

## · 临床研究 ·

NF- $\kappa$ B 和 CXCR4 在大肠腺癌中的表达及临床意义\*郑淑芳<sup>①</sup> 时丽芳<sup>①</sup> 展晓红<sup>②</sup> 秦晓静<sup>①</sup> 何滔<sup>①</sup>

**摘要** 目的:探讨NF- $\kappa$ B和CXCR4在大肠腺癌发生、发展、浸润转移中的作用及临床意义。方法:应用免疫组织化学S-P法检测60例大肠腺癌、23例大肠管状腺瘤、25例正常大肠黏膜组织中NF- $\kappa$ B和CXCR4的蛋白表达情况。结果:大肠腺癌组中的阳性表达均高于大肠管状腺瘤组和正常大肠黏膜组,大肠管状腺瘤组中NF- $\kappa$ B和CXCR4的阳性表达均高于正常大肠黏膜组,且大肠腺癌组、大肠管状腺瘤组、正常大肠黏膜组中的阳性表达差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ );大肠腺癌组中NF- $\kappa$ B和CXCR4的阳性表达均与癌组织的浸润深度、有无淋巴结转移有关( $P$ 均 $<0.05$ ),与患者的性别、年龄及癌组织的分化程度无关( $P$ 均 $>0.05$ );大肠腺癌组织中NF- $\kappa$ B和CXCR4的表达呈正相关( $r=0.346, P=0.007$ )。结论:NF- $\kappa$ B和CXCR4的高表达与大肠腺癌的发生、发展、浸润转移密切相关。

**关键词** 核因子 $\kappa$ B CXCR4 大肠腺癌 浸润 转移

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.16.010

## Expressions of Chemotatic Factor NF- $\kappa$ B and CXCR4 in Colorectal Adeno-carcinoma and Their Clinical Significance

Shufang ZHENG<sup>1</sup>, Lifang SHI<sup>1</sup>, Xiaohong ZHAN<sup>2</sup>, Xiaojing QIN<sup>1</sup>, Tao HE<sup>1</sup>

Correspondence to: Shu-fang ZHENG; E-mail: zhengshf@126.com

<sup>1</sup>Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Logistics College of Chinese People's Armed Police Forces (CPAPF), Tianjin 300162, China

<sup>2</sup>Department of Pathology, Qingdao Center Medical Group, Qingdao 266042, China

This work was supported by Program of Frontier Technology and Fundamentals of Its Application in Tianjin (11jcybjc13000)

**Abstract Objectives:** The aim of the current paper was to evaluate the role of the NF- $\kappa$ B and CXCR4 expressions in the oncogenesis, development, infiltration, and metastasis of colorectal adeno-carcinoma (CAdCa) and their clinical significances. **Methods:** The expression of NF- $\kappa$ B and CXCR4 in 60 cases with CAdCa, 23 with canalicular adenoma of large intestine (CALI), and 25 with normal colorectal mucosa (NCM) were detected using the SP immuno-histochemical method. **Results:** The positive expression of NF- $\kappa$ B and CXCR4 were both higher in the CAdCa group compared with the CALI and NCM groups ( $P < 0.05$ ). This positive expression was higher in the CALI group than in the CNM group. Statistically significant differences have been observed among the expressions in the CAdCa, CALI, and NCM groups ( $P < 0.05$ ). However, stronger expression of NF- $\kappa$ B and CXCR4 protein was observed in CAdCa, compared with that in normal paraneoplastic tissues ( $P < 0.05$ ). The positive expression of NF- $\kappa$ B and CXCR4 was closely correlated with the depth of tumor infiltration and the nodal metastasis ( $P < 0.05$ ). Moreover, a positive correlation was also observed between the expression of NF- $\kappa$ B and CXCR4 in CAdCa ( $r = 0.346, P = 0.007$ ). **Conclusion:** The over-expression of NF- $\kappa$ B and CXCR4 are closely correlated with the infiltration and metastasis of CAdCa.

**Keywords** NF- $\kappa$ B; CXCR4; Colorectal adeno-carcinoma; Infiltration; Metastasis

大肠腺癌是消化道常见恶性肿瘤之一。随着人们生活水平的提高和饮食习惯改变,其发病率呈明显上升趋势,死亡率也逐年增高,其主要死亡原因为癌组织的浸润转移。关于大肠腺癌浸润转移机制的研究报道较多,但有关NF- $\kappa$ B和CXCR4在大肠腺癌浸润转移中的作用报道极少。本研究应用免疫组织化学方法检测NF- $\kappa$ B和CXCR4在大肠腺癌、大肠管状腺瘤、正常大肠黏膜组织中的表达情况,以探讨其

与大肠腺癌发生、发展及浸润转移的关系。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

选取手术切除大肠腺癌标本60例(术前均未行放疗和化疗)。其中男35例,女25例;年龄35~84岁,中位年龄63岁。同期选取上述60例大肠腺癌标本距癌组织6cm以远的正常大肠黏膜组织25例(经病理切片证实无增生性及肿瘤性病变)及手术和内

作者单位:①武警后勤学院附属医院病理科(天津市300162);②山东省青岛市中心医院病理科

\* 本文课题受天津市应用基础及前沿技术研究计划(编号:11JCYBJC13000)资助

通信作者:郑淑芳 zhengshf@126.com

窥镜切除的大肠管状腺瘤23例。

1.2 方法

HE染色切片由两位高年资病理医师双盲法复核病理诊断,并明确分级、浸润深度及淋巴结转移情况,有争议由第三者复核。免疫组织化学法采用S-P两步法。NF-κB p65一抗为兔抗人单克隆抗体(Santa Cruz,稀释度1:200);CXCR4一抗为兔抗人多克隆抗体(Santa Cruz,稀释度1:50)。二抗选用SP9001(北京中杉金桥生物技术有限公司)。实验中以PBS液代替一抗作为阴性对照,以试剂公司提供的阳性对照片作为阳性对照同批次染色。

1.3 阳性判断标准

NF-κB p65阳性主要表达于肿瘤细胞胞浆和胞核中,CXCR4阳性表达于肿瘤细胞胞浆,两者均呈黄色细颗粒状。每张切片于肿瘤区域随机选取10个高倍镜视野(×400,避开大面积间质),按着色强度:所计数细胞无着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2

分,棕褐色为3分;按阳性细胞所占百分比:0~5%为0分,6%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,76%~100%为4分。两者积分相乘0分者为阴性(-),1~3分为弱阳性(+),4~7分为阳性(++),8~12分为强阳性(+++)。

1.4 统计学方法

使用SPSS 13.0统计软件进行统计学分析。等级资料采用非参数统计秩和检验(Mann-Whitney Test), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;相关性分析采用Spearman等级相关性检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组织中NF-κB p65和CXCR4的表达

随着大肠黏膜恶性程度的增加,NF-κB和CXCR4的阳性表达也逐渐增高,且大肠腺癌、大肠管状腺瘤、正常大肠黏膜组织中的二者阳性表达差异均有统计学意义( $P$ 均 $< 0.05$ ,表1,图1~6)。

表1 不同组织中NF-κB p65和CXCR4的表达例

Table 1 Expression of NF-κBp65 and CXCR4 in different tissues

组别	例数	NF-κB p65					CXCR4				
		-	+	++	+++	P	-	+	++	+++	P
大肠腺癌组	60	9	16	18	17	0.05 <sup>a</sup>	1	24	23	12	<0.05 <sup>a</sup>
大肠管状腺瘤组	23	9	7	4	3	0.05 <sup>b</sup>	5	8	8	2	<0.05 <sup>b</sup>
正常大肠黏膜组	25	18	4	2	1	0.05 <sup>c</sup>	15	10	0	0	<0.05 <sup>c</sup>

注:<sup>a</sup>与大肠管状腺瘤组比较;<sup>b</sup>与正常大肠黏膜组比较;<sup>c</sup>与大肠腺癌组比较

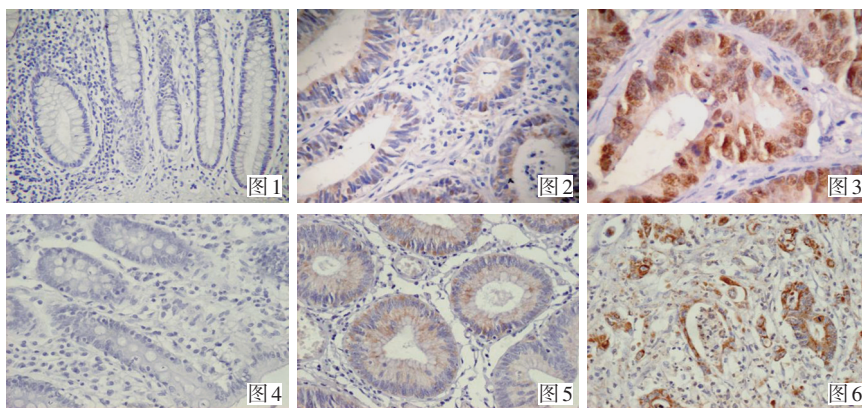


图1 NF-κB p65在正常大肠黏膜中的表达(SP×100)

Figure 1 Expression of NF-κBp65 in normal colorectal mucosa

图2 NF-κB p65在大肠管状腺瘤中的表达(SP×200)

Figure 2 Positive expression of NF-κBp65 in canalicular adenoma of the large intestine

图3 NF-κB p65在大肠腺癌中的表达(SP×400)

Figure 3 Positive expression of NF-κBp65 in colorectal adeno-carcinoma

图4 CXCR4在正常大肠黏膜中的表达(SP×200)

Figure 4 Expression of CXCR4 in normal colorectal mucosa

图5 CXCR4在大肠管状腺瘤中的表达(SP×200)

Figure 5 Positive expression of CXCR4 in colorectal adenoma of the large intestine

图6 CXCR4在大肠腺癌中的表达(SP×200)

Figure 6 Positive expression of CXCR4 in colorectal adeno-carcinoma

## 2.2 大肠腺癌组织中NF-κB p65和CXCR4的表达与临床病理的关系

大肠腺癌组织中NF-κB p65和CXCR4的阳性表达均与癌组织的浸润深度、有无淋巴结转移有关( $P$ 均 $<0.05$ ),而均与患者的年龄、性别及癌组织的分化程度无关( $P$ 均 $>0.05$ ,表2)。

## 2.3 大肠腺癌组织中NF-κB p65与CXCR4表达的相关性分析

经Spearman等级相关分析发现,大肠腺癌组织中NF-κB p65与CXCR4的表达呈正相关( $r=0.346$ , $P=0.007$ ,表3)。

表2 大肠腺癌组织中NF-κB p65和CXCR4的表达与临床病理的关系 例

Table 2 Relationship between the NF-κB p65 and CXCR4 expression in colorectal adeno-carcinoma and the clinicopathologic parameters

临床病理联系	例数	NF-κB p65					$P$	CXCR4					$P$
		-	+	++	+++	-		+	++	+++			
性别	男	35	6	8	11	10	$>0.05$	0	16	14	5	$>0.05$	
	女	25	3	8	7	7		1	8	9	7		
年龄(岁)	$<63$	30	6	7	9	8	$>0.05$	0	13	10	7	$>0.05$	
	$\geq 63$	30	3	8	10	9		1	11	13	5		
分化程度	中高分化	42	8	10	14	10	$>0.05$	1	18	16	7	$>0.05$	
	低分化	18	1	7	3	7		0	6	7	5		
浸润深度	肌层	19	6	6	4	3	$<0.05$	1	9	7	2	$<0.05$	
	浆膜	41	3	11	14	13		1	11	16	13		
淋巴结转移	有	29	1	9	7	12	$<0.05$	1	4	15	9	$<0.05$	
	无	31	8	11	7	5		0	20	8	3		

表3 大肠腺癌组织中NF-κB p65与CXCR4表达的相关性 例

Table 3 Correlation between the expressions of NF-κB p65 and CXCR4 in colorectal adeno-carcinoma

NF-κB p65	CXCR4				合计	$r$	$p$
	-	+	++	+++			
-	0	4	5	0	9	0.346	0.007
+	0	10	5	1	16		
++	0	8	6	4	18		
+++	1	2	7	7	17		
合计	1	24	23	12	60		

## 3 讨论

趋化因子是一类能吸引或激活白细胞的促炎性细胞因子,通过与受体结合,参与局部炎症反应,并且与肿瘤细胞的迁移和肿瘤内血管生成密切相关。CXCR4作为趋化因子SDF-1的受体,是一个编码352个氨基酸且高度保守的G蛋白偶联七次跨膜受体<sup>[1]</sup>,与SDF-1具有高度的亲和力,两者特异性结合,形成SDF-1/CXCR4轴,启动细胞内信号转导系统,发挥多种生物学功能。NF-κB作为转录因子,广泛存在于真核细胞内,能与多种细胞基因启动子或增强子序列的特定位置发生特异性结合,促进其转录和表达。

### 3.1 NF-κB和CXCR4与大肠腺癌的发生

本实验应用免疫组织化学S-P法检测了60例大肠腺癌、23例大肠管状腺瘤、25例正常大肠黏膜组织

中NF-κB和CXCR4的表达,结果显示随着大肠黏膜恶性程度的增加,二者的阳性表达也在逐渐升高,提示NF-κB和CXCR4与大肠腺癌发生有关。本研究推测,CXCR4作为趋化因子受体家族的重要成员,其分泌增高,可能在趋化白细胞参与炎症反应过程中,造成过度的组织损伤,增加癌变的机率。有研究<sup>[2]</sup>报道,幽门螺杆菌感染的胃黏膜组织中CXCR4的表达增高,导致胃黏膜的炎性损伤,可能增加了损伤黏膜的癌变机率;在炎性肠病中,CXCR4的表达增加也可增加肠黏膜炎性损伤的机率。采用凝胶电泳迁移率(EMSA)方法检测结肠直肠癌组织、结肠腺瘤、正常结肠、组织中NF-κB的活化情况,结果发现结肠、直肠癌和腺瘤组织NF-κB活化程度比正常结肠、直肠组织明显增高,有显著性差异,说明结肠、直肠癌的发生发展与NF-κB活化有关。此外CXCR4与其配体SDF-1结合还可激活NF-κB信号传导途径,活化的NF-κB可以诱导多种抗凋亡基因的表达,如MnSOD、A20、Bcl-XL等<sup>[3]</sup>从而促进肿瘤细胞的增殖分化及血管生成。这些机制均有待于进一步探讨。

### 3.2 NF-κB和CXCR4与大肠腺癌的浸润转移

本实验分析了60例大肠腺癌组织中NF-κB和CXCR4的表达与临床病理的关系,发现NF-κB和CXCR4的表达均与患者的年龄、性别及癌组织的分化程度无关,而均与癌组织的浸润深度、淋巴结转移



有关,提示NF- $\kappa$ B和CXCR4参与了大肠腺癌的浸润转移。有关于NF- $\kappa$ B和CXCR4促进大肠腺癌转移的分子机制鲜见报道,但依据本实验结果及相关研究报告推测其可能的机制有:1)SDF-1/CXCR4有诱导淋巴细胞归巢的作用<sup>[4]</sup>。此假设包括SDF-1/CXCR4在内的趋化因子是否也能够介导肿瘤细胞向特异性部位-淋巴结“归巢”,形成淋巴结特异性转移,有待进一步探讨。同时SDF-1/CXCR4在血液中的表达还能影响成年小鼠NK细胞的运动<sup>[5]</sup>。2)加速细胞外基质降解,促进肿瘤细胞的浸润转移。已知的细胞外基质降解酶类有基质金属蛋白酶类(MMPs)、尿激酶型纤溶酶原激活物(u-PA)以及组织型纤溶酶原激活物(t-PA)等,其中MMPs基因启动子区域-600、-615上有NF- $\kappa$ B的结合位点,uPA基因启动子区域也有3个NF- $\kappa$ B的结合位点:-1 596~-1 588区,-1 865区,-1 835区<sup>[6]</sup>,当肿瘤细胞异常高表达的CXCR4与SDF-1结合后,可促使NF- $\kappa$ B过度活化,增加其与上述位点上NF- $\kappa$ B序列的结合,从而明显上调MMPs和uPA的表达,加速胞外基质的降解,有利于肿瘤细胞的浸润转移。3)促进肿瘤血管生长,加速肿瘤细胞的增殖和浸润转移<sup>[7]</sup>。血管内皮生长因子(VEGF)能选择性地促进血管内皮细胞分裂进而促进血管新生,同时还具有增加血管尤其是微血管渗透性的功能。肿瘤细胞合成的CXCR4可直接上调VEGF表达,也可以通过激活NF- $\kappa$ B信号转导途径,间接上调VEGF表达<sup>[8]</sup>。VEGF的高表达可以刺激血管内皮细胞增殖、迁移并形成新生血管,给肿瘤细胞提供营养,促进肿瘤增殖。

Schimanski等<sup>[9]</sup>研究发现有肝脏和淋巴结转移的大肠腺癌组织中CXCR4表达增高,与本实验结果一致。霍胜军等<sup>[10]</sup>研究CXCR4抑制剂LPS对胆管癌的影响时发现LPS能有效抑制胆管癌细胞株QBC939的生长与转移能力,也支持本实验结果。

### 3.2 NF- $\kappa$ B和CXCR4表达相关性分析

本实验结果显示NF- $\kappa$ B与CXCR4在大肠腺癌组织中的阳性表达均明显高于大肠管状腺癌组和正常大肠黏膜组,且经Spearman等级相关分析显示二者呈正相关。研究表明,编码趋化因子及其受体的基因均为NF- $\kappa$ B调节的目标基因。CXCR4基因启动子上存在着多个NF- $\kappa$ B的结合位点:-897区域,-209区域,-66~+7区域<sup>[11]</sup>,通过激活NF- $\kappa$ B,使其与CXCR4启动子上的-66~+7区域结合可直接激活转录,明显上调CXCR4的表达量并增强其与SDF-1结合的敏感性。另一方面,CXCR4与SDF-1特异性结合后可激活多条信号转导途径,其中最重要的一条包括SDF-1/CXCR4 $\rightarrow$ PI-3K $\rightarrow$ AKT $\rightarrow$ NF- $\kappa$ B,使NF- $\kappa$ B活

化,从而产生多种生物学效应<sup>[12]</sup>。有研究显示<sup>[13]</sup>,抑制胶质瘤细胞中NF- $\kappa$ B的活性,能显著降低患者的死亡率。因此,NF- $\kappa$ B和CXCR4两者相互作用、相互影响,进而调节着各自的生物学功能,而这种可能的作用机制及相关的信号转导通路可能会成为进一步研究的热点。

综上所述,NF- $\kappa$ B和CXCR4的过度表达与大肠腺癌的发生、发展、浸润转移密切相关,其作用机制有待进一步探讨。

### 参考文献

- Murdoch C. CXCR4: chemokine receptor extraordinaire[J]. *Immunol Rev*, 2000, 177(1): 175-184.
- Malvoisin E, Livrozet JM, Makloufi D, et al. Soluble chemokine receptor CXCR4 is present in human sera[J]. *Anal Biochem*, 2011, 414(2): 202-207.
- Mao X, Moerman-Herzog AM, Wang W, et al. Differential transcriptional control of the superoxide dismutase-2 kappaB element in neurons and astrocytes[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(47): 35863-35872.
- Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis[J]. *Nature*, 2001, 410(6824): 50-56.
- Noda M, Omatsu Y, Sugiyama T, et al. CXCL12-CXCR4 chemokine signaling is essential for NK-cell development in adult mice[J]. *Blood*, 2011, 117(2): 451-458.
- Tanaka Y, Kobayashi H, Suzuki M, et al. Transforming growth factor-beta1-dependent urokinase up-regulation and promotion of invasion are involved in Src-MAPK-dependent signaling in human ovarian cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(10): 8567-8576.
- 孙甲甲,陈剑秋.CXCR4在原发性肝细胞癌中的表达及意义[J].*中国肿瘤临床*,2009,36(8):218-221.
- Wu M, Chen Q, Li D, et al. LRRC4 inhibits human glioblastoma cells proliferation, invasion and proMMP-2 activation by reducing SDF-1 $\alpha$ /CXCR4-mediated ERK1/2 and Akt Signaling Pathways[J]. *J Cell Biochem*, 2008, 103(1): 245-255.
- Schimanski CC, Schwald S, Simiantonaki N, et al. Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(5): 1743-1750.
- 霍胜军,汤恢焕,曾祥福.CXCR4抑制剂LPS对胆管癌细胞株QBC939生物学行为的影响[J].*中国肿瘤临床*,2010,37(12):669-672.
- Tang CH, Chuang JY, Fong YC, et al. Bone-derived SDF-1 stimulates IL-6 release via CXCR4, ERK and NF-kappaB pathways and promotes osteoclastogenesis in human oral cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(8): 1483-1492.
- 马向涛,余力伟,王杉,等.趋化因子受体CXCR4/CXCL12信号转导通路与胃癌淋巴结转移关系的研究[J].*中国肿瘤临床*,2007,34(10): 544-546.
- Coupienne I, Bontems S, Dewaele M, et al. NF-kappaB inhibition improves the sensitivity of human glioblastoma cells to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2011, 81(5): 606-616.

(2011-12-07收稿)

(2012-02-03修回)

(本文编辑:邢颖)