

文章编号:1005-6947(2005)11-0860-03

· 简要论著 ·

细胞核转录因子 κ B 在慢性胰腺炎组织中表达的研究

张国伟, 周杰, 廖彩仙, 林艺雄

(南方医科大学南方医院 肝胆血管外科, 广东 广州 510515)

摘要:为探讨细胞核转录因子 κ B (NF- κ B) 在慢性胰腺炎抗凋亡机制中的作用。笔者将慢性胰腺炎组织以及正常人胰腺组织各 20 例, 采用免疫组织化学方法检测其 NF- κ B 的表达, 并采用原位标记法检测细胞凋亡。结果示慢性胰腺炎细胞凋亡指数高于对照组 ($P < 0.05$)。慢性胰腺炎组 NF κ Bp65 阴性细胞数低于对照组 ($P < 0.05$)。提示慢性胰腺炎腺泡细胞凋亡与 NF κ B 的活性降低有关。

关键词: 胰腺炎; NF- κ B

中图分类号: R657.51

文献标识码: B

目前对慢性胰腺炎的发病机制尚无明确结论, 治疗也很棘手。其与急性胰腺炎差别在于, 该病主要以腺泡细胞的萎缩和腺泡结构被纤维组织替代为特征。目前认为细胞凋亡是腺泡细胞死亡的主要方式之一, 其中核转录因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 在炎症细胞中的激活可能是其抗凋亡的主要途径之一。越来越多的研究表明 NF- κ B 是一种介导细胞内信号传递的重要转录因子, 它可以被许多刺激剂激活引起大量炎性介质的释放。1996 年自 Antwerp^[1] 发现 NF- κ B 能抑制由肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 诱导的细胞凋亡以来, 这方面的研究正不断地深入。笔者采用免疫组织化学方法 (免疫组化) 检测其 NF- κ B, 采用原位末端标记法检测慢性胰腺炎和正常胰腺组织中的细胞凋亡, 旨在探讨 NF- κ B 在慢性胰腺炎凋亡发生机制中的作用。

1 资料和方法

1.1 病例资料来源

40 例标本中, 慢性胰腺炎 20 例, 正常胰腺组织 20 例 (壶腹部肿瘤中正常组织)。25 例来自手术所

取新鲜标本, 15 例来自本院病理科。慢性胰腺炎组男 16 例, 女 4 例, 平均年龄 49.8 岁。正常胰腺组男 15 例, 女 5 例, 平均年龄 50.9 岁。所有病例均经病理诊断。

1.2 标本制备

手术标本迅速保存在低温冰箱 (-40°C), 经 10% 福尔马林液固定 24h 后, 沿胰腺横断面切取大小为 $0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm} \times 0.2\text{cm}$ 胰腺组织, 经脱水、透明、浸蜡后石蜡包埋。新鲜及陈旧标本用轮转式切片机对蜡块进行连续切片, 片厚 $4\mu\text{m}$ 。取组织片置于经氨丙基三氧基硅烷 (APES) 预处理的载玻片上, 置 60°C 烤箱中烤 3h 备用。新鲜及陈旧标本 HE 染色方法相同。

1.3 细胞凋亡的检测

采用武汉博士德生物工程有限公司细胞凋亡检测试剂盒。切片脱蜡、水化 (3 个二甲苯, 3 个无水乙醇, 均无梯度) \rightarrow 新鲜配制的 3% H_2O_2 室温灭活 10min, 水洗 3 次, 每次 5min \rightarrow 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液修复抗原 \rightarrow 切片标本置于湿盒内, 加入 proteinase K 消化 10min \rightarrow 滴加 TdT 和 DIG-d-UTP 标记液, 置入湿盒中, 37°C 标记 2h \rightarrow TBS 冲洗 3 次, 每次 5min \rightarrow 加入封闭液, 室温 30min, 甩掉封闭液, 不洗 \rightarrow 加入生物素化地高辛抗体, 置入湿盒中, 37°C 反应 30min \rightarrow 三苄基硅 (TBS) 冲洗 3 次, 每次 5min \rightarrow 每张切片加 1 滴链霉亲和素-生物素-过

收稿日期:2005-04-12; 修订日期:2005-11-01。

作者简介:张国伟 (1977-), 男, 河南焦作人, 南方医科大学南方医院硕士研究生, 主要从事 NF- κ B 在胰腺疾病中的作用机制方面的研究。

通讯作者:张国伟 电话 020-61641888-87180(0), 13352828400(手机); E-mail: guoweizhang77@hotmail.com。

氧化物酶复合物(SABC), 37℃ 60min → TBS 冲洗4次, 每次5min → DAB 显色液, 室温显色, 镜下控制 → 苏木精轻度复染, 水洗, 返蓝, 37℃ 烘干, 封片。HE 染色后各组胰腺组织中典型的细胞细胞凋亡形

态学变化为: 细胞核固缩, 染色质凝集, 核破裂及凋亡小体形成等(图1, 2)。光镜下计数4个高倍视野凋亡细胞数和总细胞数, 凋亡指数(apoptotic index, AI) = 凋亡细胞数/总细胞数 × 100%。

图1 正常胰腺组织细胞凋亡免疫组化(×20)

1.4 NF- κ B 的检测

采用 DAKO 公司的 NF- κ Bp65 抗体(sc-8088) 和羊抗兔 IgG。采用二步法, 切片脱蜡、水化(3个二甲苯, 3个无水乙醇, 均无梯度) → 新鲜配制的3% H₂O₂ 室温灭活10min, 水洗3次, 每次5min → 微波修复抗原 → 切片标本置于湿盒内, 山羊血清封闭液, 室温孵育20min → 甩去多余液体, 不洗, 滴加 NF- κ Bp65 抗体(1:400 稀释), 37℃ 30min → TBS 冲洗3次, 每次5min → 加1滴生物素化羊抗兔 IgG, 37℃ 20min → TBS 冲洗3次, 每次5min → 每张切片

图2 慢性胰腺炎组织细胞凋亡免疫组化(×20)

加一滴 SABC 37℃ 20min → TBS 冲洗4次, 每次5min → DAB 显色液, 室温显色, 镜下控制 → 苏木精轻度复染, 水洗, 返蓝, 37℃ 烘干, 封片。阴性对照: TBS 代替一抗。阳性对照: 人乳腺导管细胞癌切片(试剂盒自备)。结果判断: 胰腺腺泡细胞胞浆或胞膜被染色呈棕黄色为阳性细胞。计算每个20倍镜下平均横切面中100个胰腺腺泡细胞 NF- κ Bp65 阳性细胞数(共取10个视野, 求取平均数), 结果以百分数表示(图3, 4)。

图3 正常胰腺组织 NF- κ B 免疫组化(×20)

1.5 统计学处理

采用 SPSS10.0 进行方差齐性检验、单因素方差分析比较。

图4 慢性胰腺炎组织 NF- κ B 免疫组化(×20)

2 结果

免疫组化结果显示: 慢性胰腺炎细胞凋亡指数高于对照组, 两组差异有显著性($P < 0.05$) (表

1)。慢性胰腺炎组 NF- κ Bp65 阳性细胞数低于对照组,差异有显著性 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 1 胰腺组织细胞凋亡免疫组化检测阳性单位比较表 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞凋亡指数	P 值
慢性胰腺炎	20	0.43% \pm 0.09%	<0.05
对照	20	0.21% \pm 0.07%	

表 2 胰腺组织 NF- κ Bp65 蛋白免疫组化检测值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NF- κ Bp65 阳性细胞数	P 值
慢性胰腺炎	20	3.44% \pm 0.33%	<0.05
对照	20	12.03% \pm 1.27%	

3 讨论

NF- κ B 广泛存在于真核生物中,是一个由复杂的多肽亚单位组成的蛋白家族。作为信号传导途径中的枢纽,它与免疫、肿瘤的发生、发展,细胞凋亡的调节以及胚胎发育等重要事件有着密切联系,是一种重要的核转录因子。细胞死亡存在两种方式即坏死和凋亡。细胞凋亡 (apoptosis) 是机体生长发育、细胞分化和病理状态中细胞自主性死亡的过程。与急性胰腺炎不同,慢性胰腺炎主要以腺泡细胞的萎缩与腺泡结构被纤维组织替代为特征。目前认为细胞凋亡是腺泡细胞死亡的主要原因之一。众所周知, TNF- α 与肿瘤坏死因子受体 (TNFR1) 结合后可通过信号转导途径诱导细胞凋亡,但同时通过另一条信号转导途径激活与细胞存活相关的基因 NF- κ B,而 NF- κ B 抑制 TNF- α 诱导的细胞凋亡,其有关 NF- κ B 抑制 TNF- α 诱导的细胞凋亡机制直到最近才阐明。TNF- α 在诱导细胞凋亡的同时通过活化 NF- κ B 建立细胞的快速防御机制,在凋亡启动阶段即已阻断死亡信号的传递。NF- κ B 可激活 TNFR 相关因子 TRAF1, TRAF2, c-IAP (inhibitor-of-apoptosis) 和 IAP2。这些

基因产物可相互协同在早期抑制 TNF- α 诱导的细胞凋亡;同时 NF- κ B 对重要的凋亡相关分子 caspase8 有直接阻断作用,而由此抑制一系列 caspase 的活化。这也是其抗细胞凋亡的重要机制^[2]。IL-6, IL-8 介导的细胞凋亡被认为与急慢性胰腺炎密切相关。Blanchard^[3] 等通过用抗氧化剂抑制 NF- κ B 的活性,减少上述因子的表达,可明显减轻胰腺急慢性炎症的程度。慢性胰管阻塞的小鼠,喂饲乙硫氨酸后可出现腺泡细胞凋亡及腺体萎缩。在喂饲乙醇及低蛋白饮食的啮齿动物的胰腺组织中亦可见腺泡细胞的凋亡,后者与人类的慢性胰腺炎极相似。从上述实验可见,慢性胰腺炎腺泡细胞凋亡指数升高, NF- κ B 阳性率随之显著降低。提示慢性胰腺炎腺泡细胞的死亡方式以凋亡为主。由于细胞凋亡往往不伴随剧烈的炎症反应,这也可以解释为何慢性胰腺炎与急性胰腺炎有着截然不同的临床特征。本实验结果也提示在慢性胰腺炎中,凋亡指数升高与 NF- κ B 因子活性下调有关。

从本实验的观察中可以看出, NF- κ B 在慢性胰腺炎的发生、发展中起了重要作用。如果设计出合理的抑制 NF- κ B 的因子,可望在治疗慢性胰腺炎、癌症或各种炎性疾病方面产生巨大的影响。

参考文献:

- [1] Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, *et al.* Suppression of TNF- α induced apoptosis by NF- κ B [J]. *Science*, 1996, 274(5288):787-789.
- [2] Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, *et al.* NF- κ B anti-apoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP-2 to suppress caspase-8 activation [J]. *Science*, 1998, 281(5283):1680-1683.
- [3] Blanchard JA 2nd, Brave S, Joshi-Brave S, *et al.* Antioxidants inhibit cytokine production and suppress NF- κ B activation in CAPAN-1 and CAPAN-2 cell lines [J]. *Dig Dis Sci*, 2001, 46(12):2768-2772.