文章编号:1000-5404(2005)23-2363-03

论著

人类大肠癌 SSTR2 mRNA 表达及其与细胞增殖相关性研究

代远斌,曾希志,向 志 (重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016)

提 要:目的 了解人类大肠癌组织中生长抑素受体亚型2(SSTR2)mRNA的表达情况,并探讨其与细胞增殖的关系。**方法** 收集60例大肠癌标本,采用多相寡核苷探针原位杂交法检测SSTR2 mRNA表达,免疫组化法检测增殖细胞核抗原(PCNA)表达,并用图像分析仪进行SSTR2 mRNA相对含量测定。**结果** SSTR2 mRNA在早期和分化好的大肠癌表达的阳性率和相对含量均明显高于晚期和分化差的病变,并发现大肠癌SSTR2 mRNA表达与PCNA表达呈负相关($P<0.05$)。**结论** SSTR2 mRNA表达与大肠癌的分化程度和临床分期有关;SSTR2 mRNA是阻滞肿瘤细胞增殖的因素之一,对大肠癌具有反映恶性程度及估计预后的价值。

关键词:大肠癌;生长抑素受体;增殖细胞核抗原
中图法分类号:R329.28;R394.2;R735.34 **文献标识码**:A

SSTR2 mRNA expression and correlation with proliferating cell nuclear antigen in human colorectal cancer

DAI Yuan-bin, ZENG Xi-zhi, XIANG Zhi (Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To investigate somatostatin receptor subtype 2 (SSTR2) mRNA expression and its correlation with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in human colorectal cancer. **Methods** A total of 60 colorectal cancer samples were analyzed. The SSTR2 mRNA expression was examined by *in situ* hybridization (ISH) using multiphase oligoprobes. The PCNA were detected by immunohistochemical staining. A computerized image analysis system was utilized to estimate the relative contents of SSTR2 mRNA. **Results** The positive rate of expression of SSTR2 mRNA and relative contents in early and well-differentiated colorectal cancer were higher than those in advanced and poorly differentiated lesion. A negative correlation between SSTR2 mRNA expression and PCNA was found in colorectal cancer. **Conclusion** In the samples of colorectal cancer, the expression of SSTR2 mRNA is correlated with the degree of differentiation and clinical stage, and it plays an important role in reflecting the degree of malignancy and prognosis.

Key words: colorectal cancer; somatostatin receptor; proliferating cell nuclear antigen

生长抑素(somatostatin, SST)是一种在体内广泛分布的多肽类激素,其生物学功能主要表现为抑制作用。近年来的研究表明,SST及其结构类似物能够抑制许多实体肿瘤如大肠癌、胰腺癌、肝癌等的生长,其抑制肿瘤细胞分裂增殖的直接机制是通过肿瘤细胞表面的生长抑素受体(somatostatin receptor, SSTR)介导的[1,2],因此肿瘤细胞有无SSTR基因表达是影响SST疗效的重要因素。现已克隆出5种SSTR亚型,其中2型受体(SSTR2)被认为与肿瘤的关系最为密切[3,4]。为此,作者采用多相寡核苷酸探针的原位杂交技术,检测不同临床分期和分化程度的60例人类大肠癌组织SSTR2受体mRNA的表达,并探讨其与增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)表达的关系。

1 材料与方法

1.1 组织来源

收集1999年1月至2000年9月在重庆医科大学临床学院住院60例手术切除的大肠癌组织标本,均经病理组织学证实,

作者简介:代远斌(1963-),男,重庆市人,副主任医师,副教授,主要从事普外科、血管外科方面的研究。电话:(023)89011013

收稿日期:2005-06-28;修回日期:2005-10-20

其中黏液腺癌14例,低分化腺癌12例,中分化腺癌20例,高分化腺癌14例。按临床Dukes分期标准:A期11例,B期16例,C期28例,D期5例。标本用10%中性甲醛固定,常规石蜡包埋、切片厚5 μm,置于用APES防脱处理的载玻片上。

1.2 SSTR2 mRNA原位杂交

1.2.1 试剂来源 SSTR2 mRNA原位杂交检测试剂盒,购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2.2 探针设计 采用三相寡核苷酸探针技术以提高原位杂交的敏感性。根据寡核苷酸探针设计原则,选择SSTR2 mRNA序列的外显子中119~148、548~577、941~970位3段碱基作为结合序列。探针序列为:①5′-AGATGAACGTGAGGACGGCGTTGCTTGTCA-3′; ② 5′-AGCTGCTTCTGCCCCACTGGTTGCTCCGGA-3′; ③ 5′-GGAAGCTCTTCTTGAAGTTGTCAGACAAGA-3′。探针应用3′-末断地高辛标记。

1.2.3 染色步骤 ①石蜡切片常规二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化,3% H_2O_2 室温处理10 min以灭活内源性过氧化物酶;②切片上滴加胃蛋白酶,37 ℃消化25 min;③ 0.5 mol/L PBS洗15 min;④杂交:按每张切片加20 μl含寡核苷酸探针的原位杂交液,恒温箱37 ℃杂交过夜;⑤杂交后洗涤:2×SSC洗涤15 min;⑥滴加封闭液:37 ℃ 15 min;⑦滴加兔抗地高辛:37 ℃ 60 min;⑧滴加生物素化羊抗兔IgG;⑨滴加SABC;⑩DAB显色;⑪苏木精轻度复染,显微镜观察。

1.2.4 结果判断 细胞浆呈棕黄色为SSTR2 mRNA原位杂交阳性,以阳性细胞≥20%定为阳性;并采用CM-2000B生物医学图像分析系统(北京航空航天大学研制),测定阳性反应物的平均光密度(MOD),以之代表SSTR2 mRNA的相对含量。

1.3 PCNA免疫组化检测

1.3.1 方法 采用链霉菌抗生物素-过氧化酶连结法(S-P法)。

1.3.2 试剂 S-P试剂盒购自福州迈新生物开发公司;所用一抗为Maxim Biotech公司产品。

1.3.3 步骤 按照试剂盒说明书进行操作,均用DAB显色,苏木精轻度复染后,显微镜观察。

1.3.4 结果判断 PCNA阳性者为细胞核内有棕黄色颗粒,以阳性细胞数≥20%定为阳性。

1.4 统计学分析

SSTR2 mRNA相对含量,用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验;阳性率间的比较用 χ^2 检验,SSTR2 mRNA与PCNA表达的相关性用四格表的确切概率法。

2 结果

2.1 不同Dukes分期大肠癌SSTR2 mRNA、PCNA的表达

本组60例大肠癌SSTR2 mRNA总阳性率为58.3%(35/60),PCNA总阳性率为63.3(38/60)。各期大肠癌SSTR2 mRNA阳性率和相对含量(MOD)、PCNA阳性率见表1。按A、B、C、D期顺序,SSTR2 mRNA阳性率与MOD均呈递减趋势,阳性率比较在A期与B期差异无显著性($P>0.05$),而A期与C期、A期与D期、C期与B期、D期与B期、C期与D期差异均有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$),A期+B期与C期+D期差异有统计学意义($P<0.01$);相对含量比较在A期与B期、B期与C期、C期与D期差异均有显著性($P<0.05$)。PCNA阳性率按A、B、C、D期顺序递增,各组间两两比较差异有显著性($P<0.05$,$P<0.01$)。

表1 各期大肠癌SSTR2 mRNA、PCNA的表达

Tab 1 The expression of SSTR2 mRNA, PCNA in colorectal cancer in various stages

Dukes' staging	n	SSTR2 mRNA +n(%)	SSTR2 mRNA MOD($\bar{x}\pm s$)	PCNA +n(%)
A	11	8(72.7)	0.48±0.15	5(45.5)
B	16	11(68.8)	0.41±0.13	9(56.3)
C	28	14(50.0)	0.36±0.11	20(71.4)
D	5	2(40.0)	0.26±0.10	4(80.0)

2.2 不同分化程度的大肠癌SSTR2 mRNA、PCNA表达

结果见表2,按大肠腺癌低、中、高分化顺序,SSTR2 mRNA阳性率和MOD递增,而PCNA阳性率呈递减,差异均有显著性($P<0.05$,$P<0.01$)。

表2 不同分化程度的大肠癌SSTR2 mRNA、PCNA表达

Tab 2 The expression of SSTR2 mRNA, PCNA in colorectal cancer in different degree of differentiation

Degree of differentiation	n	SSTR2 mRNA +n(%)	SSTR2 mRNA MOD($\bar{x}\pm s$)	PCNA +n(%)
Low	12	5(41.7) **	0.29±0.11 *	9(75.0) **
Middle	20	12(60.0)	0.38±0.14	11(55.0)
High	14	11(78.6) **	0.47±0.16 *	6(42.9) *

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* middle

2.3 大肠癌组织SSTR2 mRNA与PCNA表达的关系

如表3所示,可见大肠癌组织中SSTR2 mRNA表达与PCNA表达呈显著负相关($P<0.05$)。

表3 大肠癌组织SSTR2 mRNA与PCNA表达的关系[例数(%)]

Tab 3 Relationship between SSTR2 mRNA, PCNA expression in colorectal cancer [case(%)]

	n	SSTR2 mRNA(+)	SSTR2 mRNA(−)
PCNA(+)	38	15(39.5)	23(60.5)
PCNA(−)	22	20(90.9)	2(9.1)

3 讨论

生长抑素及其类似物通过SSTR相关亚型的介导

具有多种多样的生理与药理作用，包括经细胞内信号传导系统，使靶器官出现分泌受抑、分化停止、生长延缓、血流减少、代谢降低和运动减弱[2,5]，以及通过直接或间接作用抑制肿瘤细胞增殖和诱导其凋亡等[1,4,6,7]。SSTR 属 G 蛋白耦联受体（G-protein-coupled receptors，GPRs），当其与配体结合而激活后，通过与百日咳毒素敏感的 G 蛋白介导特异性细胞内效应系统，不同 SSTR 亚型介导的信号途径可能不同[8,9]。SSTR 各亚型表达具有组织特异性，1995 年 Vikic 等以类癌和结肠癌为对象检测了 SSTR 的表达，发现 SSTR2 的表达在待测肿瘤组织中仅 2 例阴性，并认为肿瘤组织中所表达的 SSTRs 以 SSTR2 为主。1996 年 Buscail 等发现，正常结肠和结肠良性肿瘤组织、50% Dukes B 期、20% C 期的结肠癌组织中均可检测到 SSTR2 mRNA，而在 Dukes 分期 D 期的结肠癌及其转移结节中则无 SSTR 表达。2001 年 Pinzani 等[10]采用定量 RT-PCR 方法，没有发现 SSTR2 mRNA 在结肠癌与正常结肠黏膜的差异。为进一步明确 SSTR2 mRNA 表达在大肠癌中的表达特性，我们应用多相寡核苷酸探针技术，对不同临床分期和分化程度大肠癌病变的 SSTR2 受体亚型 mRNA 表达进行原位杂交检测，具有较高的敏感性和特异性。结果显示，60 例大肠癌 SSTR2 mRNA 总阳性率为 58.3%（35/60），按 Dukes 分期 A、B、C、D 期的顺序，SSTR2 mRNA 的阳性率与相对含量依次递减，提示 SSTR2 是机体阻滞肿瘤进展的一个环节，缺乏 SSTR2 比表达 SSTR2 的肿瘤细胞更具生长优势。按低、中、高分化的顺序，SSTR2 mRNA 阳性表达和相对含量依次递增，说明 SSTR2 在分化好、恶性程度低的大肠癌中比分化差、恶性程度高者表达高。Foekens 等在对乳腺癌的研究中也有类似结果，提示 SSTR2 可以作为大肠癌细胞分化的标志物。本研究结果表明，随着大肠癌的进展与分化程度的降低，SSTR2 mRNA 的表达会逐渐下降，提示 SST 类似物对晚期病变可能无效。

增殖细胞核抗原（PCNA）是一种 36×10^3 的核蛋白，是 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白，是 DNA 复制的必需物质，其含量与细胞增殖状况密切相关，是检测肿瘤细胞增殖动力学的有效指标。本研究结果显示，按高、中、低分化程度的顺序，PCNA 阳性率依次增高，按 Dukes 分期 A、B、C、D 期的顺序，PCNA 的阳性率依次递增，表明大肠癌 PCNA 的表达与肿瘤细胞分化程度和临床分期有关，是预后判断的重要指标。我们对 SSTR2 mRNA 与 PCNA 表达的相关分析发现，大肠癌 SSTR2 mRNA 表达与 PCNA 表达呈显著负相关，即存在反变关系，表明 SSTR2 mRNA 是抑制肿瘤细胞增殖的因素之一。因此，我们认为 SSTR2 mRNA 对大肠癌具有反映恶性程度及估计预后的价值。

参考文献：

[1] Pollak M N, Schally A V. Mechanisms of antineoplastic action of somatostatin analogs[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1998, 217(2): 143 - 152.

[2] Guillermet Guibert J, Lahlou H, Pyronnet S, *et al*. Somatostatin receptors as tools for diagnosis and therapy: Molecular aspects[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2005, 19(4): 535 - 551.

[3] Rochaix P, Delesque N, Esteve J P, *et al*. Gene therapy for pancreatic carcinoma: local and distant antitumor effects after somatostatin receptor sst2 gene transfer[J]. Hum Gene Ther, 1999, 10(6): 995 - 1008.

[4] Smitha M C, Maggi M, Orlando C. Somatostatin receptors in non-endocrine tumours[J]. Dig Liver Dis, 2004, 36(Suppl 1): S78 - S85.

[5] Viguerie N, Tahiri Jouti N, Esteve J P, *et al*. Functional somatostatin receptors on rat pancreatic acinar cell line[J]. Am J Physiol, 1998, 255(1 Pt 1): G113 - G120.

[6] Sharma K, Srikant C B. Induction of wild-type p53, bax, and acidic endonuclease during somatostatin-signaled apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells[J]. Int J Cancer, 1998, 76(2): 259 - 266.

[7] Thangaraju M, Sharma K, Liu D, *et al*. Interdependent regulation of intracellular acidification and SHP-1 in apoptosis[J]. Cancer Res, 1999, 59(7): 1649 - 1654.

[8] Keri G, Erchegyi J, Horvath A, *et al*. A tumor-selective somatostatin analog(TT-232) with strong *in vitro* and *in vivo* antitumor activity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(22): 12513 - 12518.

[9] Charland S, Boucher M J, Houde M, *et al*. Somatostatin inhibits Akt phosphorylation and cell cycle entry, but not p42/p44 mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in normal and tumoral pancreatic acinar cells[J]. Endocrinology, 2001, 142(1): 121 - 128.

[10] Pinzani P, Orlando C, Raggi C C, *et al*. Type-2 somatostatin receptor mRNA levels in breast and colon cancer determined by a quantitative RT-PCR assay based on dual label fluorogenic probe and the TaqMan technology[J]. Regul Pept, 2001, 99(2 - 3): 79 - 86.

（编辑　薛国文）