

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2019.06.004

· 基础研究 ·

NF- κ B 在口腔鳞状细胞癌及癌旁组织中的表达意义

桂心伟, 姚小武, 陈仕生, 卢子正, 林敏校, 彭毓

汕头大学医学院第二附属医院口腔科, 广东 汕头 (515041)

【摘要】 目的 探讨NF- κ B在口腔鳞状细胞癌及癌旁组织中的表达意义。方法 选择口腔鳞状细胞癌患者47例,切取口腔鳞状细胞癌组织和肿瘤边界外5 mm的癌旁组织,采用免疫组织化学SP法检测NF- κ B在口腔鳞状细胞癌及癌旁组织中的表达,并与32例口腔正常黏膜组织对比分析。结果 口腔鳞状细胞癌组织和癌旁组织的免疫组化阳性细胞的平均光密度值(OD值)高于正常黏膜组织,差异有统计学意义($P < 0.001$);口腔鳞状细胞癌组织和癌旁组织的免疫组化阳性细胞的平均光密度值差异无统计学意义($P = 0.356$)。口腔鳞状细胞癌组织和癌旁组织的NF- κ B阳性率等级评分结果高于正常黏膜组织,差异有统计学意义($P < 0.001$);口腔鳞状细胞癌组织和癌旁组织的NF- κ B阳性率差异无统计学意义($P = 0.117$),但口腔鳞状细胞癌组织的中强阳性率高于癌旁组织($P < 0.001$)。结论 NF- κ B可能与口腔鳞状细胞癌的发生发展相关。

【关键词】 口腔肿瘤; 癌; 鳞状细胞; 癌旁组织; 核因子- κ B蛋白

【中图分类号】 R739.8 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2019)06-0360-05

【引用著录格式】 桂心伟,姚小武,陈仕生,等. NF- κ B在口腔鳞状细胞癌及癌旁组织中的表达意义[J]. 口腔疾病防治, 2019, 27(6): 360-363.

Expression of NF- κ B in oral squamous cell carcinoma and paracancerous tissues and its significance GUI Xinwei, YAO Xiaowu, CHEN Shisheng, LU Zizheng, LIN Minxiao, PENG Yu. Department of Stomatology, The Second Affiliated Hospital, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, China

Corresponding author: YAO Xiaowu, Email: stumcdenty@163.com, Tel:0086-754-88915756

【Abstract】 Objective To investigate the expression and significance of NF- κ B in oral squamous cell carcinoma and paracancerous tissues. **Methods** Cancerous and paracancerous tissues about 5 mm outside the tumor boundary were cut from 47 patients with OSCC. NF- κ B expression in these tissues were detected by the immunohistochemical SP method and compared with that in 32 normal oral mucosa tissues. **Results** The average optical density (OD value) of immunohistochemical-positive cells in cancer tissues and paracancerous tissues was higher than that in normal tissues, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$). There was no significant difference in the OD values between cancer tissues and paracancerous tissues ($P = 0.356$). The rate of NF- κ B positive expression in cancer tissue and paracancerous tissue was significantly higher than that in normal mucosa tissue, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$). There was no significant difference in the rate of NF- κ B positive expression between cancer tissues and paracancerous tissues ($P = 0.117$), but the rate of moderate-to-strong positive expression in cancer tissues was significantly higher than that in paracancerous tissues ($P < 0.001$). **Conclusion** NF- κ B may be involved in the development of OSCC.

【Key words】 Oral neoplasms; Carcinoma; squamous cell; paracancerous tissues; NF- κ B

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma,

OSCC)是最常见的头颈部恶性肿瘤,约占口腔恶性肿瘤的90%,目前治愈率仍不高^[1-2]。了解其相关的发生机理有助于其预防和早期诊断及治疗。核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)是调节肿瘤进程的关键转录因子之一,在OSCC发生、侵袭和转移中起着重要的作用^[1,3]。本研究采用免疫组化技术检测OSCC组织和癌旁组织中NF- κ B的表达情

【收稿日期】 2019-01-01; **【修回日期】** 2019-03-10

【基金项目】 广东省科技计划项目(2013B021800260); 2017年度汕头市医疗卫生科技计划(汕府科[2018]11号)

【作者简介】 桂心伟, 医师, 硕士, Email: 1175652142@qq.com

【通信作者】 姚小武, 教授, 硕士, Email: stumcdenty@163.com, Tel: 0086-754-88915756

况,并与口腔正常黏膜组织对比,分析研究 NF- κ B 与 OSCC 形成与发展的关系,为 OSCC 诊断和治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 临床资料

选择2014年1月—2018年1月在汕头大学医学院第二附属医院口腔颌面外科就诊手术的 OSCC 患者47例,其中男27例、女20例,年龄27~79岁,平均 (57.89 ± 10.44) 岁。所有病例术前病理检查均确诊为 OSCC,术前未进行放疗或化疗,其中舌癌27例、口底癌8例、牙龈癌4例、颊癌7例、口咽癌1例。切取 OSCC 组织和肿瘤边界外约5 mm 的癌旁组织进行研究。同期选择32例为颌骨外伤患者手术过程中切除的口腔正常黏膜组织,其中男16例、女16例,年龄13~76岁,平均 (40.78 ± 16.37) 岁。该研究经医院伦理委员会批准,患者均知情同意。

1.2 主要试剂

兔抗人 NF- κ Bp65 单克隆抗体(CST 公司,美国);即用型快捷免疫组化 MaxVision TM 试剂盒(鼠/兔)(福州迈新生物股份有限公司,中国);中性树胶(福州迈新生物股份有限公司,中国);加强型 DAB 显色试剂盒(福州迈新生物股份有限公司,中国);苏木素体细胞快速染色液(福州迈新生物股份有限公司,中国);免疫组化抗原修复液(柠檬酸法)(福州迈新生物股份有限公司,中国);伊红染色液(碧云天生物公司,上海)。

1.3 实验方法

采用免疫组化 SP 法:①标本用10%甲醛溶液固定,常规脱水,石蜡包埋,4 μ m 连续切片;②60 $^{\circ}$ C 放置2 h,经二甲苯及梯度酒精常规脱蜡、水化;③高温高压抗原修复,室温下自然冷却。PBS 洗涤后3%过氧化氢室温处理10 min, PBS 洗涤3次,山羊血清封闭10 min 后加提前稀释好的一抗(兔抗人 NF- κ Bp65 单克隆抗体),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,以 PBS 取代一抗作为阴性对照;④PBS 洗涤3次,以即用型快捷免疫组化 MaxVision TM 试剂为二抗(鼠/兔)室温下作用10 min, PBS 洗涤3次;⑤用新鲜配置的 DAB 液显色,用显微镜控制染色时间,水洗后苏木素复染,自来水冲洗返蓝;⑥梯度酒精及二甲苯脱水、干燥,中性树脂封片。

用 HE 染色观察3种组织的细胞形态,①②步骤同上,③苏木素染色液染色3~10 min,自来水冲洗后用1%盐酸乙醇分化;④自来水冲洗返蓝;⑤

蒸馏水冲洗后伊红染色液染色;⑥步骤同上。

1.4 结果判定

利用平均光密度法和双评分半定量法进行判定。平均光密度法^[4]:利用 image pro plus 6.0 软件对组织照片进行分析,利用自定义工具随机选取照片中部分细胞区域,得出该区域的积分光密度值。接着计算出该区域的总面积。将两部分数据导出 Excel。通过 Excel 计算积分光密度值与区域总面积的比值,即平均光密度值(OD 值)。

双评分半定量法^[5]:每个样本随机选取200个细胞进行计数,首先按细胞着色比例进行计分,0~10%计为0分,11%~25%计为1分,26%~50%计为2分,51%~75%计为3分,76%~100%计为4分。再按细胞着色程度进行计分:未着色计为0分,淡黄色或略高于背景计为1分,黄色或明显高于背景计为2分,深棕色计为3分。两项分数相乘后分为4个等级:0~3分计为阴性(-),4~6分计为弱阳性(+),7~9分计为中阳性(++),10~12分计为强阳性(+++)。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 21.0 软件包进行统计分析。三种组织切片的 OD 值比较采用 Kruskal-Wallis 检验,三种组织切片免疫组化阳性结果的评分比较采用卡方检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

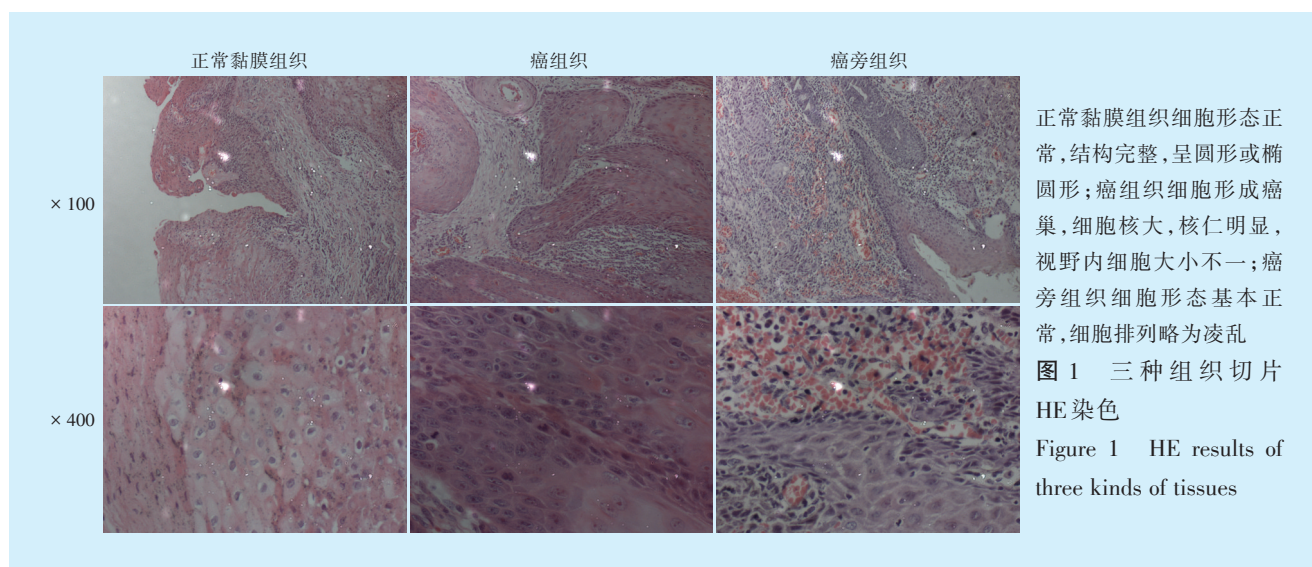
2 结果

2.1 三种组织切片 HE 染色的细胞形态及免疫组化染色结果

HE 染色切片中细胞核为蓝色,细胞质为红色。可见正常黏膜组织细胞形态正常,大小均匀,结构完整,细胞核大小正常,呈圆形或椭圆形;癌组织细胞形成癌巢,细胞核大,核仁明显,视野内细胞大小不一;癌旁组织细胞形态基本正常,细胞排列略为凌乱(图1)。三种组织切片免疫组化反应阳性结果为淡黄色至深棕色,胞核和胞质均有着色,未着色胞核为蓝色,未着色胞质为无色。免疫组化反应阴性结果为胞质及胞核无黄色或棕色,仅细胞核为蓝色(图2)。

2.2 三种组织免疫组化阳性细胞的 OD 值

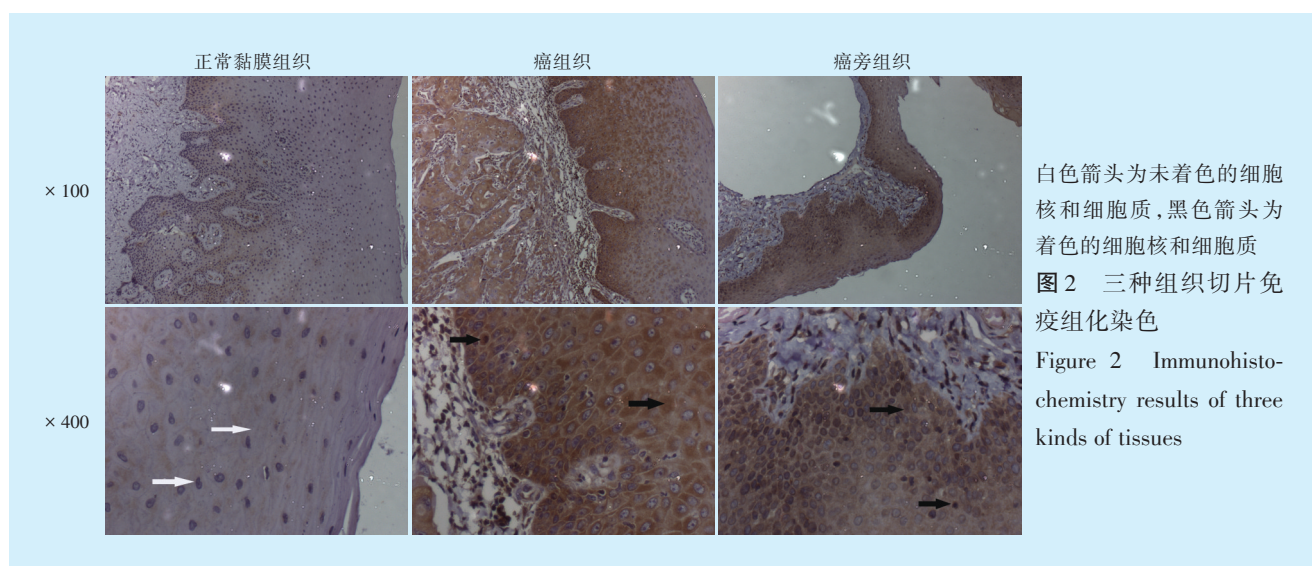
三种组织免疫组化阳性细胞的 OD 值见表1。三种组织免疫组化阳性细胞的 OD 值之间差异有统计学意义($P < 0.001$)。其中癌组织和癌旁组织的 OD 值高于正常黏膜组织,差异具有统计学意义($P < 0.001$);癌组织和癌旁组织的 OD 值差异无统计学意义($P = 0.356$)。



正常黏膜组织细胞形态正常,结构完整,呈圆形或椭圆形;癌组织细胞形成癌巢,细胞核大,核仁明显,视野内细胞大小不一;癌旁组织细胞形态基本正常,细胞排列略为凌乱

图1 三种组织切片 HE染色

Figure 1 HE results of three kinds of tissues



白色箭头为未着色的细胞核和细胞质,黑色箭头为着色的细胞核和细胞质

图2 三种组织切片免疫组化染色

Figure 2 Immunohistochemistry results of three kinds of tissues

表1 三种组织免疫组化阳性细胞的OD值

Table 1 OD value of immunohistochemical-positive cells in three kinds of tissues $\bar{x} \pm s$

| 组别 | 例数(n) | OD值 |
|--------|-------|---------------------------------|
| 癌组织 | 47 | 0.292 6 ± 0.076 6 ¹⁾ |
| 癌旁组织 | 47 | 0.275 3 ± 0.116 3 ¹⁾ |
| 正常黏膜组织 | 32 | 0.105 9 ± 0.067 6 |

1):与正常黏膜组织相比 $P < 0.001$

2.3 三种组织免疫组化阳性细胞的等级评分结果

NF- κ B在三种组织中均有表达(表2),阳性率:正常黏膜组织为28.1%(9/32),癌旁组织为91.5%(43/47),癌组织为100%(47/47);中强阳性率:正常黏膜组织为0%(0/32),癌旁组织为72.3%(34/47),癌组织为100%(47/47)。三种组织中NF- κ B的阳性率差异有统计学意义($\chi^2 = 97.910, P < 0.001$),其中癌组织和癌旁组织的NF- κ B阳性率高

于正常黏膜组织,差异有统计学意义($P < 0.001$)。癌组织和癌旁组织的NF- κ B阳性率差异无统计学意义($P = 0.117$),但癌组织的中强阳性率高于癌旁组织($P < 0.001$)。

表2 三种组织免疫组化阳性细胞的等级评分结果

Table 2 Immunohistochemical grading results in three kinds of tissues

| 评分等级 | 正常黏膜组织 | 癌旁组织 | 癌组织 |
|------|--------|------|-----|
| - | 23 | 4 | 0 |
| + | 9 | 9 | 0 |
| ++ | 0 | 16 | 24 |
| +++ | 0 | 18 | 23 |
| 合计 | 32 | 47 | 47 |

3 讨论

NF- κ B是一种多向性、多功能的核转录因子,参与多种信号转导途径,调控细胞的增殖、凋亡与

分化^[6]。NF- κ B在头颈鳞状细胞癌和口腔鳞状细胞癌等疾病的发生、发展中起着关键作用,它由属于Rel家族的5个不同亚基组成:RelA(p65/RelA), RelB, cRel(Rel), p50/p105(NF- κ B1)和p52/p100(NF- κ B2),它们共享一个N末端^[7]。NF- κ B复合体最常见的二聚体形式是p65/p50^[6]。NF- κ B信号通路在肿瘤发生发展中起着关键作用,静息状态下,NF- κ B二聚体与其抑制蛋白I κ B结合以无活性状态存在于细胞质中。I κ B受到刺激后发生磷酸化和降解,释放的NF- κ B二聚体进入细胞核,与特定的DNA序列结合,从而促进目标基因的转录^[3]。当其受到外因刺激而过度激活时,可引起炎症介质的释放及癌细胞的抗凋亡,并可诱导多种抗凋亡基因产生联合抗细胞凋亡,调节肿瘤细胞的增殖从促进肿瘤细胞的发生、发展,其在多种肿瘤组织中具有较高的表达和活化水平^[6,8]。研究表明,NF- κ B的信号传导途径在口腔癌发生的早期阶段被激活^[9]。一旦NF- κ B被激活,其会很快转移到细胞核中进而引起一系列的改变,如改变细胞的正常信号,促进细胞增殖,最终导致癌变^[10]。NF- κ B在OSCC等许多肿瘤中参与了癌细胞的生长、抗凋亡活性和蛋白酶产生等侵袭特性^[8],NF- κ B及其信号通路与口腔癌的发生发展呈正相关^[3]。本研究结果显示,在OSCC癌组织中,NF- κ B的表达水平高于口腔正常黏膜组织。这一结果与上述结论完全一致,证明了NF- κ B与OSCC的形成发展具有相关性。

本研究发现,OSCC癌组织和癌旁组织中NF- κ B的阳性表达率差异无统计学意义,但在OSCC癌组织中NF- κ B的中强阳性表达高于癌旁组织。这与一些学者研究结果存在一定的差异。占育华等^[11]在应用免疫组化检测了55例OSCC癌组织和10例癌组织边缘外1 cm的癌旁组织后,发现NF- κ B在OSCC癌组织中呈强阳性表达,阳性率为94.55%,而在癌旁组织中呈弱阳性表达,阳性率为40%。本研究结果与以上学者的结果有所不同的原因是本研究中癌旁组织取材于肿瘤外5 mm处,而上述学者研究的癌旁组织在肿瘤外10~20 mm。通常手术切除无瘤原则要求切除边界为肿瘤外10 mm,本研究癌旁组织取材于肿瘤外5 mm比较能反映癌旁组织的真实状况。本研究结果也提示,尽管癌旁组织在组织学上未见异常,但细胞中的NF- κ B可能已经被激活,肿瘤自身分泌的炎症因子导致NF- κ B通路处于持续性激活状态^[8]。有研究表明,在口腔癌的临床治疗研究中,NF- κ B抑制剂有显著

效果^[12]。姜黄色素和番茄红素协作可通过抑制NF- κ B的活化来增加口腔癌患者对放疗的敏感性^[13]。因此,NF- κ B是否可以成为未来口腔靶向的治疗靶点值得进一步研究^[14]。

参考文献

- [1] Tang DF, Tao DT, Fang Y, et al. TNF-Alpha promotes invasion and metastasis via NF-Kappa B pathway in oral squamous cell carcinoma[J]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2017, 23: 141-149.
- [2] Zhang SK, Zheng RS, Chen Q, et al. Oral cancer incidence and mortality in China, 2011[J]. *Chin J Cancer Res*, 2015, 27(1): 44-51.
- [3] Johnson JJ, Miller DL, Jiang R, et al. Protease-activated receptor-2 (PAR-2)-mediated NF-B activation suppresses inflammation-associated tumor suppressor microRNAs in oral squamous cell carcinoma[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(13): 6936-6945.
- [4] Horai Y, Kakimoto T, Takemoto K, et al. Quantitative analysis of histopathological findings using image processing software[J]. *J Toxicol Pathol*, 2017, 30(4): 351-358.
- [5] Li W, Wang YQ, Tan SB, et al. Overexpression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and HER-2 in bladder carcinoma and its association with patients' clinical features[J]. *Med Sci Monit*. 2018, 24: 7178-7185.
- [6] Sokolova O, Naumann M. NF - κ B signaling in gastric cancer[J]. *Toxins (Basel)*, 2017, 9(4): e119.
- [7] Bano N, Yadav M, Mohania D, et al. The role of NF-kappa B and miRNA in oral cancer and cancer stem cells with or without HPV16 infection[J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0205518.
- [8] Puar YR, Shanmugam MK, Fan L, et al. Evidence for the involvement of the master transcription factor NF - κ B in cancer initiation and progression[J]. *Biomedicine*, 2018, 6(3): 82.
- [9] Kamperos G, Nikitakis N, Sfakianou AA, et al. Expression of NF-kappa B and IL-6 in oral precancerous and cancerous lesions: an immunohistochemical study[J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2016, 21(1): e6-e13.
- [10] Zhou JB, Ching YQ, Chng WJ. Aberrant nuclear factor-kappa B activity in acute myeloid Leukemia: from molecular pathogenesis to therapeutic target[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(8): 5490-5500.
- [11] 占育华, 崔涵, 刘济远, 等. 核因子 κ B/细胞淋巴瘤2信号通路与糖原合成激酶3 β 在口腔鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. *华西口腔医学杂志*, 2015, 33(1): 11-15.
- [12] Zhang W, Yin G, Dai J, et al. Chemoprevention by quercetin of oral squamous cell carcinoma by suppression of the NF-kappa B signaling pathway in DMBA-treated hamsters[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(8): 4041-4049.
- [13] Pordanjani SM, Hosseinimehr SJ. The role of NF-kappa B inhibitors in cell response to radiation[J]. *Curr Med Chem*, 2016, 23(34): 3951-3963.
- [14] Monisha J, Roy NK, Bordoloi D, et al. Nuclear factor kappa B: a potential target to persecute head and neck cancer[J]. *Curr Drug Targets*, 2017, 18(2): 232-253.

(编辑 罗燕鸿,刘曙光)