

· 基础研究 ·

## 核转录因子- $\kappa$ Bp65 在中耳胆脂瘤 上皮中的表达和意义

刘 伟,殷团芳,任基浩,李俐华

(中南大学湘雅二医院耳鼻咽喉头颈外科,湖南长沙 410011)

**摘 要:** **目的** 检测核转录因子- $\kappa$ Bp65 (nuclear factor kappa Bp65, NF- $\kappa$ Bp65) 在中耳胆脂瘤上皮中的表达和活化,探讨其在中耳胆脂瘤发病机制中的可能作用。**方法** 采用免疫组织化学 SP 法检测 30 例中耳胆脂瘤组织标本与 15 例正常外耳道皮肤标本中 NF- $\kappa$ Bp65 蛋白的表达。**结果** NF- $\kappa$ Bp65 蛋白阳性表达定位于上皮细胞核。NF- $\kappa$ Bp65 蛋白在中耳胆脂瘤上皮组织中阳性表达率为 63.3%,明显高于正常外耳道皮肤组的 20.0% ( $P < 0.01$ )。**结论** NF- $\kappa$ Bp65 蛋白在中耳胆脂瘤上皮的异常表达可能在胆脂瘤的发生、发展过程中起重要作用。胆脂瘤上皮中 NF- $\kappa$ Bp65 的活化可能参与了胆脂瘤上皮细胞过度增殖机制。

**关 键 词:** 胆脂瘤;中耳;核转录因子- $\kappa$ Bp65;免疫组织化学

中图分类号:R764.2

文献标识码:A

文章编号:1007-1520(2010)01-0021-05

## Expression of nuclear factor- $\kappa$ Bp65 in human middle ear cholesteatoma epithelium and its significance

LIU Wei, YIN Tuan-fang, REN Ji-hao, et al.

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

**Abstract:** **Objective** To determine the expression and activation of nuclear factor kappa Bp65 (NF- $\kappa$ Bp65) protein in human middle ear cholesteatoma epithelium, and to explore its possible role in the pathogenesis of middle ear cholesteatoma. **Methods** SP immunohistochemical assay was used for detecting the expression of NF- $\kappa$ Bp65 protein in 30 specimens of human middle ear cholesteatoma epithelium and 15 specimens of normal skin from the external ear canal. **Results** NF- $\kappa$ Bp65 immunoreactivity was detected in the nuclei of epithelial cells. The positive expression rate of NF- $\kappa$ Bp65 protein in middle ear cholesteatoma epithelium was 63.3% (19/30), while that in normal skin specimens was 20.0% (3/15). The difference between them was significant ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The abnormal expression of NF- $\kappa$ Bp65 in middle ear cholesteatoma epithelium indicates its important role in the formation and development of cholesteatoma. The activation of NF- $\kappa$ Bp65 might be an important factor involved in the hyperproliferation of cholesteatoma epithelium.

**Key words:** Cholesteatoma; Middle ear; Nuclear factor- $\kappa$ Bp65 (NF- $\kappa$ Bp65); Immunohistochemistry

中耳胆脂瘤 (middle ear cholesteatoma)

是耳科常见疾病,其主要病理生理特征表现为中耳腔内存在大量高度增生的角化鳞状上皮以及对周围骨质的破坏,其中胆脂瘤上

皮细胞的高度增殖是该病的重要特征。本病发病机制尚不明确,目前公认其是一种慢性炎症疾病,且越来越多研究表明多种炎症因子在胆脂瘤发生和发展中起到重要作用,如 EGF(表皮生长因子)<sup>[1]</sup>、TGF(转化生长因子)<sup>[2]</sup> 和白细胞介素<sup>[3]</sup> 等。核转录因子- $\kappa$ B(nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B)是介导细胞内信号传递最重要的核转录因子,它能与调控炎症反应、免疫应答和细胞增殖等过程中的诸多细胞因子的基因启动子或增强子特异性结合,从而启动并调节这些基因转录和表达,在促进细胞增殖的作用机制中具有核心调节作用。本文应用免疫组织化学 SP 法检测 NF- $\kappa$ Bp65 在中耳胆脂瘤上皮中的表达和激活情况,并探讨其在胆脂瘤发生、发展过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本 收集 2007 年 8 月~2008 年 10 月在中南大学湘雅二医院耳鼻喉头颈外科手术的胆脂瘤型中耳炎标本 30 例。为了配合研究主题,研究炎症相关因子在胆脂瘤形成中的可能作用机制,我们选取的病例临床均诊断为后天继发性胆脂瘤(即中耳腔内长期慢性炎症继发形成胆脂瘤),鼓膜均为紧张部穿孔,其中男 17 例,女 13 例;年龄 17~56 岁,平均 35.7 岁,左耳 19 例,右耳 11 例,听骨链无破坏者 7 例,破坏 1 个者 6 例,破坏 2 个者 12 例,破坏 3 个者 5 例,复发者 3 例。同时收集术耳外耳道皮肤 15 例作为对照组。标本于中耳手术中取出后立即用 10% 甲醛固定。常规石蜡包埋,作 4  $\mu$ m 厚的连续切片,以备免疫组化应用,且每块组织的连续切片中,均取一张留做 HE 染色对照。30 例胆脂瘤组织标本镜下 HE 染色观察均具有胆脂瘤的 3 个基本特征:囊内容物(上皮角化碎屑、胆固醇结晶等)、上皮组织及上皮结缔组织(图 1)。15 例对照组外耳道皮肤标本经石蜡包埋切片后,行 HE 染色,镜下观察均为正常外耳道鳞状上皮(图 2)。

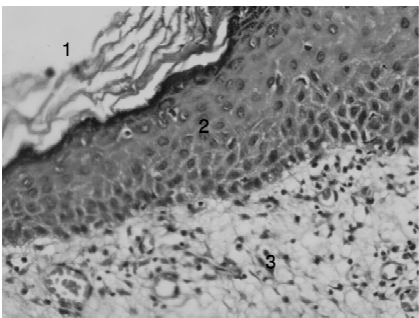


图 1 中耳胆脂瘤组织(HE 染色,  $\times 400$ )  
(1. 囊内容物;2. 上皮组织;3. 上皮结缔组织)

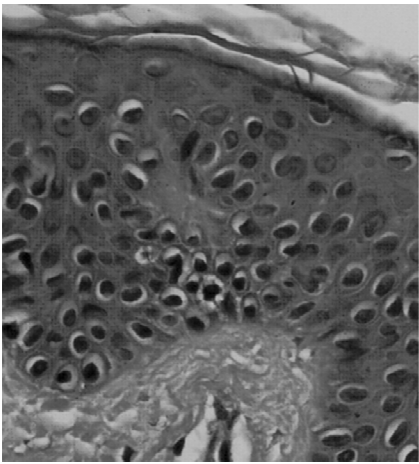


图 2 正常外耳道皮肤组织(HE 染色,  $\times 400$ )

1.1.2 主要试剂 鼠抗人 NF- $\kappa$ Bp65 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,过氧化物酶标记的链霉卵白素标记盒(即用型 SP 免疫组织化学试剂盒)、DAB 显色剂均购自北京中杉金桥生物科技公司。

1.2 方法

采用免疫组化 SP 法对实验标本分批染色,严格按照 SP 试剂盒说明书操作,步骤如下:二甲苯脱蜡、梯度酒精水化。3% 过氧化氢去离子水孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。高压修复法行抗原修复,冷却后 PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。滴加试剂 A(封闭用正常山羊血清工作液)室温孵育 10 min,倾去,勿洗。滴加一抗(预实验选定 NF- $\kappa$ Bp65 工作浓度为 1:200),4℃ 冰箱内过夜。PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。滴加试剂 B(生物素化二抗工作液),室温孵育 10~15 min, PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。滴加试剂 C(辣根酶标记链霉卵白

素工作液),室温孵育10~15 min,PBS冲洗3次,每次3 min。滴加新鲜配制的DAB溶液显色,显微镜下观察以适度为止。自来水冲洗,苏木素复染。梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

上述步骤中用已知阳性片作为阳性对照,用PBS缓冲液代替一抗作为阴性对照,以排除非特异性着色。

1.3 结果判定

1.3.1 组织分层 采用Schulz等<sup>[4]</sup>的方法将胆脂瘤上皮和正常外耳道皮肤上皮层分为基底层(basal layer)、基底上细胞层(suprabasal layer)、表层即角质层(upper layer/straum corneum)。其中,基底上细胞层包括棘层(spinous layer)和颗粒层(granular layer)。

1.3.2 免疫组化实验结果判定 NF-κBp65染色以细胞核着棕黄色者为阳性细胞。每张切片在400倍显微镜下随机选取5个不重叠视野进行阳性细胞计数,每个视野计数100个细胞,计算5个视野的阳性细胞的平均百分数。阴性(-):阳性细胞数<10%;弱阳性表达(+):阳性细胞数≥10%~25%;中等阳性表达(++) :阳性细胞数≥26%~50%;强阳性表达(+++) :阳性细胞数>50%。

1.4 统计学分析

应用SPSS 16.0统计软件包对数据进行统计学处理,率的比较采用χ<sup>2</sup>检验(卡方检验),以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

NF-κBp65活化后定位于细胞核,故以细胞核着棕黄色者为阳性细胞。活化了的NF-κBp65在胆脂瘤上皮中定位于细胞核,30例中耳胆脂瘤组织标本中有19例上皮

细胞出现胞核着色为阳性表达,阳性率为63.3%,主要分布于胆脂瘤上皮基底层和基底上层(图3)。对照组15例外耳道皮肤组织中仅有3例阳性表达,为胞核着色,阳性率为20.0%,其余12例均为胞质着色,为阴性表达(图4)。中耳胆脂瘤上皮组织中NF-κBp65阳性表达率较正常外耳道皮肤组高,两组间比较差异具有统计学意义(P<0.01),见表1。

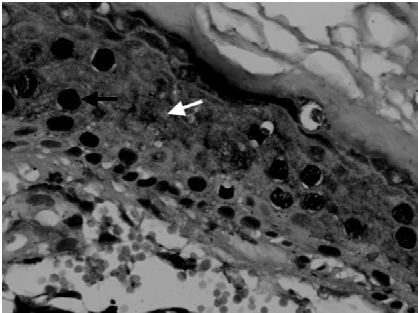


图3 NF-κBp65在中耳胆脂瘤上皮中的阳性表达,可见胞核(黑箭头所示)、胞质均着色(白箭头所示),以胞核着色为阳性细胞,主要分布于基底层和基底上层(SP染色,×400)

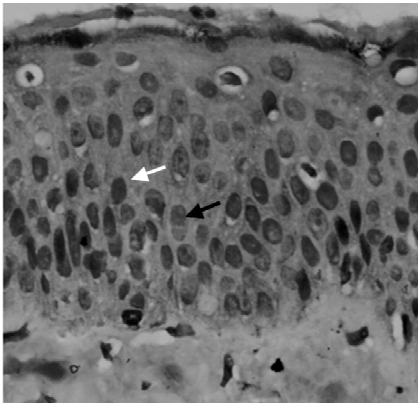


图4 NF-κBp65在正常外耳道皮肤中的阴性表达,可见胞核无着色(黑箭头所示),仅胞质着色(白箭头所示)(SP染色,×400)

表1 组间NF-κBp65蛋白表达情况的比较

组别	总例数(n)	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)	χ <sup>2</sup>	P
中耳胆脂瘤组	30	19	11	63.3	7.515	0.006
外耳道皮肤组	15	3	12	20.0		

### 3 讨论

NF- $\kappa$ B 是一种重要的多功能核转录因子,最先发现在 B 淋巴细胞中,其能与免疫球蛋白  $\kappa$  轻链基因增强子  $\kappa$ B 序列 (GGGACTTTCC) 特异结合,故称之为核因子- $\kappa$ B。它包括 c-Rel、NF- $\kappa$ B1 (P50/P105)、NF- $\kappa$ B2 (P52/P100)、RelA (P65)、RelB 5 个亚单位,亚单位间可形成同源或异源二聚体,在大部分细胞中,NF- $\kappa$ B 主要以 P50/P65 异源二聚体形式存在,而 P65 亚基是其主要的亚基。当细胞处于静息状态时,NF- $\kappa$ B 二聚体与其抑制蛋白 I- $\kappa$ B (inhibition  $\kappa$ B) 以非活性形式结合于胞质中;当细胞受到外界信号刺激时,I- $\kappa$ B 被迅速降解,NF- $\kappa$ B 得以释放而被激活,活化了的 NF- $\kappa$ B 在核定位信号作用下进入细胞核,启动靶基因转录<sup>[5]</sup>。作为信号传导途径中的枢纽,NF- $\kappa$ B 能与调控免疫应答、炎症反应、细胞分化和生长以及细胞凋亡等过程中所必需的诸多细胞因子、粘附分子等基因启动子或增强子部位的  $\kappa$ B 位点特异结合,从而启动和调节这些基因的转录与表达<sup>[6]</sup>。

NF- $\kappa$ B 广泛存在于机体各种组织细胞中,在炎症反应、氧化应激、细胞增生等过程中发挥核心作用,和多种疾病特别是炎症疾病的发病机制密切相关。我们研究发现,NF- $\kappa$ Bp65 在中耳胆脂瘤中的阳性表达率明显高于正常外耳道皮肤,前者阳性率为 63.3%,而后者仅为 20.0% ( $P < 0.01$ ),表明中耳胆脂瘤上皮细胞较正常外耳道上皮细胞出现了更为明显的 NF- $\kappa$ B 核转位,亦即 NF- $\kappa$ B 蛋白在中耳胆脂瘤上皮中存在异常表达和过度活化。据此,我们推测 NF- $\kappa$ B 可能在中耳胆脂瘤的发生和发展过程中发挥了重要作用。目前公认中耳胆脂瘤是一种慢性炎症疾病,且越来越多研究表明炎症因子在其发生和发展中起到重要作用,如 IL-1 (白细胞介素 1)<sup>[3]</sup> 和 TNF- $\alpha$  (肿瘤坏死因子  $\alpha$ )<sup>[7]</sup> 等,二者在胆脂瘤中的表达均显著增加。研究表明 IL-1 和 TNF- $\alpha$  是 NF- $\kappa$ B 的重要激活物,它

们通过激活 IKK (I- $\kappa$ B 激酶) 使 I- $\kappa$ B 快速磷酸化后降解,释放出的 NF- $\kappa$ B 发生核转位被激活。而活化了的 NF- $\kappa$ B 又能与调控炎症反应、免疫应答等过程中的诸多细胞因子的基因启动子或增强子特异性结合,启动并调节基因转录,进而促进这些炎症因子表达和释放;反过来,炎症因子又可进一步激活 NF- $\kappa$ B,使炎症不断加重。由此形成一个正反馈,使中耳胆脂瘤病变持续发展,逐渐扩展并累及邻近结构。

此外,NF- $\kappa$ B 核转位可能还参与了中耳胆脂瘤上皮细胞的过度增殖机制。上皮细胞过度增殖是中耳胆脂瘤的重要特征之一,反映细胞增殖状态的度量指标 PCNA (proliferation cell nuclear antigen,增殖细胞核抗原) 和 Ki-67 在胆脂瘤上皮中的表达均显著增加<sup>[8]</sup>。我们认为 NF- $\kappa$ B 的活化可能是中耳胆脂瘤上皮细胞过度增殖的重要机制。NF- $\kappa$ B 可启动靶基因 cyclinD1 (细胞周期素 D1) 转录,加速细胞从 G1 期向 S 期转化,从而促进胆脂瘤细胞增殖<sup>[9]</sup>。除了直接参与细胞周期与分化调控,NF- $\kappa$ B 还可通过抑制与细胞凋亡通路起始相关的 caspase-8 (天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶-8) 而发挥抗凋亡及促进胆脂瘤细胞增殖作用<sup>[10]</sup>。

目前有关 NF- $\kappa$ B 在中耳胆脂瘤上皮中的表达和活化研究尚不多,且存在争议。Miyao 等<sup>[11]</sup> 应用免疫组化法检测了 41 例胆脂瘤标本中 NF- $\kappa$ B 的表达,发现 NF- $\kappa$ B 在胆脂瘤上皮中的表达较对照组明显增加,但均为胞质着色,而少见胞核着色,他们认为胆脂瘤中 NF- $\kappa$ B 可能处于非激活状态,但似乎不好解释胆脂瘤上皮细胞的过度增殖与抗凋亡性。而本研究恰恰发现 NF- $\kappa$ Bp65 在中耳胆脂瘤上皮细胞核中显著着色,主要定位于上皮基底层和基底上细胞层,与对照组相比不仅范围广,表达水平也显著增高,并且从这个角度可以更好地解释为什么中耳胆脂瘤炎症病变持续发展以及胆脂瘤上皮细胞的过度增殖。

综上,NF- $\kappa$ Bp65 蛋白在中耳胆脂瘤上皮的异常表达与活化可能在胆脂瘤的发生、发展过程中起重要作用。我们认为 NF- $\kappa$ Bp65 的活化是中耳胆脂瘤炎症病变持

续发展及胆脂瘤上皮细胞过度增殖的重要机制之一。今后我们将深入研究 NF- $\kappa$ B 在中耳胆脂瘤中的确切作用机制,希望能够在 NF- $\kappa$ B 激活通路上的多个环节阻断其激活过程,从而控制胆脂瘤上皮增殖与炎症的发展,为临床提供一种阻止中耳胆脂瘤发生与发展的新途径。

#### 参考文献:

- [1] Kojima II, Shiwa M, Kamide Y, et al. Expression and localization of mRNA for epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in human cholesteatoma [J]. Acta Otolaryngol, 1994, 114(4): 423-429.
- [2] Ergün S, Zheng X, Carls B. Expression of transforming growth factor- $\alpha$  and epidermal growth factor receptor in middle ear cholesteatoma [J]. Am J Otol, 1996, 17(3): 393-396.
- [3] Aumente PO, Bujia J, Kim C, et al. A quantitative study of the presence of interleukin-1 and interleukin-6 in cholesteatoma of the middle ear [J]. Acta Otorrinolaringol Esp, 1996, 47(4): 259-262.
- [4] Schulz P, Bujia J, Holly A, et al. Possible autocrine growth stimulation of cholesteatoma epithelium by transforming growth factor  $\alpha$  [J]. Am J Otolaryngol,

1993, 14(2): 82-87.

- [5] Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity [J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18(4): 621-663.
- [6] 周永芹,韩莉. NF- $\kappa$ B 与肿瘤关系的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(5): 855-858.
- [7] 沈玲,葛文胜,王领台. 肿瘤坏死因子- $\alpha$  在中耳胆脂瘤中的定量表达及其在骨吸收中的作用 [J]. 中国医药导报, 2008, 5(9): 34-35.
- [8] Olszewska E, Chodynicky S, Chyczewski L, et al. Some markers of proliferative activity in cholesteatoma epithelium in adults [J]. Med Sci Monit, 2006, 12(8): 337-340.
- [9] Hinze M, Krappmann D, Eichten A, et al. NF- $\kappa$ B function in growth control: regulation of cyclinD1 expression and G0/G1-to-S-phase transition [J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(4): 2690-2698.
- [10] Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, et al. NF- $\kappa$ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation [J]. Science, 1998, 281(5383): 1680-1683.
- [11] Miyao M, Shinoda II, Takahashi S. Caspase-3, Caspase-8, and nuclear factor- $\kappa$ B expression in human cholesteatoma [J]. Otol Neurotol, 2006, 27(1): 8-13.

(修回日期:2010-01-15)

## • 消息 •

### 2010(上海)鼻创伤和畸形的功能与形态重建学习班通知

2010年5月,美丽的黄浦江畔将迎来举世瞩目的世博会,毗邻会场,上海交通大学医学院附属第九人民医院耳鼻喉科也准备了一个精彩丰富的学习班。依托九院颌面部整形修复的特色,我科在鼻面部外伤畸形的临床治疗方面做了很多工作并成功地举办了多期国家级继续教育学习班和研讨会,使学员了解到最新的治疗方法和进展,分享和探讨鼻面部畸形矫治方面的经验。

我科将于2010年5月21~25日在上海举办“鼻创伤和畸形的功能与形态重建”继续教育学习班,(学习班代码:20100701040,30个学时,授予国家级Ⅰ类学分10分。)学习班将邀请多位具有丰富鼻面部外伤整形经验的专家教授参与。讲课内容将涵盖国内外最新的鼻外伤和外伤后畸形的治疗专题讲座,并有精彩翔实的手术录像讲解。部分课程如下(鼻面部美容手术解剖学,鼻面部骨折及组织缺损的急诊处理和鼻面部畸形的手术研究)。

欢迎国内耳鼻喉科和整形外科同行参加,初定名额30人,学费800元。另有尸头解剖训练,学费1500元,拟招10人,每人一具,名额有限,欢迎来函报名,我们会发报到通知函,凭报到通知函报到。

因恰逢世博会举办期间,酒店客房须预定,故请报名者预付200元。

联系地址:上海市制造局路639号第九人民医院耳鼻喉科病房,邮编:200011

联系人:汪涛、叶灵茶,联系电话:021-23271699-5145

电子信箱:ent9h@yahoo.cn,请来函或者 Email 索取报名表。

上海交通大学医学院附属第九人民医院耳鼻喉科

2010年1月