

核因子 B 在胰腺癌中的表达及与 VEGF 和 p53 表达的相关性

张克君,李德春

Expression of Nuclear Factor B and Its Relationship with VEGF, p53 Proteins in Pancreatic Cancer

ZHANG Ke-jun, LI De-chun

General Surgery, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China

Abstract: **Objective** To study the expression of nuclear factor kappa B gene (NF- κ B) and its relationship with expression of VEGF, p53 proteins in pancreatic cancer (PC). **Methods** The expression of NF- κ B, I κ B- α was investigated by Western blot in PC samples, paracarcinoma tissues, chronic pancreatitis (CP) samples and normal pancreatic (NP) samples. The activity of NF- κ B was detected through electrophoretic mobility shift assay (EMSA) in PC, CP and NP samples. Immunohistochemical analysis for VEGF, p65, p53. **Results** The positive expression rate of NF- κ B protein determined by Western Blotting analysis is 71% in PC tissues, 20% in paracarcinoma tissues, and 12.5% in CP, 0/9 in NP, there was significant difference between the 4 groups ($P < 0.05$). There was no relationship between NF- κ B gene expression and histological differentiation, clinical stages ($P > 0.05$), but the lymph node metastasis was ($P < 0.05$), the expression of NF- κ B gene correlated with VEGF, p53 expression. **Conclusion** NF- κ B may play an important role in pathogenesis of PC. Upregulated NF- κ B and dysfunction of VEGF, p53 may play a synergistic role in the process of carcinogenesis of PC.

Key words: Pancreatic cancer; Nuclear factor kappa B; Inhibitory; Factor kappa B- α ; Vascular endothelial growth factor (VEGF); Protein p53

摘要: **目的** 探讨核因子 B (NF- κ B, p65) 在胰腺癌组织中的表达及其与 VEGF、p53 蛋白表达的相互关系。 **方法** 电泳迁移率变动分析 (EMSA) 测定 45 例胰腺癌及癌旁组织、8 例慢性胰腺炎和 9 例正常胰腺组织中 NF- κ B 的活性, Western 印迹法检测 NF- κ B、I κ B- α 蛋白表达; 免疫组织化学法检测胰腺癌中 VEGF、p53、p65 蛋白表达。 **结果** NF- κ B 在肿瘤组织中被激活; NF- κ B 在胰腺癌、旁组织、慢性胰腺炎、正常胰腺组织中阳性表达率分别为 71.0%、20.0%、12.5%、0 ($P < 0.05$); NF- κ B 基因表达与胰腺癌的分化程度、临床分期、肿瘤大小无关 ($P > 0.05$), 与淋巴结转移和周围浸润有相关性 ($P < 0.05$); 转移癌中 NF- κ B 蛋白表达与 VEGF、p53 蛋白表达显著相关。 **结论** 核因子 B 基因在胰腺癌中过度表达并与 VEGF、p53 一起参与胰腺癌的浸润、转移过程。

关键词: 胰腺癌; 核因子 B; 抑制性 B α ; 血管内皮生长因子; 蛋白质 p53

中图分类号: R735.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2006)11-0805-03

0 引言

最近研究发现, 肿瘤细胞浸润转移能力的改变是通过核因子 B 对其他因子的调节作用实现的, 但具体的作用机制还不清楚。本文拟研究核因子 B 在胰腺癌组织中的表达与胰腺癌生物行为的关系以及核因子 B 表达与 VEGF、p53 表达的相关性, 为肿瘤的基因治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

收集苏州大学第一附属医院普通外科 2000 年 4 月 ~ 2005 年 5 月期间病理诊断均为导管腺癌的 45 例胰腺癌石蜡标本 (临床资料完整) 及其 45 例癌旁组织 (距癌灶边缘 1.5 ~ 2.0 cm, 33 例呈 I 级不典型增生表现, 4 例呈原位癌改变, 5 例有炎性变化, 3 例有癌细胞浸润)。其中男 25 例, 女 20 例, 年龄 36 ~ 70 岁, 中位数 55 岁; 肿瘤直径 < 4 cm 者 21 例, \geq 4 cm 者 24 例; 高分化 13 例, 中分化 14 例, 低分化 18 例; 根据 TNM 分期 (1997 恶性肿瘤国际临床分期标准): I 期 11 例、II 期 9 例、III 期 13 例、IV 期 12 例; 伴有区域或远处淋巴结转移和周围

收稿日期: 2005-10-19; 修回日期: 2005-12-23

作者单位: 215006 苏州大学第一附属医院普通外科

作者简介: 张克君 (1967-), 男, 在读博士, 主要从事肝胆胰疾病的基础与临床研究

浸润者 30 例,其中远处转移者 18 例(肝转移、腹膜和网膜种植等)无淋巴结转移和周围浸润者 15 例。8 例慢性胰腺炎和 9 例正常胰腺组织新鲜标本,取自壶腹癌和胰腺内分泌肿瘤的病人。所有标本在术后立即放入 -70℃ 冰箱备用,所有病人均为第一次手术,术前未经任何放化疗。

1.2 主要试剂

鼠抗人 p65 单抗、鼠抗人 I B-a 多抗、鼠抗人 p53 单抗(突变型)、鼠抗人 VEGF 单抗,免疫组化染色(SP)试剂盒均购自北京中山生物技术公司, ³²ATP 标记的双链寡核苷酸探针:

5'-AGTTGAGGGGACTTCCCA GGC-3'

3'-TCAACTCCCCTGAAA GGGTCCG-5'

1.3 方法

1.3.1 Western-blot 分析 提取细胞核蛋白^[1],采用 Lowry 法准确测定浓度。蛋白质样品上样量每泳道为 100μg,用 10%聚丙烯酰胺凝胶分离,并转到 Hybond 硝酸纤维素膜上(美国 Bio Rad 公司)。

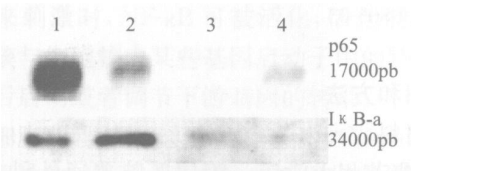
1.3.2 电泳迁移率变动分析 细胞核的制备、核提取液蛋白含量的测定和反应条件参考文献[1]。

1.3.3 免疫组化 操作方法按照试剂盒进行,p53、VEGF、p65 表达的判断按照文献方法^[2,3]。

1.3.4 统计学方法 采用医学统计软件 SPSS 10.0, ²检验, Spearman 相关分析。

2 结果

2.1 Western 检测 NF- B、I B-a 的表达 p65 在肿瘤组织的灰度值高于癌旁组织,I B-a 在肿瘤组织的灰度值低于癌旁组织,(正常胰腺和慢性胰腺炎组织偶见表达),说明肿瘤组织中 p65 激活,而 I B-a 失活见图 1、表 1。



1:肿瘤组织;2:肿瘤旁组织;3:正常胰腺组织;4:慢性胰腺炎组织
图 1 Western 印迹分析 p65、I B-a 的表达

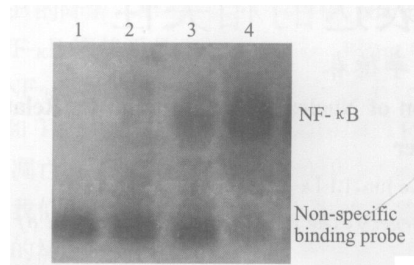
2.2 EMSA 检测 NF- B 的活性

胰腺癌组织中可见明显的条带,癌旁组织少量条带,慢性胰腺炎和正常胰腺组织未见条带,提示肿瘤组织 NF- B 结合活性提高,见图 2。

2.3 免疫组化法检测 VEGF、p53、p65 蛋白表达

p65 在肿瘤组织的检出率 71%(32/45),高于癌旁组织 20%(9/45), $P < 0.01$; p53、VEGF 在胰腺癌组织中的阳性表达分别为 57.8%(26/45)、64.4%(29/

45),分别高于癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.05$),VEGF 阳性染色位于细胞质,阳性细胞分布在血管周围,见图 3。



1:正常胰腺组织;2:慢性胰腺炎组织;3:肿瘤旁组织;4:肿瘤组织
图 2 NF- B 在不同组织中的活性检测

2.4 胰腺癌的临床病理特征与 p65 蛋白表达的关系 p65 蛋白表达与胰腺癌的分化程度、临床分期,肿瘤大小无关($P > 0.05$);但 p65 蛋白在浸润转移组的表达率高于非浸润转移组($P < 0.01$),远处转移组高于非远处转移组($P < 0.05$),见表 1。

表 1 胰腺癌的临床病理特征与 p65 蛋白表达

Group	Num	p65		P
		+	-	
Tumor size				>0.05
< 4cm	21	15	6	
4cm	24	17	10	
Differentiation				>0.05
Well, moderate	27	18	9	
Poor	18	14	7	
TNM stage				>0.05
+	20	15	8	
+	25	17	8	
Metastasis				<0.01
+	30	27	3	
-	15	5	10	
Distant metastasis				<0.05
+	18	17	1	
-	27	15	12	

2.5 胰腺癌组织 p65 蛋白表达与 VEGF、p53 蛋白表达的相关性分析 VEGF 在浸润转移组和远处淋巴结转移组的阳性表达率分别为 70%(21/30)和 88.9%(16/18); p53 在浸润转移组和远处转移组的阳性表达率分别为 66.7%(20/30)和 83.33%(15/18)。在浸润转移和远处淋巴结转移组中的 VEGF 阳性表达组中,VEGF 和 p53 的阳性表达符合率为 61.9%(13/21)和 75.0%(12/16)。30 例浸润和淋巴结转移组胰腺癌组织中,p65 阳性表达 27 例,VEGF 在这 27 例中阳性表达 19 例,两者符合率为 70.4%(19/27)。但在 17 例 p65 阳性表达的远处转

移组中, VEGF 阳性表达 14 例, 两者符合率为 82.4% (14/17)。同样, 在转移组和远处转移组中, p53 和 p65 的表达符合率分别为 59.3% (16/27) 和 82.4% (14/17)。

3 讨论

核因子 B (NF- κ B, p50/p65) 是近年来发现的一种转录因子, 其表达水平与某些肿瘤的浸润、粘附、转移行为密切相关。近年来发现, 核因子 B 引起肿瘤细胞浸润、粘附、转移的原因是由于核因子 B 激活后导致许多粘附分子、血管生长因子、基质蛋白酶的瀑布样释放。我们发现^[4,5], 核因子 B 在肝癌中高表达, 并且表达越高, 转移率越高; 细胞系研究揭示^[6], 核因子 B 与肝癌转移的关系通过 MMP-9 实现; 前列腺癌和膀胱癌的研究中发现^[7,8], 核因子 B 与肿瘤转移的关系分别通过 MMP-9、VEGF 和 IL-8 实现; 胰腺癌细胞系研究提示^[9], 核因子 B 与胰腺癌细胞转移行为有关, VEGF、IL-8 参与了这个过程。

本研究发现, 胰腺癌组织中 NF- κ B 被活化, p65 蛋白在癌组织表达明显增高, 表明 NF- κ B 激活在胰腺癌的发生发展中有重要作用。本研究还发现, p65 蛋白表达与胰腺癌的分化程度、临床分期、肿瘤大小无关, 但与与肿瘤周围浸润和淋巴结转移有关: p65 蛋白表达在浸润和淋巴结转移组高于非浸润和转移组, 远处转移组高于非远处转移组, 说明核因子 B 参与了胰腺癌的浸润转移过程。

VEGF 是最重要的促进血管生成的因子。有研究发现^[10,11], 胰腺癌细胞 VEGF 基因的表达受 NF- κ B 基因调控, 因为 NF- κ B 激活或阻滞, VEGF 表达和血管生成发生变化, 肿瘤细胞的转移能力发生改变, 肺癌细胞系的研究也得到了相同的结果^[12]。在本试验中, VEGF 在胰腺癌组织中高表达, 且 VEGF 表达水平与胰腺癌淋巴结转移和远处转移有关, VEGF 基因表达的改变可能与上述机理有关。

VEGF 受多种因素调节, 近年来研究表明, 野生型 p53 下调 VEGF 表达, 而突变型失去这种功能^[13], 本研究中突变型 p53 蛋白在胰腺癌中高表达 (57.8%), 且 p53、VEGF 有很高的阳性表达符合率, 突变型 p53 蛋白可能参与 VEGF 表达的调控, 从而间接参与胰腺癌血管生成。

NF- κ B 和野生型 p53 基因表达是相互协调的^[14]。在肿瘤组织中突变型 p53 废除了野生型 p53 的作用, 当 NF- κ B 激活后, 野生型 p53 诱导细胞凋亡的作用丧失, 对 NF- κ B 的抑制作用丧失。在本研究中, NF- κ B 表达增加可能与 p53 突变和野生型

p53 抑制作用下降有关。

比较 NF- κ B、p53、VEGF 表达的相关性发现, 在转移组或远处转移组中, NF- κ B 表达与 p53、VEGF 表达的符合率在 80% 左右, 表明 NF- κ B、p53、VEGF 表达是相互联系的, 它们在胰腺癌的浸润转移过程中共同发挥了作用, 因此 NF- κ B 是胰腺癌基因治疗的靶点。

(本文图 3 见封 3)

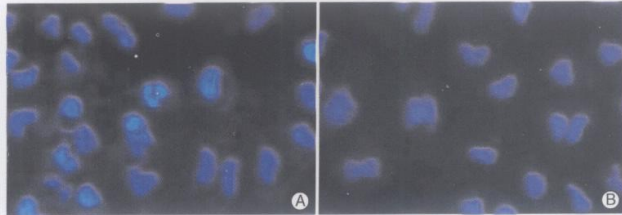
参考文献:

- [1] Diana V, Messadi Hai S. Activation of NF- κ B signal pathways in keloid fibroblasts [J]. Arch Dermatol Res, 2004, 296 (11): 125-133.
- [2] Kang SM, Maeda K, Onoda N. Combined analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in colorectal carcinoma for determination of tumor vascularity and liver metastasis [J]. Int J Cancer, 1997, 74(5): 502-507.
- [3] Uchida S, Shimada Y, Watanabe G. In oesophageal squamous cell carcinoma vascular endothelial growth factor is associated with p53 mutation, advanced stage and poor prognosis [J]. Br J Cancer, 1998, 77(10): 1704-1709.
- [4] 张克君, 高焱明. 核因子 B、p65、I κ B- α 在肝炎相关性肝癌中的表达 [J]. 实用肿瘤杂志, 2004, 19(3): 216-218.
- [5] 张克君, 高焱明. 核因子 B 在肝细胞癌中的表达及与临床病理的相关性 [J]. 中国癌症杂志, 2005, 15(1): 12-15.
- [6] 张克君, 李德春, 高焱明. 核因子 B、MMP-9 与肝细胞肝癌浸润转移的实验研究 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2005, 16(6): 201-204.
- [7] Shukla S, MacLennan GT, Fu P. Nuclear factor- κ B/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression [J]. Neoplasia, 2004, 6(4): 390-400.
- [8] Karashima T, Sweeney P, Kamat A. Nuclear factor- κ B mediates angiogenesis and metastasis of human bladder cancer through the regulation of interleukin-8 [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(7): 2786-2797.
- [9] Shuichi F, Guido M, Scwabas. Function of Nuclear Factor B in Pancreatic Cancer Metastasis [J]. Clinical Cancer Research, 2003, 9(9): 346-354.
- [10] Henry Q, Xiong James L, Abbruzzese, et al. NF- κ B activity blockade impairs the angiogenic potential of human pancreatic cancer cells [J]. Cancer Cell Biology, 2004, 208(3): 181-188.
- [11] Fujioka S, Scwabas GM, Schmidt C. Inhibition of constitutive NF- κ B activity by I κ B α suppresses tumorigenesis [J]. Oncogene, 2003, 22(9): 1365-1370.
- [12] Ni J, Takayama K, Inoshima N. Gene transfer of inhibitor κ B in human lung cancer cell line NCF H460 inhibits tumorigenesis and angiogenesis in vivo [J]. Anticancer Res, 2005, 25(1): 69-77.
- [13] Liang Y, Wu J, Stancel GM. p53-dependent inhibition of progesterin-induced VEGF expression in human breast cancer cells [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2005, 93(2-5): 173-182.
- [14] Ryan KM, Ernst MK, Rice NR. Role of NF- κ B in p53-mediated programmed cell death [J]. Nature, 2000, 404(6780): 892-897.

[编辑:周永红]

熊果酸对 A549 细胞增殖、凋亡的影响及其机制

(正文见 802 页)



A: 46.65 $\mu\text{mol/L}$ UA 处理 A549 细胞 48h 后, 核呈现染色质凝集和核碎; B: 未用 UA 处理的 A549 细胞, 核染色较均匀, 呈蓝色

图 2 荧光显微镜观察 UA 诱导 A549 细胞凋亡的形态学变化

DRH1 和 Ki-67 在胃癌中的表达

(正文见 846 页)

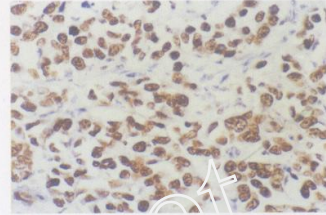
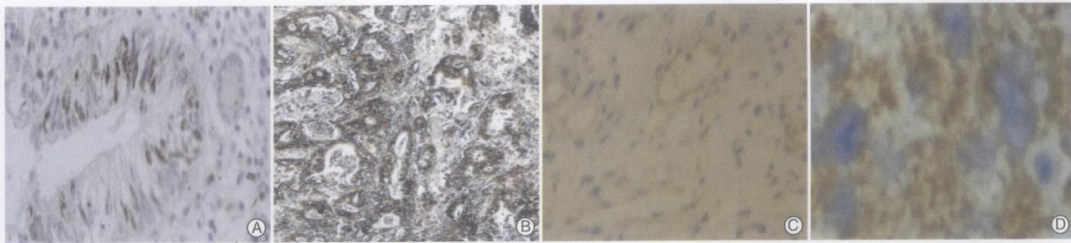


图 2 胃癌组织 Ki-67 阳性表达 (SP $\times 400$)

核因子 κB 在胰腺癌中的表达及与 VEGF 和 p53 表达的相关性

(正文见 805 页)



A: p53 在肿瘤组织阳性表达: 阳性染色位于细胞核(SP $\times 400$); B: p65 在肿瘤组织阳性表达, 阳性染色位于细胞质(SP $\times 200$); C、D: VEGF 在肿瘤组织阳性表达: 阳性染色位于细胞质, 阳性细胞分布在血管周围 (C: SP $\times 40$, D: $\times 160$)

图 3 VEGF、p53、p65 的免疫组化结果

36 例粘膜原发恶性黑色素瘤临床病理分析及鉴别诊断

(正文见 823 页)

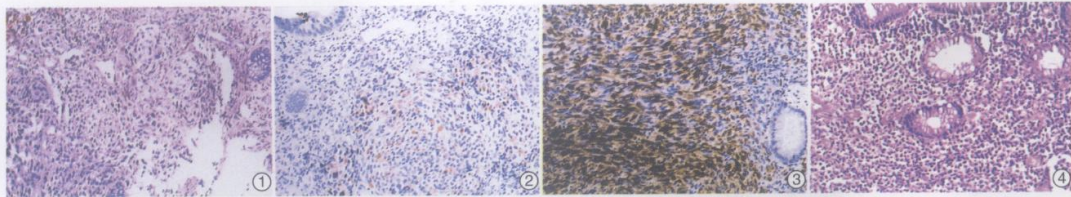


图 1 上皮样细胞为主型恶黑, 瘤细胞呈多边形, 边界清楚, 排列成巢团状 (HE $\times 100$)

图 2 上皮样细胞为主型恶黑, 肿瘤细胞 HMB₄₅ 表达阳性 (SP $\times 100$)

图 3 梭形细胞为主型恶黑, 瘤细胞呈梭形, 似成纤维细胞, 排列成束状, HMB₄₅ 表达强阳性 (SP $\times 100$)

图 4 小痣样细胞型恶黑, 瘤细胞体积小、胞浆少, 弥漫排列成片 (HE $\times 100$)