

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X·2009·01·017

· 临床研究 ·

Clusterin 在大肠癌组织中的表达及其与临床病理特征的关系

陈金元^{1*}, 李杰², 徐宏³(1. 广东医学院附属医院胃肠外科, 广东湛江 524043; 2. 深圳蛇口人民医院外科, 广东深圳 518000; 3. 广东医学院药理学教研室, 广东湛江 524043)

[摘要] 目的: 观察凋亡抑制因子 Clusterin 在大肠癌组织中的表达及其与大肠癌发生、发展的关系。方法: 收集广东医学院附属医院临床资料完整的大肠癌术后标本 58 例(其中直肠癌 32 例, 结肠癌 26 例), 采用免疫组织化学 SP 法检测大肠癌组织、癌旁组织和正常大肠组织中 Clusterin 的表达情况, 流式细胞术检测大肠癌组织中肿瘤细胞凋亡的情况。结果: Clusterin 在大肠癌组织中的阳性表达率明显高于大肠癌癌旁组织和大肠正常组织($P < 0.05$); Clusterin 在大肠癌组织中的阳性表达与肿瘤的分化程度、Dukes 分期和淋巴结转移密切相关($P < 0.05$); 大肠癌组织中肿瘤细胞凋亡与淋巴结转移和临床分期密切相关($P < 0.05$); Clusterin 蛋白的阳性表达与大肠癌组织的细胞凋亡之间呈明显负相关($r = -0.381$)。结论: Clusterin 的抗凋亡机制在大肠癌发生、发展中可能起着重要的促瘤生长作用。

[关键词] Clusterin; 大肠癌; 凋亡

[中图分类号] R735.3; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)01-075-05

Expression of Clusterin in colorectal cancer tissues and its relationship with clinicopathological properties

CHEN Jin-yuan^{1*}, LI Jie², XU Hong³(1. Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524043 Guangdong, China; 2. Department of Surgery, Shekou People's Hospital, Shenzhen 518000 Guangdong, China, 3. Department of Pharmacology Guangdong Medical College, Zhanjiang 524043, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the expression of Clusterin in colorectal cancer tissues and study its relationship with the development and progression of colorectal cancer. **Methods:** Fifty-eight colorectal cancer tissues samples (32 rectal cancer tissues, 26 colon carcinoma tissues) of patients with completed clinic data were obtained after surgery from the Affiliated Hospital of Guangdong Medical College. Immunohistochemical staining (SP method) was used to detect the expression of Clusterin in colorectal cancer tissue, adjacent normal tissue of colorectal cancer and normal tissue. Flow cytometry was used to examine the apoptosis of colorectal cancer cells. **Results:** The expression of Clusterin in colorectal cancer tissues was significantly higher than those in the adjacent tissues of colorectal cancer and normal colorectal tissue ($P < 0.05$); besides, the expression of Clusterin in the colorectal cancer tissue was correlated with the differentiation, Dukes stages and lymphatic metastasis of colorectal cancer. Apoptosis of colorectal cancer cells was found correlated with the clinical stage and lymphatic metastasis; Clusterin expression in colorectal cancer tissue was negatively correlated with apoptosis of colorectal cancer cells ($r = -0.381$, $P < 0.05$). **Conclusion:** Clusterin may play important roles in the development and progression of colorectal cancer by inhibiting apoptosis of tumor cells, which may pave a way for immunotherapy of colorectal cancer.

[Key words] clusterin; colorectal neoplasms; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(1): 75-79]

大肠癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一, 大肠癌在全球发病率高居恶性肿瘤第四位^[1], 在欧美发达国家位列恶性肿瘤死亡原因的第二位^[2]。我国大肠癌发病率和病死率呈逐年上升趋势, 大肠癌的发病率已居恶性肿瘤的第三位, 病死率位列癌

症死因的第五位^[3]。正常肠道黏膜存在着细胞凋

[作者简介] 陈金元(1972-), 男, 硕士, 湖北省浠水县人, 主治医师, 主要从事消化道肿瘤的诊治方面的研究, E-mail: CJYXHH@sina.com

* 通讯作者(Corresponding author). E-mail: CJYXHH@sina.com

亡,维持黏膜细胞生理平衡。大肠癌的肠黏膜细胞凋亡存在障碍,有利于肿瘤的发生和发展;诱导细胞凋亡而不伤及或少伤及正常组织细胞,是肿瘤治疗的新思路。

凝集素(Clusterin)是一种异源二聚体硫酸化糖蛋白,最早于1983年在羊睾丸组织中分离得到^[4],随后又发现在人体的许多组织包括脑、心脏、肾脏、肝脏、肺脏、眼、乳腺、子宫、前列腺等器官中均有表达^[5]。Clusterin有两种亚型:分泌型Clusterin(sCLU),有抗凋亡作用;核型的Clusterin(nCLU),有促凋亡作用。目前大多数文献所指的Clusterin是sCLU。Chen等^[6]认为Clusterin可作为鼠大肠癌的诊断标志物。但有关Clusterin与人大肠癌的关系,国内外报道甚少。本研究应用免疫组织化学技术在蛋白质水平上分析Clusterin在大肠癌中的表达情况,并应用流式细胞术检测肿瘤细胞的凋亡,试图从蛋白质水平探讨Clusterin在大肠癌发生、发展中的作用并明确其在大肠癌防治中的价值。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集广东医学院附属医院临床资料完整的大肠癌术后标本58例,其中包括直肠癌32例、结肠癌26例;根据1990年全国大肠癌诊治规范进行Dukes分期:A期9例、B期16例、C期11例、D期22例(7例伴有远处转移),其中25例有淋巴结转移。分化程度:高分化12例,中分化31例,低分化15例。组织类型:腺癌45例,黏液癌12例,腺鳞癌1例。肿瘤 ≥ 5 cm的25例, < 5 cm的33例。年龄 ≥ 60 岁有20例, < 60 岁有38例,平均年龄为(48.3 \pm 3.6)岁。肠管离体后立即取材,每例标本癌组织取2块,癌旁组织(距肿瘤切缘外3 cm)1块,约0.5 cm \times 0.5 cm \times 0.5 cm大小。所有标本均经病理检查确定诊断。全部病例术前均未行放、化疗,临床病例资料完整。另取环状痔PPH术后直肠黏膜组织10例为正常对照。

1.2 主要试验材料

鼠抗人Clusterin单克隆抗体工作液、PV-9000二步法免疫组化检测试剂盒购自北京中杉金桥生物科技有限公司。流式细胞术荧光染色剂为碘化丙啶,购自Sigma公司,按说明书配制。

1.3 免疫组织化学SP法检测Clusterin在大肠癌组织、癌旁组织和正常大肠组织中的表达

标本均经10%中性甲醛固定,石蜡包埋,切片,常规脱蜡、水化,应用免疫组织化学技术SP法分别

检测Clusterin在大肠癌组织、癌旁组织和正常大肠组织中的表达。所用一抗为鼠抗人Clusterin单克隆抗体工作液,主要步骤依照试剂盒使用说明操作。

免疫组化阳性结果的判定:Clusterin蛋白阳性反应为细胞质染色呈黄色或棕黄色。结果采用双人双盲显微镜观察,评分标准参照文献^[7]作适当修改:(1)按染色强度,阴性染色记为0分,淡黄色染色为1分,黄色染色为2分,棕黄色染色为3分;(2)按阳性细胞数,阳性细胞数 $< 25\%$ 时记为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分, $> 75\%$ 为4分。两者得分乘积为Clusterin蛋白的表达水平(0~12分)。由于Clusterin蛋白在正常大肠组织中染色阴性或弱阳性,因此定义以正常大肠黏膜组织中评分最高者为界,即0~6分为Clusterin阴性表达,7~12分为阳性表达。

1.4 流式细胞术检测大肠癌组织细胞的凋亡

取材后用70%酒精固定,制备成单细胞悬液,碘化丙啶染色后上流式细胞仪进行检测。出现细胞凋亡时,在DNA含量直方图上二倍体细胞 G_1 峰的左侧出现亚二倍体峰,即为细胞凋亡峰。每份标本测10 000个细胞,经Cellquest多功能软件分析,绘制细胞数-DNA含量分布图,计算凋亡指数AI(apoptosis index, AI)。参照文献标准^[8],当肿瘤的AI值 $>$ 平均AI值时,即认定为高AI值,反之则认定为低AI值。本研究中58例大肠癌患者平均AI为31.6%,以此确定肿瘤细胞的高或低AI值。

1.5 统计学处理

实验数据用百分数表示,两因素间的差异比较采用 χ^2 检验,相关分析采用Spearman相关性检验,应用SPSS 13.0统计软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 大肠癌组织、癌旁组织和正常组织中Clusterin蛋白的表达

免疫组化染色结果显示,大肠癌组织中Clusterin阳性染色为黄色或棕黄色,主要定位于细胞质中(图1)。大肠癌组织中阳性表达率为67.24%(39/58),癌旁组织中为48.28%(28/58),正常组织中均为阴性表达(0/10)。大肠癌组织中Clusterin的表达明显高于癌旁组织和正常组织($P < 0.05$)。

2.2 大肠癌组织细胞的凋亡指数及其与Clusterin表达的相关性

58例大肠癌患者中23例表现为高水平AI值,35例为低水平AI值(图2)。Clusterin阳性表达组中74.36%(29/39)表现为低水平AI值,而Clusterin

阴性表达组中 68.42% (13/19) 呈现高水平 AI 值, 两者之间有显著性差异 ($P < 0.05$)。Spearman 相关性分析显示, Clusterin 的表达与肿瘤细胞 AI 值呈负相关 ($r = -0.381, P < 0.05$)。

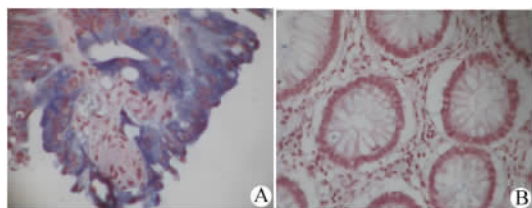


图 1 免疫组化检测 Clusterin 在大肠癌组织 (A) 和正常大肠组织 (B) 中的表达 ($\times 400$)

Fig. 1 Expression of Clusterin in colorectal cancer tissues detected by immunohistochemical staining ($\times 400$)

A: Positive expression of clusterin in colorectal cancer;

B: Negative expression of clusterin in normal colorectal tissue

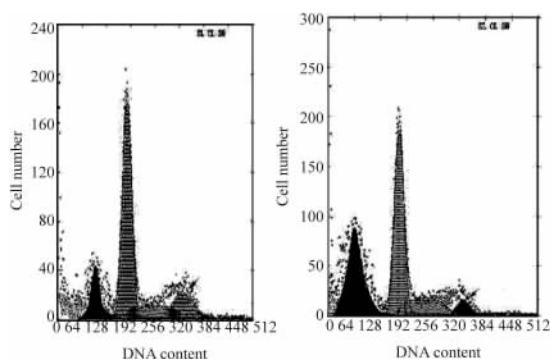


图 2 流式细胞术检测大肠癌组织中的细胞凋亡

Fig. 2 Apoptosis of colorectal cancer tissue as detected by FCM

A: Low AI; B: High AI

2.3 大肠癌组织中 Clusterin 表达与各病理特征之间的关系

大肠癌组织中 Clusterin 的阳性表达率与患者年龄、肿瘤部位、肿瘤大小均无相关性 ($P > 0.05$); 与肿瘤的 Dukes 分期、分化程度和淋巴结转移之间有显著相关性 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.4 大肠癌组织中细胞凋亡与大肠癌各病理特征之间的关系

大肠癌组织中肿瘤细胞凋亡率与患者年龄、肿瘤部位、肿瘤大小和分化程度均无相关性 ($P > 0.05$), 与肿瘤 Dukes 分期和淋巴结转移之间有显著相关性 ($P < 0.05$, 表 2)。

3 讨论

多年来, 人们一直以为细胞增殖和分化的异常

是肿瘤发病的主要症结所在, 然而随着细胞凋亡概念的引入, 人们开始从细胞凋亡的角度来审视肿瘤的发生。凋亡的调节对人体组织保持内环境稳态至关重要, 这一过程受到干扰将使细胞寿命无限延长或累积突变, 有利于肿瘤的发生。由此认为肿瘤不仅是细胞增殖和分化异常的疾病, 同时也是凋亡异常的疾病^[9]。

细胞凋亡参与了肿瘤的起始过程, 并对肿瘤的发生起负调控作用, 是肿瘤发生的一个重要基础, 而细胞凋亡的抑制打破了细胞增生和细胞死亡的平衡。近年研究^[10]提示 Clusterin 可通过抗细胞坏死和抗细胞凋亡的机制发挥一种细胞保护作用, 与肿瘤细胞的不死性及增殖关系密切, 所以对其细胞保护作用机制的研究正逐步成为细胞生物学一个新的热点。

表 1 大肠癌组织中 Clusterin 表达与病理特征之间的关系

Tab. 1 Relationship of Clusterin expression in colorectal cancer tissue with its clinicopathologic characters

Index	N	Clusterin expression [n(%)]	χ^2	P
Age(year)				
≥ 60	20	16(80.0)	2.26	> 0.05
< 60	38	23(60.5)		
Location				
Colon	26	17(65.4)	0.07	> 0.05
Rectum	32	22(68.8)		
Tumor size(diameter)				
$\geq 5\text{cm}$	25	19(76.0)	1.53	> 0.05
$< 5\text{ cm}$	33	20(60.6)		
Dukes stage				
A + B	25	12(48.0)	7.39	< 0.05
C + D	33	27(81.8)		
Differentiation				
Highly	12	4(33.3)	8.05	< 0.05
Moderately	31	23(71.9)		
Poorly	15	12(80.0)		
Lymphatic metastasis				
-	33	18(54.6)	5.60	< 0.05
+	25	21(84.0)		

近年来一系列的研究显示,Clusterin 蛋白在抗细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用,其高表达与许多肿瘤的发生、发展有关。Sensibar 等^[11]应用反义寡核苷酸阻断 LNCaP 细胞株中 Clusterin 基因表达,发现细胞凋亡率明显增加。Trougakos 等^[12]在应用 RNA 干扰技术转染肿瘤细胞后发现,Clusterin 基因在 mRNA 转录后的沉默可以明显诱导细

胞凋亡。Trougakos 等^[13]通过抑制 RNA 来降低内源性 Clusterin 的合成,发现 P53 介导的肿瘤细胞生长障碍和凋亡率升高,这种凋亡是通过线粒体功能障碍实现的,认为 Clusterin 通过与 Ku70-Bax 结合而使其更加稳定,Bax 不能释放,即 Clusterin 通过抑制 Bax 的促凋亡作用而达到抗凋亡的作用。

表 2 大肠癌组织细胞凋亡与病理特征之间的关系

Tab.2 Relationship of colorectal cancer cell apoptosis with its clinic pathological characteristics

Index	N	Apoptosis index		χ^2	P
		High	Low		
Age (year)					
≥60	20	5(25%)	15(75%)	2.74	>0.05
<60	38	18(47.36%)	20(52.64%)		
Location					
Colon	26	13(50%)	13(50%)	2.11	>0.05
Rectum	32	10(31.25%)	22(68.75%)		
Tumor size (diameter)					
≥5 cm	25	9(36%)	16(64%)	0.24	>0.05
<5 cm	33	14(42.42%)	20(57.58%)		
Dukes stage					
A + B	25	15(60%)	10(40%)	7.60	<0.05
C + D	33	8(24.24%)	25(75.76%)		
Differentiation					
Highly	12	7(58.33%)	5(41.67%)	4.23	>0.05
Moderately	31	13(41.94%)	18(58.06%)		
Poorly	15	3(20%)	12(80%)		
Lymphatic metastasis					
-	33	17(51.52%)	16(48.48%)	4.50	<0.05
+	25	6(24%)	14(76%)		

本研究应用免疫组织化学技术检测 Clusterin 的表达情况得知,Clusterin 在大肠癌组织中的阳性表达率明显高于癌旁组织和正常大肠组织。在对乳腺癌、前列腺癌等^[14-15]研究中均发现 Clusterin 蛋白的高度表达而在相应的对照正常组织中不表达或表达很弱,这与本研究的结果一致。

本研究还探讨了 Clusterin 蛋白的表达与大肠

癌临床各病理特征的关系,结果表明 Clusterin 蛋白的表达与 Dukes 分期、分化程度和淋巴结转移有关($P < 0.05$); Dukes 分期越晚、分化程度越低、伴有淋巴结转移,Clusterin 的阳性表达率越高。表明随着肿瘤的进展,Clusterin 的表达会增强。在其他一些人类恶性肿瘤中的研究也提示,Clusterin 高表达可能与肿瘤的生长程度及高侵袭

性有关。由此推测, Clusterin 可能是决定肿瘤侵袭性行为重要因素之一。

细胞凋亡率是衡量组织中细胞凋亡发生程度的一项重要指标。本研究按照欧启水等^[16]方法从新鲜大肠癌标本中分离制备单细胞悬液,应用流式细胞术检测肿瘤细胞的凋亡指数,结果显示大肠癌细胞凋亡指数与年龄、肿瘤大小和肿瘤部位均无关 ($P > 0.05$); 与淋巴结转移和临床分期有关 ($P < 0.05$)。这与周利群^[15]对前列腺的研究和杨国奋^[16]对卵巢癌的研究结果一致。

研究还发现, Clusterin 蛋白阳性表达组的 AI 为 (21.2 ± 4.8)%, 阴性表达组的平均 AI 为 (40.3 ± 5.7)%, 两组之间有显著性差异 ($P < 0.05$); 经 Spearman 相关分析显示 Clusterin 蛋白的表达与肿瘤细胞的凋亡指数呈明显的负相关 ($-0.381, P < 0.05$)。Steinberg^[18]、Miyake^[19]、Redondo^[14]等应用免疫组织化学技术及 TUNLE 法检测了前列腺癌、肾癌、乳腺癌等的细胞凋亡与 Clusterin 蛋白表达的关系,其结果均提示, Clusterin 蛋白在癌组织中的阳性表达与肿瘤细胞的凋亡存在明显的负相关,与本研究结果一致。

综上, Clusterin 蛋白的表达与大肠癌的进展有密切的关系,大肠癌细胞凋亡与淋巴结转移和临床分期密切相关,而 Clusterin 蛋白的阳性表达与大肠癌细胞凋亡存在明显的负相关。因此可以推论, Clusterin 蛋白与大肠癌发生发展以至于侵袭、转移有着一定的相关性,并且在大肠癌预后的评价中也有一定的参考价值。

[参考文献]

- [1] Weitz J, Koch M, Debus J, *et al.* Colorectal cancer [J]. *Lancet*, 2005, 365(9454): 153-165.
- [2] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics, 2006 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2006, 56(2): 106-130.
- [3] 王继恒,李世荣. 我国结直肠癌筛查和早期诊断十年回顾: 1994-2005 [J]. *胃肠病学*, 2006, 11(4): 245-250.
- [4] Trougakos IP, Gonos ES. Clusterin/apolipoprotein J in human ageing and cancer [J]. *In J Biochem Cell Biol*, 2002, 34(11): 1430-1448.
- [5] Pajak B, Orzechowski A. Clusterin: the missing link in the calcium-dependent resistance of cancer cells to apoptogenic stimuli [J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2006, 60: 45-51.
- [6] Chen X, Halberg RB, Ehrhardt WM, *et al.* Clusterin as a biomarker in murine and human intestinal neoplasia. [J] *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(16): 9530-9535.
- [7] Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N, *et al.* Expression of a novel anti-apoptosis gene survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(9): 1808-1812.
- [8] Yamasaki F, Tokunaga O, Sugimori H. Apoptotic index in ovarian carcinoma: correlation with clinicopathologic factors and prognosis [J]. *Gynecol Oncol*, 1997, 66(3): 439-448.
- [9] Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death [J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1317-1322.
- [10] 罗俊航,谢丹,陈炜,等. Clusterin 表达与膀胱癌预后的关系 [J]. *癌症*, 2005, 4(6): 743-747.
- [11] Sensibar JA, Sutkowski DM, Raffo A, *et al.* Prevention of cell death induced by tumor necrosis factor alpha in LNCaP cells by overexpression of sulfated glycoprotein-2(clusterin) [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(11): 2431-2437.
- [12] Trougakos IP, So A, Jansen B, *et al.* Silencing expression of the Clusterin/apolipoprotein gene in human cancer cells using small interfering RNA induces spontaneous apoptosis, reduced growth ability, and cell sensitization to genotoxic and oxidative stress [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(5): 1834-1842.
- [13] Trougakos IP, Lourda M, Antonelou MH, *et al.* Intracellular clusterin inhibits mitochondrial apoptosis by suppressing p53-activating stress signals and stabilizing the cytosolic Ku70-Bax protein complex [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(1): 48-59.
- [14] Redondo M, Villar E, Torres-Munoz J, *et al.* Overexpression of Clusterin in human breast carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 2000, 157(2): 393-399.
- [15] 周利群,杨学贞,曾荔,等. 聚集素在前列腺正常、增生、癌组织中的表达及意义 [J]. *中华外科杂志*, 2003, 41(2): 93-95.
- [16] 欧启水,沈仲毅,陆配华,等. 大肠癌细胞 p53 基因突变与细胞凋亡及细胞倍性的关系 [J]. *中华实验外科杂志*, 1999, 16(5): 425-426.
- [17] 杨国奋,李晓明,谢丹,等. 卵巢癌组织中 clusterin 蛋白表达和细胞凋亡检测 [J]. *中国肿瘤临床*, 2007, 34(12): 674-676.
- [18] Steinberg J, Oyasu R, Lang S, *et al.* Intracellular levels of SGP-2 (Clusterin) correlate with tumor grade in prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 1997, 3(10): 1707-1711.
- [19] Miyake H, Gleave ME, Arakawa S, *et al.* Introducing the clusterin gene into human renal cell carcinoma cells enhances their metastatic potential [J]. *J Urol*, 2002, 167(5): 2203-2208.

[收稿日期] 2008 - 11 - 24 [修回日期] 2009 - 01 - 10

[本文编辑] 韩丹