

文章编号:1005-6947(2006)06-0428-04

· 基础研究 ·

核因子 kB 表达与胰腺癌转移及与 MMP-2 表达的关系

张克君, 李德春

(苏州大学第一附属医院 普通外科, 江苏 苏州 215006)

摘要:目的 探讨核因子 kB (NF-kB, p65) 在胰腺癌(PC)中的表达与淋巴结转移及 MMP-2 表达的关系。方法 免疫印迹法检测 45 例 PC(淋巴结转移 30 例,非转移 15 例)和 9 例正常胰腺组织(NP)中 p65 蛋白的表达;RT-PCR 检测 MMP-2 mRNA 的表达。结果 p65, MMP-2 在 45 例 PC 组织中的阳性表达率分别为 66.7% (30/45) 和 57.8% (26/45), 在 30 例转移组织中的阳性表达率分别为 83.3% (25/30) 和 73.3% (22/30), 在非转移组织中的阳性表达率分别为 33.3% (5/15) 和 26.7% (4/15), p65 与 MMP-2 表达呈明显正相关($r = 0.743, P < 0.05$)。结论 NF-kB 异常表达与胰腺癌淋巴结转移有关, 并与 MMP-2 正相关, NF-kB 可能通过对下游基因表达的调控, 参与了胰腺癌的转移过程。

关键词: 胰腺肿瘤; 淋巴转移; NF-kB; 明胶酶 A; 基因表达调控, 肿瘤

中图分类号: R735.9

文献标识码: A

The relationship of expression of nuclear factor kappab gene and MMP-2 mRNA and with lymph node metastasis of pancreatic cancer

ZHANG Ke-jun, LI De-chun

(Department of the General Surgery, the First Affiliated Hospital, Soochow University, Soochow, Suzhou 215006, China.)

Abstract: **Objective** To study the relationship of expression of nuclear factor kappab gene and MMP-2 mRNA and with lymph node metastasis of pancreatic cancer. **Methods** The expression of NF-kB was investigated by Western blot in normal pancreatic (NP) samples of 9 cases and pancreatic cancer (PC) samples of 45 cases (lymph node metastasis 30 cases, non-lymph node metastasis 15 cases). The expression of MMP-2 mRNA was detected through semiquantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Of 45 PC cases, the positive expression rate of p65 and MMP-2 mRNA was 66.7% (30/45) and 57.7% (26/45), respectively. Of 30 cases of lymph node metastasis, the positive expression rate of p65 and MMP-2 mRNA was 83.3% (25/30) and 73.3% (22/30), respectively. Of 15 cases of non-lymph node metastasis, the positive expression rate of p65 and MMP-2 mRNA is 33.3% (5/15) and 26.7% (4/15), respectively, and the expression of p65 gene was positively correlated with MMP-2 mRNA expression ($r = 0.743, P < 0.05$). **Conclusions** The abnormal expression of NF-kB is closely associated with lymph node metastasis of PC. NF-kB is closely related to MMP-2, which indicated that NF-kB is involved in the lymph node metastasis of PC by mediating downstream gene expression.

Key words: Pancreatic Neoplasms; Lymphatic Metastasis; NF-kappa B; Gelatinase A; Gene Expression Regulation, Neoplasms

CLC number: R735.9

Document code: A

收稿日期:2006-03-10; 修订日期:2006-06-12。

作者简介:张克君,男,苏州大学第一附属医院 医师,主要从事肝胆胰疾病的基础与临床方面的研究。

通讯作者:张克君 E-mail:Love5028@sohu.com。

核因子kB(NF-kB)为抗凋亡因子,在其家族中,绝大部分成分为p50/p65。研究发现^[1],NF-kB激活在胰腺癌的发生过程中起重要作用,且其激活与胰腺癌细胞的浸润转移能力有关。MMP-2是与转移相关的基质金属蛋白酶,在胰腺癌的转移过程中起重要作用^[2]。笔者既往的研究^[3]发现,肝细胞癌的浸润转移行为与NF-kB激活MMP-9表达有关。本文探讨NF-kB p65(P65)表达与胰腺癌转移的关系及与MMP-2表达的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本 收集本院普通外科2000年4月~2005年5月45例临床资料完整的胰腺癌标本,其中淋巴结转移和远处转移(肝转移、腹膜和网膜种植等)30例,无淋巴结转移15例。收集9例正常胰腺新鲜标本[外伤5例,胰岛素瘤2例,壶腹癌2例(最后病理证实)],将所有标本立即置-700℃冰箱备用。所有患者均为第1次手术,术前未经任何放疗和化疗。

1.1.2 主要试剂 鼠抗人p65单抗,总RNA提取试剂盒和逆转录试剂盒(Promega),PCR产物回收试剂盒(QIAGEN公司),Taq酶、DNA连接酶、RNA酶(上海华舜生物工程公司),引物由上海生物工程技术有限公司合成。

MMP-2引物扩增片断307bp 5'-ACCTGGATGCCGTCCTGGAC-3' 5'-TGTGGCAGCAGGGCAGC-3' β -Actin引物扩增片断510bp 5'-AACTCCATCATGAAGTGTGA-3' 5'-ACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3'

1.2 实验方法

1.2.1 免疫印迹分析 p65蛋白表达 细胞蛋白

质的提取参考文献^[4]。采用Lowry法准确测定蛋白质浓度。蛋白质样品上样量每泳道为60 μ g,用10%聚丙烯酰胺凝胶分离,并转至Hybond硝酸纤维素膜上(美国Bio Rad公司)。

1.2.2 逆转录多聚酶联反应分析 MMP-2 mRNA水平 采用RNA分离试剂盒提取并纯化细胞总RNA,采用M-MLV逆转录试剂盒将RNA逆转录成cDNA。PCR条件:95℃ 5min, 95℃ 1min, 56℃ 1min, 72℃ 1min, 30个循环。测定MMP-2表达与 β -Actin灰度相对比值,大于1为表达阳性(+),小于1为表达阴性(-)。

1.3 统计学处理

采用 χ^2 检验,Speaman相关分析。

2 结果

2.1 p65蛋白表达

45例胰腺癌组织(转移30例,非转移15例)中p65(+)30例(66.7%);其中转移组为83.3%(25/30),非转移组为33.3%(5/15),9例正常胰腺组织未见表达。转移组p65阳性表达明显高于非转移组($P < 0.01$)和正常组($P < 0.000$),非转移组和正常组的阳性表达率无统计学差异(图1)(表1)。

2.2 MMP-2 mRNA表达分析

30例转移胰腺癌组织中,MMP-2(+)表达22例(73.3%),15例非转移胰腺癌组织中,MMP-2(+)表达4例(26.7%),9例正常胰腺组织未见表达,转移组MMP-2表达明显高于非转移组,差异有显著性($P < 0.01$),非转移组和正常组之间的阳性表达率差异无统计学意义($P > 0.05$)(图2)(表1)。

1:正常胰腺组织;2:胰腺癌淋巴结转移组;3:胰腺癌非淋巴结转移组

图1 Western-blot分析p65蛋白表达

M:Marker;1:胰腺癌非淋巴结转移组;2:胰腺癌淋巴结转移组;3:正常胰腺组织

图2 PT-PCR分析MMP-2 mRNA表达

表1 p65, MMP-2 表达与胰腺癌淋巴结转移的关系

分组	例数	p65		MMP-2	
		(+)	(-)	(+)	(-)
胰腺癌并转移	30	25 ¹⁾	5	22 ²⁾	8
未并转移	15	5	10	4	11

注:1)与非转移组比, $P < 0.01$; 2)与非转移组比, $P < 0.05$

2.3 p65 和 MMP-2 表达相关性分析

30 例 p65 阳性表达的胰腺癌组织, MMP-2 阳性表达 21 例, 15 例 p65 阴性表达的 PC 中, MMP-2 阳性表达 5 例, 两者有明显的正相关性 ($r = 0.743$, $P < 0.05$) (表 2)。

表2 p65, MMP-2 表达的相关性分析

项目	例数	MMP-2		r	P
		(+)	(-)		
p65(+)	30	21	9	0.743	<0.05
p65(-)	15	5	10		

3 讨论

NF- κ B 是一类重要的核转录因子, 通常以同源或异源二聚体的形式存在于细胞质中。以往的研究主要集中在 NF- κ B 在免疫反应和炎症反应中的作用。最近研究发现, NF- κ B 在肿瘤的发生、发展中也起重要作用, 它可以调控细胞的增殖、分化、凋亡及恶性转移。

研究证实^[5-7], NF- κ B 在许多肿瘤中被激活, 其活性程度与许多肿瘤的转移能力密切相关; 药物或基因转染抑制 NF- κ B 的活化, 则肿瘤细胞的转移能力明显降低。许多研究也发现^[8-11], NF- κ B 与肿瘤转移的关系是间接的, MMPs, IL-8, VEGF 等分子可能起桥梁作用。本研究证实了 p65 蛋白在胰腺癌转移组表达明显增高, 而在未转移组和正常胰腺组织的表现表达无统计学差别, 表明 NF- κ B 激活在胰腺癌的发展中有重要作用; 特别是 p65 蛋白表达与胰腺癌淋巴结转移有关: p65 蛋白表达在淋巴结转移组高于非转移组 ($P < 0.01$)。说明核因子 κ B 参与了胰腺癌的浸润转移过程。

MMPs 是一组锌离子依赖性内肽酶, 几乎能降解细胞外基质的所有成分, 在机体生长发育和伤口愈合过程中起重要作用。病理状态下, MMPs 一

方面通过降解基底膜和包绕肿瘤的基质, 突破基质屏障, 促进肿瘤侵袭转移, 另一方面通过促进新生血管生成等而促进肿瘤生长和扩散。IV 型胶原酶包括 MMP-2 和 MMP-9 两个亚型。Koshiba 等^[11]发现在胰腺癌组织及其肝转移结节和正常胰腺组织中均可表达 MMP-9, 而 MMP-2 则在所有胰腺癌组织及其转移结节中表达, 正常胰腺未见表达, 故认为 MMP-2 对胰腺癌的特异性高。Bramhall^[12]研究认为, MMP-2 的表达与胰腺癌的恶性表型相关。本研究显示, 淋巴结转移组的 MMP-2 阳性表达率高于非转移组, 且 MMP-2 在正常胰腺组织中不表达, 故认为 MMP-2 对胰腺癌的特异性高, 这与 Koshiba^[11]的研究结果一致。目前已发现^[13-14], 在 Bel-2, Bel-XL, C-Myc, MMP-9, CyclinD1, Cox-2, ICAM-1 等许多基因的启动子或增强子上有 NF- κ B 的结合位点。当 NF- κ B 激活时可引起它们的释放, 从而产生增生、抗凋亡、转移等不同效应。

本研究结果显示, p65 与 MMP-2 表达呈明显的正相关。说明在基因转录水平上 p65 可能对 MMP-2 分泌有调节作用, 两者共同参与胰腺癌转移过程。

参考文献:

- [1] Fujioka S, Scwabas GM, Schmidt C, *et al.* Function of nuclear factor kappaB in pancreatic cancer metastasis [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(1):346-354.
- [2] 花瞻, 张百顺, 张远春, 等. Her-2/neu 和 MMP2 在胰腺癌中的表达及其意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(1):57-59.
- [3] 张克君, 李德春, 高焱明. NF- κ B、MMP-9 与肝细胞肝癌浸润转移的实验研究 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2006, 8, (待发表).
- [4] Andela VB, Schwarz EM, Puzas JE. Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor kappaB [J]. Cancer Res, 2000, 60(23):6557-6562.
- [5] Shishodia S, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB activation mediates cellular transformation, proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of cancer [J]. Cancer Treat Res, 2004, 119(3):139-173.
- [6] Shukla S, MacLennan GT. Nuclear factor-kappaB / p65 (RelA) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression [J]. Neoplasia, 2004, 6(4):390-400.
- [7] Futakuchi M, Ogawa K, Tamano S, *et al.* Suppression of metastasis by nuclear factor kappaB inhibitors in an in vivo lung metastasis model of chemically induced hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Sci, 2004, 95(1):18-24.

- [8] Shuichi Fujioka, Guido M. Scelabas. Function of nuclear factor B in pancreatic cancer metastasis [J]. *Clinical Cancer Res*, 2003, 9(9):346-354.
- [9] Shukla S, MacLennan GT, Fu P. Nuclear factor-kappaB/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression [J]. *Neoplasia*, 2004, 6(4):390-400.
- [10] karashima T, Sweeney P, Kamat A. Nuclear factor-kappaB mediates angiogenesis and metastasis of human bladder cancer through the regulation of interleukin-8 [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(7):2786-2797.
- [11] Koshba T, Hosotani R, Wada M, *et al.* Detection of MMP activity in human pancreatic cancer [J]. *Surg Today*, 1997, (4):302-304.
- [12] Bramhall SH, Neoptolemos JP, Stamp GW, *et al.* Imbalance of expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibition of the matrix metalloproteinase in human pancreatic carcinoma [J]. *J Pathol*, 2002, 182(3):347-355.
- [13] Belotti D, Paganoni P. Matrix-metalloproteinases (MMP-9 and MMP-2) induce the release of vascular endothelial growth factor by ovarian carcinoma cells; implications for ascites formation [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(17):5224-5229.
- [14] Takada Y, Kobayashi Y. Evodiamine abolishes constitutive and inducible NF-kappaB activation by inhibiting IkappaB alpha kinase, thereby-kappaB-regulated anti apoptotic and metastatic gene expression, up-regulating apoptosis, and inhibiting invasion [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(17):17203-17212.

文章编号:1005-6947(2006)06-0431-01

· 病例报告 ·

宫内节育器穿透子宫至腹腔致肠坏死 1 例

丛滋丰¹, 杨大伟²

(1. 辽宁省喀左县第一人民医院 普通外科, 辽宁 喀左 122300; 2. 辽宁省喀左县中蒙医院 外科, 辽宁 喀左 122300)

关键词:肠/病理学; 坏死; 宫内节育器; 病例报告

中图分类号:R574; R44

文献标识码:D

患者 女, 60岁, 聋哑人。入院前十天, 因右下腹痛, 在外医院诊断为“阑尾炎”, 行阑尾切除手术。术后3d排气、排便, 但仍有腹部呈持续性胀痛, 因腹痛、腹胀加重12h, 转来我院。

体查: T: 37.8℃, BP: 110/70mmhg, 轻度贫血貌, 心肺正常, 全腹胀隆, 见胃肠型及蠕动浪, 全腹有压痛反跳痛, 移动性浊音(+), 肠鸣音0-1次/min, 未闻及气过水音。白细胞 $18.9 \times 10^9/L$, 血红蛋白90G/L, RBC: $3.0 \times 10^{12}/L$; 腹透示: 右上腹可见数个液平面, 下腹部有一环型金属影, 腹部CT示: 子宫上方与肠系膜附近见一直径17mm大小环形金属影, 呈短管状。入院诊断: 急性腹膜炎, 急性肠梗阻, 腹腔内异物(节育环)? 遂

急诊在全麻下行剖腹探查术。术中见下腹部广泛粘连, 腹腔内约有400mL血性分泌物, 见子宫节育环将小肠管套入约30cm, 剪断并取出节育环, 见套入肠管为回肠, 颜色暗黑, 无肠蠕动, 给予热敷、系膜注射利多卡因等方法后, 见距回盲部约35cm处有30cm回肠坏死。行坏死肠管切除, 回盲部闭锁, 回肠与升结肠端侧吻合术。术中曾请妇科会诊, 探查子宫附件无异常。探查腹腔内无其它病灶及异物及无活动出血后, 冲洗腹腔, 盆腔放置胶管引流一枚后关腹。术后痊愈出院。再次追问病史, 因计划生育而置宫腔内节育环30余年, 绝经后未取出。

讨论 本例追问病史, 于阑尾切除前1周有腹部不适感, 并有轻度梗阻症状, 后因腹痛加重, 遂以急性阑尾炎于外院急诊手术, 术中未进一步探查, 术后不全梗阻症状并未消失, 也未引起更多注意, 住院期间未进行腹透或拍腹平片, 导致误诊, 梗阻进一步加重, 并出现腹膜炎。我院影像学检查

时发现下腹部有一环型金属物, 再次手术才明确诊断。本病误诊的最大原因是: 询问病史不仔细、术前检查不完善, 其次, 手术探查不仔细、不全面, 误认为阑尾炎而行阑尾切除术, 导致误诊误治。最终致肠管坏死; 再次, 术后观察不仔细, 对术后出现的症状不加分分析, 虽然宫腔节育器穿透子宫至腹腔罕见。加以患者因为聋哑, 属于特殊人群, 沟通较正常人困难。临床医师如能仔细询问病史及详细体格检查, 并根据各项实验室资料、影像学检查综合分析, 任何做到不误诊或少误诊。刘志勇, 季洪阁曾报道过子宫节育器穿透子宫至腹腔1例, 术前诊断明确, 未造成误诊误治, 是可以借鉴的一个好的例证。所以对于育龄妇女急腹症, 及慢性腹痛病史的患者, 应仔细询问一下妇科病史, 节育器安放等情况。对绝经期后妇女应询问节育器的安置及取出情况, 尤其在医疗落后的边远山区, 以防此类病的发生和误诊误治。

收稿日期:2005-10-19。

作者简介:丛滋丰, 男, 辽宁朝阳人, 辽宁省喀左县第一人民医院主治医师, 主要从事普通外科、腹部外科、泌尿外科方面的研究。

通讯作者:丛滋丰 E-mail: congzifeng9966@163.com。