文章编号:1000-5404(2011)12-1243-03

论著

大肠癌淋巴管生成与β-连环素异位表达的关系

牟江洪[1],向德兵[1],周 琪[2],吴 峰[3],阎晓初[3],肖华亮[1],林 俐[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科[1];408000 重庆,涪陵中心医院肿瘤科[2];400038 重庆,第三军医大学西南医院病理学研究所[3])

【摘要】 **目的** 探讨大肠癌淋巴管生成情况与β-连环素(β-catenin)的关系。**方法** 应用淋巴管特异标记物podoplanin检测96例大肠癌及正常大肠的淋巴管密度,以CD31标记血管作对比研究;免疫组化S-P法检测大肠癌β-catenin的表达。**结果** 正常大肠黏膜β-catenin呈细胞膜阳性表达,大肠癌β-catenin主要呈细胞核和/或细胞质的异位表达,异位表达率为67.71%;大肠癌微淋巴管密度(microlymphatic density,MLD)显著高于正常大肠组织($t=3.624$,$P<0.01$);大肠癌β-catenin异位表达组MLD显著高于非异位表达组($t=2.843$,$P<0.01$)。**结论** 大肠癌β-catenin异位表达可能是诱导大肠癌淋巴管生成的重要原因。

【关键词】 淋巴管生成;β-catenin;微淋巴管密度;肠肿瘤
【中图法分类号】 R754.34;R394.2;R730.23 【文献标志码】 A

Correlation between lymphangiogenesis and ectopic expression of β-catenin in colorectal cancer

Mou Jianghong[1], Xiang Debing[1], Zhou Qi[2], Wu Feng[3], Yan Xiaochu[3], Xiao Hualiang[1], Lin Li[1] ([1]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2]Department of Oncology, Fuling Central Hospital, Chongqing, 408000; [3]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the correlation between lymphangiogenesis and ectopic expression of β-catenin in colorectal cancer (CRC). **Methods** Microlymphatic density (MLD) in 96 cancer tissues of CRC patients and their normal large intestine samples was detected with the specific lymphatic marker, podoplanin, and comparatively studied using CD31 as a marker of blood vessels. Expression of β-catenin in CRC was detected with the immunohistochemical S-P method. **Results** β-catenin was positively expressed in cell membrane of normal large intestine mucosa and ectopically expressed in cell nuclei and/or cytoplasm in tumor cells, with an ectopic expression rate of 67.71%. The MLD was significantly higher in CRC than in normal large intestine mucosa ($t=3.624$, $P<0.01$) and in CRC with ectopic β-catenin expression than in CRC without ectopic β-catenin expression ($t=2.843$, $P<0.01$). **Conclusion** Ectopic expression of β-catenin in CRC may be the major reason of lymphangiogenesis.

【**Key words**】 lymphangiogenesis; β-catenin; microlymphatic density; intestinal neoplasm

Supported by National Natural Science Foundation of China (30801096). Corresponding author: Mou Jianghong. Tel: 86-23-68757649, E-mail: mjh945@hotmail.com

大肠癌的发生、发展中,大约90%的大肠癌存在Wnt/β-catenin信号通路的异常激活,并进一步启动多种下游靶基因转录(如c-myc、cyclinD1、NF-κB、COX-2、MMP等)起重要作用[1-3]。人体大多数癌的早期播散主要是通过淋巴管向局部淋巴结转移,大肠癌局部淋巴结转移尤其常见。业已证实大肠癌组织存在较丰富的新生淋巴管[4],但是其与β-catenin信号通路是否有关联尚不清楚。本实验旨在探讨大肠癌淋巴管生成与β-catenin表达的关系,拓展β-catenin功能,为潜在的靶向β-catenin信号通路的分子、基因治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料

采用大坪医院1996年6月至1998年3月手术根治的大肠癌标本96例,所有患者均未进行术前放化疗。大肠癌诊断均经术后病理证实,取距离肿瘤至少5 cm的大肠组织作为对照

【基金项目】 国家自然科学基金(30801096)
【通信作者】 牟江洪,电话:(023)68757649,E-mail:mjh945@hotmail.com

标本。所有标本经常规固定、脱水、浸蜡,石蜡包埋,4 ℃保存。

1.2 主要试剂

一抗:鼠抗人 β-catenin(1∶200)单克隆抗体为 Novus Bio 公司产品;鼠抗人 podoplanin(1∶200)单克隆抗体为 AngioBio 公司产品;鼠抗人 CD31 单克隆抗体(即用型工作液)、S-P 试剂盒和 DAB 显色系统为北京中杉生物有限公司产品。

1.3 实验方法

石蜡包埋标本 4 μm 厚度连续切片,贴附于涂布 APES 涂片剂的防脱玻片,常规脱蜡、水化、胰酶消化和微波抗原修复后行免疫组化染色。S-P 法染色操作步骤参照试剂盒说明。已知的 β-catenin、podoplanin、CD31 阳性表达的大肠癌组织作为阳性对照,PBS 替代一抗作为阴性对照。

1.4 结果判断

①微淋巴管和血管密度(MLD、MVD):参照 Ohno[5] 和 Weidner 等[6] 的方法,以细胞质呈棕黄色细颗粒状的单个内皮细胞或内皮细胞簇计为 1 个微淋巴管或微血管。低倍镜下选取组织中脉管最丰富的区域(即"hot spot")为计数区域,再在 200×(0.74 mm^2)、400×(0.16 mm^2)视野下分别计数 MLD 和 MVD,每例重复 3 个视野,计算其均值即为该病例的 MLD 和 MVD。②β-catenin 结果判定:β-catenin 免疫组化染色阳性物质呈棕黄色细颗粒状,染色结果判断标准参照 Maruyama 等[7] 的方法,细胞质和/或细胞核阳性表达的细胞数 > 10% 定义为 β-catenin 异位表达阳性。

1.5 统计学分析

所有计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 对数据进行统计学分析,组间计量资料差异显著性采用 t 检验。

2 结果

2.1 大肠癌 β-catenin 表达

正常大肠组织中 β-catenin 免疫组化阳性产物定位于黏膜上皮细胞细胞膜,而大肠癌组织中 β-catenin 细胞膜表达不同程度缺失,主要呈大肠癌细胞质和/或细胞核异位表达,见图 1A。大肠癌 β-catenin 异位表达率为 67.71%。

2.2 大肠癌 MLD 和 MVD

Podoplanin 是淋巴管内皮细胞的特异标记物,免疫组化的阳性产物定位于淋巴管内皮细胞膜和细胞质,呈棕黄色细颗粒状,大肠癌淋巴管管腔内时常可见癌栓形成,见图 1B。大肠癌组织中的淋巴管分布不均匀,表现为肿瘤边缘区 MLD > 肿瘤浅表区 MLD > 肿瘤中心区 MLD,参照文献[5]以密度最高的肿瘤边缘区 MLD 作为大肠癌 MLD,其均值经 t 检验分析,显著高于正常大肠组织 MLD($t = 3.624$, $P < 0.01$)。大肠癌组织中血管内皮细胞的细胞膜和细胞质呈 CD31 阳性表达,见图 1C,其分布特点与淋巴管类似。大肠癌 MVD 显著高于正常大肠组织 MVD($t = 3.552$, $P < 0.01$)。

2.3 大肠癌 β-catenin 异位表达与 MLD/MVD 的关系

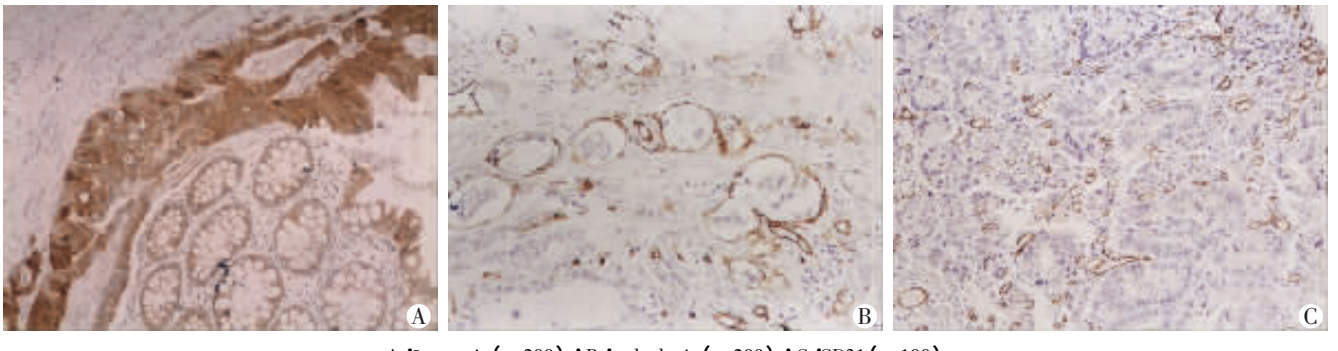
将 96 例大肠癌标本按有无 β-catenin 细胞质和/或细胞核表达,分为 β-catenin 异位表达组和非异位表达组,采用 t 检验比较组间 MLD 和 MVD 的差异,结果显示,大肠癌 β-catenin 异位表达组 MLD[(59.8 ± 23.2) *vs* (39.7 ± 20.1), $t = 2.843$, $P < 0.01$]和 MVD[(67.3 ± 26.5) *vs* (49.7 ± 21.7), $t = 2.717$, $P < 0.01$]均显著高于 β-catenin 非异位表达组。

3 讨论

经典的 Wnt/β-Catenin 信号通路是目前已知的作为胚胎发育所必需的信号通路之一[8]。同时,在多种肿瘤的发生、发展中该通路也占据着重要的地位[1],尤其在大肠癌的发生、发展中,大约 90% 的大肠癌存在 Wnt/β-catenin 信号通路的异常激活[2-3]。

正常成熟细胞细胞质内的 β-catenin 大部分与细胞膜上的钙粘蛋白(cadherin)结合介导同型细胞间黏附,少部分与细胞质内腺瘤性结肠息肉病(adenomatous polyposis coli,APC)蛋白、糖原合成酶激酶-3β(glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β)及轴蛋白(axin)结合成多蛋白复合体,其中 APC 蛋白作为载体将 β-catenin 与 GSK-3β 联系起来,GSK-3β 通过磷酸化可降解 β-catenin,因而细胞质内游离的 β-catenin 水平极低,不能进入细胞核调控相应基因表达。

在多种肿瘤细胞中,β-catenin 基因(CTNNB1)或 APC 基因突变,使 β-catenin 降解障碍,在细胞质内异常积聚,达到一定浓度后与 T 细胞因子-4(T-cellfactor-4,



A:β-catenin(×200);B:podoplanin(×200);C:CD31(×100)

图 1 大肠癌免疫组化染色观察 (S-P)

Tcf-4）结合成复合物，然后穿梭入核内，激活下游靶基因（如c-myc、cyclin D1、PPAR等），从而启动肿瘤生长程序[9]。β-catenin的这种信号传导功能与多种肿瘤的发生、发展有关。

令我们感兴趣的是，β-catenin信号通路通过调控VEGF对血管生成具有重要的作用。Katoh[10]和Easwaran等[11]在评估β-catenin信号通路是否调控血管生成时，分析了一系列与血管生成有关的基因启动子是否含有β-catenin/Tcf-4复合体的结合位点。令人惊讶的是，他们都发现VEGF基因启动子含有β-catenin/Tcf-4复合体的结合位点，所不同的是前者认为含有1个结合位点，而后者认为含有7个一致的结合位点。进一步的实验[11-12]发现，正常结肠上皮细胞或骨骼肌细胞转染激活的β-catenin后，VEGF mRNA和蛋白水平上调了2.5~3倍；而高表达β-catenin的结肠癌细胞采用RNAi干扰后，VEGF水平下降了一半以上。采用GSK-3β抑制剂LiCl或SB216763，抑制GSK-3β活性而降低β-catenin降解所引起的β-catenin细胞质聚集和核转位，同样可以上调VEGF表达，增加毛细血管密度[13]。随后，一系列的研究还证实多种癌基因或化学因子（比如K-ras、环氧合酶以及其衍生物PGE2、人参皂甙Rg1等）都可以通过β-catenin信号通路（增加β-catenin表达或降低β-catenin降解）调节VEGF表达，参与血管生成；而采用β-catenin RNAi干扰或选择性的β-catenin/Tcf-4结合位点突变则可以抑制这种作用[14-16]。这些研究结果提示β-catenin信号通路可能直接调控下游VEGF基因表达，影响血管生成。本实验结果显示大肠癌β-catenin异位表达组MVD显著高于β-catenin非异位表达组，也证实了上述观点。

但是，β-catenin信号通路与淋巴管生成的关系，国内外尚未见明确报道。鉴于淋巴管生成与血管生成存在类似之处，我们猜测上述β-catenin信号通路调控血管生成的机制可能也存在于淋巴管生成中。本实验显示，大肠癌β-catenin异位表达组MLD显著高于β-catenin非异位表达组，提示β-catenin可能参与调控大肠癌淋巴管生成，但是其具体调控机制和作用位点还有待于进一步研究和证实。这对于进一步解释肿瘤淋巴管生成的机制以及为抗肿瘤淋巴管生成治疗提供理论和实验依据将起到重要的作用。

参考文献：

[1] Liu F, Millar S E. Wnt/beta-catenin signaling in oral tissue development and disease[J]. J Dent Res, 2010, 89(4): 318-330.

[2] Katoh M. Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis[J]. Stem Cell Rev, 2007, 3(1): 30-38.

[3] Pishvaian M J, Byers S W. Biomarkers of WNT signaling[J]. Cancer Biomark, 2007, 3(4/5): 263-274.

[4] Duff S E, Jeziorska M, Kumar S, *et al*. Lymphatic vessel density, microvessel density and lymphangiogenic growth factor expression in colorectal cancer[J]. Colorectal Dis, 2007, 9(9): 793-800.

[5] Ohno M, Nakamura T, Kunimoto Y, *et al*. Lymphagenesis correlates with expression of vascular endothelial growth factor-C in colorectal cancer[J]. Oncol Rep, 2003, 10(4): 939-943.

[6] Weidner N. Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication[J]. Semin Diagn Pathol, 1993, 10(4): 302-313.

[7] Maruyama K, Ochiai A, Akimoto S, *et al*. Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer[J]. Oncology, 2000, 59(4): 302-309.

[8] 张翠萍，陈鹏，付小兵，等. Wnt/β-catenin信号通路活化对人表皮细胞表型变化的影响[J]. 第三军医大学学报，2010，32(16)：1716-1719.

[9] 赖庆梧，彭旭，谭江琳，等. ITGB4BP对Wnt/β-catenin信号通路活性的下调作用[J]. 第三军医大学学报，2010，32(18)：1945-1948.

[10] Katoh Y, Katoh M. Comparative integromics on VEGF family members[J]. Int J Oncol, 2006, 28(6): 1585-1589.

[11] Easwaran V, Lee S H, Inge L, *et al*. beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer[J]. Cancer Res, 2003, 63(12): 3145-3153.

[12] Kim K I, Cho H J, Hahn J Y, *et al*. Beta-catenin overexpression augments angiogenesis and skeletal muscle regeneration through dual mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell proliferation and progenitor cell mobilization[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(1): 91-98.

[13] Kaga S, Zhan L, Altaf E, *et al*. Glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin promotes angiogenic and anti-apoptotic signaling through the induction of VEGF, Bcl-2 and survivin expression in rat ischemic preconditioned myocardium[J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 40(1): 138-147.

[14] Li J, Mizukami Y, Zhang X, *et al*. Oncogenic K-ras stimulates Wnt signaling in colon cancer through inhibition of GSK-3beta[J]. Gastroenterology, 2005, 128(7): 1907-1918.

[15] Shao J, Jung C, Liu C, *et al*. Prostaglandin E2 Stimulates the beta-catenin/T cell factor-dependent transcription in colon cancer[J]. J Biol Chem, 2005, 280(28): 26565-26572.

[16] Leung K W, Pon Y L, Wong R N, *et al*. Ginsenoside-Rg1 induces vascular endothelial growth factor expression through the glucocorticoid receptor-related phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and beta-catenin/T-cell factor-dependent pathway in human endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2006, 281(47): 36280-36288.

（收稿：2010-11-20 修回：2011-01-29）

（编辑 栾 嘉）