

[文章编号 1000-1182(2005)05-0421-03]

人舌癌组织中转录因子 p65 的表达及意义

吴军楼¹, 梁新华², 毛祖彝², 肖贵州³

(1. 山东大学山东省立医院 口腔颌面外科, 山东 济南 250021;

2. 四川大学华西口腔医学院 口腔颌面外科学教研室, 四川 成都 610041;

3. 浙江大学邵逸夫医院 口腔科, 浙江 杭州 310016)

[摘要] 目的 研究 p65 在舌癌组织中的表达及其与舌癌转移、预后的关系。方法 应用免疫组化方法检测 50 例舌癌患者的癌组织中 p65 的表达, 并对其与患者临床病理特征的关系进行分析。结果 p65 阳性表达率为 64%; 其阳性表达率在不同 TNM 分期之间有统计学差异 ($P < 0.05$), 分期越高 p65 表达率越高; p65 的阳性表达率与淋巴结转移有关, 有淋巴结转移者 p65 阳性率高 ($P < 0.05$); 但不同病理分级间 p65 的表达无统计学差异 ($P > 0.05$)。Kaplan-Meier 生存曲线显示 p65 阳性表达组、阴性表达组的 5 年生存率分别为 59.3% 和 88.9%, 两组之间有统计学差异 ($P < 0.05$)。结论 p65 异常表达在判断舌癌转移和患者预后方面有重要意义。

[关键词] 舌癌; p65; 转移; 预后

[中图分类号] R 739.86 [文献标识码] A

High Expression of p65 Transcription Factor and Its Significance in Tongue Carcinoma WU Jun-lou¹, LIANG Xin-hua², MAO Zu-yi², XIAO Gui-zhou³. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Shandong Provincial Hospital of Shandong University, Jinan 250021, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Dept. of Stomatology, Shao Yi-fu Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310016, China)

[Abstract] **Objective** To examine the correlation between p65 expression and the metastasis and prognosis in tongue carcinoma. **Methods** The immunohistochemical expression of p65 was examined in 50 cases of tongue carcinoma, and the clinical and histopathologic records were retrospectively analyzed. **Results** Overexpression of p65 in cytoplasm and nucleus was found in 64% cases of tongue carcinoma. There was significant difference of p65 expression among different TNM stages, and the higher expression rate of p65 was found in higher stages. Overexpression of p65 was also related to lymph node metastasis. Significantly greater increase in expression levels of p65 was found in the metastatic cases ($n = 22$) compared to the nonmetastatic cases ($n = 10$). However, there was no significant difference of p65 expression among different histopathologic grading. The 5-year survival rate of p65 positive and negative group was 59.3% and 88.9% respectively, and there was significant difference in Kaplan-Meier survival curve ($\chi^2 = 5.6, P < 0.05$). **Conclusion** The results suggest that the expression of p65 was important to predict the metastasis and prognosis in tongue carcinoma.

[Key words] tongue carcinoma; p65; metastasis; prognosis

p65 是核因子- B (nuclear factor- B, NF- B) 家族成员之一, 调控多种基因表达, 参与咽部鳞癌、乳腺癌、何杰金淋巴瘤等的发病和转移过程, 并与患者预后有关¹。本实验采用免疫组化研究舌癌组织中 p65 的表达情况, 同时对其与舌癌患者 TNM 分期、淋巴结转移情况、病理分级和预后的关系进行回顾性分析。

1 材料和方法

1.1 研究对象的选择

选择 1995 ~ 1998 年在四川大学华西口腔医院确诊为舌鳞状细胞癌并行舌颌颈联合根治术的 50 例患

者为研究对象, 其中男性 37 例, 女性 13 例, 年龄 25 ~ 70 岁, 平均 53 岁。50 例患者中有 27 例已发生淋巴结转移; 按照国际抗癌联盟 (international union against cancer, UICC) 的 TNM 分期标准 (1987)², 其中 I 期 5 例、II 期 13 例、III 期 19 例、IV 期 13 例; 根据 WHO 的病理分级标准 (1971)³, I 级 19 例、II 级 15 例、III 级 16 例。

1.2 研究方法

取 50 例患者的舌癌术后石蜡标本进行免疫组化染色, 检测 p65 的表达情况, 另取 5 例正常舌黏膜的石蜡标本作为对照, 对照标本来自四川大学华西口腔医院门诊切除舌部良性病变时切取的周围正常舌黏膜。分析 p65 的表达情况与患者 TNM 分期、淋巴结转移情况和病理分级的关系, 并采用 Kaplan-Meier 法

[收稿日期 2005-03-08; 修回日期 2005-06-15]

[作者简介] 吴军楼 (1972-), 男, 山东人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 梁新华, Tel: 028-85502334

计算生存率,进行生存分析。

1.2.1 免疫组化染色方法 采用 SABC 法进行 p65 免疫组化染色。主要试剂采用鼠 p65 单克隆抗体 fc-8008 (Santa cluz 公司,美国)。石蜡切片脱蜡至水,3% H₂O₂ 室温孵育 20 min 以清除内源性过氧化物酶,微波炉加热 8 min 以修复抗原,5%山羊血清孵育 10 min 后滴加一抗(1:150),37℃ 孵育 30 min,4℃ 冰箱过夜,滴加 biotin 二抗(1:200),37℃ 孵育 30 min,滴加 SP 复合物(1:200),37℃ 孵育 30 min,DAB 显微镜下控制显色。以 PBS 代替一抗作为空白对照。

1.2.2 p65 阳性表达的判断标准 p65 阳性表达为细胞浆或细胞核出现棕黄色颗粒。每张切片在显微镜下选取 3 个细胞均匀分布的视野,计数阳性细胞和总细胞数,阳性细胞百分数 ≥ 5% 该切片染色阳性。

1.3 统计分析

采用 SPSS 10.0 统计软件对数据进行分析,检验水准为双侧 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 免疫组化检测结果

p65 免疫组化阳性染色呈棕黄色细颗粒状,主要位于细胞浆中,少量附着于核膜上,偶见癌细胞核阳性染色(图 1);正常黏膜中 p65 表达阴性(图 2)。50 例舌癌患者中 p65 表达阳性者 32 例,占 64.0%;阴性者 18 例,占 36.0%;5 例正常黏膜 p65 表达均为阴性。

2.2 癌组织 p65 表达与患者 TNM 临床分期、淋巴结转移和病理分级的关系

舌癌组织中 p65 表达与舌癌患者 TNM 临床分期、有否淋巴结转移以及病理分级间的关系见表 1。由表 1 可见,p65 的阳性表达率在不同 TNM 分期之间

有统计学差异 ($P < 0.05$),分期越高 p65 表达率越高;淋巴结转移情况不同,p65 的表达阳性率也不同,有淋巴结转移者 p65 阳性率高 ($P < 0.05$);但不同病理分级间 p65 的表达无统计学差异 ($P > 0.05$)。

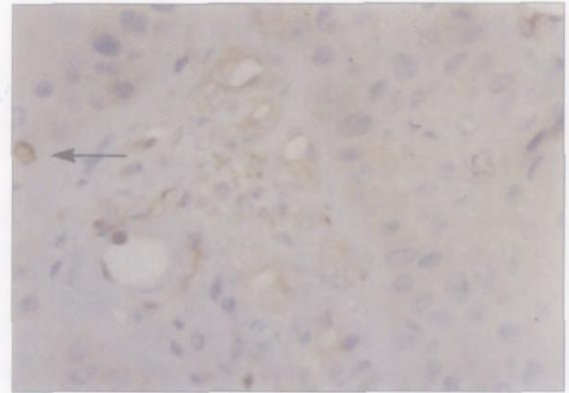


图1 舌癌组织中 p65 表达阳性(示癌细胞核阳性染色) SABC ×400

Fig 1 Positive expression of p65 in tongue carcinoma (p65 positive staining in nucleus) SABC ×400

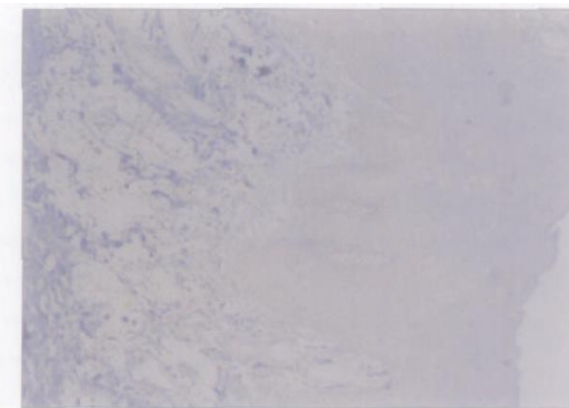


图2 正常舌黏膜组织 p65 表达阴性 SABC ×40

Fig 2 Negative expression of p65 in normal tongue mucosa SABC ×40

表 1 50 例舌鳞癌患者 p65 表达与临床分期、淋巴结转移和病理分级的关系

Tab 1 Relationship among p65 expression and the clinical stage, metastasis of lymph nodes and pathological grade of 50 tongue carcinoma cases

p65 表达	TNM 分期 [*]				淋巴结转移 [*]		病理分级		
	1	2	3	4	转移	不转移	I	II	III
阳性例数	2	7	12	11	22	10	12	9	11
阴性例数	3	6	7	2	5	13	7	6	5
阳性率(%)	40.0	53.9	63.2	84.6	81.5	43.5	63.2	60.0	68.8

注: * $P < 0.05$

2.3 癌组织中 p65 表达与舌癌患者预后的关系

术后 5 年,50 例患者有 15 例死亡。采用 Kaplan-Meier 法计算生存率,p65 阳性表达组(32 例)和阴性表达组(18 例)的 5 年生存率分别为 59.3% 和 88.9%,其生存率曲线见图 3。经 Log-rank 检验,两组的生存率有统计学差异($\chi^2 = 5.6, P < 0.05$)。

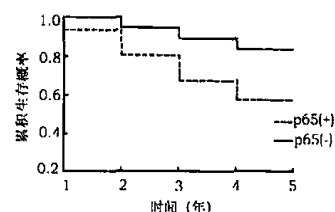


图3 Kaplan-Meier 生存函数曲线

Fig 3 The Kaplan-Meier survival curve

3 讨论

p65 是 NF- κ B 家族成员之一,是一种多功能转录因子。正常情况下 p65 与 p50 构成 p65-p50 异源二聚体,并与其抑制因子 I κ B 结合组成 p65-p50-I κ B 复合物存在于细胞浆中。除某些神经元外,在未受诱导的正常体细胞核中并不存在 p65-p50;而当 NF- κ B 信号传导通路被激活,I κ B 磷酸化降解,p65-p50 活化并迅速进入细胞核。本研究结果表明,正常舌黏膜细胞浆中,p65 染色阴性;而舌癌组织标本的细胞浆中 p65 异常高表达,部分细胞核中也发现 p65 的表达,说明 NF- κ B 信号传导通路处于激活状态。p65 进入细胞核后可与其靶基因上的特异位点即 B 位点 (GGG-GACTTCC) 结合,调控靶基因的转录和表达。有研究证明 p65 在卵巢癌、结肠癌、乳腺癌、咽部鳞癌等恶性肿瘤中表达增加⁴,其持续活化可影响细胞增殖和凋亡,抑制活化的 p65 能促进癌细胞凋亡⁵。

细胞间粘附分子-1、环氧合酶-2、诱导性一氧化氮合酶、基质金属蛋白酶-9 和尿激酶型纤溶酶原激活物等因子与肿瘤转移相关,这些因子的基因序列上都存在 B 位点,其基因表达可受 p65 的调控。有研究表明舌癌组织中尿激酶型纤溶酶原激活物⁶等转移因子存在高表达,Aggarwal 等⁷通过阻断头颈部鳞癌细胞 p65 信号传导通路,抑制基质金属蛋白酶-9 等基因的表达,从而抑制了癌细胞的生长和转移。肿瘤组织中 p65 异常高表达及核移位可增加促转移因子的表达,影响肿瘤的区域淋巴结转移及其对周围组织的侵袭,促进肿瘤发生转移。本研究结果与之相符,舌癌患者的 TNM 分期和有否淋巴结转移与 p65 的表达情况有关,TNM 分期高、有淋巴结转移者 p65 表达的阳性率高。

p65 还能调控细胞周期蛋白 D1 的表达,从而调控癌细胞的分化。Loercher 等⁸的体外实验表明 p65 是控制鳞状细胞癌分化和恶性表型的重要转录因子,但本实验未发现 p65 表达情况与舌癌患者病理分级之间有联系,推测舌癌细胞的分化是由多种因子调控的,p65 可能不是主要的影响因素。

p65 表达阳性的舌癌患者较阴性患者预后差,笔者认为与 p65 促进上述促转移因子高表达导致肿瘤复发、转移而造成患者预后不良有关。此外 p65 作为一种保护性应激蛋白,在放疗、化疗诱导癌细胞凋亡过程中可被激活而发生核移位,促进多种抗凋亡基因的表达,使癌细胞具有抵抗放疗、化疗的能力。舌癌 p65 高表达可能是舌癌放疗、化疗相对不敏感的原

因之一,也是影响预后的因素。Kim 等⁹认为 p65 是提高鳞状细胞癌放疗敏感性的治疗靶点,抑制 p65 激活可显著增加 SCC-35 癌细胞的放疗敏感性。Tamatani 等¹⁰也发现抑制 p65 信号传导能提高口腔癌常规化疗、放疗的敏感性。

本研究表明 p65 在舌癌组织中异常表达是判断舌癌转移、患者预后的分子生物学指标,也提示 p65 及其信号传导通路可能是舌癌治疗的新靶点。

[参考文献]

- 1] Mayo MW, Baldwin AS. The transcription factor NF-kappa B: Control of oncogenesis and cancer therapy resistance J. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1470(2): M55-62.
- 2] 邱蔚六主编. 口腔颌面外科理论与实践 M. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 565-567.
(Qu WL. Theory and practice of oral and maxillofacial surgery M. Beijing: People's Medical Publishing House, 1998: 565-567.)
- 3] 吴齐光主编. 口腔组织病理学 M. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 209.
(Wu QG. Oral histopathology M. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994: 209.)
- 4] Yu LL, Yu HG, Yu JP, et al. Nuclear factor-kappa B p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human colorectal carcinoma tissue J. *World J Gastroenterol*, 2004, 10 (22): 3255-3260.
- 5] Biswas DK, Shi Q, Bailly S, et al. NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis J. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(27): 10137-10142.
- 6] 梁新华, 毛祖彝, 何永文, 等. 尿激酶型纤溶酶原激活物在口腔鳞癌中的表达及意义 J. *华西口腔学杂志*, 2003, 21(2): 147-150.
(Liang XH, Mao ZY, He YW, et al. The expression of urokinase-type plasminogen activator in oral squamous cell carcinoma J. *West China J Stomatology*, 2003, 21(2): 147-150.)
- 7] Aggarwal S, Takada Y, Singh S, et al. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappa B signaling J. *Int J Cancer*, 2004, 111(5): 679-692.
- 8] Loercher A, Lee TL, Ricker JL, et al. Nuclear factor-kappa B is an important modulator of the altered gene expression profile and malignant phenotype in squamous cell carcinoma J. *Cancer Res*, 2004, 64(18): 6511-6523.
- 9] Kim KM, Zhang Y, Kim BY, et al. The p65 subunit of nuclear factor-kappa B is a molecular target for radiation sensitization of human squamous carcinoma cells J. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3 (6): 693-698.
- 10] Tamatani T, Azuma M, Ashida Y, et al. Enhanced radiosensitization and chemosensitization in NF-kappa B-suppressed human oral cancer cells via the inhibition of gamma-irradiation- and 5-FU-induced production of IL-6 and IL-8 J. *Int J Cancer*, 2004, 108 (6): 912-921.

(本文编辑 邓本姿)