

河湟谷地胃癌患者 TNF- α 、NF- κ B P65 的表达及临床意义

谢大伟 燕 速

摘 要 **目的** 探讨河湟谷地胃癌患者 TNF- α 及 NF- κ B P65 的表达及临床意义。**方法** 采用 ELISA 法检测河湟谷地健康人、胃炎患者及胃癌患者(各 20 例)血清中 TNF- α 的表达,Western blot 法检测上述胃癌患者癌组织及癌旁组织 NF- κ B P65 蛋白的表达,分析 TNF- α 和 NF- κ B P65 与胃癌发生、发展的相关性。**结果** TNF- α 在健康人、胃炎患者及胃癌患者血清中的表达具有差异性($P < 0.001$),并与胃癌分期及淋巴结转移具有相关性($P < 0.05$)。NF- κ B P65 蛋白在胃癌组织和癌旁正常组织中的表达差异具有统计学意义($P < 0.001$),并与胃癌分期及淋巴结转移有相关性($P < 0.05$)。胃癌患者 TNF- α 和 NF- κ B P65 的表达呈正相关($r = 0.745, P < 0.01$)。**结论** TNF- α 和 NF- κ B P65 具有作为河湟谷地胃癌患者早期诊断的分子标志物的潜力,并且二者在胃癌发生、发展及转移过程中可能起重要协同作用。

关键词 TNF- α NF- κ B P65 胃癌 河湟谷地

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] A

Expression and Clinical Significance of TNF- α and NF- κ B P65 in Gastric Cancer of Hehuang Valley. Xie Dawei, Yan su. *Surgical Department of Gastroenterology Oncology, Qinghai University Affiliated Hospital, Qinghai 810001, China*

Abstract Objective To investigate the expression and their clinical significance of TNF- α and NF- κ B P65 in patients with gastric cancer in Hehuang Valley. **Methods** The expression of TNF- α in healthy people, patients with gastritis and patients with gastric cancer (20 cases, respectively) in Hehuang Valley were detected by ELISA, and the expression of NF- κ B P65 were detected in 20 patients with gastric cancer by Western blot. The correlation between the expression of TNF- α , NF- κ B P65 and the occurrence, development of gastric cancer were analyzed. **Results** There was a significant difference in the expression of TNF- α in healthy people, patients with gastritis and patients with gastric cancer ($P < 0.001$), which was associated with stages and lymph node metastasis of gastric cancer ($P < 0.05$). A statistical difference in the expression of NF- κ B P65 between gastric cancer tissues and normal tissues was demonstrated obviously ($P < 0.001$), which was also associated with gastric cancer stages and lymph node metastasis ($P < 0.05$). Expression of TNF- α and NF- κ B P65 were positively correlated in gastric patients ($r = 0.745, P < 0.01$). **Conclusion** TNF- α and NF- κ B P65 may be the possible molecular markers for early diagnosis of gastric cancer in Hehuang Valley. TNF- α and NF- κ B P65 may play an important synergistic role in the occurrence, development and metastasis of gastric cancer.

Key words TNF- α ; NF- κ B P65; Gastric cancer; Hehuang Valley

肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 是体内具有多种生物活性的重要促炎细胞因子,主要通过激活单核细胞和巨噬细胞在炎症反应中起着重要的作用,已被大量研究证实与多种人类肿瘤的发生及发展相关^[1-4]。核因子- κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 作为一种多向转录调节因子,能够广泛参与肿瘤的多种生理和病理过程的基因调控,参与信号通路,促进肿瘤细胞血管生成、诱导细胞抗凋

亡并促进细胞的增殖、侵袭及转移^[5-7]。大量研究证实, NF- κ B 可以促进胃癌的发生和发展,但有关 TNF- α 和 NF- κ B 二者与胃癌相关性的研究尚少^[8,9]。青海省境内的河湟谷地具有独特的地理环境,是黄河与湟水流域间形成的肥沃三角地带,位于青海省东部农业区,人口稠密,是我国胃癌高发生率和高病死率地区之一^[10]。本研究采用酶联免疫吸附法(ELISA)和蛋白免疫印迹(Western blot)法检测河湟谷地胃癌患者中 TNF- α 和 NF- κ B 的表达并探讨其临床意义。

材料与方法

1. 研究对象:随机抽取青海大学附属医院胃肠外科 2013

作者单位:810001 西宁,青海大学附属医院胃肠(肿瘤)外科

通讯作者:燕速,副教授,硕士生导师,电子信箱: yansuqinghai@

163.com

年6月~2013年12月新发胃癌确诊病例20例,设立胃癌组,患者年龄45~75岁,中位年龄56.8岁,其中,男性14例,女性6例,根据国际抗癌联盟(UICC)第7版PTNM分期,I期3例,II期6例,III期11例。随机选取胃良性病变(包括慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎)患者为20例,设立慢性胃炎组,患者年龄43~70岁,中位年龄53.1岁,其中,男性11例,女性9例;随机选取青海大学附属医院门诊体检中心健康体检者20例,设立健康对照组,年龄40~72岁,中位年龄53.7岁,其中,男性12例,女性8例。所有入组病例均世居于河湟谷地,且无严重心、肺、肝、肾、血液系统疾病以及其他器官功能不全,无自身免疫性疾病或内分泌疾病;无急、慢性感染性疾病以及近期内手术史,无其他恶性肿瘤。3组年龄、性别比较差异无统计学意义($P>0.05$),组间具有可比性。

2. 主要试剂及仪器:主要试剂有兔抗NF- κ B P65多克隆抗体(Abcam公司,美国)、兔抗GAPDH(Gen Tex,美国)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG(碧云天生物科技有限公司)、蛋白标准分子质量标志物(上海前尘生物科技有限公司)、BCA蛋白测定试剂盒(Pierce公司,美国)、ECL发光试剂盒(Pierce公司,美国)、显影剂和定影剂(碧云天生物科技有限公司)、人TNF- α ELISA试剂盒(上海川翔试剂有限公司)。仪器采用电动匀浆机Pro200(Pro Scientific,美国)、离心机Centrifuge 5810R(Eppendorf公司,德国)、超低温冰箱Thermo forma(热电公司,美国)、BIO-RAD电泳仪(Power Pac HC公司,美国)、半干转膜仪(TRAN-BLOT SD,美国)。

3. 实验方法:(1)TNF- α 的检测:3组受检者均于清晨空腹抽取静脉血4ml,4000r/min离心10min,然后吸取上层血清置于-80℃下冻存待测。采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清TNF- α 水平,操作严格按照试剂盒说明书进行。在酶标仪上测吸光度(A450),用SPSS软件绘出标准曲线,计算各样本的值。(2)NF- κ B P65的检测:取胃癌组患者术后胃癌组织以及相应癌旁正常组织,正常组织距肿瘤边缘至少8cm。所有标本均经术后病理证实。标本均于离体后30min内采集,剔除坏死出血组织,液氮速冻,后转至-80℃冰箱冻存备用;蛋白提取参照Trizol提取法,蛋白浓度测定按照BCA蛋白定量试剂盒说明书严格操作。提取的蛋白样本通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质(110V电泳30min,80V电泳1h),取出凝胶,用半干转膜法(10V 40min)将蛋白质转到PVDF膜上,取下PVDF膜,TBST洗膜后,放入含质量分数为7%的脱脂牛奶中,摇床室温孵育2h,封闭非特异性蛋白结合位点。一抗孵育:将PVDF膜置于5%的脱脂牛奶稀释的一抗中4℃过夜孵育(NF- κ B P65抗体1:1000,内参GAPDH抗体1:3000);二抗孵育:分别浸泡于HRP标记的山羊抗兔的二抗(1:1000稀释于5%脱脂奶粉中)中,常温孵育1.5h;TBST充分洗膜10次,6分钟/次,洗膜后ECL发光、显影、定影、洗片。选取质量较好的显影片,胶片用BIO-RAD扫描仪(Gel Doc XR+美国)进行扫描,用Image Lab 5.0图像分析软件进行目的蛋白及内参蛋白灰度值分析,计算出

NF- κ B P65与GAPDH灰度值的比值即为所测目的蛋白的相对百分含量。

4. 统计学方法:采用SPSS 17.0统计软件,实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,同一组不同组织间比较采用配对 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著性差异法(LSD),两变量间的相关性研究采用Pearson相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 胃癌组、慢性胃炎组、健康对照组血清TNF- α 的表达差异:胃癌组、慢性胃炎组与健康对照组间TNF- α 的表达差异有统计学意义($P<0.001$,表1)。

表1 3组受检者血清TNF- α 水平比较($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别	<i>n</i>	TNF- α	<i>F</i>	<i>P</i>
健康对照组	20	30.34 $\pm$ 12.45		
慢性胃炎组	20	60.89 $\pm$ 15.64 [*]	176.95	<0.001
胃癌组	20	262.75 $\pm$ 70.50 ^{*△}		

与健康对照组比,^{*} $P<0.001$;与慢性胃炎组比,[△] $P<0.05$

2. 不同分期胃癌患者血清TNF- α 水平差异比较:I期、II期、III期胃癌患者TNF- α 水平差异有统计学意义($P<0.001$,表2)。

表2 不同分期胃癌患者血清TNF- α 水平比较($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

病理分期	<i>n</i>	TNF- α	<i>F</i>	<i>P</i>
I期	3	188.70 $\pm$ 38.26		
II期	6	208.98 $\pm$ 29.31	15.35	<0.001
III期	11	312.27 $\pm$ 51.42 ^{*△}		

与I期比,^{*} $P<0.05$;与II期比,[△] $P<0.05$

3. 不同淋巴结转移胃癌患者血清TNF- α 水平差异的比较: N_0 、 N_1 、 N_2 、 N_3 淋巴结转移胃癌患者血清TNF- α 水平差异有统计学意义($P<0.001$,表3)。

表3 不同淋巴结转移胃癌患者血清TNF- α 水平比较($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

淋巴结分期	<i>n</i>	TNF- α	<i>F</i>	<i>P</i>
N_0	5	184.54 $\pm$ 31.83		
N_1	5	237.00 $\pm$ 21.29 [*]	31.38	<0.001
N_2	6	278.40 $\pm$ 36.73 ^{*△}		
N_3	4	369.23 $\pm$ 19.19 ^{*△#}		

与 N_0 比,^{*} $P<0.001$;与 N_1 比,[△] $P<0.05$;与 N_2 比,[#] $P<0.05$

4. 癌旁组织与癌组织NF- κ B P65蛋白的表达差异:Western blot法检测NF- κ B结果见图1和图2,癌组织中NF- κ B P65蛋白的相对表达量明显高于相应的癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.001$,表4)。

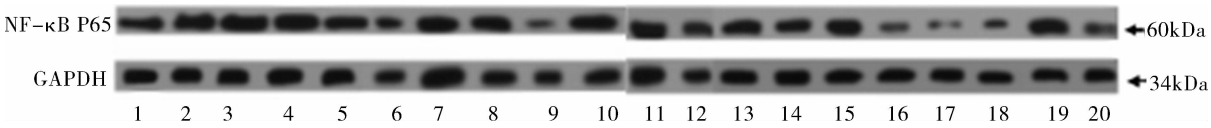


图 1 癌旁组织中 NF - κB P65 与 GAPDH 的表达

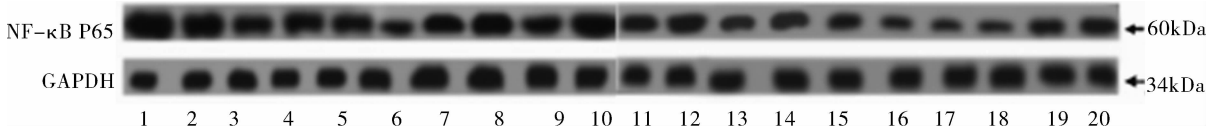


图 2 癌组织中 NF - κB P65 与 GAPDH 的表达

表 4 胃癌患者癌旁组织、癌组织 NF - κB P65 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

指标	癌旁组织	癌组织	<i>t</i>	<i>P</i>
NF - κB P65	0.86 ± 0.16	2.55 ± 0.85	-8.73	<0.001

5. 不同分期胃癌患者组织 NF - κB P65 蛋白表达水平差异的比较: I 期、II 期、III 期胃癌患者癌组织 NF - κB P65 蛋白表达水平差异有统计学意义 ($P = 0.001$, 表 5)。

表 5 不同分期胃癌患者癌组织 NF - κB P65 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

病理分期	<i>n</i>	NF - κB P65	<i>F</i>	<i>P</i>
I 期	3	1.63 ± 0.35	10.64	0.001
II 期	6	2.00 ± 0.67		
III 期	11	3.10 ± 0.59 * Δ		

与 I 期比, * $P < 0.05$; 与 II 期比, Δ $P < 0.05$

6. 不同淋巴结转移胃癌患者组织 NF - κB P65 蛋白表达水平差异的比较: N_0 、 N_1 、 N_2 、 N_3 淋巴结转移胃癌患者癌组织 NF - κB P65 蛋白表达水平差异有统计学意义 ($P = 0.001$ M, 表 6)。

表 6 不同淋巴结转移胃癌患者癌组织 NF - κB P65 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

淋巴结分期	<i>n</i>	NF - κB P65	<i>F</i>	<i>P</i>
N_0	5	1.64 ± 0.22	9.14	0.001
N_1	5	2.28 ± 0.83		
N_2	6	2.93 ± 0.62 * Δ		
N_3	4	3.45 ± 0.26 * Δ		

与 N_0 比, * $P < 0.05$; 与 N_1 比, Δ $P < 0.05$

7. NF - κB P65 和 TNF - α 的相关性分析: 线性相关分析结果显示, 在胃癌患者体内 NF - κB P65 和 TNF - α 的表达呈正相关 ($r = 0.745$, $P < 0.01$, 图 3)。

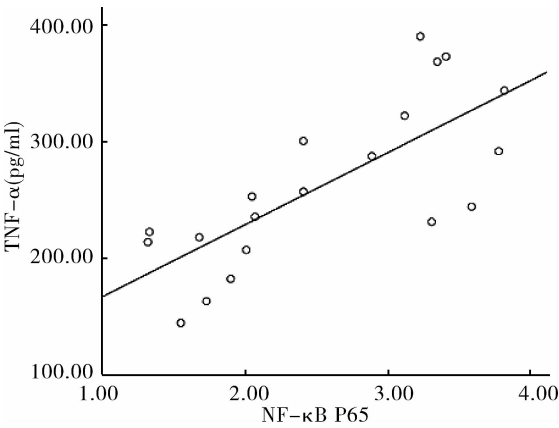


图 3 TNF - α 与 NF - κB P65 表达关系散点图

讨 论

TNF - α 在炎症过程中是一个重要的免疫介质, 被认为是人类致癌作用的内源性肿瘤促进剂^[11,12]。肿瘤的发生可诱导体内淋巴细胞过度释放 TNF - α, 另外肿瘤细胞的自分泌也导致患者的 TNF - α 升高。血液中 TNF - α 浓度过高可促进肿瘤血管生成, 使肿瘤组织能吸收更多的营养物质, 促进癌细胞生长; 还能够激活金属蛋白酶等某些基质降解酶的活性, 使基质分解, 有利于癌细胞向周围组织浸润并转移从而对机体产生明显的损害。激活的炎性因子参与胃癌的发生、发展, 影响胃癌的预后及转归, TNF - α 即为其中一种有效的促炎细胞因子^[13,14]。本研究结果显示, 河湟谷地胃炎患者血清中 TNF - α 表达水平比健康人的 TNF - α 表达水平高, 而胃癌患者 TNF - α 表达水平平均高于胃炎患者及健康体检者, 且 TNF - α 表达水平与胃癌临床病理分期呈正相关。笔者认为, 河湟谷地胃癌患者存在细胞因子分泌调节的紊乱, 其血清 TNF - α 水平增高, 并与临床病理分期及淋巴结转移等有关, 检测河湟谷地胃癌患者血清中 TNF - α 可能作为胃癌侵袭和转移的辅助预测指标以及判断胃

癌病情进展程度及预后的可能分子标志物。

此外,肿瘤的发病机制复杂且与多因素相关,细胞内信号转导通路的失调是主要致癌机制之一。致癌物质和炎症因子能活化大多数细胞的生存信号,从而导致肿瘤形成。NF- κ B 是细胞主要的生存信号之一,是刺激抗凋亡基因表达的主要转录因子,在静息的细胞中,NF- κ B 被阻隔在细胞质内,与 I- κ Bs 等抑制性蛋白形成复合体,处于无活性状态。NF- κ B 的激活不仅促进恶性肿瘤细胞转化、肿瘤进展,亦可促进肿瘤逃避免疫监测、产生治疗耐受^[15],其活化与胃癌演进过程密切相关。本研究结果显示,胃癌组织与癌旁正常组织中 NF- κ B P65 蛋白的表达具有显著差异性,且与临床病理分期及淋巴结转移呈正相关,提示 NF- κ B P65 蛋白的表达促进胃癌的侵袭及淋巴结转移。

TNF- α 可以促进 NF- κ B 的激活,NF- κ B 激活也是诱导 TNF- α 表达的关键因素,TNF- α 和 NF- κ B 之间并不是只有单向调节作用,还存在复杂的相互调节。TNF- α 是 NF- κ B 主要的诱导者,接受 TNF 的刺激后,I- κ B 尤其是 I- κ B α 被降解,从而活化 NF- κ B,这是 NF- κ B 激活的经典模式。而 NF- κ B 是炎性反应的中心环节,可通过抑制凋亡,上调 TNF- α 等细胞因子的表达从而导致细胞转化。研究结果得出,在河湟谷地胃癌患者中 TNF- α 与 NF- κ B 的表达呈正相关,TNF- α 可通过诱导 NF- κ B 信号通路,在胃癌的发生、发展中起到重要作用。NF- κ B P65 和 TNF- α 参与胃癌的发生,且与胃癌的侵袭及转移有一定的关系,具备作为早期诊断胃癌的分子标志物的可能性。NF- κ B P65 与 TNF- α 的表达呈正相关,提示它们在河湟谷地胃癌的发生发展中可能起重要协同作用。

前期研究显示,河湟谷地胃癌具有高侵袭性,该地区进展期胃癌易发生神经及脉管侵犯,易发生胃周淋巴结的转移,是造成河湟谷地胃癌高病死率的原因之一^[16]。NF- κ B P65 和 TNF- α 在胃癌发生及发展中的分子机制尚不明确,而如何启动 TNF- α 表达,并诱导 NF- κ B 信号通路的激活,以及下游效应基因的功能尚不十分明确,接下来将进一步扩大样本量,深入研究河湟谷地胃癌侵袭及转移相关信号通路的分子机制。

参考文献

- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α ; direct role in obesity-linked insulin

resistance [J]. Science, 1993, 259(5091): 87-91

- Thalmaier U, Lehn N, Pfeffer K, *et al.* Role of tumor necrosis factor alpha in Helicobacter pylori gastritis in tumor necrosis factor receptor 1-deficient mice [J]. Infection, Immunity, 2002, 70(6): 3149-3155
- Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. Tumour necrosis factor- α as a tumour promoter[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(6): 745-750
- Yu G, Tang B, Yu PW, *et al.* Systemic and peritoneal inflammatory response after laparoscopic-assisted gastrectomy and the effect of inflammatory cytokines on adhesion of gastric cancer cells to peritoneal mesothelial cells [J]. Surgical Endoscopy, 2010, 24(11): 2860-2870
- Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B in immunobiology [J]. Cell research, 2011, 21(2): 223-244
- Ghosh S, Hayden MS. Celebrating 25 years of NF- κ B research [J]. Immunological Reviews, 2012, 246(1): 5-13
- DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. NF- κ B and the link between inflammation and cancer [J]. Immunological Reviews, 2012, 246(1): 379-400
- Sohma I, Fujiwara Y, Sugita Y, *et al.* Parthenolide, an NF- κ B inhibitor, suppresses tumor growth and enhances response to chemotherapy in gastric cancer[J]. Cancer Genomics Proteomics, 2011, 8(1): 39-47
- Yin Y, Si X, Gao Y, *et al.* The nuclear factor- κ B correlates with increased expression of interleukin-6 and promotes progression of gastric carcinoma[J]. Oncol Rep, 2013, 29(1): 34-38
- 燕速, 白振忠, 赵健信, 等. CYP2E1 DraI 基因遗传多态性与青海省胃癌人群易感性的相关性研究[J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(4): 273-278
- Grimm M, Lazariotou M, Kircher S, *et al.* Tumor necrosis factor- α is associated with positive lymph node status in patients with recurrence of colorectal cancer-indications for anti-TNF- α agents in cancer treatment [J]. Analytical Cellular Pathology, 2010, 33(3): 151-163
- Fujiki H, Suganuma M. Tumor promoters- α -microcystin-LR, nodularin and TNF- α and human cancer development [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2011, 11(1): 4-18
- Bhayal AC, Krishnaveni D, RangaRao KP, *et al.* Role of tumor necrosis factor- α -308 G/A promoter polymorphism in gastric cancer [J]. Saudi J Gastroenterol, 2013, 19(4): 182-186
- Marusawa H. Mechanisms of H. pylori infection-induced gastric carcinogenesis [J]. Cancer & Chemotherapy, 2010, 37(1): 23-27
- Zhu BS, Xing CG, Lin F, *et al.* Blocking NF- κ B nuclear translocation leads to P53-related autophagy activation and cell apoptosis[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17: 478-487
- Su Yan, Bin Li, Junqi Wu, *et al.* Changes in the clinicopathological characteristics of gastric cancer in Hehuang Valley of China-2379 cases of gastric cancer in recent 10 years [J]. Chinese-German J Clin Oncol, 2014, 13(2): 63-68

(收稿日期:2014-05-18)

(修回日期:2014-05-21)