

· 临床研究 ·

NF- κ B、Notch-1 和 Ki-67 在结肠癌中的表达及其意义

何晓彬, 赖 敏

(泸州医学院附属医院消化内科, 四川泸州 646000)

摘要:目的 探索核因子 κ B(NF- κ B)、Notch-1 和 Ki-67 在结肠癌组织中的表达及其临床意义。方法 收集泸州医学院附属医院病理科 2008 年 12 月至 2010 年 1 月存档结肠蜡块 120 例, 其中结肠腺瘤 20 例; 结肠癌 90 例, 包括高分化腺癌 45 例, 中分化腺癌 33 例, 低分化腺癌 12 例; 结肠正常黏膜组织 10 例。采用免疫组织化学的方法检测 NF- κ B、Notch-1 和 Ki-67 的表达。结果 (1) 在结肠正常黏膜-腺瘤-癌序列中, NF- κ B 的阳性率呈递增趋势, 其在结肠癌组中的表达率高于正常黏膜组 ($P < 0.05$); Notch-1 的阳性率呈递增趋势, 其在结肠癌组中的表达率高于正常黏膜组 ($P < 0.05$); Ki-67 的阳性率呈递增趋势, 其在结肠癌组中的阳性表达率高于结肠腺瘤组及正常黏膜组 ($P < 0.05$)。 (2) NF- κ B 的表达与结肠癌大小、不同侵袭深度、有、无淋巴结转移及分化程度有关 ($P < 0.05$); Notch-1 的阳性表达率与结肠癌大小、分化程度显著相关 ($P < 0.05$); Ki-67 的阳性表达率与结肠癌的组织分化程度及有、无淋巴结转移有关 ($P < 0.05$)。秩和检验显示 NF- κ B、Notch-1、Ki-67 在结肠癌不同分化程度中的表达率不同, 分化越低, 阳性率越高 ($P < 0.05$)。 (3) NF- κ B、Notch-1、Ki-67 在结肠癌组织中的表达呈正相关 ($P < 0.01$)。结论 NF- κ B、Notch-1、Ki-67 与结肠癌的发生、发展有关; Notch 信号通路和 NF- κ B 信号通路可能相互影响共同参与结肠癌的发生、发展。

关键词:核因子 κ B; 结肠肿瘤; 免疫组织化学; Notch-1 蛋白; Ki-67 蛋白

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.03.008

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)03-0230-03

The expression and clinical significance of NF- κ B, Notch-1 and Ki-67 in colonic mucosa in patients with colon cancer

He Xiaobin, Lai Min

(Department of Digestion, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective The present experiment is to investigate the expression of NF- κ B, Notch-1 and Ki-67 in colonic mucosa in patients with colon cancer, for the clinical diagnosis and useful prognostic indicator. **Methods** The 120 cases of paraffin block from the department of pathology of the affiliated hospital of Luzhou medical college from December 2008 to January 2010, 20 colon adenoma, 90 colon cancer, with 45 well-differentiated, 33 moderately differentiated and 12 poorly differentiated, 10 cases of normal colon. NF- κ B, Notch-1, Ki-67 expression was assessed by immunohistochemistry method. **Results** (1) We demonstrated that the positive rate of NF- κ B in the sequence of normal colon mucosa-adenoma-carcinoma was gradually increased. The positive rate of NF- κ B in colon cancer was higher than that of normal mucosa group ($P < 0.05$). The positive rate of Notch-1 in the sequence of normal colon mucosa-adenoma-carcinoma was gradually increased. The positive rate of Notch-1 in colon cancer was higher than that of normal mucosa group ($P < 0.05$). The positive rate of Ki-67 in the sequence of normal colon mucosa-adenoma-carcinoma was gradually increased. The positive rate of Ki-67 in colon cancer group was higher than that of colon adenoma group and normal colon mucosa group ($P < 0.05$). (2) We founded that the positive rate of NF- κ B in colon cancer concerned with tumor size, different depth of invasion, lymph node metastasis and extent of differentiation ($P < 0.05$). The positive rate of Notch-1 in colon cancer concerned with tumor size and extent of differentiation ($P < 0.05$). The positive rate of Ki-67 in colon cancer concerned with the differentiation degree and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The expression of NF- κ B, Notch-1 and Ki-67 by rank sum test was distinguished at distinct differentiation degree in colon cancer. The lower differentiation, the higher positive rate was ($P < 0.05$). (3) We also founded that the expression of NF- κ B, Notch-1 and Ki-67 in colon cancer had positive correlation ($P < 0.01$). **Conclusion** All above, our data imply that (1) the high expression of NF- κ B, Notch-1 and Ki-67 in colon mucosa is related with the pathogenesis and development of colon cancer. (2) NF- κ B signaling pathway and Notch signaling pathway may interact together in the pathogenesis and development of colon cancer.

Key words: NF-kappaB; colonic neoplasms; immunohistochemistry; Notch-1 protein; Ki-67 protein

核因子 κ B(NF- κ B) 是一种特异的核蛋白因子, 其活化后参与多种疾病的发病过程, 与细胞的生长分化、增殖、凋亡及机体的炎症反应等过程有关, 还与肿瘤的发生、发展、癌细胞的浸润转移、抗凋亡及耐药性的产生有密切关系^[1-3]。最近有很多研究发现, Notch 信号通路可能参与肿瘤的发生、发展, 并在不同肿瘤中呈现出抑癌或者促癌机制^[4]。Notch-1 受体属于 Notch 受体家族, 具有调节细胞分化、发育的功能。增殖细胞核抗原

Ki-67 是一种与细胞周期相关的蛋白质, 是目前多种恶性肿瘤研究中的热门生物指标, 可以通过 Ki-67 抗原的检测, 了解恶性肿瘤的细胞增殖活性。本文通过对比观察 NF- κ B、Notch-1 和 Ki-67 在结肠正常黏膜、结肠腺瘤、结肠癌组织中的表达, 探索 NF- κ B、Notch-1 和 Ki-67 与结肠癌发生、发展的关系以及它们之间的相关性, 为结肠癌的临床诊疗与预后判断提供有参考价值的指标。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取泸州医学院附属医院病理科 2008 年 12 月至 2010 年 1 月存档的结肠癌病理标本蜡块 120 例, 每例标本病例资料完整, 病理类型均经病理诊断证实。10 例结肠正常黏膜标本, 20 例结肠腺瘤标本, 90 例结肠癌标本。其中男 63 例, 女 27 例; 肿瘤直径大于或等于 5 cm 66 例, 小于 5 cm 24 例; 淋巴结转移: 有转移 33 例, 无转移 57 例; 组织病理学分级: 高分化腺癌 45 例, 中分化腺癌 33 例, 低分化腺癌 12 例。排除标准: 所有被检测病例无慢性炎症性肠病史或结肠腺瘤性息肉, 特别是家族性多发性肠息肉病史, 术前均未行放疗。

1.2 方法 (1) 主要试剂: NF-κB 兔抗人多克隆抗体、Notch-1 小鼠抗人单克隆抗体、Ki-67 羊抗人多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品。SP 免疫组织化学系列工作液试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。(2) 检测方法: 所有标本经 10% 的甲醛固定, 常规石蜡包埋连续切片, 厚 4 μm。采用免疫组织化学 SP 法检测, 步骤按试剂盒说明书操作。每例切片用磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作阴性对照, 用已知阳性表达的结肠癌标本作阳性对照。

1.3 免疫组织化学结果判定 按照 Maruyama 等^[5] 提出的判断方法, 以细胞膜、细胞质、细胞核中出现淡黄色或棕黄色颗粒为阳性表达, 每张切片随机观察 5 个视野, 取均值, 表达率大于 10% 的细胞为阳性细胞。

1.4 统计学处理 本实验数据经 SPSS17.0 统计软件分析。计数资料样本率之间的比较分析采用 χ² 检验及 Fisher 精确概率法检验, 非参数统计分析采用秩和检验, 相关性分析采用 Spearman 等级相关分析法。

2 结果

2.1 NF-κB 在不同组织中的表达情况 NF-κB 在结肠正常黏膜-腺瘤-癌序列中的表达率呈逐步递增趋势, 在结肠正常黏膜中阳性表达率 10%, 结肠腺瘤中阳性表达率 35%, 结肠癌中阳性表达率 56.7%。NF-κB 在结肠癌组中的表达率高于正常黏膜组 (χ² = 7.853, P < 0.05), 与结肠腺瘤组相比, 差异无统计学意义 (χ² = 3.082, P = 0.079)。NF-κB 在正常黏膜与结肠腺瘤组中的表达, 差异无统计学意义 (χ² = 2.060, P = 0.151)。

2.2 Notch-1 在不同组织中的表达情况 Notch-1 在结肠正常黏膜-腺瘤-癌序列中的表达率呈逐步递增趋势, 阳性率分别为 20%、55%、62.2%。Notch-1 在结肠癌组中的表达率高于正常黏膜组 (χ² = 6.586, P < 0.05), 与结肠腺瘤组相比, 差异无统计学意义 (χ² = 0.358, P = 0.549)。Notch-1 在正常黏膜与结肠腺瘤组中的表达, 差异无统计学意义 (χ² = 3.215, P = 0.073)。

2.3 Ki-67 在不同组织中的表达情况 Ki-67 在结肠正常黏膜-腺瘤-癌序列中的表达率呈逐步递增趋势, 阳性率分别为 40%、75%、83.3%。Ki-67 在结肠癌组中的表达率高于正常黏膜组 (χ² = 13.228, P < 0.05), 高于结肠腺瘤组 (χ² = 7.275, P < 0.05)。Ki-67 在结肠腺瘤组中的表达率与正常黏膜相比, 差异无统计学意义 (χ² = 1.734, P = 0.188)。

2.4 NF-κB、Notch-1、Ki-67 阳性表达率与结肠癌临床病理特征的关系 见表 1。

2.5 NF-κB、Notch-1、Ki-67 在结肠癌中表达的相关性 在 90 例结肠癌中, 统计结果表明, NF-κB、Notch-1 在结肠癌组织中的表达呈正相关 (r = 0.831, P < 0.01); Notch-1、Ki-67 在结肠

癌组织中的表达呈正相关 (r = 0.986, P < 0.01); NF-κB、Ki-67 在结肠癌组织中的表达呈正相关 (r = 0.861, P < 0.01)。

表 1 NF-κB、Notch-1、Ki-67 在结肠癌中的表达与临床病理因素的相关性

临床病理特征	n	NF-κB(+)	Notch-1(+)	Ki-67(+)
组织				
正常结肠	10	1	2	2
结肠腺瘤	20	7	11	9
结肠癌	90	51	56	68
性别				
男	63	36	38	48
女	27	15	18	20
年龄(岁)				
<50	33	18	20	25
≥50	57	33	36	43
瘤体大小(cm)				
<5	24	12	12	18
≥5	66	39	44	50
分化程度				
高分化	45	24■	19▲	32◆
中分化	33	20■	29▲	26◆
低分化	12	7■	11▲	10◆
Dukes 分期				
AB	1 836	819	1 019	1 227
CD	333	222	213	263
淋巴结转移				
有	33	24	23	29
无	57	27	33	39

■: P < 0.05, NF-κB 在高、中、低分化组阳性表达率比较; ▲: P < 0.05, Notch-1 在高、中、低分化组阳性表达率比较; ◆: P < 0.05, Ki-67 在高、中、低分化组阳性表达率比较。

3 讨论

NF-κB 属于受调蛋白水解酶依赖的受体信号转导通路, NF-κB 最常见的是 p50/p65 异二聚体形式存在于细胞质中, 其几乎存在于体内所有细胞中。静息状态时以无活性方式存在于细胞质中。当细胞受到放疗、化疗、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 等外界信号刺激时, 活化的 NF-κB 转移进入细胞核内, 与靶基因启动子固定核苷酸序列结合, 启动相关基因的转录并接受多种刺激, 进而调节细胞的免疫和炎症反应以及调控细胞增殖。NF-κB 持续表达可能引起肠黏膜细胞过度增生, 机制主要是 NF-κB 信号通路可以调节细胞的转化和增殖, 其对结肠癌细胞的增殖起重要作用^[6]。另外, NF-κB 信号通路在结肠癌细胞抗凋亡中发挥了重要作用。有研究发现激活的 NF-κB 能够抑制依赖 p53 的细胞凋亡。近年来有报道, NF-κB 诱导的死亡效应域包含蛋白可以通过抑制 TNF 诱导的 Bel-2 家族成员抑制因子半胱天冬酶-8 (caspase-8) 的活性而抑制细胞凋亡, 对不依赖 caspase-8 的细胞凋亡无抑制作用^[7]。在结肠癌中激活的 NF-κB 能促进癌细胞的转移已经有报道^[8-9]。研究发现, 外科手术切除肿瘤后, LPS 等作用于肿瘤细胞的 NF-κB 信号通路, 使其被激活, 通过上调金属基质蛋白酶-2 和血管内皮细胞生长因子的表达, 从而促进肿瘤的生长和远处转移^[10]。NF-κB 信号通路能够调节参与了肿瘤的浸润转移过程的多种基因和细胞因子的表达, 推测其在结肠癌的浸润转移中起作用。本研究结果显示, NF-κB 在正常结肠黏膜-结肠腺瘤-结肠癌序列中的表

达率呈逐步递增趋势。NF- κ B 在结肠癌组中的表达率高于正常黏膜组。NF- κ B 在结肠癌组织中表达与结肠癌大小、不同侵袭深度,有、无淋巴结转移及分化程度有关。NF- κ B 信号通路和结肠癌的关系是当前一个大有可为的研究领域,其作为治疗靶点应进一步研究。NF- κ B 信号通路作为结肠癌治疗的新靶点,通过特异性地阻断 NF- κ B 信号通路可以有效抑制结肠癌的发展,改善患者的预后。

Notch 信号通路是一个进化上高度保守的细胞间信号通路,Notch 在人体有 4 种受体(Notch-1 到 Notch-4)及 5 种配体。Notch 受体主要分布于干细胞或原始细胞表面。Notch 信号转导在细胞分化中起到了中枢性的作用,它不仅维持干细胞的储备数量,也决定着细胞的命运^[11]。正常 Notch 信号转导通路参与了细胞正常增殖和分化、器官和组织的更新,当受到外界刺激时,Notch 信号表达增加,细胞增殖增加,肿瘤发生^[12]。Sang 等^[13]通过研究 Notch 信号转导通路的靶基因 HES1,发现该基因具有抑制静止期成纤维细胞的未成熟细胞衰老和异常分化的能力,在结肠癌的形成过程中其表达增加^[14]。因此,在结肠癌中 HES1 的激活,可以使干细胞逃避分化和发展成不可逆的增殖细胞,从而导致结肠癌的发生。研究发现,Notch-1 表达在隐窝下端 1/3 的增殖区,也大量表达在黏膜固有层。在结肠黏膜刷状缘中 Notch-1 有表达^[15]。本研究结果显示,Notch-1 在正常结肠黏膜-结肠腺瘤-结肠癌序列中的表达率呈逐步递增趋势。Notch-1 在结肠癌组中的表达率高于正常黏膜组。Notch-1 在结肠癌组织中表达与肿瘤大小、分化程度显著相关。可以预测以 Notch 为靶点的肿瘤基因治疗及新药开发将为结肠癌治疗的研究开辟新的领域。

Ki-67 抗体属于 IgG₁ 家族,是用霍奇金瘤系 L428 细胞的粗核成分免疫鼠后首次制备出,其对应的抗原命名为 Ki-67 抗原。Ki-67 蛋白属于非组蛋白,对蛋白酶有很高的敏感性,很难分离提取。许多研究表明,Ki-67 蛋白的过量表达与胃癌、大肠癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤的浸润转移及预后有密切关系。Ki-67 的阳性表达强度与结肠癌的组织学类型无明显相关性,但其表达的变化对早期发现、诊断结肠癌及监视腺瘤癌变有重要意义。Ki-67 标记指数高的大肠腺瘤更易恶变,应及早手术治疗。

参考文献:

- [1] Karin M. NF-kappa B and cancer: mechanisms and targets [J]. *Mol Carcinog*, 2006, 45(6): 355-361.
- [2] Aranha MM, Borralho PM, Ravasco P, et al. NF-kappa B and apoptosis in colorectal tumorigenesis [J]. *Eur J Clin Invest*, 2007, 37(5): 416-424.
- [3] Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquiti-

nation; the control of NF- κ B activity [J]. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18(5): 621-663.

- [4] Leng KG, Karsan A. Resent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis [J]. *Blood*, 2006, 107(6): 222-223.
- [5] Maruyama K, Ochiai A, Akimoto S, et al. Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer [J]. *Oncology*, 2000, 59(4): 302-309.
- [6] Bharti AC, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64(6): 883-888.
- [7] You Z, Ouyang H, Lopatin D, et al. Nuclear factor-kappa B-inducible death effector domain-containing protein suppresses tumor necrosis factor-mediated apoptosis by inhibiting caspase-8 activity [J]. *J Biol Chem*, 2001, 6(28): 26398-26340.
- [8] Maeda S, Omata M. Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappa B activation [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(5): 836-842.
- [9] Karin M, Cao Y, Greten FR, et al. NF- κ B in cancer from innocent bystander to major culprit [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(4): 301-310.
- [10] Harney JH, Bucana CD, Lu W, et al. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion [J]. *Int J Cancer*, 2002, 101(5): 415-422.
- [11] Radtke F, Fasnacht N, Macdonald HR. Notch signaling in the immune system [J]. *Immunity*, 2010, 32(1): 14-27.
- [12] Li L, Neaves WB. Normal stem cells and cancer stem cells: The Niche matters [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(29): 4553-4557.
- [13] Sang L, Coller HA, Roberts JM. Control of the reversibility of cellular quiescence by the transcriptional repressor HES1 [J]. *Science*, 2008, 321(8): 1095-1100.
- [14] Reedijk M, Odorcic S, Zhang H, et al. Activation of Notch signaling in human colon adenocarcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2008, 33(10): 1223-1229.
- [15] Sander GR, Powell BC. Expression of Notch receptors and ligands in the adult gut [J]. *J Histochem Cytochem*, 2004, 52(4): 509-516.

(收稿日期: 2011-08-27 修回日期: 2011-10-27)

(上接第 229 页)

- [8] 陈怀远, 韩慕, 卢家桢. 浅谈着色牙的烤瓷修复 [J]. *北京口腔医学*, 1997, 5(11): 1362-1371.
- [9] 高承志. 烤瓷修复中色彩相关问题 [J]. *中华口腔医学杂志*, 1999, 34(2): 316-318.
- [10] Douglas RD, Przybylska M. Predicting porcelain thickness

required for dental shade matches [J]. *J Prosthet Dent*, 1999, 82(2): 143-149.

- [11] Douglas RD. Precision of in vivo colorimetric assessments of teeth [J]. *J Prosthet Dent*, 1997, 77(3): 464-466.

(收稿日期: 2011-08-09 修回日期: 2011-10-22)