

TLR4 和 NF- κ B 在肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌中的表达及临床意义

陈佳¹, 余宏铸¹, 王正林¹, 张晓亮²

摘要 目的 探讨 Toll 样受体 4 (TLR4) 和核因子 κ B (NF- κ B) 在肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌组织中的表达及其临床意义。方法 收集 110 例胆管病理组织蜡块, 包括 40 例肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌组织、40 例肝内胆管结石旁胆管组织和 30 例正常肝内胆管组织 (肝血管瘤旁正常胆管组织或者肝外伤后切除肝组织的正常胆管组织), 采用免疫组织化学 (PV) 法检测各组织中 TLR4 和 NF- κ B 的表达情况并分析结果。结果 肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌组织中的 TLR4 和 NF- κ B 表达量明显高于肝内胆管结石旁胆管组织和正常肝内胆管组织 ($P < 0.05$)。在肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌组织中 TLR4 和 NF- κ B 的表达呈正相关 ($r = 0.709$)。TLR4 和 NF- κ B 的表达与患者的性别、年龄、肿瘤分化程度及淋巴结转移的组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 TLR4 和 NF- κ B 的表达与肝内胆管结石到肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌的逐步发展具有密切相关性, 且两者表达呈正相关。

关键词 胆管细胞癌; TLR4; NF- κ B; 肝内胆管结石
中图分类号 R 735.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0625-04

肝内胆管细胞癌是来自于肝内胆管上皮细胞的恶性肿瘤。有研究^[1]表明, 肝内胆管结石与肝内胆管细胞癌的发生具有密切关系, 但是由于在临床上缺乏特异性的症状、体征以及检查依据, 以至于肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌的早期诊断一直较困难。脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS)-Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)-核因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 信号转导通路是目前发现的重要的炎性通路之一, 已有研究^[2]表明 NF- κ B 在肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌组织中呈现过度表达, 但是没有文献报道 TLR4 在肝内胆管结石相关

的肝内胆管细胞癌中的表达情况以及 TLR4 和 NF- κ B 的相关性分析。该研究通过免疫组织化学 (PV) 法检测 TLR4 和 NF- κ B 在肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌组织、肝内胆管结石旁胆管组织和正常肝内胆管组织 (肝血管瘤旁正常胆管组织或者肝外伤后切除肝组织的正常胆管组织) 中的表达情况, 并分析其相关性与临床意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集安徽医科大学第一附属医院病理科 2003 年 1 月 ~ 2013 年 1 月与本课题相关的 110 例肝内胆管组织蜡块标本, 分为 3 组: I 组为 40 例肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌组织; II 组为 40 例肝内胆管结石旁胆管组织; III 组为 30 例正常肝内胆管组织 (肝血管瘤旁正常胆管组织或者肝外伤后切除肝组织的正常胆管组织)。I 组在术前未接受过任何放疗、化疗和抗炎治疗。

1.2 方法

1.2.1 石蜡切片 将病理科切取的石蜡切片放置于 98 °C 烤片机中 20 min, 经二甲苯两次脱蜡, 再经由高到低的 3 种梯度乙醇水化, 蒸馏水冲洗后待用。

1.2.2 抗原微波修复及处理 将切片置于柠檬酸盐缓冲液中, 放于微波炉中加热 20 min, 取出冷却。3% H₂O₂ 去离子水室温下孵育 15 min, 以阻断内源性过氧化物酶, PBS 冲洗 3 min \times 3 次。滴加一抗 (TLR4 的一抗工作浓度为 1 : 120, NF- κ B 的一抗工作浓度为 1 : 100) 4 °C 冰箱过夜。第 2 天取出后置于 37 °C 温箱复温 40 min, PBS 冲洗 3 min \times 3 次。滴加通用型 IgG 抗体-HRP 多聚体, 37 °C 温箱孵育 20 min, PBS 冲洗 3 min \times 3 次。

1.2.3 显色和封片 应用 DAB 显色液显色, 约 5 min 后置于水中终止反应。蒸馏水冲洗、复染、脱水、透明封片。用 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照, 试剂商提供的阳性片作为阳性对照。

1.3 结果判定标准 采用荧光显微镜观察染色结果。其中 TLR4 表达于胆管细胞膜和 (或) 细胞质内, NF- κ B 表达于胆管细胞核和 (或) 细胞质内。染

2014-02-25 接收

基金项目: 2013 年安徽省年度重点科研项目 (编号: 1301043034)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院普通外科, 合肥 230022

²安徽医科大学病理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 陈佳, 男, 硕士研究生;

余宏铸, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hong-zhu.620929@aliyun.com

色结果判断采用半定量方法。首先根据染色强度打分:细胞无染色为0分,浅黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。再次根据阳性细胞所占细胞的百分比:阴性为0分,阳性细胞占总数≤10%为1分,11%~50%为2分,51%~75%为4分。依据染色强度和阳性百分比分值相乘结果分为4个等级:0~2分为“-”,3~4分为“+”,5~8分为“++”,9~12分为“+++”。≥3分则为阳性。

1.4 统计学处理 使用SPSS 21.0统计软件进行分析,采用 χ^2 检验检测组间差异以及P值,相关性分析则采用 χ^2 检验及其列联系数法分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 3组标本组织中的TLR4和NF- κ B表达水平比较 ① TLR4表达:镜下可见胆管细胞膜和(或)细胞质棕黄褐色均质和颗粒,肝细胞显示强阳性,见图1A1、B1、C1)。通过表1分析可得I组和II组比较,差异具有统计学意义($\chi^2 = 4.381, P < 0.05$);II组和III组比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.715, P < 0.05$);I组和III组比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 16.138, P < 0.01$);由上可知TLR4在3组中的表达强弱为I组 > II组 > III组,差异有统计学意义。② NF- κ B表达:镜下可见胆管细胞核和(或)细胞质棕黄褐色均质和颗粒,肝细胞显示强阳性,见图1A2、

B2、C2。通过表1分析可得I组和II组比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.114, P < 0.05$);II组和III组比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.755, P < 0.05$);I组和III组比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 15.522, P < 0.01$);由上可知NF- κ B在3组中的表达强弱为I组 > II组 > III组。

表1 3组标本组织中的TLR4和NF- κ B表达水平比较(n)

组别	n	TLR4 表达		NF- κ B 表达	
		阳性数	阴性数	阳性数	阴性数
I	40	30	10	27	13
II	40	21	19	18	22
III	30	8	22	6	24

2.2 肿瘤组织标本中的TLR4和NF- κ B的相关性分析 利用统计学 χ^2 检验及其列联系数法分析肿瘤组织标本中的TLR4和NF- κ B的表达情况,结果显示二者呈正相关($\chi^2 = 20.09, P < 0.01, r = 0.709$),见表2。

表2 肿瘤组织标本中的TLR4和NF- κ B的相关性分析(n)

NF- κ B 表达	TLR4 表达		总计
	阳性	阴性	
阳性	26	1	27
阴性	4	9	13
总计	30	10	40

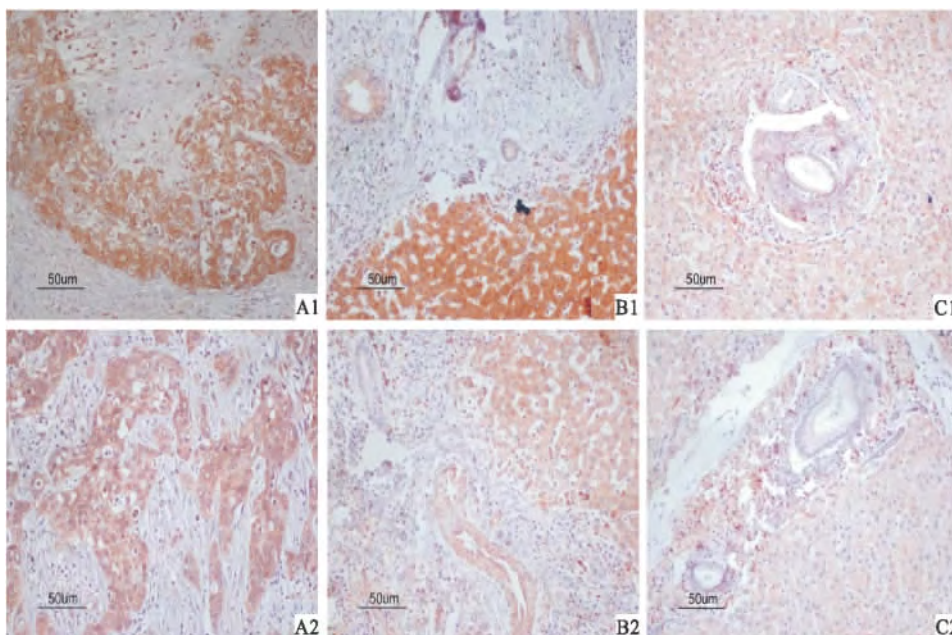


图1 TLR4和NF- κ B在3组不同胆管组织中的表达 PV×200

A:肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌组织中的表达;B:肝内胆管结石旁胆管组织中的表达;C:正常肝内胆管组织中的表达;1:TLR4;2:NF- κ B

2.3 肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌组织中 TLR4 和 NF- κ B 的表达与临床病理参数的关系 得出 TLR4 和 NF- κ B 的表达与患者的性别、年龄、肿瘤分化程度及淋巴结转移等的组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

表 3 肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌组织中 TLR4 和 NF- κ B 的表达与临床病理参数的关系

项目	n	TLR4 表达		χ^2 值	P 值	NF- κ B 表达		χ^2 值	P 值
		阳性	阴性			阳性	阴性		
性别									
男	24	17	7	0.556	0.456	17	7	0.304	0.581
女	16	13	3			10	6		
年龄(岁)									
≤50	10	9	1	1.600	0.206	7	3	0.038	0.845
>50	30	21	9			20	10		
结石合并胆管癌肿瘤分化									
高、中	23	15	8	3.510	0.061	16	7	3.224	0.073
低、未	17	6	11			7	10		
淋巴结转移									
有	25	7	18	0.320	0.572	8	17	0.008	0.931
无	15	3	12			5	10		

3 讨论

肝内胆管细胞癌的发病率约为消化系统肿瘤的 3%^[3],而其中肝内胆管细胞癌的发病率约为整个胆管癌的 5%~10%^[4],而近年来的发病率依旧处于上升趋势^[5]。肝内胆管可因结石的梗阻、胆汁淤积而反复的发生细菌感染,导致胆道系统内慢性炎症环境的持续存在,是肝内胆管上皮细胞癌变的主要诱因^[6]。炎症是机体对于外界感染刺激所做出的有益的反应,是先天性免疫系统的重要组成部分,但同时慢性反复的炎性刺激又与癌症的发生发展具有密切的关联^[7-9]。Sheen-Chen et al^[10]发现胆道感染的细菌谱主要是革兰阴性菌,如大肠杆菌、克雷伯杆菌等,而革兰阴性菌的外壁层中具有一种特别的化学成分 LPS,而 LPS 则是介导 TLR4 产生应答的主要配体。

TLR4 是人类发现的第一个 Toll 样受体蛋白。Toll 样受体是一类病原识别受体,可感受入侵的病原微生物,主要存在于免疫细胞。而近年的研究^[11]也表明其与肿瘤的发生发展具有不可分割的联系,如肿瘤细胞可以通过 TLR 信号转导通路对细胞进行调控。TLR 配体可刺激炎症分子,尤其是 NF- κ B 的活性,从而最终促进肿瘤的发生,其中 TLR4 是介

导内毒素/LPS 应答的最重要受体。当 TLR4 与相应配体结合后会将信号转导至翻译起始区(TIR 区域),然后进一步激活 NF- κ B 和丝裂原活化蛋白激酶信号通路,从而促进各种炎性细胞基因表达。

NF- κ B 在静息情况下以同源或者异源二聚体的形式与细胞质抑制蛋白结合形成复合物^[12],当细胞受到外来的刺激时,复合物解离,NF- κ B 则会由胞质中转移至核内发挥其调控作用。NF- κ B 作为慢性刺激与癌变关系演变中的关键调控环节,在多种肿瘤细胞的增殖侵袭调控中发挥重要作用。目前研究^[2]表明,NF- κ B 在肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌组织中呈过表达,其上调多种细胞因子(抗凋亡蛋白及白细胞介素 6 等)的表达,阻止细胞的正常凋亡,促进细胞的增殖等从而诱发肿瘤的发生。因此研究 TLR4 通路的阻断和抑制的方法也成为了目前医学研究的热点课题之一。

关于 LPS-TLR4-NF- κ B 转导通路,已知是目前发现的重要的炎性通路之一,其转导过程与许多疾病以及肿瘤的发生及发展具有密切联系,其下游的炎症信号级联式反应的表达不同也常会使得疾病的转归不同。

本研究中 TLR4 和 NF- κ B 分别在 3 组中的表达均逐渐衰减,且在 I、II、III 组之间差异均有统计学意义,同时分析可得两种因子在肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌组织的表达呈正相关,由此推测 LPS-TLR4-NF- κ B 通路在肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌发生中的作用,有利于肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌临床早期的预防和诊断。实验结果为下一步寻找特异性的标志物检测肝内胆管结石患者是否并发肝内胆管细胞癌提供了理论依据,为研究该通路中关键分子的抑制物从而预防肝内胆管结石患者的胆管上皮细胞癌变提供了理论依据。通过对临床相关的病理参数的研究表明,肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌组织中 TLR4 和 NF- κ B 的表达在性别、年龄、肿瘤分化程度及淋巴结有无转移的组间比较,差异并无统计学意义,提示肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌中 LPS-TLR4-NF- κ B 通路在肿瘤的逐步发展过程中扮演重要角色,而与肿瘤本身的特性无关。

参考文献

- [1] Vetrone G, Ercolani G, Grazi G L, et al. Surgical therapy for hepatolithiasis: a Western experience[J]. J Am Coll Surg, 2006,

- 202(2):306-12.
- [2] 黄 奋,陈汝福,周泉波,等. 肝内胆管结石合并肝内胆管癌组织中 NF- κ B 的表达及其意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2010,19(8):925-8.
- [3] Ulstrup T, Pedersen F M. Photodynamic therapy of cholangiocarcinomas [J]. *Ugeskr Laeger*, 2013,175(9):579-82.
- [4] Vasilieva L E, Papadhimitriou S I, Dourakis S P. Modern diagnostic approaches to cholangiocarcinoma [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2012,11(4):349-59.
- [5] Razumilava N, Gores G J. Classification, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2013,11(1):13-21, e3-4.
- [6] Sibulesky L, Nguyen J, Patel T. Preneoplastic conditions underlying bile duct cancer [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2012,397(6):861-7.
- [7] Nesaretnam K, Meganathan P. Tocotrienols: inflammation and cancer [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2011,1229:18-22.
- [8] Aggarwal B B, Sung B. The relationship between inflammation and cancer is analogous to that between fuel and fire [J]. *Oncology (Williston Park)*, 2011,25(5):414-8.
- [9] Zamarron B F, Chen W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression [J]. *Int J Biol Sci*, 2011,7(5):651-8.
- [10] Sheen-Chen S, Chen W, Eng H, et al. Bacteriology and antimicrobial choice in hepatolithiasis [J]. *Am J Infect Control*, 2000,28(4):298-301.
- [11] Huang B, Zhao J, Unkeless J C, et al. TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword [J]. *Oncogene*, 2008,27(2):218-24.
- [12] Lu Y, Sun Q, Zheng Y, et al. The role of nuclear factor- κ B p50 subunit in the development of endometriosis [J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2011,3:591-603.

Expression and clinical significance of NF- κ B and TLR4 in intrahepatic lithiasis associated with intrahepatic cholangiocarcinoma

Chen Jia, Yu Hongzhu, Wang Zhenglin, et al

(Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the expressions and clinical significance of NF- κ B and TLR4 in intrahepatic lithiasis associated with intrahepatic cholangiocarcinoma. **Methods** Collect bile duct histopathologic wax blocks of liver tissues specimen of hepatectomy which were selected in department of pathology of the first affiliated hospital of Anhui medical university in recent 10 years, including 40 cases of intrahepatic bile duct calculi of intrahepatic bile duct carcinoma tissue, 40 cases of intrahepatic biliary calculi by bile duct tissues and 30 cases of normal bile duct tissues (normal bile duct tissues adjacent to liver hemangioma or liver trauma after resection of liver tissue of normal bile duct tissues). Immune histochemical method (PV) was tested in organizations in NF- κ B and the expression of TLR4 and results were analyzed. **Results** The amount of NF- κ B and TLR4 expression in intrahepatic biliary calculi of intrahepatic bile duct carcinoma tissue was significantly higher than that in the intrahepatic bile duct stones near bile duct tissues and normal bile duct tissue ($P < 0.05$). The expression of TLR4 and NF- κ B in intrahepatic biliary calculi of intrahepatic bile duct carcinoma was correlative and presents positive correlation ($r = 0.709$). The comparison between groups of patients' age, sex, tumor differentiation, tumor invasion and lymph node metastasis that related the expression of TLR4 and NF- κ B showed that there was no statistically significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** The abnormal expression of TLR4 and NF- κ B is closely associated with the gradual progress of intrahepatic bile duct stones complicated with intrahepatic bile duct carcinoma, and both are positively correlated.

Key words cholangiocarcinoma; TLR4; NF- κ B; intrahepatic