]
		+ (%)	+ (%)
Stage 0	8	2(25.0)	2(25.0)
I	17	11(64.7)	12(70.6)
II	21	15(71.4)	17(81.0)

Compared within groups: * $r_s = -0.284, P = 0.056$; △ $r_s = -0.366, P = 0.012$.

2.4 宫颈癌组织 HPV-DNA 检测结果 46 例宫颈癌和 31 例正常对照组采用 PCR 进行 HPV-DNA 检测(图 2),显示宫颈癌组 HPV16 型的检出率与对照组比较,差异有统计学意义(见表 1)。

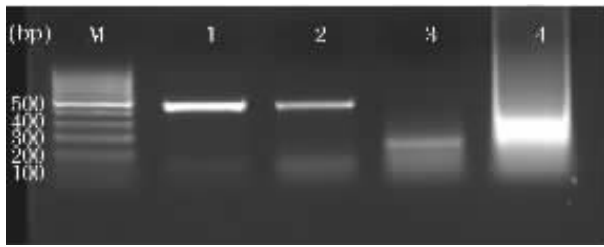


图 2 宫颈癌组织 HPV DNA 检测结果。1, 2 为 HPV 通用型阳性; 3 为 HPV16 型阳性; 4 为阴性对照

Figure 2 HPV DNA in cervical cancer by PCR. 1, 2: HPV positive; 3: HPV16 positive; 4: negative control

2.5 宫颈癌 HPV16 感染与 NF- κ B、COX-2 表达的关系 在宫颈癌 HPV16 阳性组中, NF- κ B 和 COX-2 的表达明显高于 HPV16 阴性组, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 说明宫颈癌组织中 NF- κ B、COX-2 的表达与 HPV16 感染之间具有相关性, 见表 4。

表 4 宫颈癌 HPV16 感染与 NF- κ B、COX-2 表达的关系 ($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Relationship between expressions of NF- κ B, COX-2 and HPV16 infection in cervical cancer

HPV16 DNA	n	NF- κ B scores	COX-2 scores
Positive	23	5.60 \pm 2.62 [*]	6.05 \pm 2.67 [#]
Negative	23	3.00 \pm 2.73	3.08 \pm 2.31
$r_s(P)$	-	-0.459(0.014)	-0.543(0.002)

Compared with negative: ^{*} $t = 2.344$, $P = 0.027$; [#] $t = 3.164$, $P = 0.004$.

3 讨论

近年来的流行病学资料和实验研究证实 HPV 感染与宫颈癌的发生关系密切, 99% 以上的宫颈部位肿瘤可检测到高危型 HPV DNA 的存在^[3], 其中 HPV16 型与宫颈癌关系尤为密切, 在 50% ~ 60% 的 HPV 阳性病理活检组织中被发现^[4]。我们在宫颈癌组织中检测到 HPV16 DNA 的阳性率为 50.0% (23/46), 与正常组比较差异有统计学意义。

NF- κ B 是一类多功能的核转录调控因子, 在免疫细胞活化、增殖、分化以及炎症、应激反应、细胞凋亡、肿瘤细胞的发生发展中发挥作用。本研究检测了 46 例宫颈癌组织 NF- κ B, 其阳性率显著高于正常对照组, 并且浸润癌的阳性率明显高于原位癌 ($P < 0.05$), 提示 NF- κ B 的高表达与宫颈癌的发生和发展可能相关。

本研究在 NF- κ B 表达阳性的宫颈癌组织中, HPV16 型阳性组的 NF- κ B 表达的染色分值明显高于 HPV16 型阴性组 ($P < 0.05$), 提示 HPV 感染可以诱导 NF- κ B 活化, NF- κ B 可能参与 HPV16 型的致癌过程。有研究发现在 HPV16 型 LCR(long control region) 区有 NF- κ B 的结合

点, 当 NF- κ B 结合点被诱发突变时, LCR 的活性增加, NF- κ B 可能为 HPV16 LCR 转录的阻遏物^[5]。因此, 通过 NF- κ B 阻滞剂阻断 NF- κ B 的活化, 可能抑制 HPV16 的致癌作用。

COX 又称前列腺素内过氧化物合酶, 是合成前列腺素的关键酶。COX-2 为诱生型, 机体大多数组织中无表达(平滑肌细胞、血管内皮细胞、炎症细胞除外), 可由多种生长因子、丝裂原、内毒素、前致癌物等刺激而产生。本研究结果显示, 宫颈癌中 COX-2 蛋白高度表达, 阳性率达 67.4%, 与正常对照组 (6.5%) 比较差异显著 ($P < 0.01$), 说明 COX-2 的表达与宫颈癌的发生密切相关, 与国外学者报道一致^[6]。我们的研究结果还显示: COX-2 表达与临床病理分期明显相关 ($r_s = -0.366$, $P < 0.05$), 提示 COX-2 的高表达与宫颈癌的发生和发展相关。COX-2 基因的 5'端 flanking 区域含有 2 个 NF- κ B 结合位点, COX-2 的表达受 NF- κ B 调控, NF- κ B 的激活能够促进 COX-2 表达^[7]。本研究中, COX-2 的表达与 NF- κ B 表达呈明显正相关 ($r_s = 0.522$, $P = 0.000$), 提示 NF- κ B 可能调控且促进 COX-2 基因表达, 共同参与宫颈癌的发生、发展。因而抗病毒治疗、NF- κ B 抑制剂和选择性 COX-2 抑制剂将是抗肿瘤治疗的新靶点。

参考文献:

- [1] Xavier D, David L, Judit P, et al. NF- κ B in development and progression of human cancer[J]. *Virchows Arch*, 2005, 446(5): 475 - 482.
- [2] 张声, 李莉, 林华, 等. 胃癌淋巴结转移相关因素的多元分析[J]. *中华肿瘤杂志*, 2001, 23 (5): 399 - 402.
- [3] Frazer I. Vaccines for papillomavirus infection[J]. *Virus Res*, 2002, 89 (2): 271 - 274.
- [4] Bosch FX, Manos M, Munoz N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87(11): 796 - 802.
- [5] Fontaine V, van der Meijden E, de Graaf J, et al. A functional NF-kappaB binding site in the human papillomavirus type 16 long control region[J]. *Virology*, 2000, 272 (1): 40 - 49.
- [6] Kim MH, Seo SS, Song YS, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 associated with expression of VEGF in primary cervical cancer and at metastatic lymph nodes[J]. *Gynecol Oncol*, 2003, 90(1): 83 - 90.
- [7] Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, et al. Structure of the cyclooxygenase-2 gene[J]. *Biochem J*, 1994, 302(Pt3): 723 - 727.