

基因及其蛋白在肿瘤中的表达

DOI: 10.11699/cyxb20130813

核转录因子- κ B 和缺氧诱导因子-1 α
在前列腺癌中的表达及意义李 星¹, 何朝宏², 许长宝¹, 李云鹏¹

(1. 郑州大学第二附属医院泌尿外科, 郑州 450014; 2. 河南省肿瘤医院泌尿外科, 郑州 450008)

【摘要】目的:研究核转录因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)和缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)在前列腺癌中的表达及其临床意义。**方法:**采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)和免疫组织化学光谱纯试剂(spectrum pure, SP)法检测 62 例前列腺癌组织及 17 例良性前列腺增生组织中 NF- κ B 和 HIF-1 α 的 mRNA 和蛋白的表达。**结果:**(1)RT-PCR 结果显示 NF- κ B 和 HIF-1 α 的 mRNA 在前列腺癌组中的相对表达量明显高于前列腺增生($P<0.05$)。免疫组织化学结果显示 NF- κ B 和 HIF-1 α 蛋白在前列腺癌组中的阳性表达率分别为 62.90% 和 66.13%, 明显高于前列腺增生组 11.77% 和 5.88%($P<0.05$)。(2)NF- κ B 和 HIF-1 α 的阳性表达均与前列腺癌的 Gleason 分级、临床分期有关($P<0.05$), 而与年龄无关($P>0.05$)。(3)NF- κ B 和 HIF-1 α 的表达呈正相关($r_s=0.368, P<0.05$)。**结论:**NF- κ B 和 HIF-1 α 可能与前列腺癌的发生、发展密切相关, 并可能在前列腺癌的浸润和转移中起重要作用。

【关键词】前列腺癌; 核转录因子- κ B; 缺氧诱导因子-1 α

【中国图书分类法分类号】R737.25

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-10-24

Expressions and clinical significances of nuclear factor- κ B and hypoxia
inducible factor-1 α in prostate cancerLI Xing¹, HE Chaohong², XU Changbao¹, LI Yunpeng¹

(1. Department of Urinary Surgery, the Second Affiliated Hospital, Zhengzhou University;

2. Department of Urinary Surgery, Henan Cancer Hospital)

【Abstract】Objective: To study expressions and clinical significances of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) in prostate cancer. **Methods:** RT-PCR and immunohistochemistry SP method were used to detect NF- κ B and HIF-1 α mRNA and protein expressions in 62 cases of prostate cancer tissues and 17 cases of prostatic hyperplasia tissues. **Results:** (1) RT-PCR results showed that NF- κ B and HIF-1 α mRNA expression levels were relatively significantly higher in prostate cancer group than in prostatic hyperplasia group, with statistical differences ($P<0.05$). Immunohistochemical results showed that positive expression rates of NF- κ B and HIF-1 α proteins in prostate cancer group were 62.90% and 66.13%, 8.33% and 5.88%, significantly higher than those in prostatic hyperplasia group with statistically significant differences ($P<0.05$). (2) Expressions of NF- κ B and HIF-1 α were correlated with Gleason grade and clinical stages of prostate cancer ($P<0.05$), but not with age ($P>0.05$). (3) Expressions of NF- κ B and HIF-1 α were positively correlated ($r_s=0.368, P<0.05$). **Conclusions:** Overexpression of NF- κ B and HIF-1 α may be involved in the pathogenesis and progression of prostate cancer. Moreover, NF- κ B and HIF-1 α may be correlated with the invasion and metastasis of prostate cancer.

【Key words】 prostate cancer; nuclear factor- κ B; hypoxia inducible factor-1 α

前列腺癌是男性泌尿系常见的恶性肿瘤之一,近年来在我国的发病率逐年上升^[1]。研究资料表明,核转录因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)和缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)通过不同的途径影响着细胞的增殖及凋亡,在肿瘤细胞的发生、发展、浸润和转移的过程中发挥重

要的作用。本研究通过检测 NF- κ B、HIF-1 α 在前列腺癌组织中的表达情况,初步探讨其与前列腺癌临床病理和生物学行为的关系,并为深入地研究前列腺癌发生机制及治疗提供理论据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

收集郑州大学第二附属医院、河南省肿瘤医院 2011 年

作者介绍: 李 星, Email: xingli0116@sina.com,

研究方向: 泌尿系肿瘤的诊治与治疗。

通信作者: 何朝宏, Email: 15981828716@163.com。

6月-2012年7月行前列腺癌根治手术和经直肠前列腺穿刺标本共计12例,经尿道前列腺增生电切标本10例。标本1式2份,一份用福尔马林液固定,石蜡包埋,另一份立即放入液氮,移入-80℃低温冰箱冻存备用。另收集2009-2012年郑州大学第二附属医院、河南省肿瘤医院手术切除及穿刺组织石蜡包埋标本57例,其中前列腺癌50例,前列腺增生7例。所有患者术前均未接受化疗、激素治疗及放疗。患者年龄42~79岁,平均67.4岁,前列腺癌标本病理分级按Gleason评分标准:2~4分为高分化癌16例,5~6分为中分化癌25例,7~10分为低分化癌21例。临床分期根据美国癌症分期联合会2002分期系统:I期+II期14例;III期20例;IV期28例。

1.2 实验试剂

兔抗人HIF-1 α 多克隆抗体,兔抗人NF- κ B多克隆抗体购自美国SANTA CRUZ公司,SP9000试剂盒、抗原修复液和DAB显色试剂盒均购自北京中杉生物工程公司;Trizol总RNA提取试剂购自北京金全生物技术有限公司,引物、PCR扩增试剂盒购自上海生工有限责任公司,Taq DNA polymerase购自上海普洛麦克公司。

1.3 实验方法

1.3.1 RT-PCR法 分别取新鲜的前列腺癌和前列腺增生组织,用Trizol法分别提取总RNA,42℃逆转录合成第1条cDNA链后进行PCR扩增。引物设计:NF- κ B上游:5'-CGA-GAGGAGCACAGATACCAC-3',下游:5'-CGCTTCTTCACAC-TGGATT-3',扩增片段208bp;HIF-1 α 上游:5'-TCCAAGA-AGCCCTAACGTGT-3',下游:5'-TTGTCTTTTGCTCCATTC-CA-3',扩增片段259bp;GAPDH上游:5'-CAAGTCATCC-ATGACAACCTTTG-3',下游:5'-GTCCACCACCTGTTGTGT-AG-3',扩增片段496bp。PCR反应条件:95℃预变性5min后。95℃45s,60℃30s,72℃30s,30个循环,最后72℃延伸10min。产物经2%琼脂糖凝胶电泳。用Gel-Pro-Analyzer 4.0软件进行积分吸光度分析。测出每个条带的积分吸光度值(integral absorption, IA),用目的基因的IA值/内参基因(GAPDH)的IA值来表示目的片段的相对表达量。

1.3.2 免疫组织化学光谱纯试剂(spectrum pure, SP)法 石蜡包埋标本,均做4 μ m切片,分别采用SP免疫组织化学和HE染色,具体操作步骤严格按试剂盒说明书操作。以已知阳性切片作阳性对照(试剂公司提供),以PBS代替一抗做阴性对照。每张切片随机读取5个高倍(400 $\times$)视野,根据细胞的胞质和(或)胞核中出现黄色或棕黄色颗粒为标准,综合染色的强度和阳性细胞数进行分析。染色强度标准:不着色0分,黄色1分,棕黄色2分,黄褐色3分。阳性细胞所占比例标准:阳性细胞<10%为0分,10%~40%为1分,40%~70%为2分, $\geq$ 70%为3分。两者相加后即总分:0~1分为(-),2分为(+),3~4分为(++),5~6分为(+++)。

1.4 统计学处理

所有数据采用SPSS 17.0统计软件进行统计分析,计量资料用均数标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间均数比较采用 t 检验;计数资料组间比较采用卡方检验;两变量间的相关性研究采用Spearman相关分析。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 前列腺癌组和前列腺增生组中NF- κ B和HIF-1 α 的mRNA表达情况

NF- κ B mRNA在前列腺癌组和前列腺增生组中相对表达量分别为 0.668 ± 0.045 和 0.473 ± 0.032 ;HIF-1 α mRNA在前列腺癌组和前列腺增生组中的相对表达量分别为 0.880 ± 0.057 和 0.586 ± 0.058 ,前列腺癌组中NF- κ B、HIF-1 α mRNA的相对表达量均明显高于前列腺增生组($P < 0.05$)。见表1,图1。

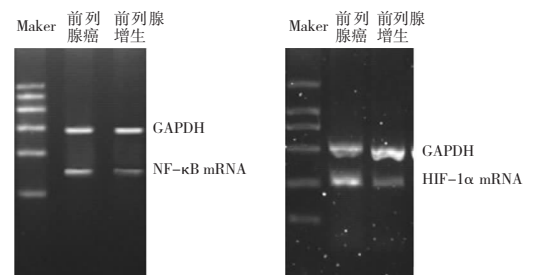


图1 前列腺癌和前列腺增生组织中NF- κ B mRNA和HIF-1 α mRNA的表达情况

Fig.1 mRNA expressions of NF- κ B and HIF-1 α in prostate cancer tissues and prostatic hyperplasia tissues

2.2 前列腺癌组和前列腺增生组中NF- κ B和HIF-1 α 蛋白的表达情况

NF- κ B蛋白阳性主要表达在胞核和胞质,在前列腺癌组和前列腺增生组中阳性表达率分别为62.90%和11.76%,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图2、图3,表2;HIF-1 α 蛋白阳性主要表达在胞核和胞质,在前列腺癌组和前列腺增生组中阳性表达率分别为66.13%和5.88%,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图4、图5,表2。

2.3 前列腺癌组中HIF-1 α 和NF- κ B蛋白表达与临床病理特征的关系

前列腺癌组织中NF- κ B和HIF-1 α 蛋白的表达与肿瘤组织的分化程度和临床分期相关($P < 0.05$),与年龄无关($P > 0.05$)。前列腺癌组织中,NF- κ B蛋白在低、中分化组的表达水平明显均高于高分化组($P < 0.05$),III期、IV期的表达水平均显著高于I期+II期($P < 0.05$);HIF-1 α 蛋白在低、中分化组的表达水平明显均高于高分化组($P < 0.05$),III期、IV期的表达水平均显著高于I期+II期($P < 0.05$)。见表3。

表1 NF- κ B和HIF-1 α mRNA在前列腺癌组织与前列腺增生组织中的表达

Tab.1 mRNA expressions of NF- κ B and HIF-1 α in prostate cancer tissues and prostatic hyperplasia tissues

分组	例数(n)	NF- κ B	t 值	P 值	HIF-1 α	t 值	P 值
前列腺癌组	12	0.668 ± 0.045	11.393	0.000	0.880 ± 0.057	11.809	0.000
前列腺增生组	10	0.473 ± 0.032			0.586 ± 0.058		

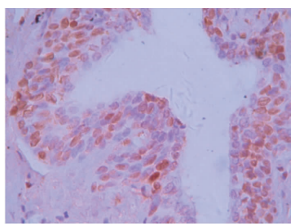


图 2 NF-κB 在前列腺癌组
织中的表达(400 ×)
Fig.2 Expressions of
NF-κB in prostate cancer
tissues(400 ×)

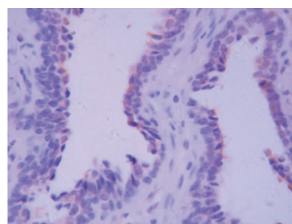


图 3 NF-κB 在前列腺增生
组织中的表达(400 ×)
Fig.3 Expressions of NF-κB
in prostatic hyperplasia
tissues(400 ×)

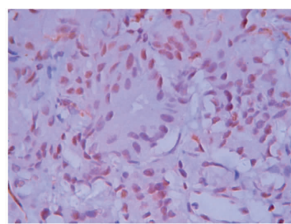


图 4 HIF-1α 在前列腺癌
组织中的表达(400 ×)
Fig.4 Expressions of
HIF-1α in prostate cancer
tissues(400 ×)

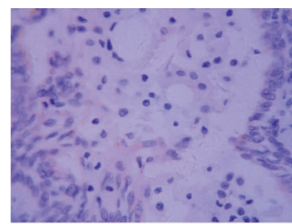


图 5 HIF-1α 在前列腺增生
组织中表达(400 ×)
Fig.5 Expressions of
HIF-1α in prostatic
hyperplasia tissues(400 ×)

表 2 NF-κB 和 HIF-1α 蛋白在前列腺癌组织与前列腺增生中的表达
Tab.2 Protein expressions of NF-κB and HIF-1α in prostate cancer tissues and prostatic hyperplasia tissues

分组	例数 (n)	NF-κB		χ^2 值	P 值	HIF-1α		χ^2 值	P 值
		阳性 (n)	阳性率 (%)			阳性 (n)	阳性率 (%)		
前列腺癌组	62	39	62.90	10.866	0.000	41	66.13	19.488	0.000
前列腺增生组	17	2	11.76			1	5.88		

表 3 NF-κB 和 HIF-1α 在前列腺癌组织中的表达
Tab.3 Expressions of NF-κB and HIF-1α in prostate cancer tissues

项目	例数 (n)	NF-κB		χ^2 值	P 值	HIF-1α		χ^2 值	P 值
		阳性 (n)	阳性率 (%)			阳性 (n)	阳性率 (%)		
年龄 (岁)	< 65	29	15	51.72	2.918	16	55.17	2.920	0.087
	≥ 65	33	24	72.73		25	75.76		
Gleason 分级	高分化	16	5	31.25	11.565	4	25.00	18.026	0.000
	中分化	25	16	64.00		18	72.00		
	低分化	21	18	85.71		19	90.48		
TNM 分期	I 期 + II 期	14	3	21.43	14.799	3	21.43	17.432	0.000
	III 期	20	13	65.00		14	57.00		
	IV 期	28	23	82.14		24	85.71		

2.4 前列腺癌组中 NF-κB 和 HIF-1α 蛋白表达的相关性
NF-κB 和 HIF-1α 在前列腺癌组中表达呈正相关($r_s=0.368, P<0.05$), 见表 4。

表 4 NF-κB 和 HIF-1α 在前列腺癌组织中的关系 (n)
Tab.4 Relationship between expressions of NF-κB and HIF-1α
in prostate cancer tissues (n)

项目		NF-κB		r_s 值	P 值
		阳性	阴性		
HIF-1α	阳性	31	10	0.368	0.003
	阴性	8	13		

3 讨论

NF-κB 是一个广泛参与多个基因转录调控的转录因子, 与多种肿瘤的发生, 发展有关^[2]。静息时 NF-κB 以无活性的前体形式存在, 激活后介导血管

内皮生长因子、细胞周期素 D1、环氧酶-2、基质金属蛋白酶-9、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因等相关靶基因的转录, 促进肿瘤血管的生成, 抑制肿瘤细胞的凋亡, 影响肿瘤细胞的发生发展^[3]。Mimeault 等^[4]研究发现, 在前列腺癌组织中 NF-κB 呈过度表达水平, 并随着临床分期的增高, 表达愈高。Rodrique-Brriquete 等^[5]研究表明, NF-κB 在前列腺癌组织和 PC3 癌株中的表达高于正常前列腺组织, 并与 Gleason 分级有关。本研究通过运用 RT-PCR 和免疫组织化学方法观察到 NF-κB 的 mRNA 和蛋白在前列腺癌组织中表达明显高于前列腺增生组织, 提示无论在转录还是翻译阶段, NF-κB 可能在前列腺癌的发生过程中起一定的作用。本研究通过对 NF-κB 蛋白表达水平与前列腺癌的病理临床特征进行分析, 结果表明: 低、中分化前列腺癌组织中 NF-κB 蛋白的表达水平明显高于高分化组, 表明 NF-κB 蛋白的表达水平越高, 肿瘤的分化水平越低, 恶性程度

越高;Ⅲ期、Ⅳ期前列腺癌中 NF- κ B 蛋白阳性表达率明显高于 I 期+Ⅱ期,即浸润性前列腺癌组织中的 NF- κ B 表达明显高于局限性前列腺癌,提示 NF- κ B 可能参与了前列腺癌的浸润转移。本研究结果与相关文献报道一致,表明在前列腺癌中, NF- κ B 蛋白的表达与肿瘤细胞的分化程度及肿瘤细胞的浸润转移有关,检测 NF- κ B 蛋白的表达水平有助于判断疾病的进展和预后。

HIF-1 α 是一个具有螺旋-环-螺旋结构的转录因子,介导细胞对缺氧进行适应性反应的调控^[6]。多项研究表明, HIF-1 α 在多种恶性肿瘤及癌前病变中呈过度表达状态,通过刺激肿瘤血管的生成、增加肿瘤细胞的能量供应影响肿瘤增殖,侵袭和转移^[7-9]。本实验结果显示,在前列腺癌组中 HIF-1 α 的 mRNA 和蛋白的表达明显高于前列腺增生组,提示 HIF-1 α 的高表达可能与前列腺的发生有关。进一步分析 HIF-1 α 蛋白的表达与肿瘤的临床指标之间的关系,结果显示:低、中分化前列腺癌组中 HIF-1 α 的表达明显高于高分化组,Ⅲ期、Ⅳ期前列腺癌中 HIF-1 α 蛋白阳性表达率明显高于 I 期+Ⅱ期,差异有统计学意义。这与 Lekas 等^[10]通过免疫组织化学方法研究 170 例前列腺癌组织中 HIF-1 α 的表达结果相一致,表明在前列腺癌中, HIF-1 α 蛋白高表达与前列腺癌的发生发展及其预后密切相关。

Jung 等^[11]研究发现,白介素-1 β 通过激活 NF- κ B/环氧酶-2 信号传导通路可以上调 HIF-1 α 的表达。NF- κ B 通过激活 PI3K/Akt 途径上调 HIF-1 α 的表达,促进肿瘤新生血管的生成,并最终影响肿瘤细胞的增殖和转移,在乳腺癌和胰腺癌的研究中得到证实^[12-14]。本研究结果显示,在前列腺癌中 NF- κ B 和 HIF-1 α 的表达呈显著正相关,提示 NF- κ B 可能通过激活 PI3K/Akt 通路上调 HIF-1 α 的表达,从而促进新生血管的生成和能量的供应,进而促进前列腺癌细胞的发生、发展、浸润和转移。

综上所述,本研究证明了 NF- κ B 和 HIF-1 α 在前列腺癌中高表达,并与其临床病理分期相关。由此可以推测两者相互作用可能参与了前列腺癌的发生、发展,并在前列腺癌浸润转移的过程中起到了重要的作用。但两者之间的具体机制较复杂,尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] 叶定伟.前列腺癌的流行病学和中国的发展趋势[J].中华外科杂志,2006,44(6):362-364.

Ye D W.Epidemiology of prostate cancer and the development trend of China[J].Chin J Surg,2006,44(6):362-364.

[2] 刘 聪,周 晟,柯昌庶,等.AKT、NF- κ B 及 STAT3 在有淋巴结转移及雌激素受体阳性的乳腺癌组织中的活化及意义[J].癌症,2007,26(9):929-936.

Liu C,Zhou S,Ke C S,et al.Activation and prognostic significance of AKT,NF-kappa B and STAT3 in breast cancer with lymph node metastasis and estrogen receptor expression[J].Chinese Journal of Cancer,2007,26(9):929-936.

[3] Kunnumakkara A B,Diagaradjane P,Anand P,et al.Curcumin sensitizes MMP-9,VEGF and CXCR4 expression in an orthotopic mouse model[J].Int J Cancer,2009,125(9):2187-2197.

[4] Mimeault M,Johansson S L,Batra S K.Pathobiological implications of the expression of EGFR,pAkt,NF- κ B and MIC-1 in prostate cancer stem cells and their progenies[J].PLoS One,2012,7(2):e31919.

[5] Rodrique-Berriquete G,Fraile B,Paniagua R,et al.Expression of NF- κ B-related proteins and their modulation during TNF- α -provoked apoptosis in prostate cancer cells[J].Prostate,2012,72(1):40-50.

[6] Powis G,Kirkpatrick L.Hypoxia inducible factor-1 alpha as a cancer drug target[J].Mol Cancer Ther,2004,3(5):647-654.

[7] Pistollato F,Rampazzo E,Persano L,et al.Interaction of hypoxia-inducible factor-1alpha and notch signaling regulates medulloblastoma precursor proliferation and fate[J].Stem Cells,2010,28(11):1918-1929.

[8] Kong H S,Lee S,Beebe K,et al.Emetine promotes von Hippel-Lindau independent degradation of inducible factor-2 alpha in clear cell renal carcinoma[J].Mol Pharmacol,2010,78(6):1072-1078.

[9] Krishnamoorthy S,Jin R,Cai Y,et al.12-lipoxygenase and the regulation of hypoxia-inducible factor in prostate cancer cells[J].Exp Cell Res,2010,316(10):1706-1715.

[10] Lekas A,Lazaris A C,Deliveliotis C,et al.The expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha(HIF-1alpha) and angiogenesis makers in hyperplastic and malignant prostate tissue[J].Anticancer Res,2006,26(4B):2989-2993.

[11] Jung Y,Isaacs J,Lee S,et al.IL-1 beta-mediated upregulation of HIF-1 α via an NF- κ B/COX-2 pathway identifies HIF-1 α as a critical link between inflammation and oncogenesis[J].FASEB J,2003,17(14):2115-2117.

[12] Tacchini L,Ponti C,Matteucci E,et al.Hepatocyte growth factor-activated NF- κ B regulates HIF-1 activity and ODC expression,implicated in survival,differently in different carcinoma cell lines[J].Carcinogenesis,2004,25(11):2089-2100.

[13] Edderkaoui M,Odinokova I,Ohno I,et al.Ellagic acid induces apoptosis through inhibition of nuclear factor kappa B in pancreatic cancer cells[J].World J Gastroenterol,2008,14(23):3672-3680.

[14] 胡恒通,彭 波,马清涌,等.HIF-1 α 与 NF- κ B 通路对胰腺癌缺氧调节及肿瘤进展作用[J].西安交通大学学报(医学版),2010,31(3):274-278.

Hu H T,Peng B,Ma Q Y,et al.The role of HIF-1 α and NF- κ B pathways in hypoxia adjustment of pancreatic carcinoma and tumor progression[J].Journal of Xi'an JiaoTong University(Medical Sciences),2010,31(3):274-278.

(责任编辑:关蕴良)