

大肠癌中 β -catenin 表达及与 COX-2、VEGF 表达的关系

汪 洋, 林从尧, 周 夏

Expression of β -catenin in Human Colorectal Carcinoma and Its Relationship to Expression of COX-2 with VEGF

WANG Yang, LIN Cong-yao, ZHOU Xia

Department of Oncology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between the abnormal expression of β -catenin and the high expression of COX-2 and VEGF and its significance. **Methods** The expression of β -catenin and COX-2 and VEGF were detected in 78 cases of colorectal carcinoma and 15 cases of normal colorectal mucous tissues around the foci by immunohistochemical method. **Results** β -catenin was expressed normally in 15 cases of the normal colorectal mucous tissue, while COX-2 and VEGF were negative. The expression rate of COX-2, VEGF was 65.4%, 70.5%, and the abnormal expression rate of β -catenin was 75.6% in the tissue of colorectal carcinoma. The abnormal expression rate of β -catenin was correlated with the extent of proliferation, Duke's stage and metastasis of lymph node ($P < 0.05$). COX-2 and VEGF positive expression were correlation with the lymph node metastasis and Duke's staging ($P < 0.05$). The abnormal expression of β -catenin and the positive expression of COX-2 and VEGF had a parallel relationship in colorectal carcinoma ($P < 0.05, r = 0.278, 0.419$). **Conclusion** β -catenin accumulation in the cytoplasm/nuclear and the high expression of COX-2 and VEGF have synergistic effect on the progression of colorectal carcinoma.

Key words: β -catenin; COX-2; VEGF; Colorectal carcinoma; Immunohistochemistry

摘要: **目的** 探讨大肠癌组织中 β -catenin 的异常表达的意义及与 COX-2、VEGF 表达的关系。 **方法** 应用免疫组化 SP 法检测 78 例大肠癌组织和 15 例癌旁正常粘膜组织中 β -catenin、COX-2、VEGF 的表达。 **结果** β -catenin 在 15 例正常组织均呈正常表达, 而 COX-2 和 VEGF 均呈阴性。大肠癌中 β -catenin 异常表达率为 75.6%, COX-2 和 VEGF 阳性表达率分别为 65.4%、70.5%。 β -catenin 异常表达与大肠癌的分化程度、转移和 Dukes 分期显著相关 ($P < 0.05$)。COX-2、VEGF 表达水平与大肠癌转移、Duke's 分期有统计相关性 ($P < 0.05$)。 β -catenin 异常表达与 COX-2 和 VEGF 的表达在大肠癌中均有显著的正相关性 ($P < 0.05, r = 0.278, 0.419$)。 **结论** β -catenin 在胞浆或胞核内的异常聚集以及 COX-2 和 VEGF 的过度表达共同参与大肠癌的进展。

关键词: β -catenin; COX-2; VEGF; 大肠癌; 免疫组织化学

中图分类号: R735.3⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2006)01-0020-03

0 引言

目前关于 β -catenin 与 COX-2、VEGF 在人体大肠癌组织表达相关性的研究报道甚少, 国内还未见报道。本研究采用免疫组化的方法检测 β -catenin、COX-2、VEGF 在结直肠癌组织中的表达情况, 探讨它们的表达与大肠癌发生、发展之间的关系并研究三者之间的联系, 以期了解它们在大肠癌发生、发展中的可能作用机制。

1 资料与方法

1.1 病例资料

收集武汉大学中南医院肿瘤研究所存档的 2000 年 3 月 ~ 2003 年 3 月间手术切除的 78 例结直肠癌组织标本, 另收集 15 例相对应癌旁正常结直肠组织 (距肿瘤切缘 5cm 以上)。所有标本经 4% 甲醛固定, 石蜡包埋, 临床病理资料齐全。78 例标本中男性 46 例, 女性 32 例, 年龄 29 ~ 78 岁。直肠癌 43 例, 结肠癌 35 例。Duke's 分期: A 期 16 例, B 期 21 例, C 期 35 例, D 期 6 例。高、中分化 48 例, 低分化 30 例。有淋巴结转移 36 例, 无淋巴结转移的 42 例。

1.2 实验试剂和方法

鼠抗人 β -catenin 单克隆抗体 (浓缩型)、鼠抗人 VEGF 单克隆抗体均为美国 Zymed 公司产品; 兔抗

收稿日期: 2005-05-04; 修回日期: 2005-07-13
作者单位: 430071 武汉大学中南医院肿瘤科

人 COX-2 多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品。通用型 SP 试剂盒、DAB 显色剂为北京中山生物技术有限公司产品。SP 免疫组化实验步骤按试剂盒说明书进行。抗原修复采用枸橼酸盐缓冲液(0.01 M pH6.0)微波修复。以 PBS 代替一抗作阴性对照,已知 β -catenin、COX-2、VEGF 阳性的大肠癌组织作阳性对照。

1.3 结果判断

免疫组化阳性信号为棕黄色细小颗粒状。 β -catenin 染色结果判断标准按照 Maruyama 等^[1]方法,分别从细胞膜、细胞浆、细胞核三方面判断 β -catenin 在细胞内的分特征:细胞膜阳性表达细胞率 > 70% 为正常表达,反之为表达减弱或缺失;胞浆或胞核阳性表达细胞率 > 10% 定为异位表达。细胞膜表达减弱或缺失及异位表达统称为异常表达。COX-2、VEGF 表达阳性结果判定标准为:镜下观察肿瘤细胞胞质内出现棕黄色颗粒为阳性染色。高倍镜下随机取 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞,阳性细胞数 > 10% 定为阳性,阴性细胞数 < 10% 定为阴性。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计,组间采用卡方检验,各指标间采用 Spearman 等级相关分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 β -catenin、COX-2、VEGF 在正常结直肠粘膜及结直肠癌组织中的表达

正常粘膜组织中 COX-2、VEGF 均为阴性表达;而 β -catenin 在 15 例癌旁正常粘膜组织中的正常表达率为 100%,未见异常表达。表达呈较为清晰的棕黄色染色,阳性表达几乎全部位于细胞膜上,特别是细胞间连接处呈连续线状,同质和极性分布,仅有少数胞浆呈弱表达,未见核表达,见图 1、2。结直肠癌组织中,COX-2 阳性染色主要集中在肿瘤细胞胞浆,阳性表达率为 65.4%,见图 3。VEGF 阳性表达率为 70.5%,棕黄色染色主要位于肿瘤细胞胞质,见图 4,另血管内皮细胞内有少量表达。 β -catenin 在结直肠癌组织中主要呈弥漫性胞浆表达,并有部分细胞核也呈阳性表达;且大部分伴有细胞膜呈不同程度的缺表达,见图 5、6。78 例大肠癌标本中, β -catenin 异位表达(胞浆/胞核)的 51 例,细胞膜表达缺失或减弱的 37 例,按 β -catenin 染色结果判断标准统计 β -catenin 异常表达率为 75.6% (59/78)。

2.2 β -catenin、COX-2、VEGF 表达与大肠癌各主

要临床病理参数的关系 见表 1。

表 1 β -catenin、COX-2、VEGF 表达与大肠癌临床病理参数的关系

临床病理参数	例数	β -catenin		COX-2		VEGF	
		正常	异常	+	-	+	-
年龄							
40	54	11	43	39	15	38	16
<40	24	8	16	12	12	17	7
性别							
男	46	12	34	33	13	36	10
女	32	7	25	18	14	19	13
肿瘤部位							
结肠	35	8	27	25	10	23	12
直肠	43	11	32	26	17	32	11
组织分化程度							
高、中分化	48	16	32 ^{**}	32	16	35	13
低分化	30	3	27	19	11	20	10
浸润深度							
浆膜层以下	40	13	27	27	13	29	11
侵及浆膜或以上	38	6	32	24	14	26	12
Dukes 分期							
A+B 期	37	13	24	19	18	22	15
C+D 期	41	6	35 [*]	32 [*]	9	33 [*]	8
淋巴结转移							
无	42	14	28	22	20	25	17
有	36	5	31	29	7	30	6

注: * 与 A+B 期组比较, $P < 0.05$, 与无淋巴结转移组比较 $P < 0.05$, ** 与低分化组比较 $P < 0.05$

2.3 大肠癌组织中 β -catenin 异常表达与 COX-2、VEGF 表达之间的关系 见表 2。

表 2 大肠癌中 β -catenin 异常表达同 COX-2、VEGF 表达的关系 (例数)

β -catenin 表达	例数	COX-2		P	VEGF 值		P
		+	-		+	-	
异常	59	43 [*]	16	< 0.05	48	11	< 0.01
正常	19	8	11		7	12	

注: * β -catenin 异常表达与 COX-2 表达呈正相关, $r = 0.278$; β -catenin 异常表达与 VEGF 表达呈正相关, $r = 0.419$

3 讨论

β -catenin 可与 E-cadherin 结合,介导肿瘤细胞及上皮细胞的粘附^[2],抑制肿瘤的侵袭与转移。既往实验多集中于 β -catenin 细胞粘附作用的研究,因此大多侧重于对 β -catenin 定位于细胞膜表达的研究。本研究的重点是观察 β -catenin 的异位表达。我们的结果显示正常结直肠粘膜 β -catenin 表达几乎全部定位于细胞膜。极少数视野下有胞浆表达,未见细胞核表达。而在结直肠癌中普遍存在 -

catenin 胞浆和/或胞核异位表达及不同程度的细胞膜表达的缺失。 β -catenin 在正常组织和癌组织中的分布和表达有显著的差异性($P < 0.01$)。同时实验结论还表明 β -catenin 的异常表达与结直肠癌分化程度、Dukes 分期、淋巴结转移有关。提示 β -catenin 的异常表达与细胞恶性转化及疾病进展紧密联系。Wong 等^[3]依次对正常结直肠组织,结直肠息肉组织,腺瘤组织及癌组织的 β -catenin 表达进行研究发现: β -catenin 的胞浆/核表达率在这四种组织中分别为 0、8%、92%、100%。且 β -catenin 的异位表达与患者淋巴结转移及其不良预后存在显著相关。Hugh 等^[4]也发现 β -catenin 的广泛核表达及胞浆表达揭示了肿瘤生长的异常性,且在对患者生存预后的判断上有统计学意义。我们认为通过对 β -catenin 胞膜至胞浆表达移位的检测可以成为对细胞恶性转化及疾病进展程度的一个可行的评估手段。

肿瘤的生长很大程度依赖肿瘤血管的生长,VEGF 则是重要的促肿瘤血管生长因子之一。而 COX-2 至少通过 5 种机制来促进肿瘤的发生和肿瘤细胞的恶性表型转换^[5]:(1)对细胞凋亡的抑制;(2)促进肿瘤组织血管的发生;(3)增加肿瘤组织的侵袭力,如促进 MMPs 的表达等;(4)通过调节免疫抑制功能;(5)促进致癌物前体向致癌物转变。此外,也有研究表明,在大肠肿瘤中 COX-2 也可能通过促进细胞增殖参与肿瘤发生^[6]。本次研究结果显示大肠癌组织中 COX-2、VEGF 蛋白呈高水平表达,而在正常大肠组织中并未检测到 COX-2 和 VEGF 表达。且两者在大肠癌中的表达与淋巴结转移、Dukes 分期密切相关。结果提示两者均参与了大肠癌的侵袭和转移。

在正常分化成熟的细胞中, β -catenin 蛋白主要与膜表面 E-cadherin 结合,参与同质性粘附。而胞浆内游离的 β -catenin 因被磷酸泛素化,可被蛋白酶体降解始终保持在低水平^[7]。但当 β -catenin 降解障碍时,胞浆内 β -catenin 水平升高,导致 β -catenin 大量聚集进入细胞核内与 Tcf/Lef 转录因子结合启动下游靶基因的转录。Araki 等^[8]发现 β -catenin 在核内的聚集能够增加 COX-2 mRNA 和 cox-2 蛋白的表达。突变的 β -catenin 表达上调内源性的 COX-2 mRNA 水平。Easwaran 等^[9]的研究表明,突变型 β -catenin 的表达还能使 VEGF mRNA 相对未转染

前有 280% 的增长。此外,Zhang 等^[10]发现在结直肠腺瘤中 Wnt 信号通路可以调节血管内皮生长因子的表达。COX-2 和 VEGF 的转录启动子内均含有 Tcf-4 结合位点。两者均有可能是 β -catenin 通路的下游靶基因。我们在实验中发现,大肠癌中 β -catenin 异常表达和 COX-2、VEGF 表达之间均有显著正相关性,提示 β -catenin 的异常聚集可能通过促进 COX-2 的表达和肿瘤血管的生长来促进肿瘤的进展。且胞膜 β -catenin 表达的缺失进一步影响了细胞的黏附功能,加快了肿瘤的转移。此外,我们还发现 COX-2 的表达和 VEGF 的表达也呈正相关。提示大肠癌中 COX-2 也能上调 VEGF 的表达。因此不难发现三者在大肠癌的发生、发展中的正向协同调控作用。所以联合检测 β -catenin 异位表达和其下游靶基因蛋白的表达有助于大肠癌的临床诊断及对其生物学行为做出更加准确的判断。

(本文图见封 3)

参考文献:

- [1] Maruyama K, Ochiai A, Akimoto S, et al. Cytoplasmic β -catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer[J]. *Oncology*, 2000, 59(4):302-309.
- [2] Castano J, Raurell I, Piedra JA, et al. Beta-catenin N- and C-terminal tails modulate the coordinated binding of adherens junction proteins to beta-catenin [J]. *J Biol Chem.*, 2002, 277(35):31541-31550.
- [3] Wong SC, Lo ES, Lee KC, et al. Prognostic and diagnostic significance of beta-catenin nuclear immunostaining in colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(4):1401-1408.
- [4] Hugh TJ, Dillon SA, Taylor BA, et al. Cadherin-catenin expression in primary colorectal cancer: a survival analysis[J]. *Br J Cancer*, 1999, 80(7):1046-1051.
- [5] Dempke W, Rie C, Grothey A, et al. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001, 127(7):411-417.
- [6] 陈赞雄,吴振华,许超贵,等. 大肠肿瘤 COX-2 的表达及与细胞增殖的关系[J]. *肿瘤防治研究*, 2003, 30(3):192-195.
- [7] Peifer M, Peifer M. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis—a look outside the nucleus [J]. *Science*, 2000, 287(5458):1606-1609.
- [8] Araki Y, Okamura S, Hussain SP, et al. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(3):728-734.
- [9] Easwaran V, Lee SH, Inge L, et al. beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(12):3145-3153.
- [10] Zhang X, Gaspard JP, Chung DC, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(16):6050-6054.

[编辑:周永红]

TRAIL 及其受体 DR4、DcR1 在大肠癌及 癌旁组织中的表达

(正文见 23 页)

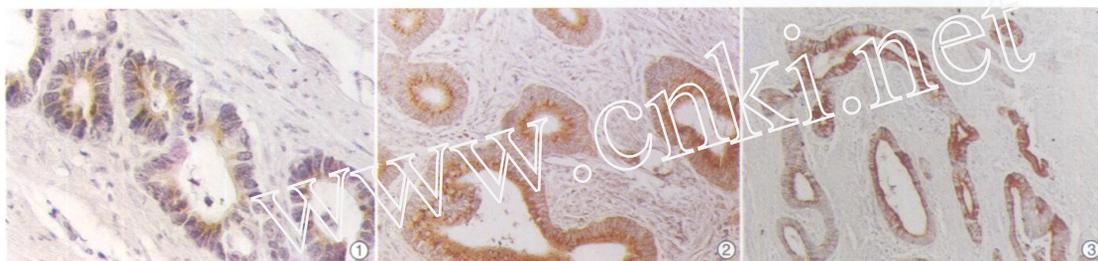


图1 TRAIL 在大肠癌中的表达 (SP × 400) 图2 DR4 在大肠癌中的表达 (SP × 400)
图3 DcR1 在大肠癌中的表达 (SP × 200)

大肠癌中 β -catenin 表达及与 COX-2、VEGF 表达的关系

(正文见 20 页)

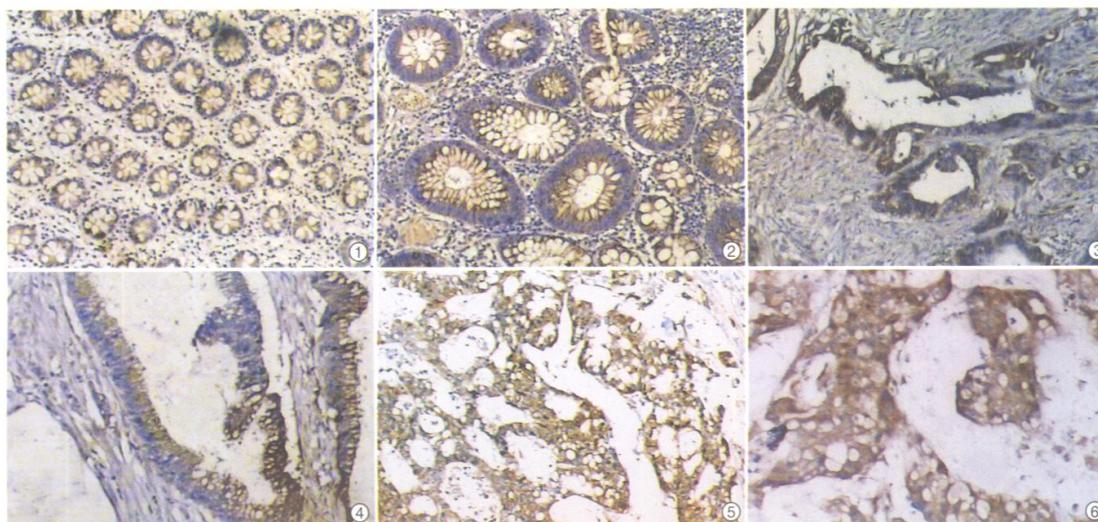


图1 β -catenin 在大肠正常粘膜组织中的表达 (SP × 100) 图2 β -catenin 在大肠正常粘膜组织中的表达 (SP × 200)
图3 COX-2 在大肠癌组织中的表达 (SP × 200) 图4 VEGF 在大肠癌组织中的表达 (SP × 200)
图5 β -catenin 在大肠癌组织中的表达 (SP × 200) 图6 β -catenin 在大肠癌组织中的表达 (SP × 400)