文章编号:1000-5404(2006)03-0227-04

论著

β-catenin 和 MMP-7 表达与大肠癌侵袭转移的关系研究

段光杰,阎晓初,章 容,卞修武,王清良,刘丽梅,陈春燕 (第三军医大学西南医院病理科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨β-链接素(β-catenin)和基质金属蛋白酶7(matrix metalloproteinase-7, MMP-7)表达与大肠癌侵袭转移的关系。**方法** 应用组织芯片和免疫组化技术检测β-catenin和MMP-7在25例大肠正常黏膜及200例腺癌组织的表达。**结果** 腺癌组织与正常黏膜相比β-catenin胞膜表达显著减弱,并出现明显的细胞质和/或细胞核表达,差异有显著性(均为$P<0.01$)。腺癌组织MMP-7阳性表达率为72.5%,显著高于正常黏膜16.0%($P<0.01$)。淋巴结转移阳性、Dukes C/D期腺癌组β-catenin胞膜表达率分别显著低于淋巴结转移阴性及A期组($P<0.05$)。β-catenin胞核表达率及MMP-7阳性表达率在溃疡型、淋巴结转移阳性及Dukes C/D期腺癌组分别显著高于息肉型、淋巴结阴性及A/B期组($P<0.05$, $P<0.01$)。193例大肠腺癌组织中β-catenin细胞质、细胞核表达与MMP-7阳性表达均呈正相关($r=0.319$, $r=0.290$, $P<0.01$)。**结论** 致瘤性β-catenin与MMP-7协同表达可能在大肠癌的侵袭转移过程中发挥重要作用。溃疡型与息肉型腺癌可能存在不同的生长调控机制。

关键词: 大肠癌;β-链接素;金属蛋白酶类;免疫组织化学;组织芯片
中图法分类号: R394.3; R73-37; R735.34 **文献标识码:** A

Correlation of beta-catenin and matrix metalloproteinase-7 expressions with invasion/metastasis of colorectal carcinoma

DUAN Guang-jie, YAN Xiao-chu, ZHANG Rong, BIAN Xiu-wu, WANG Qing-liang, LIU Li-mei, CHEN Chun-yan
(Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation of β-catenin and matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) expression with invasion/metastasis of human colorectal carcinoma. **Methods** The expressions of β-catenin and MMP-7 protein were detected by immunohistochemical staining in tissue microarrays including 25 cases of normal mucosa and 200 cases of colorectal adenocarcinoma. **Results** As compared with normal mucosa, the membranous expression rate of β-catenin in colorectal adenocarcinoma significantly decreased ($P<0.01$) and cytoplasmic/nuclear expression rate markedly increased ($P<0.01$). The positive expression rate of MMP-7 in adenocarcinoma was 72.5%, which was significantly higher than that in normal mucosa (16.0%, $P<0.01$). The membranous expression rates of β-catenin in adenocarcinoma with lymph node metastasis and in Dukes stage C/D were all significantly lower than that with non-lymph node metastasis and in stage A, respectively ($P<0.05$). The nuclear expression rates of β-catenin and positive expression rates of MMP-7 in adenocarcinomas of ulcerative type, with lymph node metastasis and in stage C/D were all significantly higher than that of polypoid type, with non-lymph node metastasis and in stage A/B, respectively ($P<0.05$ or $P<0.01$). Both cytoplasmic and nuclear expression of β-catenin were in positive correlation with positive expression of MMP-7 ($r=0.319$, $r=0.290$ respectively, $P<0.01$). **Conclusion** The synergetic expression of oncogenic β-catenin and MMP-7 may play an important role in the invasion/metastasis of colorectal carcinoma. There was likely different growth mechanism between the adenocarcinomas of ulcerative type and polypoid type.

Key words: colorectal carcinoma; β-catenin; metalloproteinases; immunohistochemistry; tissue microarray

近来研究表明β-链接素(β-catenin)除了参与细胞间黏附外,也是Wnt信号通路的关键因子,其突变或表达异常可能参与肿瘤的发生及进展[1,2]。基质金属蛋白酶7(matrix metalloproteinase-7, MMP-7)是该通路下游靶基因,与大肠癌的侵袭转移密切相关[3,4]。目前关于大肠癌MMP-7的研究国内报道较少,对β-catenin表达异常与肿瘤侵袭转移及预后关系的看法

作者简介:段光杰(1975-),男,云南省施甸县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事肿瘤分子病理方面的研究。电话:(023) 68765456, E-mail: dgj0225@mail.tmmu.com.cn
通讯作者:阎晓初,电话:(023) 68754432, E-mail: yxchwq@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-03-02;修回日期:2005-05-01

还不尽一致[2-6]。本研究拟采用高通量组织芯片(tissue microarray)和免疫组化技术,在严格、均一的实验条件下原位检测25例大肠正常黏膜及200例腺癌组织β-catenin、MMP-7蛋白表达,探讨二者在大肠癌侵袭转移中的作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 标本来源

采用本院1995年1月至2002年12月间手术切除的大肠腺癌标本200例,同期无任何肠道疾病的尸检大肠正常黏膜组织25例。所有标本经10%甲醛固定,石蜡包埋,各制作HE染色切片1张。

1.2 大肠腺癌组织芯片的制备

使用组织微阵列仪(Beecher,美国),具体参照文献[2]。

1.3 免疫组织化学染色

采用Envision™二步法,DAB显色,除了芯片内部的正常及癌旁黏膜作内对照外,每批染色均设外部阳性对照和阴性对照。β-catenin、MMP-7单克隆抗体工作液及Envision™试剂盒均购自Maixin公司。

1.4 结果判定

β-catenin在正常黏膜组织呈棕黄色细颗粒状表达于上皮细胞-细胞接触侧的胞膜上;记数每个点阵全部正常黏膜或癌细胞,分别从细胞膜、细胞质、细胞核3方面观察β-catenin的表达[2],以细胞膜阳性细胞数≥90%,细胞质阳性细胞数>30%,细胞核阳性细胞数>1%分别记为β-catenin细胞膜、细胞质、细胞核表达(+)。MMP-7阳性产物呈棕黄色细颗粒状表达于上皮细胞质内,根据阳性细胞染色程度及着色细胞百分率进行记分[7]:基本不着色为0分;着色淡为1分;着色深为2分。着色细胞占全部癌细胞百分率<5%为0分;5%~25%为1分;26%~50%为2分;>50%为3分。2种分值相乘≤1分为阴性(-),2~3分为弱阳性(+),≥4分为强阳性(++)。

1.5 统计学方法

应用SPSS10.0软件进行χ^2检验或Fisherman精确概率检验及相关分析。

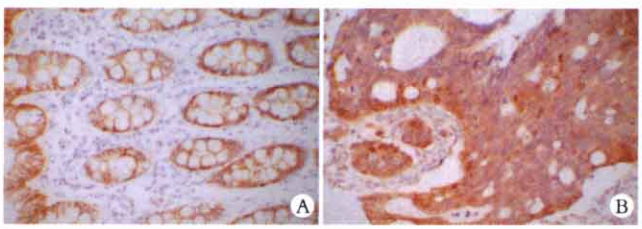
2 结果

2.1 临床病理资料

组织芯片阵列蜡块经切片HE染色观察,芯片各点阵排列整齐,厚薄均匀,染色层次分明,组织缺失和取样误差者共计7个,可供检测分析的组织包括大肠腺癌193例、正常黏膜25例。193例腺癌组织中,男性110例,女性83例;年龄25~78岁,平均53.1岁。右半结肠60例(盲肠8例,升结肠40例,横结肠12例);左半结肠133例(降结肠20例,乙状结肠25例,直肠88例)。肿瘤直径1.5~10.5 cm,平均4.0 cm。大体类型包括溃疡型100例,息肉型85例,浸润型18例。高、中、低分化腺癌分别为57、78、58例。发生淋巴结转移者82例(42.5%),远处脏器(肝、肺)转移者25例(13.0%)。按Dukes分期,A、B、C、D期分别为44、61、63、25例。

2.2 大肠黏膜及腺癌组织β-catenin、MMP-7表达

25例正常黏膜组织中,β-catenin细胞膜表达22例(88.0%),细胞质表达1例(4.0%),未见细胞核表达(图1A);腺癌组织(图1B)β-catenin细胞膜、细胞质及细胞核表达率分别为19.2%(37/193)、61.1%(118/193)、26.4%(51/193),与正常黏膜相比差异均有显著性(均为$P<0.01$)。MMP-7在正常黏膜上皮细胞多为阴性表达,少数(4/25例)呈弱阳性表达。腺癌组织(图2)MMP-7阳性表达率为72.5%(140/193),显著高于正常黏膜($P<0.01$)。



A:正常黏膜;B:腺癌

图1 大肠黏膜及腺癌正常β-catenin表达 (Envision™ ×200)

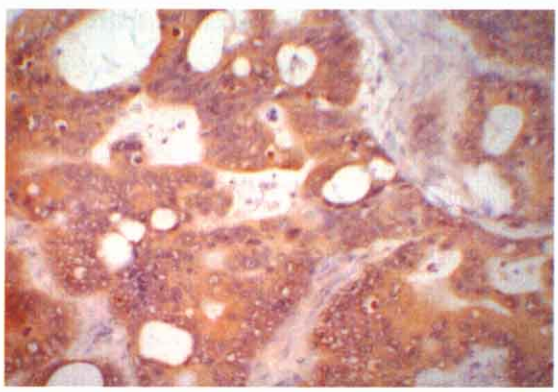


图2 大肠中分化腺癌MMP-7胞质阳性表达 (Envision™ ×200)

2.3 大肠腺癌组织β-catenin、MMP-7表达与临床病理参数的关系

淋巴结转移阳性、Dukes C/D期腺癌组β-catenin胞膜表达率分别显著低于淋巴结转移阴性及A期组(均为$P<0.05$),C、D期与B期比较β-catenin胞膜表达率差异无显著性($P>0.05$)。β-catenin细胞核表达率及MMP-7阳性表达率在溃疡型、淋巴结转移阳性及C/D期腺癌组均分别显著高于息肉型、淋巴结阴性及A/B期腺癌组($P<0.05$, $P<0.01$)。不同性别、年龄、腺癌不同部位、大小、分化程度、有无远处转移各组间以及A与B期、C与D期之间β-catenin及MMP-7表达率的差异均无显著性($P>0.05$,表1)。

2.4 大肠腺癌组织β-catenin与MMP-7表达的相关性

193例大肠腺癌组织中,β-catenin细胞质、细胞核表达阳性组MMP-7阳性表达率均显著高于β-catenin细胞质、细胞核表达阴性组,差异非常显著(均为$P<0.01$);而β-catenin细胞膜表达阳性与阴性组之间MMP-7阳性表达率差异无显著性($P>0.05$)。相关分析显示β-catenin细胞质、细胞核表达与MMP-7阳性表达均呈正相关(表2)。

表 1　193 例大肠腺癌 β-catenin 及 MMP-7 表达与临床病理参数的关系［n（%）］

参数	例数	β-catenin 表达			阳性表达
		细胞膜	细胞质	细胞核	
大体类型					
溃疡型	100	16(16.0)	68(68.0)	33(33.0)[a]	79(79.0)[a]
息肉型	75	15(20.0)	42(56.0)	13(17.3)	48(64.0)
浸润型	18	6(33.3)	8(44.4)	5(27.8)	13(72.2)
淋巴结转移					
阴性	111	27(24.3)[b]	62(55.9)	21(18.9)[b]	71(64.0)[b]
阳性	82	10(12.2)	56(68.3)	30(36.6)	69(84.1)
远处转移					
阴性	168	35(20.8)	102(60.7)	41(24.4)	119(70.8)
阳性	25	2(8.0)	16(64.0)	10(40.0)	21(84.0)
Dukes 分期					
A	44	14(31.8)	25(56.8)	7(15.9)	26(59.1)
B	61	13(21.3)	33(54.1)	11(18.0)	41(67.2)
C	63	8(12.7)[c]	44(69.8)	23(36.5)[cd]	52(82.5)[cd]
D	25	2(8.0)[c]	16(64.0)	10(40.0)[cd]	21(84.0)[cd]

a：$P<0.05$，与息肉型比较；b：$P<0.05$，与淋巴结转移阳性比较；c：$P<0.05$，与 A 期比较；d：$P<0.05$，与 B 期比较

表 2　193 例大肠腺癌组织 β-catenin 与 MMP-7 表达的关系

β-catenin 表达	例数	MMP-7 表达		r	P
		−	+/++		
细胞膜					
−	156	46	110	0.093	>0.05
+	37	7	30		
细胞质					
−	75	34	41	0.319	<0.01
+	118	19	99		
细胞核					
−	142	50	92	0.290	<0.01
+	51	3	48		

3　讨论

近年研究表明 β-catenin 作为上皮黏附复合体和 Wnt 信号通路的关键分子，具有双重作用[1]。在大肠正常黏膜组织 β-catenin 主要与细胞表面上皮型钙粘蛋白（E-cadherin，E-cad）结合，调节同型细胞间的黏附性；细胞质内微量游离的 β-catenin 通过与 APC、糖原合成激酶-3β（glycogen synthase kinase 3β，GSK-3β）及骨架蛋白（conductin/axin）组成的多蛋白复合体结合被降解[1]。当 APC 或 β-catenin 基因突变或 E-cad 表达异常时，β-catenin 由于降解障碍而在细胞质内积聚并可穿梭入核形成致瘤性 β-catenin（oncogenic β-catenin），后者可通过调控下游靶基因（c-myc、cyclinD1、MMP-7 等）的复制与转录，导致细胞癌变及侵袭表型的形成[1-4]。

目前对 β-catenin 及其通路的研究主要集中在大肠癌的发生方面[1,2,8]，对其与大肠癌侵袭转移的关系报道较少，研究结果也不尽一致。赵勇等[4]发现 β-catenin 细胞膜/细胞质/细胞核表达均与早期大肠癌侵袭深度及转移有关，细胞膜表达还与细胞分化程度有关。Cheah 等[5]对 111 例大肠癌进行免疫组化检测发现患者的高死亡率与 β-catenin 细胞核表达显著相关，而与细胞膜和细胞质表达无关。对肝细胞癌的研究却显示 β-catenin 细胞核表达的患者比无 β-catenin 细胞核表达者具有更高的生存率[6]。对存在这种差异性的原因目前尚不清楚，除了检测方法、样本选择及实验条件等存在个体差异外，推测在肝细胞癌的发生发展过程中，β-catenin 可能具有与大肠癌不同的激活机制及下游效应[5,6]。本研究显示淋巴结转移阳性及 Dukes C/D 期腺癌 β-catenin 细胞膜表达率显著降低，而细胞核表达率显著增高，提示 β-catenin 表达异常与大肠癌的侵袭转移有关，β-catenin 细胞膜表达缺失及细胞核表达者可能具有更高的侵袭能力。

β-catenin 表达异常促进大肠癌侵袭转移的确切机制还不十分清楚，研究表明 β-catenin 或 E-cad 异常均可引起 E-cad-catenin 复合体功能障碍，导致肿瘤细胞间黏附性减弱或丧失，从而有利于肿瘤细胞向局部浸润和远处转移[1,5,6]。本研究显示 β-catenin 细胞膜表达缺失者淋巴结转移率明显增高，且多为 Dukes C、D 期，可能与此有关。除了细胞黏附丧失外，致瘤性 β-catenin 促进通路下游与侵袭转移相关的靶基因表达可能也参与了大肠癌的侵袭转移[3,4]。Ougolkov 等[3]发现大肠癌浸润前沿区 β-catenin 细胞核积聚与 MMP-7 的表达正相关，二者的协同作用与大肠癌的复发、Dukes 分期和不良预后密切相关。本研究结果显示淋巴结转移阳性和 Dukes C/D 期组 β-catenin 细胞核表达率及 MMP-7 阳性表达率均显著一致性增高，提示致瘤性 β-catenin 可促进 MMP-7 表达，后者可能通过降解破坏肿瘤细胞外基质成分、促进肿瘤血管生成等方式在大肠癌局部浸润及远处转移过程中发挥重要作用。另一方面，过度表达的 MMP-7 反过来又可通过裂解 E-cad，破坏 E-cad-catenin 复合体稳定性导致癌细胞分离及 β-catenin 细胞质/细胞核的进一步积聚[9]，二者之间相互促进。这提示在肿瘤治疗上除了人工合成 MMPs 抑制剂外，阻断 β-catenin-MMP-7 信号通路的激活亦可望成为抗大肠癌侵袭转移的另一个新途径。

对不同大体类型腺癌组织的检测结果显示溃疡型腺癌 β-catenin 细胞核表达率及 MMP-7 阳性表达率均显著高于息肉型者（$P<0.05$），其原因尚不明确，根据本结果并结合文献[10]，推测两种类型的大肠癌可能存在不同的生长调控机制，隆起型的生长可能与 K-ras 基因突变导致细胞过度增殖有关，而致瘤性 β-catenin 促进靶基因 MMP-7 的过度表达导致组织酶性溶解可

能在溃疡型腺癌生长过程中起着更为重要的作用。

参考文献：

[1] NELSON W J, NUSSE R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways[J]. Science, 2004, 303(5563): 1483 - 1487.

[2] 段光杰，阎晓初，章 容，等. 应用组织芯片检测结直肠腺瘤-腺癌β-连环蛋白的表达及其意义[J]. 第三军医大学学报，2004，26(7)：587 - 590.

[3] OUGOLKOV A V, YAMASHITA K, MAI M, *et al*. Oncogenic beta-catenin and MMP-7 (matrilysin) cosegregate in late-stage clinical colon cancer[J]. Gastroenterology, 2002, 122(1): 60 - 71.

[4] 赵 勇，章必成，高建飞，等. β-连环素和基质溶素在大肠癌发生发展中的作用[J]. 第四军医大学学报，2004，25(18)：1666 - 1669.

[5] CHEAH P Y, CHOO PH, YAO J, *et al*. A survival-stratification model of human colorectal carcinomas with beta-catenin and p27kip1[J]. Cancer, 2002, 95(12): 2479 - 2486.

[6] 刘晓红，朱明华. β-连环素与肝癌的相关性研究[J]. 国外医学肿瘤学分册，2004，31(8)：627 - 630.

[7] 段光杰，阎晓初，郭德玉，等. 组织芯片及常规切片检测蛋白和基因表达的比较研究[J]. 中国新医药，2004，3(10)：22 - 25.

[8] 何渝军，刘宝华，向德兵. β-catenin 蛋白表达与大肠腺瘤癌变的关系[J]. 第三军医大学学报，2004，26(1)：78 - 80.

[9] DAVIES G, JIANG W G, MASON M D. Matrilysin mediates extracellular cleavage of E-cadherin from prostate cancer cells: a key mechanism in hepatocyte growth factor/scatter factor-induced cell-cell dissociation and *in vitro* invasion[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(10): 3289 - 3297.

[10] CHIANG J M, CHOU Y H, CHEN T C, *et al*. Nuclear beta-catenin expression is closely related to ulcerative growth of colorectal carcinoma[J]. Br J Cancer, 2002, 86(7): 1124 - 1129.

（编辑 汪勤俭）

（上接226页）

2 结果

两组达到满意控制时的各项指标见表1，两组病人在治疗前后空腹及2 h血糖比较无显著性差异（$P>0.05$），而达稳定期所需时间、胰岛素用量、低血糖发生率CSⅡ和MSⅡ组间有显著性差异（$P<0.01$）。副作用，CSⅡ组仅2例针头处皮肤发红痒，局部处理症状消失。

表1 两组治疗结果比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数	FBG(C_B mmol·L^{-1})		PBG(C_B mmol·L^{-1})		低血糖反应(例)	胰岛素用量(U/d)	达到目标时间(d)
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后			
CSⅡ	22	16.4±5.4	7.06±0.48	18.6±9.64	7.6±2.4	4	30.4±6.8	4.1±2.6
MSI	28	15.8±4.04	7.48±0.67	17.26±6.32	8.4±2.4	14	38.6±5.6	10.2±5.4
P		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01

3 讨论

糖尿病的控制与并发症的研究（DCCT）的试验和英国联邦前瞻性糖尿病研究（UKPDS）的试验研究总结，强化血糖控制是延缓和减少糖尿病并发症的关键之一[2]。本研究比较CSⅡ、MSⅡ两种短期强化治疗的结果，均能将血糖控制到理想范围，两组间治疗前后空腹及餐后血糖无差异。但持续皮下胰岛素输注（CSⅡ）效果更佳，达到血糖满意控制时间缩短，胰岛素用量少、低血糖发生少，两组相比有显著性差异（$P<0.01$）。

其优点为：①CSⅡ能模拟正常生理性的胰岛素分泌模式，24 h持续输注基础量的胰岛素，进餐前的负荷量可以及时按需补充，因进食导致胰岛素功能代强不足所需的外源性胰岛素，以防止餐后高血糖发生。②胰岛素泵通过导管向体内泵入胰岛素，根据需要随时可以补充胰岛素，减少了多次皮下注射给患者带来的不便。③胰岛素泵连续不断地向病人体内输入微量胰岛素，避免常规注射法造成的两餐间血浆中胰岛素水平退缩升高而引起的低血糖，避免夜间低血糖和预防黎明现象。④CSⅡ、MSⅡ能在更短时间内控制高血糖，达到预定的靶值，可为糖尿病病人在合并急性并发症、外伤、手术等应急情况下缩短了控制血糖的时间。⑤CSⅡ短期强化治疗控制血糖周期缩短，较快解除防高血糖对胰岛β细胞葡萄糖毒性，保护残余胰岛β细胞，可以显著改善胰岛β细胞功能，使血糖长时间维持在平稳水平。

我们随访所有用胰岛素泵短期强化治疗的22例患者6个月，有1例仅饮食控制就能控制血糖，有5例饮食控制与三甲双胍口服，其空腹及餐后血糖均能控制在正常范围，其余改为诺和灵笔芯30R早晚餐前皮下注射，6个月内血糖控制稳定。但由于我们是县级市医院，住院病人相对少，以及经济情况，患者文化素质较低，害怕使用胰岛素成瘾，观察病例较少，总之根据此次观察总结出胰岛素泵治疗糖尿病方便、快捷、高效。虽然费用相对较高，但临床上我们可以在发病早期短期使用，能很快控制血糖，缩短住院时间，也能相对节省部分费用，值得基层医院推广。

关键词：胰岛素泵；多次胰岛素注射；糖尿病

中图法分类号：R587.105 文献标识码：B

参考文献：

[1] 刘新民. 实用内分泌学[M]. 第2版. 北京：人民军医出版社，1997：301.

[2] DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRAIL RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus[J]. N Engl J Med, 1993, 329(14): 977 - 986.

（编辑 张大春）