

结直肠癌 HPV16 型感染与核因子- B 活化的关系研究

周宇,叶文桃,麦海妍

Study of Relationship between Activation of Nuclear Factor - B and Human Papillomavirus Type 16 DNA in Human Colorectal Carcinoma

ZHOU Yu, YE Wen - tao, MAI Hai - yan

Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, China

Abstract: Objective To assess activation of nuclear factor - B (NF- B) and Human papillomavirus (HPV) type 16 DNA in human colorectal carcinoma. **Methods** Both detection of activation of NF- B by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and HPV type 16 DNA by polymerase chain reaction (PCR) were performed in tissue of the patients with colorectal carcinoma (50 cases), adenoma (30 cases) and normal colorectal tissue (20 cases). **Results** There - result showed both NF- B bind activity and the positive rates of HPV type 16 DNA were significantly higher in patients with the colorectal adenocarcinoma (or adenoma) than the normal colorectal mucosal samples ($P < 0.05$), but not clearly higher in patients with the colorectal adenocarcinoma than the colorectal adenoma ($P > 0.05$). NF- B bind activity in patients with HPV type 16 DNA positive were significantly higher than those in patients with HPV type 16 DNA negative ($P < 0.05$). **Conclusion** Activation of NF- B is related to carcinogenesis of HPV type 16 in patients with colorectal adenocarcinoma.

Keywords: Nuclear factor - B (NF- B); Colorectal carcinoma; Electrophoretic mobility shift assay (EMSA); Human papillomavirus

摘要:目的 探讨结直肠癌 HPV16 型感染与核因子- B (NF- B) 活化的关系。方法 应用凝胶电泳迁移率分析 (EMSA) 检测 50 例结直肠癌、30 例结直肠腺瘤和 20 例正常大肠组织核因子 NF- B DNA 结合活性,并用多聚酶链反应 (PCR) 和 southern blot 检测 HPV16 型 DNA。结果 结直肠癌、腺瘤分别与正常结直肠组织比较, NF- B DNA 结合活性和 HPV16 型 DNA 阳性率均明显增高,差异有显著性 ($P < 0.05$); 结直肠癌和结直肠腺瘤比较, NF- B DNA 结合活性和 HPV16 型 DNA 阳性率差异均无显著性 ($P > 0.05$)。HPV16 型 DNA 阳性和阴性结直肠癌患者比较, NF- B DNA 结合活性差异有显著性 ($P < 0.05$)。结论 NF- B 活化参与 HPV16 型在结直肠癌的致癌过程。

关键词: 大肠癌; 核因子; 凝胶电泳迁移率分析 (EMSA); 人乳头瘤病毒

中图分类号: R735.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578 (2004) 05-0264-03

0 引言

核因子- B (nuclear factor kappa B, NF- B) 参与众多免疫和炎症反应有关的基因转录调控, 细胞凋亡调节, 以及肿瘤的形成、发展^[1,2]。人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是一类致癌病毒, 高危型 HPV 感染与结直肠癌有关^[3]。有研究发现, HPV16 型 LCR 区有 NF- B 的结合点, 提示 HPV16 型的作用与 NF- B 活化可能有关^[4]。结直肠癌 HPV16 型感染与 NF- B 活化的关系, 目前为止, 国内外未见文献报道。本研究通过检测结直肠癌组织 HPV16 型 DNA 与 NF- B DNA 活性, 旨在了解结直肠癌 HPV16 型感

染与 NF- B 活化的关系, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择结直肠癌共 50 例, 其中男 30 例、女 20 例, 年龄 26 ~ 79 岁, 平均 53 岁, 为手术切除标本, 术前均未行放、化疗; 30 例结直肠腺瘤中, 男 19 例、女 11 例, 年龄 28 ~ 72 岁, 平均 51 岁, 均为肠镜下高频电切除标本; 正常结直肠黏膜组织 20 例, 男 12 例、女 8 例, 年龄 30 ~ 75 岁, 平均 49 岁, 系肠镜钳取的结直肠黏膜组织, 其肉眼观正常, 均经病理检查证实。每例标本均作常规病理切片, 并由专职病理科医师阅片作出病理诊断。

1.2 组织细胞核蛋白的提取和探针的标记 获取每例患者活组织后, 立即贮存在液氮中备用。按 Schreiber 等^[5]的方法提取细胞核蛋白, 用考马斯亮蓝

收稿日期: 2003-10-13; 修回日期: 2004-02-20

作者单位: 524001 广东湛江, 广东医学院附属医院消化内科

法测定蛋白度, -80 保存备用。NF- κ B 寡核苷酸探针序列为:5' AGTTGAGGGACTTTCCCAGGC3', 3' TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG5' (Promega 公司)。对照的 SP1 寡核苷酸探针序列为:5' ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC3', 3' TAAGCTAGCCCGCCCCGCTCG5' (Promega 公司)。用 T4 噬菌体多核苷酸激酶法将 32 P-ATP (北京亚辉生物医学工程公司) 标记在该探针上 (按试剂盒说明操作)。

1.3 凝胶电泳迁移率改变分析 (EMSA) DNA 探针与核蛋白结合反应体系:取 10 μ g 核蛋白, 5 \times buffer, 反应总体积为 9 μ l, 室温下孵育 10min 后加 32 P 标记的 NF- κ B 探针 1 μ l, 室温下孵育 20min。反应产物经 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 2~4h, 电泳完毕后在干胶机干燥 1h 使凝胶干燥, -70 放射自显影后, 用凝胶成像分析系统 (Bio-Rad 公司) 对 NF- κ B 与标记探针结合的相对量进行密度分析, 以相对吸光度 (RA) \times 面积 (mm²) 表示。另在凝胶电泳迁移率实验中设两组竞争对照, 一组在反应体系中加入 100 倍未标记的 NF- κ B 探针, 另一组加入非特异性未标记的 SP1 寡核苷酸探针, 图略。

1.4 组织细胞 HPV16 型 DNA 的检测 HPV16 型和 HPV18 型质粒 DNA 克隆株由德国 ZurHausen 博士惠赠; HPV16 型 PCR 扩增使用的引物由中国科学院上海细胞生物研究所合成, 其扩增 HPV16 型 E6 区的 120bp, 序列为:5' TCAAAGCCACTGTGTCCTG3' 和 5' CGTGTCTTGATGATCTGCA3'。耐热 DNA 聚合酶为 Promega 公司产品; 核酸杂交地高辛标记探针试剂盒为德国宝灵曼公司产品; PCR 扩增仪为美国 Thermo 型。按本文作者已报道的方法检测^[3]。

1.5 统计方法 计量资料两样本比较用 *t* 检验, 计数资料两样本比较用 χ^2 检验, 所有资料均用 SPSS10 统计软件包在计算机上处理。

2 结果

2.1 结直肠癌、腺瘤和正常组织 NF- κ B 活化和 HPV16 型 DNA 的表达 50 例结直肠癌和 30 例结肠腺瘤 NF- κ B DNA 结合活性比较 (52.82 \pm 9.25 vs 46.63 \pm 6.25 RA \times mm²), 差异无显著性 ($P > 0.05$); 两者分别与 20 例正常结肠组织 (22.35 \pm 5.64 RA \times mm²) 比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。结直肠癌、腺瘤及正常结肠组织 HPV16 型 DNA 阳性率分别为 40% (20/50)、30% (9/30) 和 0% (0/20)。结直肠癌与腺瘤比较, HPV16 型 DNA 阳性率差异无显著性 ($P > 0.05$); 两者分别与正常结肠组织比较, HPV16 型 DNA 阳性率均有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2 结直肠癌组织 NF- κ B 活化与 HPV16 型 DNA 的表达的关系 HPV16 型 DNA 阳性的结直肠癌患者 (20 例) 其 NF- κ B DNA 结合活性为 58.89 \pm 6.25 RA \times mm², 而 HPV16 型 DNA 阴性的结直肠癌患者 (30 例) 其 NF- κ B DNA 结合活性为 41.82 \pm 5.35 RA \times mm², 两者比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 图略。

3 讨论

NF- κ B 是由多肽 p50 和 p65 亚基形成的同源性或异源性二聚体, 通过与抑制蛋白 I κ B 直接结合形成无活性的三聚体, 以非活化状态存在于胞浆中。在细胞因子、病毒等因素作用下, 刺激引起 NF- κ B 活化, NF- κ B 即转到胞核中发挥调控作用^[1,2]。应用 IL-1 诱导大肠癌细胞系 HT-29 的 COX-2 基因表达, 发现 NF- κ B 参与其信号传导过程, 在 COX-2 基因的 5' 框架区有 2 个 NF- κ B 的结合点, 阻断这两个位点, COX-2 基因表达减少^[1,4]。本研究应用 EMSA 检测结直肠癌组织的 NF- κ B DNA 结合活性, 结果发现结直肠癌、腺瘤组织比正常结肠组织 NF- κ B DNA 结合活性显著增高, 差异有显著性, 但结直肠癌、腺瘤患者比较, NF- κ B DNA 的结合活性无显著性差异, 说明 NF- κ B 参与结直肠癌的发生发展过程。NF- κ B 可能通过调控 COX-2 基因、ras 基因和细胞凋亡基因参与大肠癌的发生发展^[1,6]。

高危型 HPV16 型感染与大肠癌有关已有许多报道^[3], 但其发生机理仍不清楚。在结肠癌细胞系, 通过阻断 NF- κ B 的活性, HPV-16 型 E6 蛋白可提高 TNF 的细胞毒性作用并诱发细胞凋亡, 且这种效应无 p53 基因的依赖性^[7]。在喉鳞癌, HPV16 型 E7 蛋白和 NF- κ B p65 蛋白呈正相关, NF- κ B 在喉鳞癌保持连续性活化, 说明 NF- κ B 在 HPV16 型感染的喉鳞癌的发展中起重要作用^[1]。本研究发现, 结直肠癌 HPV16 型 DNA 阳性者 NF- κ B 的活化率比阴性显著性增高, 差异有显著性。说明结直肠癌组织 NF- κ B 的活化和 HPV16 型致癌过程起一定作用。提示, 通过 NF- κ B 的阻滞剂阻断 NF- κ B 的活化, 可能抑制 HPV16 型的致癌作用。NF- κ B 参与 HPV16 型的致癌过程, 其机理仍不清楚。有研究发现在 HPV16 型 LCR 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, 强烈支持 NF- κ B 作为 HPV16 LCR 转录的阻遏物^[4]; HPV16 型 E6、E7 蛋白也可刺激被 NF- κ B 诱发的多种基因的表达, 增强 NF- κ B 信号通路功能性成分的活性, 使各种炎性细胞因子和介质分泌增加, 影响宿主对 HPV16 型的感染和免疫反应^[8]; E7 蛋白还能损害 TNF 诱发的 NF- κ B 的核易位, 阻止 NF- κ B 从结

合点到同源 DNA, 去除 IKK 在胞浆的活性, 抑制 NF- κ B 的活性, 使 HPV 逃避宿主免疫系统的作用^[9]。

参考文献:

- [1] Du J, Chen GG, Vlantis AC, et al. The nuclear localization of NF- κ B p53 is positively correlated with HPV16 E7 level in early stage squamous cell carcinoma [J]. J Histochem Cytochem, 2003, 51 (4): 533-539.
- [2] Charalambous MP, Maihofner C, Bhambra U, et al. Upregulation of cyclooxygenase-2 in colon cancer and its association with nuclear factor- κ B and I κ B kinase- α in human colorectal cancer epithelial cells [J]. Br J Cancer, 2003, 88 (10): 1598-1604.
- [3] 周宇, 于皆平, 沈志祥, 等. HPV16 型 DNA 在结直肠癌组织中表达的研究 [J]. 中国肿瘤临床, 1998, 25 (7): 505-507.
- [4] Fontaine V, van der Meijden E, de Graaf J, et al. A functional NF- κ B binding site in the human papillomavirus type 16 long control region [J]. Virology, 2000, 272 (1): 40-49.
- [5] Schreiber E, Matthias P, Muller MM, et al. Rapid detection of

octamer binding proteins with mini-extracts, prepared from a small number of cells [J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17 (15): 6419.

- [6] Cadoret A, Bertrand F, Baron-Delage S, et al. Down-regulation of NF- κ B activity and NF- κ B p65 subunit expression by ras and polyoma middle T onco genes in human colonic Caco-2 cells [J]. Oncogene, 1997, 14 (13): 1589-1600.
- [7] Vikhanska ya F, Falugi C, Valente P, et al. Human papillomavirus type 16 E6 enhances susceptibility to apoptosis induced by TNF- α in A2780 human ovarian cancer cell line [J]. Int J Cancer, 2002, 97 (6): 732-739.
- [8] Nees M, Geohagan JM, Hyman T, et al. Papillomavirus type 16 oncoprotein downregulates expression of interferon-responsive genes and upregulates proliferation-associated and NF- κ B-responsive genes in cervical keratinocytes [J]. J Virol, 2001, 75 (9): 4283-4296.
- [9] Spitkovskiy D, Hehner SP, Hofmann TG, et al. The human papillomavirus oncoprotein E7 attenuates NF- κ B activation by targeting the I κ B kinase complex [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (28): 25576-25582.

[编辑校对: 贺文]

短篇个案

肝局灶性结节性增生 1 例

朱振龙, 宋适恒, 杨艳红

关键词: 肝脏; 局灶性; 结节性; 增生

中图分类号: R735.3⁺4 文献标识码: D

文章编号: 1000-8578 (2004) 05-0266-01

1 临床资料

患者女, 13 岁, 因慢性阑尾炎急性发作于腹腔镜下行阑尾切除术, 术中发现肝左叶表面有一灰白色结节, 大小约 3 × 3 × 2 cm。CT 增强扫描回报: 肝左叶血管瘤。

手术切除病理检查: 不规则结节状肝组织一块, 3.5 × 2 × 2 cm。于一端见一直径约 2 cm 的灰白色结节状肿物, 界线清楚, 但无包膜, 切面呈多结节状, 结节大小不一, 灰白色。切面中央为星芒状的灰白色纤维瘢痕组织, 其中可见大血管 (图略)。

镜下观察: 结节大小、形状不等, 由排列紊乱的肝细胞条索构成, 细胞形态似正常肝细胞, 但可见胞浆内含有较多的脂肪空泡。肝结节周围有明显宽窄不一的纤维间隔, 内有中等量的淋巴细胞浸润。同时结节周围可见大量增生的小胆管, 于中心的星芒状瘢痕组织内可见厚壁血管 (图略)。病理诊断: 肝局灶性结节性增生。

2 讨论

肝局灶性结节状增生是一种非常少见的肝脏瘤样病变, 曾被称为局灶性硬化、肝错构瘤、“肝腺瘤”等^[1]。多见于 20 ~ 50 岁的女性, 80% 的病例无临床症状, 常因其他原因行肝影像检查被发现。本例是在腹腔镜下行阑尾切除术而被发现。其发病机制尚不清楚, 部分可能与口服避孕药有关^[1]。但也有说二者无关^[2]。然而, 性激素及妊娠, 可使病变组织中的血管增加, 并使其易于破裂。有人提出局灶性结节状增生可能是一种动静脉吻合的血管畸形的局部所有肝组织成分的过度增生^[3]。

肉眼所见: 肝局灶性结节性增生多为孤立性结节, 界清, 但无真性包膜, 颜色多为黄白色、黄褐色或浅棕色, 比周围正常肝组织颜色浅 (图略), 多数结节直径小于 5 cm。切面病灶中央常有星形放射状纤维组织疤痕。

镜下特点: 经病灶中心切片多显示中央“星形”疤痕组织, 内可见一条或数

条内膜或中膜增厚的血管。大小不等的纤维间隔从中央向周围呈放射状, 其内除常见增生的小胆管外, 还有轻、中度的淋巴细胞为主的炎性细胞浸润。纤维间隔间的肝细胞结节大小形状不等, 其肝细胞基本正常, 但缺乏正常肝索排列。免疫组化证明纤维间隔内增生的小胆管多由结节内的肝细胞化生而成^[4]。

鉴别诊断: 肝局灶性结节性增生常需与肝细胞腺瘤和高分化肝细胞癌相鉴别。与肝细胞腺瘤的主要区别是肝细胞腺瘤一般较大, 且不具有“星形”疤痕组织; 高分化肝细胞癌有明显的窦隙状结构, 部分肝细胞有大而深染的核, 可见核分裂及血管内血栓形成。

感谢 本例承河北医科大学第二医院病理科魏守礼教授及河北省人民医院病理科李其云教授会诊。

参考文献:

- [1] 同济医科大学病理学教研室, 中山医科大学病理学教研室编. 外科病理学上册 [M]. 第 2 版. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1999: 216.
- [2] 周庚寅, 刘洪琪, 张庆慧, 主译. 廖松林, 主审. 肿瘤组织病理诊断 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2001: 262-263.
- [3] Wanless IR, Mawdale JC, Adams R. On the pathogenesis of focal nodular hyperplasia of the liver [J]. Hepatology, 1985, 5 (2): 1194-1200.
- [4] Van Eysken P, Sciort R, Calleja F, et al. Acetylated keratin immunohistochemical study of focal nodular hyperplasia of the liver [J]. Liver, 1989, 9 (3): 372-377.

[编辑: 安凤; 校对: 杨卉]

收稿日期: 2003-06-06; 修回日期: 2003-06-19

作者单位: 050031 石家庄, 河北医科大学第一医院病理科