

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.06.013

· 临床研究 ·

谷胱甘肽巯基转移酶在黏液性大肠癌中的表达及其临床意义

王光辉, 汤文涛, 周辉, 翁子毅, 崔龙(上海交通大学附属新华医院 肛肠外科, 上海 200092)

[摘要] **目的:** 分析谷胱甘肽巯基转移酶(glutathione S-transferase, GST)在黏液性及非黏液性大肠癌组织中的表达情况, 并探讨其临床意义。**方法:** 选取2007年1月至2012年5月在上海交通大学附属新华医院肛肠外科行手术治疗的109例黏液性大肠癌标本和441例非黏液性大肠癌标本, 运用免疫组化方法检测蛋白GST、nm23、细胞角蛋白7(cytokeratin 7, CK7)在黏液性大肠癌和非黏液性大肠癌组织中的表达情况, 并探讨其临床意义。**结果:** GST和nm23在黏液性大肠癌组织中的阳性表达率分别为52.3%和57.8%, 明显低于非黏液性大肠癌组织中的阳性率(64.7%, 73.0%; 均 $P < 0.05$), 而CK7在黏液性大肠癌组织中的阳性表达率明显高于非黏液性大肠癌组织中的阳性率(27.5% vs 18.4%, $P = 0.033$)。GST的表达与黏液性大肠癌的较低分化程度和较多淋巴结转移相关, nm23和CK7的表达与黏液性大肠癌的临床特征无明显相关性。**结论:** GST在黏液性和非黏液性大肠癌中存在异常表达, GST蛋白有可能成为检测黏液性大肠癌淋巴结转移和分化程度的生物学指标。

[关键词] 结直肠肿瘤; 黏液性大肠癌; 谷胱甘肽转移酶; nm23; 细胞角蛋白7; 免疫组织化学

[中图分类号] R735.3; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)06-0639-04

Expression of glutathione S-transferase in colorectal mucinous adenocarcinoma and its clinical significance

WANG Guang-hui, TANG Wen-tao, ZHOU Hui, WENG Zi-yi, CUI long (Department of Colorectal Surgery, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression of glutathione S-transferase (GST) in colorectal mucinous adenocarcinoma (MC) and non-mucinous adenocarcinoma (non-MC) and analyze its clinical significance. **Methods:** The expressions of GST, nm23 and cytokeratin 7 (CK7) in 109 MC and 441 non-MC specimens (from Colorectal Surgery Department, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University) were detected by using an immunohistochemical method to explore the clinical significance. **Results:** The positive rates of GST and nm23 in the MC tissues were 52.3% and 57.8% respectively, which were significantly lower than those in the non-MC tissues (64.7%, 73.0%; $P < 0.05$); while the positive rate of CK7 in the MC tissues was 27.5%, which was significantly higher than that in the non-MC tissues (18.4%, $P = 0.033$). The expression of GST was correlated with differentiation and lymph node metastasis of MC; however, no correlation was found between the expressions of CK7 and nm23 and clinical pathological features of MC. **Conclusion:** GST is abnormally expressed in MC and non-MC tissues, and GST expression might be used as a biomarker of differentiation and lymph node metastasis in MC.

[Key words] colorectal neoplasms; adenocarcinoma; mucinous; glutathione S-transferase; nm23; CK7; immunohistochemistry

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(6): 639-642]

黏液性大肠癌是大肠癌的一种特殊类型, 占有所有大肠癌的1.6%~25.4%^[1-2], 研究表明^[3,4], 黏液性大肠癌的可切除率以及5年生存率低、预后差, 有的作者甚至认为黏液性大肠癌本身就是大肠癌预后不良的一个独立危险因素^[5-6]。但目前关于黏液性大肠癌的生物标志物的研究很少。谷胱甘肽巯基转移酶(glutathione s-transferase, GST)在细胞防御

[基金项目] 上海交通大学医学院科技基金项目(No. YZ1038)。Project supported by the Science and Technology Foundation of School of Medicine of Shanghai Jiaotong University(No. YZ1038)

[作者简介] 王光辉(1987-), 男, 山东省潍坊市人, 住院医师, 主要从事大肠癌防治的研究。E-mail: wangguanghui0625@163.com

[通信作者] 崔龙(CUI Long, corresponding author), E-mail: longcuidr@yahoo.com.cn

机制中起重要作用, 细胞角蛋白 7(cyokeratin 7, CK7)被广泛应用于肿瘤的诊断, nm23 蛋白作为肿瘤转移抑制基因在大肠癌局部发展、浸润、转移中起负调控作用, 但是关于这三个蛋白在黏液性大肠癌中的表达情况尚未有人报道。本课题采用免疫组化技术, 在 109 例黏液性大肠癌和 441 例非黏液性大肠癌患者中对 GST、nm23、CK7 三个蛋白的表达情况进行了检测和分析, 探讨上述三个蛋白的表达与黏液性大肠癌临床病理特征的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象及主要试剂

选取 2007 年 1 月至 2012 年 5 月在上海交通大学附属新华医院肛肠外科治疗的 550 例大肠癌患者的组织标本。采用 WHO 对于黏液性大肠癌的判断标准对所有大肠癌病例进行分类, 即只要黏液样物质占肿瘤体积的 50.0% 以上就定义为黏液性大肠癌^[7-8], 本组中黏液性大肠癌 109 例, 非黏液性大肠癌 441 例。所用一抗为鼠抗 GST、CK7、nm23 抗体, 均购自上海市长岛生物科技有限公司; 二抗为 HRB 标记的山羊抗鼠二抗, 购自上海市基因科技有限公司。

1.2 免疫组织化学染色

石蜡切片烘片 30 ~ 60 min, 二甲苯脱蜡 2 次, 各 10 min; 经 100% 至 70% 酒精逐级脱水; 解冻档微波修复 2 次, 各 10 min; 置 0.3% H₂O₂ 的甲醇液中, 室温下放置 30 min, PBS 洗 3 次; 滴加 5% BSA 封闭 30 min, PBS 洗 3 次; 滴加一抗(1:200)后置于湿盒内 4 °C 冰箱过夜; PBS 洗 3 次, 滴加二抗(HRB 标记的山羊抗鼠二抗, 1:200), 室温下放置 30 min; PBS 洗 3 次, 显微镜下控制 DAB 显色 5 ~ 10 min; 苏木精复染 1 min, 中性树脂封片。阳性对照使用由既往实验证实的阳性组织, 阴性对照使用 PBS 代替一抗。

每例切片随机选取 5 个高倍视野进行分析判定, 按着色强度分为: 基本不着色、染色与背景相似者为 0 分; 着色淡、略高于背景者为 1 分, 着色适中、明显高于背景者为 2 分; 着色深、呈深棕色者为 3 分。按阳性细胞数百分率分为: 阳性细胞数 < 10% 为 0 分; 10% ~ 50% 为 1 分; 51% ~ 75% 为 2 分; > 75% 为 3 分。2 项评分相加后, 0 ~ 1 分为阴性(-), ≥2 分为阳性(+)。

1.3 统计学处理

以是否为黏液性大肠癌分组, 比较两组病例肿瘤相关蛋白的免疫组织化学结果, 以及与黏液性大肠癌临床特征的关系。使用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析, 计数资料用卡方检验分析, 计量资料用 *t* 检验

分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 蛋白 GST、CK7、nm23 在黏液性和非黏液性大肠癌组织中的表达情况

在 441 例非黏液性大肠癌和 109 例黏液性大肠癌中, 用免疫组织化学方法对肿瘤标志物蛋白 GST、CK7、nm23 的表达情况进行分析。结果发现, GST、CK7、nm23 这三个蛋白在两组肿瘤之间的表达情况有明显差异, GST 和 nm23 在黏液性大肠癌组织中的阳性表达率分别为 52.3% 和 57.8%, 明显低于非黏液性大肠癌组织中的阳性率(64.7%, 73.0%; 均 $P < 0.05$); 而 CK7 在黏液性大肠癌组织中的阳性表达率为 27.5%, 明显高于非黏液性大肠癌组织中的阳性率(18.4%, $P = 0.033$, 图 1、表 1)。

2.2 GST、CK7、nm23 的表达与黏液性大肠癌临床病理特征的关系

将 GST、CK7、nm23 在黏液性大肠癌中的表达情况与临床特征的关系进行分析, 结果显示, CK7、nm23 的表达与患者年龄、性别、肿瘤分化程度、大小、TNM 分期、远处转移等临床特征无明显相关性, 而 GST 的表达与黏液性大肠癌的分化程度和淋巴结转移相关, 表现为在低分化的黏液性大肠癌中 GST 的表达量降低更加明显($P = 0.029$, 表 2)。按照淋巴结转移个数将黏液性大肠癌患者分为两组: ≤3 个为一组(N0 和 N1), >3 个分为另一组(N2), 发现 GST 在 N2 患者组的表达率更低(54.7% vs 45.3%, $P = 0.026$; 表 2); 但 GST 的表达与患者性别、年龄、肿瘤直径、TNM 分期、远处转移等其他临床特征无明显相关性。

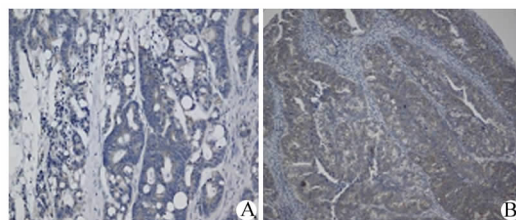


图 1 免疫组化检测 GST 蛋白在黏液性大肠癌和非黏液性大肠癌中的表达(×200)

Fig.1 Expression of GST protein in colorectal mucinous adenocarcinoma and colorectal non-mucinous adenocarcinoma tissues (×200)

A: Low expression of GST protein in colorectal mucinous adenocarcinoma tissues; B: High expression of GST in colorectal non-mucinous adenocarcinoma tissues

表1 441例非黏液性大肠癌和109例黏液性大肠癌组织中GST、CK7、nm23的表达情况[*n*(%)]

Protein		Non-mucinous adenocarcinoma	Mucinous adenocarcinoma	<i>P</i>
		(<i>N</i> = 441)	(<i>N</i> = 109)	
GST	-	156(35.4)	52(47.7)	0.017
	+	285(64.6)	57(52.3)	
CK7	-	360(81.6)	79(72.5)	0.033
	+	81(18.4)	30(27.5)	
nm23	-	119(27.0)	46(42.2)	0.002
	+	322(73.0)	63(57.8)	

表2 GST表达与黏液性大肠癌临床特征的关系[*n*(%)]

Clinical feature	GST ⁻	GST ⁺	<i>P</i>
	(<i>N</i> = 53)	(<i>N</i> = 56)	
Age (<i>t/a</i>)			0.648
≤55	14(26.4)	17(30.4)	
>55	39(73.6)	39(69.6)	
Gender			0.441
Male	29(54.7)	24(45.3)	
Female	35(62.5)	21(37.5)	
Tumor size(<i>d/cm</i>)			0.801
< median 5	14(26.4)	39(73.6)	
≥ median 5	16(28.6)	40(71.4)	
Differentiation			0.029
Poor	15(28.3)	8(14.3)	
Moderate	35(66.0)	48(85.7)	
Well	3(5.7)	0(0)	
TNM staging			0.964
I	2(3.8)	2(3.6)	
II	16(30.2)	16(28.6)	
III	24(45.3)	24(42.9)	
IV	11(20.8)	14(25.0)	
Invasion			0.927
T1	0(0)	0(0)	
T2	3(5.7)	4(7.1)	
T3	21(39.6)	23(41.1)	
T4	29(54.7)	29(51.8)	
Lymph metastasis			0.026
N0 + N1	29(54.7)	42(75.0)	
N2	24(45.3)	14(25.0)	
Distance metastasis			0.235
M0	43(81.1)	40(71.4)	
M1	10(18.9)	16(28.6)	

3 讨论

黏液性大肠癌作为结直肠癌中一种特殊的类型,其特点是细胞内部有大量黏液沉积,在基因和蛋白水平上表现为黏蛋白 MUC2 和 MUC5 的过表达^[9-10]。最近研究^[11]证实,黏液性大肠癌过表达 MUC2 蛋白是由于 MUC2 基因启动子低甲基化导致的,与非黏液性大肠癌相比,黏液性大肠癌发生微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)^[12-15]、CpG 岛甲基化^[14,16]、*BRAF* 基因突变^[12-13,17]的概率更大;另一方面,黏液性大肠癌中存在 *P53* 基因的过表达^[14]、*APC* 基因的突变^[12]、*P21* 基因的表达下调^[18];但黏液性大肠癌中关于 *K-Ras* 基因突变^[12,14]和细胞凋亡活性^[14,18]问题还存在争议。

由于独特的临床病理特征,黏液性大肠癌的研究进展一直备受人们的关注,为了更深入地了解黏液性大肠癌,本课题用免疫组化方法对临床常用肿瘤蛋白标志物 GST、CK7、nm23 的表达情况进行了分析。GST 在细胞防御机制中起到重要的作用,GST 蛋白可以促进有毒的或者致癌物质与谷胱甘肽结合,从而保护细胞内的大分子物质免受损害^[19-21]。本研究发现,在黏液性大肠癌中 GST 蛋白的表达明显降低,而且 GST 的低表达与黏液性大肠癌患者的低分化和高淋巴结转移数目(*N2*)相关,提示 GST 作为一个肿瘤标志物可能在黏液性大肠癌的发生、发展中起到关键的作用,GST 有可能成为临床上检测黏液性大肠癌淋巴结转移和分化程度的潜在分子生物学指标。CK 由 30 种不同的基因编码,这些基因可以转录成 20 种不同的多肽,上皮组织恶变后,其表达的 CK 与正常组织明显不相同,因此,CK 的表达被广泛应用于肿瘤的诊断^[22-23]。腺上皮等主要表达 I 型 CK (CK7、CK8、CK18、CK19、CK20),绝大多数来源于肺、乳腺、卵巢、胰腺、甲状腺、胆管的癌,间皮瘤、移行上皮癌都表达 CK7,只有少部分的结肠癌表达 CK7。本研究结果发现,在黏液性大肠癌中 CK7 的表达量明显上调。*nm23* 基因作为肿瘤转移抑制基因被发现,已经有研究^[24-25]证实,*nm23* 在大肠癌局部发展、浸润、转移中起负调控作用,但是关于 *nm23* 在黏液性大肠癌和非黏液性大肠癌的中相关研究尚无报道。本研究发现,在黏液性大肠癌中 *nm23* 的阳性表达率相对于非黏液性大肠癌明显降低。但是,CK7 和 *nm23* 蛋白的表达与黏液性大肠癌的临床病理特征无相关性。以上这些结果说明,黏液性大肠癌中一些抑制肿瘤发生、发展的基因及其蛋白的表达受到了抑制,这可能是造

成黏液性大肠癌相对非黏液性大肠癌更易于局部浸润和转移的原因, 该结果为研究黏液性大肠癌的治疗机制提供了新的思路。

综上所述, 本研究发现 GST、CK7、nm23 在黏液性大肠癌中存在异常表达, 并且 GST 的表达与黏液性大肠癌的分化程度和淋巴结转移密切相关, 将来有可能成为临床上检测黏液性大肠癌淋巴结转移和分化程度的潜在分子生物学指标。

[参 考 文 献]

- [1] Pande R, Sunga A, Levea C, et al. Significance of signet-ring cells in patients with colorectal cancer [J]. *Dis Colon Rectum*, 2008, 51(1): 50-55.
- [2] Papadopoulos V, Michalopoulos A, Netta S, et al. Prognostic significance of mucinous component in colorectal carcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2004, 8(6): 123-125.
- [3] Consorti F, Lorenzotti A, Midiri G, et al. Prognostic significance of mucinous carcinoma of colon and rectum: A prospective case-control study [J]. *J Surg Oncol*, 2000, 73(2): 70-74.
- [4] Farhat MH, Barada KA, Tawil AN, et al. Effect of mucin production on survival in colorectal cancer: A case-control study [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(45): 6981.
- [5] Kanemitsu Y, Kato T, Hirai T, et al. Survival after curative resection for mucinous adenocarcinoma of the colorectum [J]. *Dis Colon Rectum*, 2003, 46(2): 160-167.
- [6] Mekenkamp LJM, Heesterbeek KJ, Koopman M, et al. Mucinous adenocarcinomas: Poor prognosis in metastatic colorectal cancer [J]. *J Chemother*, 2012, 24(4): 212-216.
- [7] Verhulst J, Ferdinande L, Demetter P, et al. Mucinous subtype as prognostic factor in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. *J Clin Pathol*, 2012, 65(5): 381-388.
- [8] Morson BC, Sobin LH. *Histological typing of intestinal tumours* [C]. Geneva: World Health Organization, 1976.
- [9] Park ET, Gum JR, Kakar S, et al. Aberrant expression of SOX2 upregulates MUC5AC gastric foveolar mucin in mucinous cancers of the colorectum and related lesions [J]. *Int J Cancer*, 2007, 122(6): 1253-1260.
- [10] Grivennikov SI. Inflammation and colorectal cancer: Colitis-associated neoplasia [J]. *Semin Immunopathol*, 2012: 1-16.
- [11] Okudaira K, Kakar S, Cun L, et al. MUC2 gene promoter methylation in mucinous and non-mucinous colorectal cancer tissues [J]. *Int J Oncol*, 2010, 36(4): 765-775.
- [12] Song GA, Deng G, Bell I, et al. Mucinous carcinomas of the colorectum have distinct molecular genetic characteristics [J]. *Int J Oncol*, 2005, 26(3): 745-750.
- [13] Tanaka H, Deng G, Matsuzaki K, et al. BRAF mutation, CpG island methylator phenotype and microsatellite instability occur more frequently and concordantly in mucinous than non-mucinous colorectal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2005, 118(11): 2765-2771.
- [14] Zhang H, Evertsson S, Sun X. Clinicopathological and genetic characteristics of mucinous carcinomas in the colorectum [J]. *Int J Oncol*, 1999, 14(6): 1057-1061.
- [15] Ogino S, Giovannucci E. Commentary: Lifestyle factors and colorectal cancer microsatellite instability-molecular pathological epidemiology science, based on unique tumour principle [J]. *Int J Epidemiol*, 2012, 41(4): 1072-1074.
- [16] Enriquez J, Diez M, Tobaruela E, et al. Clinical, histopathological, cytogenetic and prognostic differences between mucinous and nonmucinous colorectal adenocarcinomas [J]. *Rev Esp Enferm Dig*, 1998, 90(8): 563-572.
- [17] Pai RK, Jayachandran P, Koong AC, et al. BRAF-mutated, microsatellite-stable adenocarcinoma of the proximal colon: An aggressive adenocarcinoma with poor survival, mucinous differentiation, and adverse morphologic features [J]. *Am J Surg Pathol*, 2012, 36(5): 744-752.
- [18] Akino F, Mitomi H, Nakamura T, et al. High apoptotic activity and low epithelial cell proliferation with underexpression of p21WAF1/CIP1 and p27Kip1 of mucinous carcinomas of the colorectum comparison with well-differentiated type [J]. *Am J Clin Pathol*, 2002, 117(6): 908-915.
- [19] Szarka CE, Pfeiffer GR, Hum ST, et al. Glutathione S-transferase activity and glutathione S-transferase mu expression in subjects with risk for colorectal cancer [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(13): 2789-2793.
- [20] Boyer TD, Kenney WC. Preparation, characterization and properties of glutathione S-transferases [J]. *J Biol Chem*, 1985, 1(16): 297-363.
- [21] Noda F, Maeda K, Lnoue T, et al. Predictive value of expression of ERCC 1 and GST-p for 5-fluorouracil/oxaliplatin chemotherapy in advanced colorectal cancer [J]. *Hepatogastroenterology*, 2012, 59(113): 130-133.
- [22] Kummar S, Fogarasi M, Canova A, et al. Cytokeratin 7 and 20 staining for the diagnosis of lung and colorectal adenocarcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(12): 1884-1887.
- [23] Lugli A, Tzankov A, Zlobec I, et al. Differential diagnostic and functional role of the multi-marker phenotype CDX2/CK20/CK7 in colorectal cancer stratified by mismatch repair status [J]. *Mod Pathol*, 2008, 21(11): 1403-1412.
- [24] Wu CS, Tung SYI, Chen PC, et al. Clinicopathological study of colorectal mucinous carcinoma in Taiwan: A multivariate analysis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 11(1): 77-81.
- [25] Molavi D, Argani P. Distinguishing benign dissecting mucin (stromal mucin pools) from invasive mucinous carcinoma [J]. *Adv Anat Pathol*, 2008, 15(1): 1-17.

[收稿日期] 2012 - 10 - 17

[修回日期] 2012 - 11 - 20

[本文编辑] 王莹