

· 论 著 ·

78 例食管癌患者 CK20 mRNA、CD44v6、NF- $\kappa$ B 表达的临床意义

李 斌, 李劲松, 袁 宁

(重庆市第三人民医院体检中心 400014)

**摘要:**目的 研究食管癌患者血和组织中的 CK20 mRNA、CD44v6、核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的变化及其临床意义。方法 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术,对 78 例食管癌患者进行血液 CK20 mRNA 测定,并对癌组织进行免疫组化检测 CD44v6、NF- $\kappa$ B。结果 食管癌患者血液 CK20 mRNA 检查阳性率为 72%(49/78),TNM I、II、III、IV 期的表达阳性率分别为 30.7%、55%、92%、100%。食管癌组织 CD44v6 阳性表达率为 59%,NF- $\kappa$ B 表达阳性,阳性率 76.9%,与淋巴转移有关,差异有统计学意义。结论 CK20 mRNA 阳性表达与对照组存在显著相关,与癌组织中 CD44v6 存在显著相关,而 NF- $\kappa$ B 与淋巴转移有关。二者结合,有利于对远处血行转移和淋巴转移作出判断。

**关键词:**食管肿瘤;免疫组织化学;核因子- $\kappa$ B;CD44v6;CK20

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.20.007

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)20-1995-02

Expressions of CK20 mRNA, CD44v6, NF- $\kappa$ B in the 78 cases of esophageal carcinoma

Li Bin, Li Jingsong, Yuan Ning

(Department of Health Examination Center, the Third People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400014, China)

**Abstract: Objective** To detect the expressions of CK20 mRNA, CD44v6, NF- $\kappa$ B in the blood or tissues of 78 cases esophageal carcinoma and the clinical meanings. **Methods** The expressions of CK20 mRNA in blood and CD44v6, NF- $\kappa$ B in tissue in 78 cases esophageal carcinoma were examined with immunohistochemical technique. **Results** Positive rates of the expression of CK20 mRNA in blood with esophageal carcinoma was 72%, and 30.7%, 55%, 92%, 100% respectively in TNM I, II, III, IV. Positive of the expression of CD44v6 in the tissue of esophageal carcinoma was 59%, while the rate of the NF- $\kappa$ B expression was 76.9%. There was significant difference between the expression of NF- $\kappa$ B and the lymphatic metastasis. **Conclusion** The expression of the CK20 mRNA and CD44v6 in esophageal carcinoma is correlated with blood metastasis, and the expression of the NF- $\kappa$ B is correlated with lymphatic metastasis.

**Key words:** esophageal neoplasms; immunohistochemistry; NF- $\kappa$ B; CD44v6; CK20

食管癌是中国常见的恶性肿瘤之一,其发生于食管黏膜上皮的基底细胞,绝大多数是鳞状上皮癌(95%),发生部位以中段最多,其次是下段,发生在上段最少。由于食管的黏膜下层的血管和淋巴比较丰富,故易发生转移。其治疗方法以手术为主,结合放、化疗的综合治疗。下段的食管癌切除率高,手术死亡率最低,远期疗效好,最适宜外科治疗。而中、上段食管癌切除率低,远期生存率低,因肿瘤易侵犯相邻的器官和组织,须结合相应的放、化疗。恶性肿瘤在就医时是否已经发生了血行方面的转移和淋巴转移是临床医生很需要关心的难题。在权衡是否需要相应的放化疗时,还缺乏相应的客观指标。本研究就食管癌血行及淋巴转移的相关指标进行检测,以期对临床治疗的选择提供可靠依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择重庆市第三人民医院住院部 2005 年 7 月至 2007 年 7 月住院的食管癌手术患者 78 例,其中男 45 例,女 33 例。年龄 24~79 岁,平均 53 岁。所有病例术前均无放、化疗及免疫治疗史。病理学组织证实为食管癌,其中高分化鳞癌 23 例,中分化鳞癌 37 例,低分化和黏液腺癌 18 例。根据国际癌症联合防治会(UICC)食管鳞癌国际临床病理分期(TNM)标准(1997):I 期 13 例,II 期 30 例,III 期 25 例,IV 期 10 例。对照组为 25 例,男 17 例,女 8 例。平均年龄为 35.2 岁,皆为同期住院患者,其中反流性食管炎 15 例,食管憩室 10 例。

## 1.2 检测项目及方法

**1.2.1 食管癌及良性对照组织中 CD44v6、核因子- $\kappa$ B(NF-**

$\kappa$ B)表达检测

标本 10%甲醛固定,石蜡包埋,5  $\mu$ m 厚度连续切片,分别行 CD44v6、NF- $\kappa$ B 免疫组织化学染色,常规脱蜡,水化,1%过氧化氢甲醇封闭内源性过氧化物酶 30 min,分别加入一抗,4  $^{\circ}$ C 过夜,二抗,室温孵育 10 min,三抗,室温孵育 10 min,上述各步间均用磷酸盐缓冲液(PBS)振洗 3 次,DAB 显色,苏木素复染,常规脱水、透明、封片。

NF- $\kappa$ B 用免疫组织化学即通用二步法对食管癌及正常食管黏膜组织作 NF- $\kappa$ B 染色。抗体的稀释浓度均为 1:200,具体操作步骤参照试剂使用说明书。所有石蜡标本连续切片 3 张,片厚 4  $\mu$ m,1 张作 HE 染色,2 张作免疫组织化学染色。切片采用高压修复抗原 2 min,一抗 4  $^{\circ}$ C 冰箱过夜,DAB 显色,苏木素复染。NF- $\kappa$ B 则采用 SP 方法。

**1.2.2 血液标本 CK20 mRNA 的检测**<sup>[1]</sup> 于淋巴细胞分离液中经 Ficoll 梯度离心(2 000 r/min)20 min,吸取淋巴细胞分离液表面的白膜层,用 PBS 液进行反复冲洗 3 遍并再次离心,沉淀细胞提取总 mRNA,用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)一步法扩增,去核酶水代替 CK20 mRNA 上下游引物作阴性对照,PCR 循环参数 94  $^{\circ}$ C 30 s,55  $^{\circ}$ C 1 min,72  $^{\circ}$ C 2 min,共 35 个循环。扩增产物同 marker 行 2%琼脂糖凝胶电泳,溴乙啶染色,紫外光下照相记录。

**1.3 结果判断** 免疫组化部分由 2 人分别在显微镜下观察标本,然后复核观察结果。SP 免疫组化染色阳性为棕黄色。CD44v6 定位于胞膜及胞质;参照 Garcia 的判断方法确定阳性反应细胞。0 级为无染色;1 级为局部浅棕黄色;2 级为深棕黄色小于 25%或浅棕黄色着色小于 80%;3 级为深棕黄色着色

25%~50%,或浅棕黄色着色大于 80%;4 级为深棕黄色着色大于 50%。

大于 2 级为阳性,小于 2 级为阴性。RT-PCR 部分电泳条带分析位于 370 碱基处有清晰明亮条带者为阳性,无此条带者为阴性。

NF- $\kappa$ B 定位于胞质和胞核。随机计数 10 个高倍视野,统计阳性细胞数及观察显色度。阳性细胞数小于 10%为 0 分,在 10%~25%者 1 分,26%~75%为 2 分,大于 75%为 3 分;显色度评分:不着色为 0 分,浅黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;两者乘积,0 分为阴性(-),1~2 分为弱阳性(+),3~4 分为阳性(++),5~6 分为强阳性(+++).

**1.4 统计学处理** 采用 Excel 软件,采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 食管癌血液 CK20 mRNA 检查结果** 其阳性率为 72% (49/78),对照组 25 例,均为阴性。两组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。TNM I、II、III、IV 期的表达阳性率分别为 30.7%、55%、92%、100%。I 期和 II 期,III 期和 IV 期间比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

**2.2 食管癌组织 CD44v6 检查结果** 阳性表达率为 59% (46/78),对照组阳性率为 12% (3/25)。两组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。I、II、III、IV 期的阳性率分别为 28% (5/18)、24% (6/25)、100% (25/25)、100% (10/10)。与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),其中 III 期和 IV 期均高于 I 期和 II 期。CD44v6 在食管癌患者血液阳性组和阴性组的阳性表达率为 81.6% (40/49) 和 31% (9/29),二者比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.3 NF- $\kappa$ B p65 蛋白检查结果** 78 例食管癌组织中,有 60 例 NF- $\kappa$ Bp65 蛋白表达阳性,阳性率 76.9% (表 1)。有淋巴结转移的判定:以手术清扫食管周围的淋巴结的病理检查来证实。

表 1 食管癌组织中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达

与淋巴结转移的关系	n	NF- $\kappa$ B p65		$\chi^2$	P
		+	-		
无	30	16	14	15.3	<0.01
有	48	44	4		

## 3 讨论

NF- $\kappa$ B 是一类与肿瘤的发生、发展、转移、浸润等密切相关的因子<sup>[2]</sup>。NF- $\kappa$ B 家族(又称 Rel 家族)包括五个成员:Rel(c-Rel)、RelA(即 p65)、RelB、NF- $\kappa$ BI(即 p50)、NF- $\kappa$ B2(即 p52)。NF- $\kappa$ B 通常会以 p50/p65 的形式和 I $\kappa$ B 形成三聚体复合物,存在于静息细胞的细胞质中,在激活过程中被磷酸化并降解为具有活性的 NF- $\kappa$ B 二聚体复合物,存在于细胞核中。近年来先后有 NF- $\kappa$ B 在多种肿瘤组织中表达的报道,如乳腺肿瘤、肺肿瘤、胰腺肿瘤、大肠肿瘤等。目前有研究表明在食管鳞癌细胞株 Eca109 和 Ec9706 中存在有经典的 NF- $\kappa$ B 信号传导通路的异常激活,在食管鳞癌细胞株 Ec9706 及 Eca109 中存在 p50、p65、I $\kappa$ B $\alpha$  及其上游激酶 IKK $\beta$  的表达,并且 p50/p65 在细胞核中具有较高的 DNA 结合活性。且 NF- $\kappa$ B p65 的表达或活化与肿瘤的发生、浸润、转移及组织学分级有关<sup>[3]</sup>。

李道明和李珊珊<sup>[4]</sup>通过对食管癌组织中的 p65 和 p50 表达的研究表明,p65 在轻度、重度不典型增生、原位癌、浸润癌组织中表达差异有统计学意义,与食管癌的发生、发展有关。

本研究结果发现在食管癌组织中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白呈高表达状态,阳性表达率为 76.9%,且部分细胞核中也有 NF- $\kappa$ B 的表达,而在正常食管组织中仅有 1 例表现出阳性,本研究还发现 NF- $\kappa$ B p65 蛋白在食管癌组织中的表达与病理组织分型、淋巴结转移有关,提示 NF- $\kappa$ B 在食管癌发生、发展中起重要作用。NF- $\kappa$ B 有可能成为食管癌检测的重要指标和最敏感的标志物之一。

CD44v6 分子是一种多种细胞均可表达的跨膜糖蛋白,多数研究表明,CD44 基因的表达与肿瘤转移具有显著相关性。CD44 基因被认为是肿瘤转移的促进因素,其中 CD44v 起到很重要的作用<sup>[5]</sup>。笔者对 78 例食管癌的研究中也得到了类似结论。CD44v6 在血液阳性组和阴性组的阳性表达率分别为 81.6% (40/49) 和 31% (9/29)。前者显著高于后者 ( $P < 0.01$ ),提示 CD44v6 高表达容易发生血行转移。

本研究所采用的肿瘤标志物 CK20,采用了 RT-PCR 方法,具有较高敏感性,可检测出较低浓度的肿瘤细胞。CK20 在严格意义上来说是具有很强的表皮特异分布,正常血液不表达 CK20。尤其适用于微量肿瘤细胞的检测。表明随着肿瘤的发生、发展,外周血微转移明显增加。骆成玉和李世拥<sup>[6]</sup>通过对大肠癌的研究发现,门静脉血的微转移率高达 75.9%。本研究还证实,即使是在 DucksA A 期患者,外周血微转移率已经高达 30.7%,说明在肿瘤早期就可能累及全身,可能与食管周围较丰富的血循环和淋巴循环有关,在临床上提示有部分患者在 TNM I 期时也需要化疗。

食管癌的发生、发展是多种基因协同作用的结果,在致癌因素的作用下,癌基因活化和抑癌基因突变、失活,使细胞增殖、分化失控而导致癌变。现在肿瘤不单单是单一的手术治疗,常常需要放、化疗等综合治疗。由于食管癌不易早期诊断,临床上经常可遇见处于食管癌晚期的患者,通过对本研究的结果分析,检测外周血中的 CK20 mRNA 和肿瘤组织中的 CD44v6、NF- $\kappa$ B 的表达,对肿瘤的血行转移和淋巴结转移做出相应的评估,选择适当的放疗或化疗,利于肿瘤的综合治疗的开展。

## 参考文献:

- [1] 郭君其. 大肠癌微转移的研究现状及进展[J]. 国外医学肿瘤学分册,1997,24(5):281-283.
- [2] Wang W, Luo HS, Yu BP. Expression of NF- $\kappa$ B and human telomerase reverse transcriptase in gastric cancer and precancerous lesions[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(2):177-181.
- [3] Datta YH, Adams PT, Drobyki WR, et al. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction[J]. J Clin Oncol, 1994, 12(6):475-479.
- [4] 李道明,李珊珊. 食道鳞癌组织中核转录因子 kBp65、p50 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报,2005,40(1):28-31.
- [5] 李珊珊. 信号传导通路与食道癌[J]. 中华病理学杂志,2007,36(6):366-369.
- [6] 骆成玉,李世拥. 大肠癌患者门静脉血癌细胞的检测及临床意义[J]. 中华外科杂志,1999,37(4):733-735.