

The Expression of NF- κ BP65 and BCL-2 Protein in Pleomorphic Adenoma

Changhui Chen^{1*}, Weihua Xiao²

¹Department of Stomatology, Beilun District People's Hospital in Ningbo City, Ningbo Zhejiang

²Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The Second Affiliated Hospital to Nanchang University, Nanchang Jiangxi

Email: *88581742@qq.com

Received: Jan. 1st, 2016; accepted: Jan. 19th, 2016; published: Jan. 22nd, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: To detect the expression and discuss the expression meaning of NF- κ BP65 and BCL-2 protein in pleomorphic adenoma. **Methods:** The expression of NF- κ BP65 and BCL-2 protein in paraffin embedded specimens of pleomorphic adenoma and adjacent normal salivary gland tissue of 20 cases was detected using immunohistochemical S-P method. **Results:** The positive rates of NF- κ BP65 expression in pleomorphic adenoma and adjacent normal salivary gland tissue were 55% and 10%, and the positive rates of BCL-2 expression were 35% and 10% respectively. The differences of NF- κ BP65 and BCL-2 expression in pleomorphic adenoma and tumor adjacent normal salivary gland tissue were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** NF- κ BP65 and BCL-2 may play an important role in pleomorphic adenoma occurrence and development.

Keywords

Pleomorphic Adenoma, NF- κ BP65, BCL-2, Immunohistochemical

NF- κ BP65和BCL-2蛋白在多形性腺瘤中的表达

陈昌晖^{1*}, 肖维华²

¹宁波市北仑区人民医院口腔科, 浙江 宁波

²南昌大学第二附属医院口腔颌面外科, 江西 南昌

Email: *88581742@qq.com

收稿日期: 2016年1月1日; 录用日期: 2016年1月19日; 发布日期: 2016年1月22日

*通讯作者。

文章引用: 陈昌晖, 肖维华. NF- κ BP65 和 BCL-2 蛋白在多形性腺瘤中的表达[J]. 生物医学, 2016, 6(1): 1-5.

<http://dx.doi.org/10.12677/hjbm.2016.61001>

摘要

目的: 检测NF- κ B P65与BCL-2蛋白在多形性腺瘤及瘤旁正常涎腺组织中的表达情况, 探讨NF- κ B P65与BCL-2蛋白在多形性腺瘤的表达意义。**方法:** 采用免疫组织化学S-P法检测20例涎腺多形性腺瘤组织石蜡标本中NF- κ B P65与BCL-2蛋白表达水平, 以瘤旁正常涎腺组织作为对照, 进行组内及组间比较。**结果:** 多形性腺瘤和瘤旁正常涎腺组织中NF- κ B P65表达的阳性率分别为55%和10.0%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); BCL-2表达的阳性率分别为35%和10.0%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:** NF- κ B P65 和 BCL-2的协同作用可能对多形性腺瘤的发生、发展起重要作用。

关键词

多形性腺瘤, NF- κ B P65, BCL-2, 免疫组化

1. 引言

NF- κ B 是最先在成熟的 B 细胞中被发现的一种核蛋白, 它可通过对相应基因的转录调节, 促进肿瘤的发生、肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移[1] [2]。而 BCL-2 是迄今研究的最深入和广泛的凋亡调控基因之一, 但有关 NF- κ B 与 BCL-2 在多形性腺瘤中表达的报道较少, 且目前对 BCL-2 表达与该肿瘤的发生、发展及侵袭过程的关系及相关机制尚不完全清楚。有鉴于此, 本研究采用免疫组化 SP 法检测 NF- κ B P65 和 BCL-2 在多形性腺瘤、正常涎腺组织中的表达水平, 分析 NF- κ B P65 和 BCL-2 在多形性腺瘤中的表达情况及意义。

2. 材料与方法

2.1. 材料

病例选自 2006 年 1 月~2010 年 12 月南昌大学第二附属医院口腔颌面外科多形性腺瘤手术患者, 共 20 例, 其中男性 13 例, 女性 7 例, 平均年龄 53.6 ± 9.8 岁, 所有患者均告知并同意其病理结果可以用于科学研究。以切除的多形性腺瘤组织为试验组, 瘤旁正常涎腺组织为对照组。收集患者性别、年龄、肿瘤大小、部位等资料。所有患者术前未进行放化疗治疗。所有标本经病理检查确诊后经 10% 中性福尔马林液固定, 常规石蜡包埋。

2.2. 主要试剂

小鼠抗人 NF- κ B P65 单克隆抗体试剂盒和小鼠抗人 BCL-2 单克隆抗体试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

2.3. 免疫组织化学染色(EliVision™plus 二步法) [3]

标本制成 $4 \mu\text{m}$ 石蜡切片, 经二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化和 PBS (PH = 7.4) 冲洗后, 切片放入高压锅中进行高温抗原修复, 冷却后用 PBS 液冲洗, 室温下孵育 10 分钟, 加 1 滴一抗, 置于 4°C 冰箱内过夜。第二天 PBS 冲洗结束后, 加 1 滴聚合物增强剂, 室温孵育 20 分钟。加 1 滴酶标抗兔聚合物, 室温孵育 30 分钟。重复 PBS 冲洗步骤一次, 加 1 滴新鲜配制的 DAB 显色液, 显微镜下控制显色时间。水洗、苏木素复染、0.1% HCL 分化 and PBS 返蓝。切片经酒精脱水干燥、二甲苯透明和树胶封片, 最后在显微镜下观察组织。

2.4. 免疫组化阳性判断标准

NF- κ B P65 以胞浆或胞核出现棕黄色颗粒为阳性; BCL-2 以胞浆或胞膜出现棕黄色颗粒为阳性。以阳

性细胞所占比率 < 10%判定为阴性(-), 10%~25%为弱阳性(+), 26%~50%为中阳性(++), >51%为强阳性(+++). 弱阳性, 中阳性, 强阳性均记为阳性。

2.5. 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计软件包进行统计学分析, 所有数据均以百分率表示(%), 采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. NF- κ BP65 在多形性腺瘤和瘤旁正常涎腺组织中的表达

NF- κ BP65 在多形性腺瘤和正常涎腺组织中的表达情况见图 1 和表 1。从该结果可以看出, NF- κ BP65 在多形性腺瘤中表达较为丰富, 表达率为 55%, 而在瘤旁正常涎腺组织表达率仅为 10%, 表达差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

3.2. BCL-2 在多形性腺瘤和瘤旁正常涎腺组织中的表达

BCL-2 在多形性腺瘤和瘤旁正常涎腺组织中的表达情况见图 2 和表 2。该结果表明, BCL-2 在多形

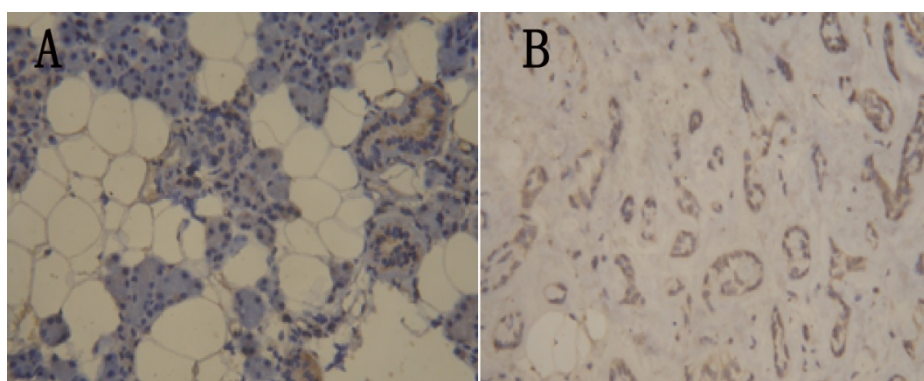


Figure 1. The expression of NF- κ BP65 in pleomorphic adenoma and adjacent normal salivary gland tissue. (A: Pleomorphic adenoma, B: Adjacent normal salivary gland tissue)

图 1. NF- κ BP65 在多形性腺瘤和瘤旁正常涎腺组织中的表达 $\times 400$ (A: 多形性腺瘤, B: 瘤旁正常组织)

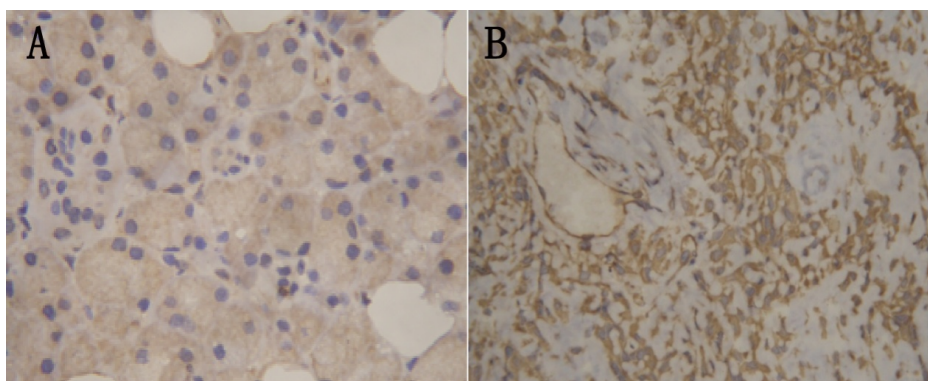


Figure 2. The expression of BCL-2 in pleomorphic adenoma and adjacent normal salivary gland tissue. (A: Pleomorphic adenoma, B: Adjacent normal salivary gland tissue)

图 2. BCL-2 在多形性腺瘤和瘤旁正常涎腺组织中的表达 $\times 400$ (A: 多形性腺瘤, B: 瘤旁正常组织)

Table 1. The positive expression rate of NF- κ Bp65
表 1. NF- κ Bp65 的表达阳性率比较

组别	例数	-	+	++	+++	阳性率(%)
多形性腺瘤	20	9	5	4	2	55.0
正常涎腺	20	18	2	0	0	10.0

注: 组别间采用卡方检测, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

Table 2. The positive expression rate of BCL-2
表 2. BCL-2 的表达阳性率

组别	例数	-	+	++	+++	阳性率(%)
多形性腺瘤	20	13	5	2	0	35.0
正常涎腺	20	18	2	0	0	10.0

注: 组别间采用卡方检测, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

性腺瘤中的表达率为 35%, 明显高于其在瘤旁正常涎腺组织中的表达, 两者差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

4. 讨论

大量的研究已表明, 肿瘤的发生发展和细胞增殖与凋亡动态平衡受破坏有关[4], 研究证实许多肿瘤中凋亡相关基因表达异常, 主要是抑凋亡基因表达上调, 促凋亡基因表达下调[5] [6]。NF- κ B 是一种分布和作用均十分广泛的真核因子, NF- κ B 对多种凋亡抑制因子如 c-IAP1、c-IAP2 等有诱导性表达作用。NF- κ B 通过对凋亡蛋白和抗凋亡蛋白不平衡表达的调节作用, 以及与肿瘤抑制蛋白(如 p53)的直接作用实现抗凋亡功能[7]; NF- κ B 所介导的对自我吞噬作用的抑制效应, 是其发挥抗凋亡作用的新机制[8]。越来越多的研究发现, NF- κ B 信号转导通路在癌变过程中起着重要作用[9], 特别是 RelA (p65)亚基可反式激活多种基因, 调节细胞的生长、凋亡、血管生成和侵袭转移。p65 蛋白在多种外界刺激下, 脱离 I κ B 的阻滞而转位至细胞核, 这是 NF- κ B 信号转导通路活化的标志。

BCL-2 是抑制细胞凋亡的基因, 它并不改变细胞增殖, 却可以抑制延缓细胞凋亡, 延长细胞寿命, 导致细胞数量增多[10]。近年来文献显示在多种肿瘤组织内 BCL-2 都呈现过表达状态。有研究发现, 原发性和复发性多形性腺瘤中 BCL-2 的表达相似, 而恶性多形性腺瘤中 BCL-2 过表达。柴琳[11]指出 BCL-2 的表达在口腔鳞癌的发生发展中起着重要的作用。提示 BCL-2 通过抑制细胞凋亡, 从而导致肿瘤细胞的累积和恶性潜能的显现, 推动肿瘤发展。本研究结果提示, BCL-2 在多形性腺瘤有高表达, 表明 BCL-2 的表达可以作为鉴别涎腺良性肿瘤和恶性肿瘤的参考依据。在恶性肿瘤中, BCL-2 蛋白阳性表达越高的病人, 恶性程度低, 生存率高, 预后好, 表明 BCL-2 不仅在良恶性肿瘤的发生发展中起重要的作用, 而且还可作为恶性肿瘤判断预后的指标。但这一推论目前仍存在着争议, 尤金强等[12]则认为 BCL-2 蛋白表达强度越强, 临床预后可能越佳; Knowlton 等[13]的观点认为 BCL-2 不仅抑制了细胞凋亡, 由此导致的细胞周期延长可能会延缓细胞增殖。BCL-2 在癌组织中的表达意义还有待进一步研究。

已有研究证实 BCL-2 启动子上存在着 NF- κ B 特异结合位点, 被认为是 NF- κ B 下游的一个重要靶基因 NF- κ Bp65 的过度激活, 可大大增加 BCL-2 的表达[14]-[16]。其调节其机制可能为: 可使抗凋亡蛋白如 BCL-x 等凋亡抑制蛋白和 TNF 受体相关因子的转录增加; 阻断 Fas 介导的凋亡通路, 从而抑制癌细胞凋亡; NF- κ Bp65 通过增加其下游基因, 如细胞周期素、肝细胞生长因子表达, 促进肿瘤细胞的生长; 抑制 NF- κ Bp65 活性或阻止 I κ B 降解的药物可增加癌细胞凋亡, 抑制癌细胞生长。Dai LC 等[17]在人肝细胞癌的研究结论也支持本实验观点。

本研究结果表明 NF- κ Bp65, BCL-2 在多形性腺瘤中有较高表达, 提示 NF- κ Bp65, BCL-2 的表达水平可作为涎腺肿瘤判断预后的可能筛选因子, 并为鉴别涎腺良性肿瘤和恶性肿瘤提供一定的参考依据。此外, 深入研究 NF- κ Bp65, BCL-2 信号转导通路在多形性腺瘤发生中的作用机制, 可能会为多形性腺瘤的诊断和治疗提供新的思路。

基金项目

浙江省卫生厅一般项目(No.2012KYB188)。

参考文献 (References)

- [1] Hagemann, T., Wilson, J., Kulbe, H., *et al.* (2005) Macrophages Induce Invasiveness of Epithelial. Cancer Cell via NF-KB and JNK. *The Journal of Immunology*, **175**, 1197-1205. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.175.2.1197>
- [2] Bernal, M.B. and Lovely, L. (2006) The Role of NF-KB and NF-KB-2 Mediated Apoptosis in Lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 9220-9222.
- [3] 张亘, 黄燕红, 李静. 磷酸化 P53 与 ER α 在乳头状甲状腺癌中的相关性研究[J]. 中国医科大学学报, 2015, 44(1): 51-54.
- [4] Groeger, A.M., Esposito, V., De-Luca, A., *et al.* (2004) Prognostic Value of Immunohistochemical Expression of p53, bax, Bcl-2 and Bcl-xL in Resected Non-Small-Cell Lung Cancers. *Histopathology*, **44**, 54-63. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2559.2004.01750.x>
- [5] Cory, S., Huang, D.C. and Adams, J.M. (2003) The Bcl-2 Family: Roles in Cell Survival and Oncogenesis. *Oncogene*, **22**, 8590-8607. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1207102>
- [6] Gobe, G., Rubin, M., Williams, G., *et al.* (2002) Apoptosis and Expression of Bcl-2, Bcl-xL, and Bax in Renal Cell Carcinomas. *Cancer Investigation*, **20**, 324-332. <http://dx.doi.org/10.1081/CNV-120001177>
- [7] Katori, H., Nozawa, A. and Tsukuda, M. (2007) Increased Expression of Cyclooxygenase-2 and Ki-67 Are Associated with Malignant Transformation of Pleomorphic Adenoma. *Auris Nasus Larynx*, **34**, 79-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anl.2006.09.006>
- [8] Djavaheri-Mergny, M., Amelotti, M., Methieu, J., *et al.* (2006) NF-kappa B Activation Represses Tumor Necrosis Factors-Alpha-Induced Autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 30373-30382. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M602097200>
- [9] 汤晓飞, 赵艳华, 张敏, 等. Nrf2 和 NF-KB 在口腔癌和癌前病变细胞中的表达及意义[J]. 北京口腔医学, 2009, 17(3): 135-137.
- [10] 魏温涛, 刘勤江. 上皮钙黏蛋白、P53 和 Bcl-2 在涎腺腺样囊性癌组织中的表达及与肺转移、神经浸润的相关性[J]. 兰州大学学报(医学版), 2007, 33(3): 17-19.
- [11] 柴琳. BCL-2 在口腔鳞癌中的表达及意义[J]. 皖南医学院报, 2002, 21(4): 249-251
- [12] Ghosh, S. and Karin, M. (2002) Missing Piece in the NF-kappaB Puzzle. *Cell*, **109**, 81-96.
- [13] Chen, C.L., Edelstein, L.C., *et al.* (2002) The Rel/NF-kappaB Family Directly Activates Expression of the Apoptosis Inhibitor bcl-x. *Molecular Biology of the Cell*, **20**, 2687-2695. <http://dx.doi.org/10.1128/MB.20.8.2687-2695.2000>
- [14] 尤金强, 王平. p53、bcl-2 和 bax 基因蛋白表达与眼眶泪腺腺样囊性癌的关系[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(28): 1978-1982.
- [15] Knowlton, K., Mancini, M., Creason, S., *et al.* (1998) Bcl-2 Slows *in Vitro* Breast Cancer Growth Despite Its Anti-apoptotic Effect. *Journal of Surgical Research*, **76**, 22-26. <http://dx.doi.org/10.1006/jsre.1998.5277>
- [16] 刘奔, 王帅, 林涛, 等. Bcl-2 过表达对多柔比星诱导的膀胱癌细胞凋亡和 NF- κ B 活化影响的观察[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(11): 841-844.
- [17] Dai, L.C., Wang, X., Yao, X., *et al.* (2007) Antisense Oligonucleotides Targeting Midkine Inhibit Tumor Growth in an *in Situ* Human Hepato Cellular Carcinoma Model. *Acta Pharmacologica Sinica*, **28**, 453-458.