

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.18.005

文章编号: 1005-8982(2017)18-0028-04

## 结肠癌患者 $\Delta$ Np63 和 NF- $\kappa$ B 的表达及意义

樊晓静, 史志涛, 孙昕

(新疆医科大学附属自治区中医院 普外一科三组, 新疆 乌鲁木齐 830000)

**摘要:目的** 探讨结肠癌患者 N 末端截短型 p63 基因( $\Delta$ Np63)和核转录因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的表达及意义。**方法** 采用免疫组织化学法检测结肠癌患者  $\Delta$ Np63 和 NF- $\kappa$ B 的表达;采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和 Western blot 检测  $\Delta$ Np63 和 NF- $\kappa$ B 信使核糖核酸(mRNA)和蛋白的表达;采用半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Caspase-3)活性检测试剂盒检测凋亡蛋白 Caspase-3 表达。**结果** 与对照组比较,结肠癌患者  $\Delta$ Np63 蛋白表达升高 35.57%,NF- $\kappa$ B 蛋白表达升高 58.93%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );结肠癌患者  $\Delta$ Np63 和 NF- $\kappa$ B mRNA 和蛋白表达均升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );结肠癌患者 Caspase-3 活性升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 结肠癌患者  $\Delta$ Np63 和 NF- $\kappa$ B 呈过度表达状态; $\Delta$ Np63 和 NF- $\kappa$ B 的过表达在结肠癌发生、发展机制中可能起到重要作用。

**关键词:** 结肠癌;N 末端截短型 p63 基因;核转录因子  $\kappa$ B;免疫组织化学

**中图分类号:** R735.35

**文献标识码:** A

## Expression of $\Delta$ Np63 and NF- $\kappa$ B in colon cancer patients and significance

Xiao-jing Fan, Zhi-tao Shi, Xin Sun

(Department of General Surgery, Xinjiang Uyghur Autonomous Region Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression and effect of  $\Delta$ Np63 and NF- $\kappa$ B in patients with colon cancer. **Methods** The expressions of  $\Delta$ Np63 and NF- $\kappa$ B in patients with colon cancer were detected by immunohistochemical method. The mRNA and protein expressed by  $\Delta$ Np63 and NF- $\kappa$ B were detected by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. The expression of Caspase-3 in apoptotic cells was detected by Caspase-3 activity assay kit. **Results** Compared with the control group, the level of protein expressed by  $\Delta$ Np63 rose by 35.57% and the level of protein expressed by NF- $\kappa$ B rose by 58.93%, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The mRNA and protein expressed by  $\Delta$ Np63 and NF- $\kappa$ B were obviously up-regulated, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The activity of Caspase-3 in the colon cancer group was obviously increased, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The expressions of  $\Delta$ Np63 and NF- $\kappa$ B in colon cancer patients are over-expressed, and the over-expressed  $\Delta$ Np63 and NF- $\kappa$ B may play important roles in the development and progression of colon cancer.

**Keywords:** colon cancer; Np63; NF- $\kappa$ B; immunohistochemistry

结肠癌是世界范围内发病最为广泛的恶性肿瘤之一,其发病率与病死率呈逐年上升趋势<sup>[1-2]</sup>。结肠癌的发病由环境、饮食、生活习惯及遗传等多因素共同作用<sup>[3]</sup>,但结肠癌的发病机制迄今尚不明确。研究

表明,原癌基因的激活和肿瘤抑制基因的失活在结肠癌的发生、发展过程中起到重要作用<sup>[1-3]</sup>。N 末端截短型 p63 基因(N distal end brachytema p63 gene,  $\Delta$ Np63)是抑癌基因 p53 家族成员之一,参与细胞周

期抑制和细胞凋亡的调控<sup>[4-5]</sup>;核转录因子 $\kappa$ B(nuclear factor  $\kappa$ B,NF- $\kappa$ B) 是一类具有多向调节作用的核转录因子,参与调节多种凋亡相关基因的表达<sup>[6-7]</sup>。 $\Delta$ Np63 和 NF- $\kappa$ B 的调节作用可能参与结肠癌的发生、发展过程,本研究主要探讨  $\Delta$ Np63 和 NF- $\kappa$ B 在结肠癌组织中的分布,以及  $\Delta$ Np63 和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达变化和作用意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 标本材料** 选取 2014 年 9 月 -2016 年 7 月本院肿瘤外科收集的 85 原发性结肠癌标本,均经组织病理学确诊。其中,男性 49 例,女性 36 例;平均发病年龄 52 岁(24 ~ 76 岁);低分化腺癌 23 例,高中分化腺癌 62 例;侵及黏膜和浅肌层 15 例,至深肌层和全层 70 例;无淋巴结转移 17 例,有淋巴结转移 68 例。同时,取 35 例手术末端未见肿瘤浸润的正常结肠组织标本作为对照。研究符合伦理委员会相关规定,并经本院医学伦理委员会批准。

**1.1.2 实验材料** 一抗  $\Delta$ Np63、NF- $\kappa$ B 及肌动蛋白( $\beta$ -actin,ACTB)单克隆抗体(购于美国 Abcam 公司),二抗碱性磷酸酶标记山羊抗兔 IgG、DAB 染色盒、抗体稀释液及中性树脂(购于北京中杉金桥有限公司),实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real time polymerase chain reaction,qRT-PCR)试剂盒(购自日本 TaKaRa 公司),Caspase-3 活性检测试剂盒(上海碧云天生物工程有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学法检测  $\Delta$ Np63 和 NF- $\kappa$ B 的蛋白表达水平** 取患者的结肠癌病理石蜡标本及正常结肠组织标本共 120 例,分别进行连续切片 6 张(8  $\mu$ m/张)。用 5%血清进行室温封闭 40 min 后,分别加入 1 : 1 000 的  $\Delta$ Np63 或 NF- $\kappa$ B 单克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。隔天加入 1 : 1 000 的二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,PBS 清洗后加入 SP 后进行恒温反应 30 min,加入 DAB 显色液进行显色,中性树脂封片后用( $\times$ 10、 $\times$ 40)显微镜进行观察。阳性染色: $\Delta$ Np63 和 NF- $\kappa$ B 的阳性表达主要表现为细胞内出现棕黄色颗粒。( $\times$ 40)显微镜下观察,随机选择 5 个高倍视野,采用 IPP 软件进行图像扫描分析,收集数据并计算图片中  $\Delta$ Np63 和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达的平均光密度(mean optical density,MOD)。MOD= 累积光密度(integrated optical density,IOD)与面积(area)的比值,用于反应

组织中  $\Delta$ Np63 和 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达含量。

**1.2.2 qRT-PCR 检测标本中  $\Delta$ Np63 和 NF- $\kappa$ B mRNA 表达含量** Trizol 法提取结肠癌组织中的总 RNA,用 TaKaRa 公司的 Prime Script RT 试剂盒逆转录合成 cDNA 后,用 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 试剂盒进行 qRT-PCR 操作。每个样本设 4 个重复孔,每个目的基因重复 3 次。最终得到 Ct 值(threshold cycles)和溶解曲线的参数,实验采用相对定量法,根据公式计算出待测样品中目的基因( $\beta$ -actin)和管家基因的准确含量,以样本的目的基因与管家基因之间含量比值,即循环阈值(cycle threshold,Ct)值比较法作为评价目的基因表达量的指标进行分析,计算不同样本间的相对百分比。公式: $\Delta\Delta Ct=(Ct_{\text{实验组的目的基因}}-Ct_{\text{实验组管家基因}})-(Ct_{\text{对照组的目的基因}}-Ct_{\text{对照组管家基因}})$ 。目的 mRNA 的量 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

**1.2.3 Western blot 检测  $\Delta$ Np63 和 NF- $\kappa$ B 的蛋白表达水平** 收集结肠癌组织,加入裂解液冰上裂解 2 h。用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度检测,将各组蛋白浓度总量调整为 30  $\mu$ g/ $\mu$ l。将各组蛋白样品加入到 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,转膜至 PVDF 膜后按 1 : 1 000 的稀释比例加入一抗和二抗。用 ECL 显色剂显色,并对各泳道条带进行灰度扫描,计算蛋白的表达量。

**1.2.4 凋亡蛋白活性检测试剂盒检测 Caspase-3** 取组织裂解离心并收集蛋白上清液,稀释后加入反应缓冲液(reaction buffer 含 10 mol/LDTT)及 5  $\mu$ l 4 mol/L LEHD-pNA 底物,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。酶标仪 405 nm 测定其吸光度 A 值。Caspase-3 活性单位(u)=(各组 A 值 - 调零组 A 值)/标准曲线斜率,每次重复 3 孔。

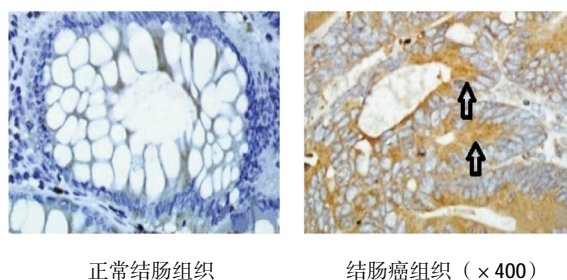
### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,比较用  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

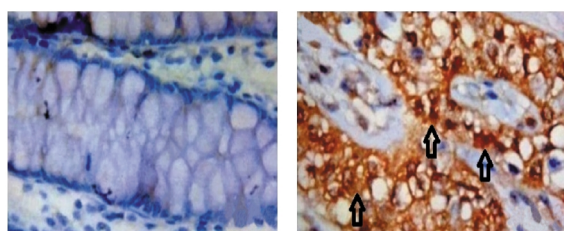
### 2.1 $\Delta$ Np63 和 NF- $\kappa$ B 免疫组织化学结果

正常结肠组织和结肠癌组织中的  $\Delta$ Np63 蛋白免疫组织化学染色强度差异有统计学意义,结肠癌组织中  $\Delta$ Np63 呈高表达水平。正常结肠组织和结肠癌组织中的 NF- $\kappa$ B 蛋白免疫组织化学染色强度差异有统计学意义,结肠癌组织中 NF- $\kappa$ B 呈高表达水平。见图 1、2。



正常结肠组织 结肠癌组织 (×400)  
ΔNp63 阳性染色主要表现为细胞内出现棕黄色颗粒(箭头示)

图 1 ΔNp63 的蛋白表达



正常结肠组织 结肠癌组织 (×400)  
NF-κB 阳性染色主要表现为细胞内出现棕黄色颗粒(箭头示)

图 2 NF-κB 的蛋白表达

## 2.2 ΔNp63 和 NF-κB 的蛋白表达水平

免疫组织化学结果分析显示,结肠癌组织中 ΔNp63 蛋白表达比正常结肠组织中的蛋白表达增加 ( $P=0.000$ ), ΔNp63 的蛋白表达量增加 35.57%;结肠癌组织中 NF-κB 蛋白表达比正常结肠组织中的蛋白表达增加 ( $P=0.000$ ), NF-κB 的蛋白表达量增加 58.93%。见附表。

## 2.3 ΔNp63 和 NF-κB mRNA 表达情况

与正常结肠组织 ΔNp63 mRNA 表达 ( $1.00 \pm 0.00$ ) 比较,结肠癌组织中 ΔNp63 mRNA 表达升高 ( $1.37 \pm 0.12$ ), 差异有统计学意义 ( $t=43.740, P=0.000$ ), NF-κB mRNA 表达升高 ( $1.84 \pm 0.15$ ), 差异有统计学意义 ( $t=80.950, P=0.000$ ), 说明结肠癌组织中 ΔNp63 和 NF-κB mRNA 水平高度表达。

## 2.4 ΔNp63 和 NF-κB 蛋白表达

Western blot 结果分析显示,与正常结肠组织 ΔNp63 蛋白表达 ( $0.55 \pm 0.03$ ) 比较,结肠癌组织中 ΔNp63 蛋白表达升高 ( $0.74 \pm 0.06$ ), 差异有统计学

附表 ΔNp63 和 NF-κB 的蛋白表达变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	ΔNp63 蛋白表达	NF-κB 蛋白表达
正常结肠组织	$0.684 \pm 0.039$	$0.857 \pm 0.024$
结肠癌组织	$0.941 \pm 0.029$	$1.362 \pm 0.037$
<i>t</i> 值	23.650	51.210
<i>P</i> 值	0.000	0.000

意义 ( $t=14.060, P=0.000$ )。与正常结肠组织 NF-κB 蛋白表达 ( $1.27 \pm 0.12$ ) 比较, NF-κB 蛋白表达升高 ( $1.89 \pm 0.13$ ), 差异有统计学意义 ( $t=15.620, P=0.000$ ), 说明结肠癌组织中 ΔNp63 和 NF-κB 蛋白水平呈高度表达。见图 3。

## 2.5 Caspase-3 活性检测试剂盒检测结果

与正常结肠组织 Caspase-3 活性 ( $0.64 \pm 0.04$ )u 比较,结肠癌组织中的 Caspase-3 活性 ( $0.75 \pm 0.08$ )u 提高, 差异有统计学意义 ( $t=6.559, P=0.000$ )。

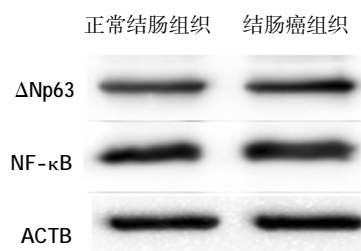


图 3 ΔNp63 和 NF-κB 蛋白表达

## 3 讨论

结肠癌是人类健康与生命威胁最大的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>, 研究表明, 原癌基因的激活和肿瘤抑制基因的失活在结肠癌的发生、发展过程中起到重要作用<sup>[2]</sup>。ΔNp63(特异性标记凋亡的缺乏酸性 N 端反式激活区的截短型 p6) 是抑癌基因 p53 家族成员之一, 是 p63 在肿瘤发生、发展过程中的主要表达形式<sup>[4-8]</sup>。ΔNp63 通过阻断 TAp63 和 p53 介导的反式激活, 竞争性与 DNA 结合, 在抑制细胞周期和调控细胞凋亡发生过程中起到重要作用<sup>[9-10]</sup>。NF-κB 作为一种多向转录调节作用的核蛋白因子, 在炎症、氧化应激及细胞增殖等生理病理过程中发挥作用<sup>[11-12]</sup>, 激活后可密切参与凋亡基因的转录调控及细胞凋亡的过程<sup>[13-14]</sup>, 最终导致效应性 Caspase-3 活化, 胞核内 DNA 链断裂, 细胞结构的全面解体, 细胞死亡发生<sup>[15]</sup>。

本研究结果显示, 与正常结肠标本组织比较, 结肠癌组织中 ΔNp63 和 NF-κB 的蛋白表达含量均上升; 同时 Western blot 结果也显示结肠癌组织中 ΔNp63 和 NF-κB 的蛋白表达含量上调。结肠癌组织中 ΔNp63 和 NF-κB mRNA 表达含量均与比正常结肠组织 mRNA 表达升高。结果表明在基因与蛋白水平上 ΔNp63 和 NF-κB 均呈过度表达状态, 参与结肠癌的发展。且由于 ΔNp63 和 NF-κB 表达含量的异常性升高, 不仅调控结肠癌的细胞的增殖过程, 更加速细胞凋亡的过程, 促使凋亡基因 Caspase-3 活

性升高。结果说明  $\Delta$ Np63 和 NF- $\kappa$ B 的特异性表达加速细胞凋亡的过程,促进结肠癌细胞的凋亡发生。

综上所述, $\Delta$ Np63 和 NF- $\kappa$ B 在结肠癌的发生和发展过程中发挥一定的抑癌作用,加速细胞凋亡的发生,但  $\Delta$ Np63 和 NF- $\kappa$ B 如何调控相关抑癌基因及加速细胞凋亡的作用机制还需进一步研究。在正常人群中,结肠上皮细胞中的  $\Delta$ Np63 的异常表达可能提示结肠癌的发生,联合检测 NF- $\kappa$ B 的蛋白表达含量有助于结肠癌的诊断与确诊,为临床治疗提供有效的帮助。

#### 参 考 文 献:

- [1] 伍雯,秦环龙. 膳食结构改变与结肠癌风险相关性的研究进展[J]. 肠外与肠内营养, 2014, 21(1): 55-59.
- [2] VARGAS A J, THOMPSON P A. Diet and nutrient factors in colorectal cancer risk[J]. Nutrition in Clinical Practice, 2012, 27(5): 613-623.
- [3] 王生,黄晓星,余鹏飞,等. 肠道菌群失调与结肠癌发生、发展之间关系的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(8): 1045-1049.
- [4] 张翊,张家模,吴小候,等.  $\Delta$ Np63 基因沉默对膀胱癌细胞增殖和凋亡的影响及分子机制[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(2): 141-144.
- [5] DU J, ROMANO R A, SI H, et al. Epidermal overexpression of transgenic  $\Delta$ Np63 promotes type 2 immune and myeloid inflammatory responses and hyperplasia via NF- $\kappa$ B activation [J]. J Pathol, 2014, 232(3): 356-368.
- [6] 黄小平,卢金冬,丁煌,等. 黄芪和三七的主要有效成分配伍对脑缺血/再灌注小鼠 NF- $\kappa$ B 信号通路及炎症因子表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(1): 141-146.
- [7] AHMED A U, SARVESTANI S T, GANTIER M P, et al. Integrin-linked kinase modulates lipopolysaccharide-and helicobacter pylori-induced nuclear factor  $\kappa$ B-activated tumor necrosis factor- $\alpha$  production via regulation of p65 serine 536 phosphorylation[J]. J Biol Chem, 2014, 289(40): 27776-27793.
- [8] 陈嘉述,王玥,王声远,等. 镍冶炼工人肺癌组织中  $\Delta$ Np63 蛋白表达的变化[J]. 中国工业医学杂志, 2016, 29(2): 126-128.
- [9] 何云锋,吴小候,罗春丽,等.  $\Delta$ Np63 mRNA 在膀胱癌组织中的表达及意义[J]. 重庆医学, 2007, 36(4): 1351-1354.
- [10] 王滢,杨业洲,谢兰,等.  $\Delta$ NP63/TAP63 在卵巢上皮性肿瘤组织中的表达及其与临床病理关系[J]. 华西医学, 2011, 26(9): 1379-1381.
- [11] 葛建彬,顾锦华,李梅. 银杏内酯 A 对小鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用及其抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路下调 p53、Caspase-3 表达的机制[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(8): 1105-1110.
- [12] 罗心静,莫选荣,周玲玲. TNF- $\alpha$  诱导类风湿关节炎滑膜细胞 NF- $\kappa$ B 信号通路活化的探讨[J]. 免疫学杂志, 2012, 28(4): 321-332.
- [13] 赖敏,何晓彬. NF- $\kappa$ B 在结肠癌组织中的表达及两者之间的关系[J]. 西南军医, 2010, 12(4): 748-750.
- [14] AFRIN M R, ARUMUGAM S, RAHMAN M A, et al. Le carbone, a charcoal supplement, modulates DSS-induced acute colitis in mice through activation of AMPK-tistically significant STAT3 and caspase 3 dependent apoptotic pathways[J]. Int Immunopharmacol, 2016, 12(43): 70-78.
- [15] CHENG C Y, SU S Y, TANG N Y, et al. Ferulic acid inhibits nitric oxide-induced apoptosis by enhancing gaba (b1) receptor expression in transient focal cerebral ischemia in rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(8): 889-899.