

乳腺癌组织血清 NF- κ B p65 表达分析及临床意义

杨明峰 李志国 孙红岗 董学君

摘要 目的 检测乳腺癌患者血清和组织 NF- κ B p65 的表达,探讨 NF- κ B p65 血清与组织表达是否一致;血清表达与乳腺癌发生发展的关系。方法 采用 RT-PCR 和 Western blotting 检测 41 例乳腺癌及癌旁组织 NF- κ B p65 的表达。ELISA 法检测 80 例乳腺癌、60 例正常和良性肿块患者血清 NF- κ B p65 水平。分析血清与组织 NF- κ B p65 表达关系及血清表达与临床病理结果的关系。结果 41 例乳腺癌患者组织 RT-PCR 和 Western blotting 结果表明 NF- κ B p65 mRNA 和蛋白表达水平均高于癌旁和良性组 ($P < 0.05$),高表达率为 (87.9%, 82.9%);血清 NF- κ B p65 的阳性率为 85.4%,血清和组织表达一致性检验发现两者具有统计学意义 ($Kappa = 0.458$),表达一致率为 73.2%。80 例乳腺癌患者血清 NF- κ B p65 表达与病理结果相关性分析表明血清 NF- κ B p65 表达与乳腺癌患者的淋巴结是否转移及 Her-2 高表达明显相关 ($P < 0.05$)。结论 血清 NF- κ B p65 浓度可反映乳腺癌患者组织 NF- κ B p65 表达水平,同时可反应乳腺癌患者转移和 Her 表达情况,为临床诊断乳腺癌提供了新的思路。

关键词 乳腺癌 转录因子 NF- κ B

Clinical Significance of The Expressions of NF- κ B p65 In Serum and Tissues from Breast Cancer. Yang Mingfeng, Li Zhiguo, Sun Honggang, Dong Xuejun. Molecular Medicine Center, Shaoxing People's Hospital, Shaoxing Hospital of Zhejiang University, Zhejiang 312000, China

Abstract Objective To investigate the consistency of NF- κ B p65 expression in serum and tissue, and study the relationship between serum NF- κ B p65 and the development of breast cancer. **Methods** Expressions of NF- κ B p65 in breast cancer, adjacent and benign tumor tissues were detected by RT-PCR and Western blotting. Expressions of NF- κ B p65 in serum were detected by ELISA. The agreement of NF- κ B p65 expression in serum and tissue was analyzed by Kappa test. And the clinical significance of serum NF- κ B p65 in the development of breast cancer was analyzed by investigating the relationship of the expression levels of serum NF- κ B p65 with clinical pathology results. **Results** The frequency of NF- κ B p65 mRNA positive was (87.9%, 82.9%) by RT-PCR and Western blotting, and serum NF- κ B p65 positive was 85.4% by ELISA. The statistically significant Kappa test indicated that NF- κ B p65 expression in tissue and serum were agreement ($Kappa = 0.458$). The levels of serum NF- κ B p65 was correlative with lymph node metastasis, ER, PR and Her-2 expression ($P < 0.05$). **Conclusion** The levels of serum NF- κ B p65 response to that in breast cancer tissues. Serum NF- κ B p65 may be a biomarker of breast cancer malignancy.

Key words Breast cancer; Transcription factor; NF- κ B

NF- κ B 作为调节多种蛋白转录的转录因子,在乳腺癌的发生和发展过程中起十分重要的作用^[1,2]。目前有不少的国内外文献报道 NF- κ B p65 mRNA 在癌组织中高表达,且与癌症转移相关^[3,4];但 NF- κ B p65 血清蛋白表达是否与组织 mRNA 表达一致,血清表达与病理特征有何关系,结果尚不一致。本文用 ELISA 法、RT-PCR 法和 Western blotting 法检测

乳腺癌患者血清 NF- κ B p65、组织 NF- κ B p65 mRNA 及 NF- κ B p65 蛋白的表达,分析组织和血清中的表达是否一致,血清学检测与临床病理特征有何关系,评价血清 NF- κ B p65 在乳腺癌诊断和治疗中的应用价值。

材料与方法

1. 材料:收集笔者医院 2009 年 6~9 月 41 例乳腺癌手术组织(病理诊断明确,术前未做过放疗和化疗),癌旁组织和 15 例乳腺良性肿块组织为对照组(经 HE 染色观察图 1)。收集上述乳腺癌患者血清,另收集 39 例乳腺癌患者血清,60 例乳腺良性肿块和正常人血清为对照组。收集的组织和血清标本经分装后分别保存于液氮和 -80℃ 冰箱。80 例患者均为女性,年龄 31~77 岁,病理类型见表 2。NF- κ B p65 ELISA 试

基金项目:浙江省医药卫生科学研究基金资助项目(2009A208);浙江省科技厅公益类项目(2010C33010);绍兴市科技计划项目(2009A23005)

作者单位:312000 浙江省绍兴市人民医院、浙江大学绍兴医院分子医学中心

通讯作者:董学君,电子信箱:dxj9666@163.com

剂盒(美国 RD 公司),Trizol 总 RNA 提取液(上海闪晶分子生物技术有限公司),Takara primeScript™ RT-PCR Kit(大连宝生物工程有限公司),PARISTM Kit(美国 AMBION 公司),兔抗人 NF-κB p65 多抗(MILLIPORE 公司)、兔抗人 β-actin 多抗(SANTA CRUZ 公司) HRP-羊抗兔的 IgG(SANTA CRUZ 公司),Bradford 检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。

2. 免疫组织化学方法及阳性结果判定:石蜡标本 4μm 厚连续切片,脱蜡,采用高温、高压修复抗原,组化染色按 SP 试剂盒说明书进行。用 PBS 液代替一抗作为空白对照。ER、PR、Her-2 均以细胞核和(或)胞质出现棕黄色细颗粒为阳性细胞,阳性细胞 <15% 为 -,15%~25% 为 +,25%~45% 为 ++,>45% 为 +++。背景无颜色或淡黄色。

3. 组织 NF-κB p65 mRNA 的 RT-PCR 检测:乳腺癌、癌旁、乳腺良性肿瘤组织中总 RNA 的提取参照 Trizol 使用说明书。总 RNA 1μg 反转录为 cDNA,反应条件:30℃ 10min,42℃ 30min,95℃ 5min。PCR 扩增 NF-κB p65/β-actin mRNA,引物由上海生工生物工程(上海)有限公司合成,序列如下:① NF-κB p65:上游引物 5'-TGCCGAGTGAACCGAAAC-3',下游引物 5'-TGCCCAGAAGGAAACACC-3',目的片段长度为 527bp;② β-actin:上游引物 5'-TTCCTTCTTGGGTATGGAAT-3',下游引物 5'-GAGCAATGATCTTGATCTTC-3',目的片段长度为 200bp。扩增条件:95℃ 3min 预变性,94℃ 30s,60℃ 30s,72℃ 1min,35 个循环;72℃ 7min 延伸。阳性对照为乳腺癌细胞株 MCF-7,用蒸馏水作为阴性对照。取 5μl PCR 扩增产物与 1μl 6×Loading buffer 液混合均匀后进行 1% 的琼脂糖凝胶(溴化乙锭 10mg/ml)电泳,计算机扫描成像判断结果。结果判断:样本琼脂糖电泳照片采用 Quantity one 分析软件进行灰度扫描,测定待测样本和内参 β-actin 的积分光密度(IA)。样本量的数值以目的片段 IA/β-actin 的 IA 的比值来表示。以乳腺癌(良性肿瘤)病灶组织的积分光密度比值/对应灶旁正常组织的积分光密度比值 >1.5 为阳性,>1.5 以“+”表示,>2 以“++”表示。

4. 组织 NF-κB p65 蛋白 Western blotting 检测:乳腺癌、癌旁、乳腺良性肿瘤组织中蛋白质样品的制备参照 PARISTM Kit 使用说明书。采用 Bradford 法检测蛋白提取液的浓度。蛋白提取液与上样缓冲液按 3:1 混匀,100℃ 变性 5min,上样至 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 2.5h;湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上;用含 2% BSA 的 PBST 封闭 1.5h;用含兔抗人 NF-κB p65 多抗(1:500)、兔抗人 β-actin 多抗(1:500)一抗孵育液 4℃ 过夜,PBST 漂洗,HRP-羊抗兔的 IgG(1:300)室温孵育 2h,PBST、PBS 漂洗后用 ECL 发光试剂在暗室压片显色。结果判断:胶片经扫描后,采用 Quantity one 分析软件进行灰度扫描,具体方法类同于 RT-PCR 检测的积分光密度比值 >1.5 为阳性(+)。

5. 血清 NF-κB p65 的 ELISA 检测:操作方法见试剂盒说明。浓度 >40ng/ml 为阳性,>40ng/ml 为(+);>80ng/ml 为(++)。

6. 统计学方法:采用 SPSS 11.0 统计软件分析,计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验;计数资料采用 χ^2 检验,Kappa 一致性检验及 Spearman 秩相关分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 组织 HE 染色结果:显微镜下观察发现,41 例癌组织标本癌细胞均占 70% 以上,而癌旁组织中无癌细胞浸润(图 1)。

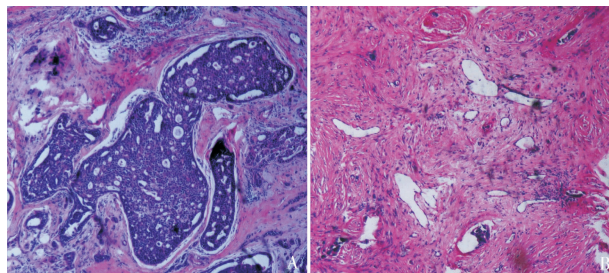


图 1 乳腺癌及癌旁组织 HE 染色(HE, ×200)

A. 乳腺癌组织;B. 癌旁组织或良性肿块组

2. 乳腺癌组织 NF-κB p65 的表达结果:41 例乳腺癌组织中 NF-κB p65 mRNA 和蛋白积分光密度比值 >1.5 的分别为 87.9% 和 82.9%。乳腺癌组织 NF-κB p65 mRNA 的 RT-PCR 产物电泳结果表明乳腺癌组织 NF-κB p65 mRNA 的表达较对应癌旁组织及乳腺良性肿块组织明显增加(图 2)。组织 Western blotting 结果与 RT-PCR 结果相似,乳腺癌组织 NF-κB p65 蛋白表达较对应癌旁组织及乳腺良性肿块组织明显增加(图 3)。

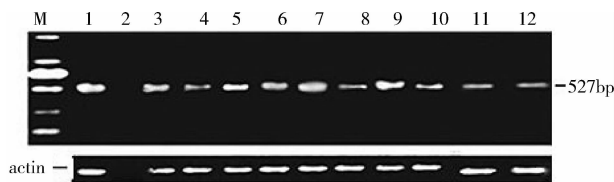


图 2 NF-κB p65 基因 RT-PCR 产物电泳图

M. DL2000 标志物,由上至下依次为 2000、1000、750、500、250、100bp;1. 阳性对照 MCF-7 细胞株;2. 阴性对照;3、5、7、9. 乳腺癌组织;4、6、8、10. 对应癌旁乳腺组织;11、12. 良性乳腺肿块组织

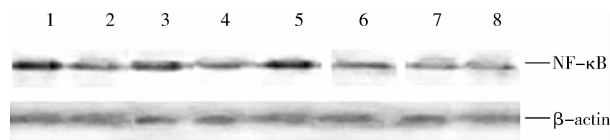


图 3 乳腺癌组织、癌旁组织及良性组织中 NF-κB p65 蛋白的 Western blotting 检测结果

1、3、5. 乳腺癌组织;2、4、6. 对应癌旁乳腺组织;7、8. 乳腺良性肿块组织

3. 血清 NF- κ B p65 的表达及其与组织 NF- κ B p65 表达的关系:乳腺癌患者血清中 NF- κ B p65 的含量 (46.4 ± 26.13 ng/ml) 明显高于对照组 (22 ± 16.5 ng/ml), 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。血清 NF- κ B p65 与组织 NF- κ B p65 表达同为“+”的 23 例, 同为“++”的 4 例, 同为“-”的 3 例。采用 Kappa 一致性检验, $Kappa = 0.458$, 95% 可信区间 (0.319, 0.630), 可以认为具有一致性。采用相关 ($P < 0.05$), Spearman 秩相关分析, $r_s = 0.369$, $P < 0.05$, 表达一致率为 73.2% (表 1)。

表 1 血清与组织中 NF- κ B p65 表达的相关性

血清	组织			合计
	-	+	++	
-	3	2	1	6
+	1	23	4	28
++	1	2	4	7
合计	5	27	9	41

Spearman 秩相关分析, $r_s = 0.369$, $P < 0.05$, 表达一致率为 73.2%; $Kappa = 0.458$, 95% 可信区间 (0.319, 0.630), 可以认为具有一致性

4. 血清 NF- κ B p65 与患者临床病理特征之间的关系:80 例乳腺癌患者血清 NF- κ B p65 阳性率为 80%, 对照组为 13.3% (表 2)。不同年龄段、TNM 分期和 ER、PR 表达情况的血清 NF- κ B p65 表达差异均无统计学意义。而不同淋巴结转移程度及 Her-2 表达状况的血清 NF- κ B p65 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 血清 NF- κ B p65 表达与乳腺癌临床病理指标的关系

项目	n	血清 NF- κ B p65			P
		+++	++	+	
TNM 分期					
0 ~ II	53	44		9	0.05
III ~ IV	27	20		7	
患者年龄					
≤50 岁	39	30		9	0.05
>50 岁	41	34		7	
淋巴结转移					
+	43	39		4	0.05
-	37	25		12	
ER 表达					
+	51	44		7	0.05
-	29	20		9	
PR 表达					
+	46	40		6	0.05
-	34	24		10	
Her-2 过表达					
+	27	25		2	0.05
-	53	39		14	

讨 论

NF- κ B 是具有多种生物活性的转录因子, 正常细胞中 NF- κ B 主要存在于胞质, 与 I κ B 结合, 形成无活性的三聚体。当细胞受刺激时, NF- κ B 主要通过 p65 亚基在细胞核中调控多种基因的表达, 在肿瘤形成和转移过程中发挥重要作用^[5]。本研究结果表明, 与对照组比 (含良性肿块), NF- κ B p65 mRNA 和蛋白在乳腺癌组织中表达均明显升高, 与文献报道的一致^[6,7]。由于大部分肿瘤相关抗原可分泌入血液, 血清学检测简单快速, 且血清标本可在未手术时取得, 减小对患者的创伤性。本研究检测了血清 NF- κ B p65 浓度, 发现乳腺癌患者 NF- κ B p65 表达明显高于对照组, 而且 Kappa 一致性检验结果表明乳腺癌患者 NF- κ B p65 血清表达与组织表达具有一致性, 提示检测血清 NF- κ B p65 浓度可部分反应组织 NF- κ B 的活性, 对诊断恶性乳腺癌具有一定的价值。我们采用 HE 染色法对收集的标本进行选择, 癌组织中癌细胞率在 70% 以上, 而癌旁组织则无癌细胞浸润, 降低了实验取材误差, 然而我们还是发现癌旁组织 NF- κ B p65 有一定程度的表达; 同时 Kappa 系数一般要 > 0.7 时, 才表明吻合度好, 所以血清检测不能完全取代组织 NF- κ B p65 检测, 这与癌旁炎症细胞表达 NF- κ B p65 是否有关, 需进一步研究。

目前多数国内外的研究表明, 乳腺癌组织 NF- κ B p65 的表达与乳腺癌的转移及 Her-2 高表达相关, 本研究结果进一步表明乳腺癌患者血清 NF- κ B p65 的表达与乳腺癌的转移及 Her-2 高表达相关, 而这两个临床病理特征代表着乳腺癌的恶性程度, 因此血清 NF- κ B p65 检测可能是评判乳腺癌预后的指标之一。文献报道癌细胞 NF- κ B 的表达与雌激素受体表达之间不一致, Jones 等^[6]认为 NF- κ B p65 与 ER、PR 表达负相关, 而 Frasor 等认为 ER 阳性时能增加 NF- κ B 的活性, 我们的研究表明血清 NF- κ B p65 的表达与雌激素受体表达的相关性尚无统计学意义, 因此我们认为血清 NF- κ B p65 尚不能作为雌激素受体表达情况的预判指标。

总之, 乳腺癌患者血清 NF- κ B p65 浓度与对照组相比明显升高, 且血清浓度能部分反应组织 NF- κ B p65 的表达。同时血清学指标与临床病理特征关系的分析表明, 血清 NF- κ B p65 表达检测对预测乳腺癌转移与否和选择治疗方案也有一定的价值。

参考文献

1 Vonach C, Viola K, Giessrigl B, et al. NF- κ B mediates the 12(S)

- HETE - induced endothelial to mesenchymal transition of lymphendothelial cells during the intravasation of breast carcinoma cells[J]. Br J Cancer, 2011, 105(2):263 - 271
- 2 Liu M, Sakamaki T, Casimiro MC, *et al.* The canonical NF - kappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion[J]. Cancer Res, 2010, 70(24):10464 - 10473
- 3 Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, *et al.* Expression of microRNA - 146 suppresses NF - kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. Suppression of NF - kappaB activity in cancer cells by miR - 146[J]. Oncogene, 2008, 27(42):5643 - 5647

- 4 童仕伦, 李恒平, 魏文. 胃癌组织中核转录因子 - kappaB 表达与意义[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 7(23):873 - 874
- 5 周洁, 陈虎, 郑海, 等. Celecoxib 可通过抑制核转录因子 - kappaB 活性诱导 SGC7901/ADR 细胞的凋亡[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 9(27):1269 - 1271
- 6 Jones RL, Rojo F, A'Hern R, *et al.* Nuclear NF - kappaB/p65 expression and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer[J]. J Clin Pathol, 2011, 64(2):130 - 135

(收稿:2011 - 09 - 07)

(修回:2011 - 10 - 13)

HBV 感染者血清 GP73 的检测及临床意义

周尧东 高国生 翁彭剑 徐炜峰

摘要 目的 探讨血清高尔基体蛋白 73(Golgi protein 73, GP73)在不同类型乙型肝炎病毒感染者的表达水平及临床意义。**方法** 采用 ELISA 法对慢性乙型肝炎、乙肝硬化、HCC 患者及正常对照组的血清 GP73 及其他血清指标进行检测,并进行 Spearman 相关分析;同时分析 HCC 患者临床及病理因素与血清 GP73 浓度的关系。**结果** 不同类型乙型肝炎病毒感染者血清 GP73 含量均显著高于正常对照组($P < 0.05$)。HCC 患者血清 GP73 含量显著其他组($P < 0.05$), GP73 诊断 HCC 的 ROC 曲线下面积 AUC 达到 0.865。Spearman 相关分析表明 HCC 患者血清 GP73 与 ALP、AFP、LAP 的相关性较高(r 均 > 0.300 , P 均 < 0.01)。HCC 患者血清 GP73 浓度不受 HBV - DNA 载量、肿瘤大小及结节数的影响。**结论** HBV 感染者血清 GP73 普遍升高,特别是 HCC 时升高显著,可作为一项较好的诊断 HCC 的血清标志物。

关键词 乙型肝炎病毒 原发性肝癌 高尔基体蛋白 73

Detection and Clinical Significant of Serum GP73 in Patients Infected with HBV. Zhou Yaodong, Gao Guosheng, Weng Pengjian, *et al.* Ningbo No. 2 Hospital, Zhejiang 315010, China

Abstract Objective To investigate the level of serum Golgi protein 73(GP73) and explore the clinical significant of serum GP73 in patients infected with HBV. **Methods** The concentration of serum GP73 in patients with chronic hepatitis B, cirrhosis, HCC and in normal controls was assayed with ELISA. Meantime, other serum markers were detected. The relationship between GP73 and other serum markers was analyzed. And the relationship between serum GP73 concentration and some clinical and pathological factors was analyzed in patients with HCC. **Results** GP73 level in patients infected with HBV was significantly higher than that in normal controls($P < 0.05$). GP73 level in patients with HCC was significantly higher than that in other patients($P < 0.05$) and the area of ROC for HCC was 0.865. GP73 had dose correlation with alkaline phosphatase(ALP), alpha - fetoprotein(AFP) and leucyl aminopeptidase(LAP) (all $r > 0.300$, all $P < 0.05$). While GP73 level was unrelated to the tumor size and number of nodules. **Conclusion** Serum GP73 level generally rises in patients infected with HBV, especially dramatically higher in patients with HCC. GP73 is a potential effective serum diagnosis marker for HCC.

Key words Hepatitis B virus; Hepatocellular carcinoma; Golgi protein 73

基金项目:吴阶平医学基金会肝病实验诊断研究基金资助项目(LDWMF - SY - 2011C004);宁波市医学科技计划资助项目(2010A02)

作者单位:315010 宁波市第二医院检验科(周尧东、高国生、翁彭剑);315041 宁波市李惠利医院检验科(徐炜峰)

通讯作者:徐炜峰, 电子信箱:nbxwf@sohu.com;高国生, 电子信箱:ggswwn@qq.com

GP73 是 Kladney 等^[1]在研究成人巨细胞性肝炎病原学时首次被发现的一种相对分子质量为 73kDa 的跨膜糖蛋白, 又称为 II 型高尔基体膜蛋白(Golgi phosphoprotein 2, Golph2)和高尔基体膜蛋白 I(Golgi membrane protein I, Golm I)。近年来国内外均有文献报道 GP73 很可能成为诊断肝癌的重要标志物, 但 GP73 在以乙型肝炎为基础的 HCC 患者中的表达