

APC、-catenin 和 c-myc 在大肠癌中的表达及其意义

戴文斌,任占平,陈蔚麟,杜娟,石喆,唐德艳

Expression and Significance of APC, -catenin and c-myc Proteins in Colorectal Carcinoma

DAI Wen-bin, REN Zhan-ping, CHEN Wei-lin, DU Juan, SHI Zhe, TANG De-yan

Department of Pathology, Liuzhou People's Hospital, Liuzhou 545001, China

Abstract :Objective To investigate the role of APC, -catenin and c-myc in the carcinogenesis and progression of colorectal carcinoma. **Methods** Expression of APC, -catenin and c-myc proteins was examined immunohistochemically in 30 cases of normal colorectal mucosa, 30 cases of colorectal adenoma, 10 cases of colorectal adenoma carcinogenesis and 50 cases of colorectal carcinoma. **Results** The positive expression rates of APC were 44.0 % and 40.0 % respectively in colorectal carcinoma and colorectal adenoma carcinogenesis, and both of the rates were significantly lower than that of colorectal adenoma (86.7 %) and normal colorectal mucosa (100 %) ($P < 0.01$). The cytoplasmic and/or nuclear -catenin expression rates were 62.0 %, 50.0 % and 30.0 % respectively in colorectal carcinoma, colorectal adenoma carcinogenesis and colorectal adenoma, and all of the rates were significantly higher than that of normal colorectal mucosa (0) ($P < 0.01$). The cytoplasmic and/or nuclear -catenin expression rate in colorectal carcinoma was significantly higher than that of colorectal adenoma ($P < 0.01$). The positive expression rates of c-myc were 56.0 %, 60.0 % and 46.7 % respectively in colorectal carcinoma, colorectal adenoma carcinogenesis and colorectal adenoma, and all of the rates were significantly higher than that of normal colorectal mucosa (0) ($P < 0.01$). The reduced membranous -catenin expression rate in colorectal carcinoma was significantly higher than that of colorectal adenoma and normal colorectal mucosa ($P < 0.01$). The reduced membranous -catenin expression was closely related with the tissue differentiation degree, the depth of invasion, lymph node metastasis and Dukes stage in colorectal carcinoma. The expression of APC was closely related with the tissue differentiation degree in colorectal carcinoma. The cytoplasmic and/or nuclear -catenin expression was thus in positive correlation with the expres-

收稿日期:2006-09-11;修回日期:2006-11-24
基金项目:广西柳州市科技攻关项目(2003 自 0217)
作者单位:545001 广西柳州市人民医院病理科
作者简介:戴文斌(1973-),男,本科,主治医师,主要从事胃肠道肿瘤研究

关性。这可能与 VEGF 增加微血管特别是毛细血管后静脉和小静脉的渗透性,加之瘤区缺乏有效的淋巴循环,导致瘤内及瘤周间质水肿,使组织间隙变宽和开放,大量组织间液在回流过程中引导瘤细胞向毛细淋巴管方向运动,最后随组织液一起进入到毛细淋巴管,最终导致淋巴道转移。

3.3 本研究结果 p65 和 VEGF 共同表达 22 例,统计学分析两者具有相关性($P < 0.05$)。提示 p65 和 VEGF 在牙龈癌生物学行为中可能有内在联系,共同促进牙龈癌的血管形成与远处侵袭转移。VEGF 本身在血管形成中的作用已较清楚,与 p65 之间的密切关系初步得以证实,但两者间相互作用机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Yu LL, Yu HG, Yu JP, et al. Nuclear factor-kappa B p65 (Re-

1A) transcription factor is constitutively activated in human colorectal carcinoma tissue[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10 (22): 3255-3260.

[2] Carsten G, Katja S, Andreas RG, et al. Luteinizing hormone-releasing hormone induces nuclear factor- κ B activation and inhibits apoptosis in ovarian cancer cells[J]. JCE M, 2000, 85 (10): 3815-3820.

[3] Aggarwal S, Takada Y, Singh S, et al. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappa B signaling[J]. Int J Cancer, 2004, 111 (5): 679-692.

[4] 刘素英. VEGF 系统与卵巢肿瘤[J]. 国外医学·妇产科学分册, 2001, 28 (4): 212-213.

[5] 王禹, 张颖超, 杨威, 等. 乳腺癌和良性乳腺疾病患者血清中 VEGF 的变化[J]. 吉林大学学报(医学版), 2005, 31 (1): 133-135.

[6] 郭翔, 曹素, 洪明晃, 等. VEGF 蛋白检测对预测鼻咽癌远处转移风险的价值[J]. 癌症, 2004, 23 (10): 1171-1175.

[编辑:安凤;校对:周永红]

sion of c-myc ($r = 0.63$, $P < 0.01$), and was in negative correlation with the expression of APC ($r = -0.39$, $P < 0.05$).

Conclusion The reduced cytoplasmic APC expression, the cytoplasmic and/or nuclear β -catenin expression, and the overexpression of c-myc may play a pivotal role in carcinogenesis and progression of colorectal carcinoma, and may be an early event. The reduced membranous β -catenin expression may be related to the invasion and metastasis of colorectal carcinoma.

Key words: Colorectal carcinoma; APC; β -catenin; c-myc

摘要:目的 探讨 APC、 β -catenin 和 c-myc 在大肠癌发生、发展中的作用。方法 采用免疫组化方法检测 30 例正常大肠黏膜、30 例大肠腺瘤、10 例大肠腺瘤恶变及 50 例大肠癌组织中 APC、 β -catenin 和 c-myc 蛋白的表达情况。结果 大肠癌和大肠腺瘤恶变 APC 阳性率分别为 44.0%、40.0%，显著低于大肠腺瘤 (86.7%) 和正常大肠黏膜 (100%) ($P < 0.01$)。大肠癌、大肠腺瘤恶变和大肠腺瘤 β -catenin 胞浆和 (或) 胞核异位表达率分别为 62.0%、50.0%、30.0%，显著高于正常大肠黏膜 (0) ($P < 0.01$)，大肠癌 β -catenin 异位表达率显著高于大肠腺瘤 ($P < 0.01$)。大肠癌、大肠腺瘤恶变、大肠腺瘤 c-myc 阳性率分别为 56.0%、60.0%、46.7%，显著高于正常大肠黏膜 (0) ($P < 0.01$)。大肠癌中 β -catenin 膜表达缺失率为 46.0%，显著高于大肠腺瘤 (10.0%) 和正常大肠黏膜 (0) ($P < 0.01$)，且与大肠癌组织分化程度、浸润深度、淋巴结转移、Dukes 分期有关。APC 蛋白表达与大肠癌组织分化程度有关。大肠癌中 β -catenin 异位表达与 c-myc 阳性表达呈正相关关系 ($r = 0.63$, $P < 0.01$)，而与 APC 阳性表达呈负相关关系 ($r = -0.39$, $P < 0.05$)。结论 APC 失表达和 (或) β -catenin 异位表达、激活癌基因 c-myc 过表达与大肠癌的发生、发展密切相关，可能是大肠癌发生的早期事件； β -catenin 膜表达缺失与大肠癌的侵袭、转移有关。

关键词: 大肠癌; APC; β -catenin; c-myc

中图分类号: R735.3 文献标识码: A

文章编号: 1000-8578(2007)10-0755-04

0 引言

大肠癌的发生、发展是一个多因素、多阶段、多基因异常改变的复杂过程。近年来，分子生物学研究发现 Wnt 信号传导通路成员各癌基因、抑癌基因的异常，激活下游相关靶基因的转录及细胞黏附分子异常与大肠癌的发生、发展密切相关，其中 β -catenin 在 Wnt 信号传导通路和细胞黏附中发挥关键作用。 β -catenin 具有双重功能，它是 Wnt 信号传导通路中的重要成员， β -catenin 介导的 Wnt 信号传导通路异常激活与大肠癌的发生关系密切，同时 β -catenin 参与的 E-cadherin/ β -catenin 复合体结构和功能异常在大肠癌的侵袭、转移中起重要作用。本研究应用免疫组化技术检测 APC、 β -catenin 及 c-myc 蛋白在正常大肠黏膜、大肠腺瘤、大肠腺瘤恶变和大肠

癌中的表达及其关系，以探讨 Wnt 信号传导通路及细胞黏附分子异常在大肠癌发生、发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 资料 随机抽取我院 1998 年 1 月 ~ 2002 年 12 月大肠癌根治性切除经病理确诊的 50 例大肠腺癌及同期手术切除和结肠镜活检并经病理确诊的 30 例大肠腺瘤，10 例大肠腺瘤恶变标本。其中取癌旁 10 cm 以上正常大肠黏膜组织 30 例作正常对照。大肠癌标本中男 27 例，女 23 例；年龄 19 ~ 81 岁，中位年龄 60.5 岁。大肠癌组织学分型，乳头状腺癌 1 例，管状腺癌 43 例，黏液腺癌 4 例，印戒细胞癌 2 例，其中高分化腺癌 11 例，中分化腺癌 22 例，低分化腺癌 17 例。已浸润至浆膜层者 37 例，未及者 13 例；伴有淋巴结转移者 13 例，无淋巴结转移者 37 例。按 Dukes 分期，A 期 11 例，B 期 26 例，C 期 9 例，D 期 4 例。大肠腺瘤标本中，管状腺瘤 19 例，混合型腺瘤 8 例，绒毛状腺瘤 3 例，腺瘤伴轻、中、重度不典型增生各 10 例。

1.2 主要试剂与免疫组化方法

1.2.1 主要试剂 浓缩型兔抗人 APC 多克隆抗体 C-20、鼠抗人 β -catenin 单克隆抗体 SC-7963、鼠抗人 c-myc 单克隆抗体 SC-40 均购自美国 Santa Cruz 公司，工作浓度分别为：1:200、1:100、1:100。Envision 试剂盒购自福州迈新公司。

1.2.2 免疫组化 所有标本均做 4 μm 连续切片，作 HE 和免疫组化染色。按 Envision 二步法进行免疫组化染色，3 种抗体孵育前，切片均经微波抗原修复，具体方法参照说明书。以 PBS 代替一抗作为阴性对照，以已知大肠癌阳性组织作为阳性对照。

1.3 结果判断 免疫组化染色阳性信号为细胞出现棕黄色细小颗粒。 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 在细胞内的分布：细胞膜 > 70% 细胞阳性为正常表达，反之为表达缺失；细胞浆或细胞核 > 10% 细胞阳性为胞浆或胞核阳性表达，胞浆或胞核表达称为异位表达；细胞膜表达缺失、胞浆或胞核表达统称为表达异常。APC 以细胞浆，而 c-myc 以细胞核 > 10% 细胞阳性为阳性表达，反之为阴性表达。

1.4 统计学处理 运用 SPSS10.0 统计软件进行 χ^2 检验和相关性检验。

2 结果

2.1 APC、 β -catenin 和 c-myc 蛋白在不同大肠组织中的表达

APC 阳性表达定位于上皮细胞浆,见图 1。-catenin 正常表达定位于上皮细胞膜,见图 2。大肠腺瘤、大肠腺瘤恶变和大肠癌组织 -catenin 胞膜表达不同程度缺失,-catenin 呈胞浆和(或)胞核异位表达,见图 3。c-myc 阳性呈胞核表达。正常大肠黏膜组织、大肠腺瘤、大肠腺瘤恶变、大肠癌组织中 APC、-catenin 和 c-myc 的表达情况,见表 1。

表 1 APC、-catenin 和 c-myc 蛋白在正常大肠黏膜组织、大肠腺瘤、大肠腺瘤恶变、大肠癌组织中的表达

组别	n	APC (%) 阳性表达	-catenin (%)		c-myc (%) 阳性表达
			异位表达	膜表达缺失	
正常大肠黏膜	30	30 (100.0)	* 0 **	0	0
大肠腺瘤	30	26 (86.7)	* 9 (30.0) &	3 (10.0)	14 (46.7)
轻度不典型增生	10	9 (90.0)	1 (10.0)	0	3 (30.0)
中度不典型增生	10	9 (90.0)	4 (40.0)	1 (10.0)	5 (50.0)
重度不典型增生	10	8 (80.0)	4 (40.0)	2 (20.0)	6 (60.0)
大肠腺瘤恶变	10	4 (40.0)	5 (50.0)	2 (20.0)	6 (60.0)
大肠癌	50	22 (44.0)	31 (62.0)	23 (46.0) #	28 (56.0)

注: * 分别与大肠腺瘤恶变、大肠癌比较, $P < 0.01$; ** 分别与大肠腺瘤、大肠腺瘤恶变、大肠癌比较, $P < 0.01$; & 与大肠癌比较, $P < 0.01$; # 分别与大肠腺瘤、正常大肠黏膜比较, $P < 0.01$; 分别与大肠腺瘤、大肠腺瘤恶变、大肠癌比较, $P < 0.01$

2.2 APC、-catenin 和 c-myc 蛋白表达与大肠癌临床病理参数的关系 见表 2。

表 2 APC、-catenin 和 c-myc 蛋白表达与大肠癌临床病理参数的关系

临床病理参数	n	APC (%)		-catenin (%)		c-myc (%)
		阳性表达		异位表达	膜表达缺失	阳性表达
组织学分型						
乳头状腺癌	1	1	(100.0)	1 (100.0)	0	1 (100.0)
管状腺癌	43	17	(39.5)	25 (58.1)	18 (41.9)	24 (55.8)
黏液腺癌	4	3	(75.0)	3 (75.0)	3 (75.0)	2 (50.0)
印戒细胞癌	2	1	(50.0)	2 (100.0)	2 (100.0)	1 (50.0)
浸润深度						
未及浆膜层	13	7	(53.8)	7 (53.8)	2 (15.4)	6 (46.2)
浸及浆膜层	37	15	(40.5)	24 (64.8)	21 (56.8) *	22 (59.5)
分化程度						
高、中分化	33	19	(57.6)	* 19 (57.6)	10 (30.3)	* 18 (54.5)
低分化	17	3	(17.6)	12 (70.6)	13 (76.5)	10 (58.8)
淋巴结转移						
有	13	7	(53.8)	9 (69.2)	10 (76.9)	8 (61.5)
无	37	15	(40.5)	22 (59.5)	13 (35.1) #	20 (54.1)
Dukes 分期						
A + B 期	37	15	(40.5)	22 (59.5)	13 (35.1)	20 (54.1)
C + D 期	13	7	(53.8)	9 (69.2)	10 (76.9)	8 (61.5)

注: * 与未及浆膜层组比较, $P < 0.05$; ** 与低分化组比较, $P < 0.01$; # 与有淋巴结转移组比较, $P < 0.01$; 与 A+B 期组比较, $P < 0.01$

2.3 APC、-catenin 和 c-myc 蛋白在大肠癌中表达的相关性 见表 3。

表 3 APC、-catenin 和 c-myc 蛋白在大肠癌中表达的相关性

蛋白表达	-catenin (异位表达)		P	c-myc		P
	+	-		+	-	
APC						
+	9	13	< 0.05	10	12	> 0.05
-	22	6		18	10	
-catenin (异位表达)						
+				25 *	6	< 0.01
-				3	16	

注: * -catenin 异位表达与 c-myc 阳性表达呈正相关, $r = 0.63$; -catenin 异位表达与 APC 阳性表达呈负相关, $r = -0.39$

3 讨论

Wnt 信号传导通路是调控细胞生长、发育和分化的重要通路,其异常激活与肿瘤的发生密切相关^[2],而 E-cadherin/-catenin 复合体是介导同型细胞间黏附的连接复合体,其在维持正常上皮的极性和完整性中起重要作用,肿瘤细胞间黏附的丧失是肿瘤侵袭、转移的关键。-catenin 是一个多功能蛋白,它在介导 Wnt 信号传导通路和细胞黏附中起中心分子作用,对肿瘤形成、分化、侵袭及转移中起重要作用。正常成熟细胞中没有 Wnt 信号,胞浆内的 -catenin 大部分与胞膜上的 E-cadherin 结合,参与同型细胞间黏附,少部分与胞浆的 APC、Axin、Gsk-3 结合形成降解复合物,最终被降解,因而胞浆的 -catenin 水平降低,不能进入细胞核。而肿瘤细胞中存在异常的 Wnt 信号传导通路,APC 或 -catenin 基因突变或蛋白结构、功能异常导致 -catenin 在胞浆内聚集,并进入细胞核内与 Tcf/Lef 结合激活相关靶基因如 c-myc、cyclinD1 等的转录,导致细胞癌变。

APC 是 Wnt 信号传导通路的重要组成分子,在 Wnt 信号传导通路中起负向调节作用,抑制其异常激活。同时,APC 作为一种抑癌基因,是大肠黏膜上皮细胞增殖中的“看门”基因,它的突变或蛋白异常与大多数散发性大肠肿瘤发生有关。王东旭等^[3]应用免疫组化技术证实在大肠腺癌及大肠腺瘤恶变中 APC 蛋白表达显著低于正常大肠黏膜,提出 APC 蛋白失表达可能与大肠癌的发生密切相关。本研究发现,APC 蛋白定位于胞浆,正常大肠黏膜均呈阳性表达,而在大肠腺瘤、大肠腺瘤恶变及大肠癌组织中其阳性表达率依次下降,在大肠腺瘤恶变时下降尤为明显,提示 APC 蛋白表达缺失可能与大

肠腺瘤的恶变密切相关,且发生于大肠癌的早期阶段。APC 蛋白失表达除与大肠癌的分化程度有一定关系以外,与大肠癌其他临床病理参数无关。作为 Wnt 信号传导通路中的正向调节分子, β -catenin 在正常大肠黏膜中呈胞膜表达,无胞浆和(或)胞核表达,而在大肠腺瘤、大肠腺瘤恶变和大肠癌中均不同程度存在异位表达和膜表达缺失,且呈逐渐升高的趋势,大肠癌异位表达率(62.0%)显著高于大肠腺瘤(30.0%)。大肠腺瘤恶变 β -catenin 异位表达率(50.0%)亦高于大肠腺瘤(30.0%),但差异无统计学意义,可能与大肠腺瘤恶变组例数较少(10 例)有一定关系。在大肠癌发生、发展的过程中,腺瘤恶变是腺瘤由良性向恶性转化的最早期阶段,我们发现 β -catenin 异位表达率在腺瘤恶变组织中显著增高,提示 β -catenin 的胞浆聚集并进入核内,导致 β -catenin 的肿瘤性活化并激活下游靶基因可能在腺瘤恶变过程中发挥关键作用,同时显示腺瘤伴中、重度不典型增生 β -catenin 异位表达率(40.0%)显著增高,提示 β -catenin 异位表达在癌变前的腺瘤中、晚阶段就已发生,可能是大肠癌发生的早期事件。 $c-myc$ 是 Wnt 信号传导通路下游的一个靶基因^[4]。本组试验结果显示,大肠腺瘤、腺瘤恶变、大肠癌中均有 $c-myc$ 过表达,以腺瘤恶变阳性率最高,而正常大肠黏膜未见阳性表达,表明 $c-myc$ 过表达在大肠癌的发生过程中是一种频发事件。此外,通过对大肠癌中 APC、 β -catenin、 $c-myc$ 表达的相关性分析发现, β -catenin 异位表达与 APC 阳性表达呈负相关关系,而与 $c-myc$ 过表达呈正相关关系,提示 APC 蛋白表达的缺失或降低可能导致 β -catenin 免于降解,游离的 β -catenin 在胞浆内聚集并进入核内, β -catenin 异位表达可能是癌基因 $c-myc$ 激活的重要原因。

细胞间黏附能力的降低是肿瘤细胞发生侵袭、转移的前提条件,介导上皮细胞黏附最主要的成分是 E-cadherin/ β -catenin 复合体,其结构和功能异常可引起肿瘤侵袭、转移。Ikeguchi 等^[5]研究发现 E-cadherin/ β -catenin 复合体的表达异常与大肠癌的侵袭与转移密切相关。我们在分析大肠癌临床病理参数与 β -catenin 胞膜表达缺失的关系中发现,大肠癌高、中分化组中 β -catenin 胞膜表达缺失率显著低于

低分化组,而浸润至浆膜层组中 β -catenin 胞膜表达缺失率显著高于未及浆膜层组,因此我们认为 β -catenin 胞膜表达缺失与大肠癌的恶性行为和去分化有一定的相关性,是大肠癌获得高增殖活性和侵袭性的原因之一。同时发现伴淋巴结转移组和 DukesC、D 期大肠癌 β -catenin 胞膜表达缺失率显著高于无淋巴结转移组和 DukesA、B 期。 β -catenin 异位表达与肿瘤侵袭、转移及预后的关系尚有不同意见。李刚等^[6]研究发现 β -catenin 异位表达、膜表达缺失与大肠癌侵袭、转移密切相关,而段光杰等^[7]认为 β -catenin 胞核异常表达与大肠癌淋巴结转移及 Dukes 分期有关。本研究结果未发现 β -catenin 异位表达与大肠癌分化、侵袭、转移及 Dukes 分期有关。因此,APC 失表达和(或) β -catenin 异位表达介导的 Wnt 信号传导通路异常激活导致大肠癌发生是早期事件,而 β -catenin 胞膜表达缺失是肿瘤获得高侵袭、转移潜能的重要原因之一,是大肠癌发生、发展过程中的晚期事件,也是判断大肠癌生物学行为的分子标记物,在预测大肠癌转移潜能,评价预后,指导临床处理有重要意义。

(本文图见第 816 页)

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] Michaelson JS, Leder P. β -catenin is a downstream effector of wnt-mediated tumorigenesis in the mammary gland[J]. *Oncogene*, 2001, 20(37): 5093-5099.
- [3] 王东旭, 苏玲, 闫晓初, 等. APC 蛋白在大肠粘膜、腺瘤及大肠腺癌中的表达[J]. *华北国防医药*, 2002, 14(4): 235-236.
- [4] Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1653(1): 1-24.
- [5] Ikeguchi M, Makino M, Kaibara N, et al. Clinical significance of E-cadherin/ β -catenin complex expression in metastatic foci of colorectal carcinoma[J]. *J Surg Oncol*, 2001, 77(3): 201-207.
- [6] 李刚, 王万里, 魏莉. E-cadherin、 β -catenin、FAK 在大肠癌的表达及其意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2005, 32(9): 542-544.
- [7] 段光杰, 闫晓初, 卞修武, 等. β -连接素和基质金属蛋白酶-7 在结直肠腺瘤-腺癌组织表达的意义[J]. *中华病理学杂志*, 2004, 33(6): 518-522.

[编辑校对:周永红]

APC、 β -catenin 和 c-myc 在大肠癌中的表达及其意义

(正文见 755 页)

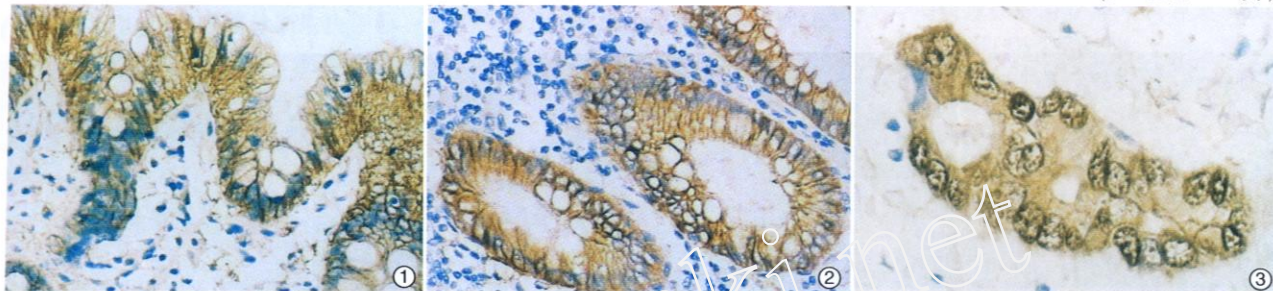


图1 APC 在正常大肠粘膜组织中胞浆阳性表达 图2 β -catenin 在正常大肠粘膜组织中胞膜阳性表达
图3 β -catenin 在大肠癌组织中胞浆和胞核表达 (均为 Envision $\times 400$)

乙酰肝素酶与大肠癌浸润、转移和血管生成的相关性

(正文见 759 页)

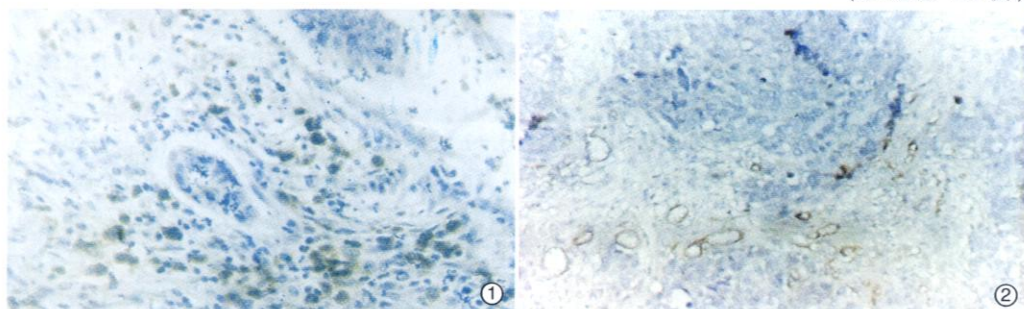


图1 乙酰肝素酶 mRNA 在大肠癌中的表达 图2 CD105 在大肠癌中的表达 (SP $\times 40$)
(原位杂交 $\times 40$)

增殖抑制基因在结直肠癌中的表达及其意义

(正文见 762 页)

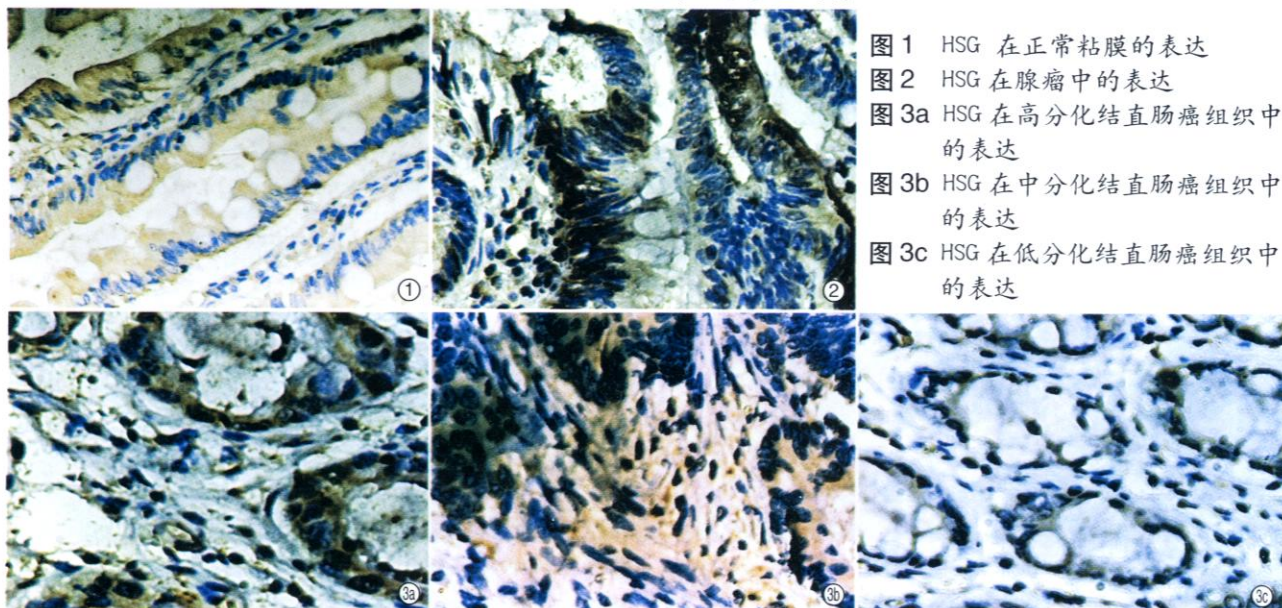


图1 HSG 在正常粘膜的表达
图2 HSG 在腺瘤中的表达
图3a HSG 在高分化结直肠癌组织中的表达
图3b HSG 在中分化结直肠癌组织中的表达
图3c HSG 在低分化结直肠癌组织中的表达