论著

文章编号:1000-5404(2014)04-0336-04

2型脯氨酸羟化酶在结直肠癌中的表达及临床意义

周荣斌,周 杰,吴 双,谢赣丰,彭 媛,梁后杰 (400038 重庆,第三军医大学西南医院肿瘤科)

[摘要] **目的** 检测脯氨酸羟化酶(proline hydroxylase domain 2, PHD2)在结直肠癌及癌旁肠黏膜中的表达,探讨分析其临床意义。**方法** 应用组织芯片技术结合免疫组化法检测本校3所附属医院收治的结直肠癌患者术后149例组织标本以及相应50例癌旁肠黏膜和50例结直肠癌原发及转移灶中PHD2蛋白的表达。**结果** PHD2在149例结直肠癌组织中阳性表达率显著低于癌旁肠黏膜(48.9% *vs* 72.0%, $P<0.01$),并与肿瘤的分化程度、临床分期、转移等密切相关($P<0.01$);在50例结直肠癌原发灶中阳性表达率高于相应转移灶(64.0% *vs* 46.0%, $P<0.01$)。**结论** PHD2在结直肠癌组织中表达低于癌旁肠黏膜,在结直肠癌原发灶中表达高于相应转移灶,在结直肠癌的恶性进展中发挥着重要作用。

[关键词] 结直肠癌;组织芯片;脯氨酸羟化酶
[中图法分类号] R345;R730.23;R735.35 [文献标志码] A

Expression of proline hydroxylase domain 2 in colorectal cancer and its clinical significance

Zhou Rongbin, Zhou Jie, Wu Shuang, Xie Gangfeng, Peng Yuan, Liang Houjie (Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression status of proline hydroxylase domain 2 (PHD2) in colorectal cancer and adjacent tissue, and to explore the clinical significance of PHD2. **Methods** Immunohistochemical staining was applied for the detection of PHD2 expression in 149 cases of colorectal cancer tissues, 50 adjacent mucosa tissues and 50 cases of metastasis from three affiliated hospitals. **Results** The expression level of PHD2 in the colorectal cancer tissue was lower than that in the adjacent tissue. The positive expression rate of PHD2 in the colorectal cancer tissue was significantly lower than that in the adjacent tissue (48.9% *vs* 72.0%, $P<0.01$). PHD2 expression was significantly correlated with tumor differentiation degree, clinical stage and metastasis ($P<0.01$). The expression level of PHD2 in the colorectal cancer tissues was higher than that in the metastasis (64.0% *vs* 46.0%, $P<0.05$). **Conclusion** PHD2, which is mildly expressed in colorectal cancer tissue but highly expressed in adjacent tissue, plays an important role in the malignant progression of colorectal cancer.

[**Key words**] colorectal cancer; tissue microarray; proline hydroxylase domain 2; clinical significance

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81272364). Corresponding author: Liang Houjie, Tel: 86-23-68754128, E-mail: lianghoujie@sina.com.cn

结直肠癌是我国最常见的五大恶性肿瘤之一,随着我国饮食结构和环境的改变,发病率逐年上升,5年生存率为60%左右[1],其侵袭转移能力是影响患者预后的重要因素[2]。目前已证实,在恶性肿瘤发生、发展过程中,缺氧微环境是促进肿瘤细胞侵袭转移的重要因素之一,但对缺氧导致肿瘤细胞侵袭转移的发生机制尚未完全阐明[3]。脯氨酸羟化酶(proline hydroxylase domain 2,PHD2)是近年发现的重要缺氧感受器,可直接调控细胞对氧浓度改变的反应能力[4]。研究发现PHD2在多种肿瘤细胞系或肿瘤组织中表达缺失[5-6]。目前其与结直肠癌侵袭转移的关系尚不明确。为此,本研究检测了PHD2在结直肠癌中的表达情况及与临床病理特征和肿瘤侵袭转移的关系。

1 资料与方法

1.1 临床病例

收集第三军医大学西南医院、新桥医院和大坪医院2012年1-8月手术切除结直肠癌标本149例,其中50例含癌旁肠黏膜标本(距肿瘤边缘3 cm以内),50例原发灶和转移灶组织标本。标本经4%中性甲醛固定,常规石蜡包埋,制作成4 μm厚

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81272364)
[通信作者] 梁后杰,电话:(023) 68754128, E-mail: lianghoujie@sina.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131127.1109.006.html(2013-11-27)

切片供定位染色用。每例经由资深病理医师做病理学诊断并标记出癌组织、癌旁肠黏膜组织部位。采用组织芯片制作仪(Beecher 公司,美国)制作组织芯片(取样针直径1 mm)。每例标本取 2 ~ 3 个点,共制作蜡块 5 个,蜡块 A 含66 例结直肠癌样本及 50 例对应癌旁肠黏膜标本,蜡块 B 含39 例结直肠癌样本,蜡块 C 含 44 例结直肠癌样本,蜡块 D 及 E 分别含 25 例结直肠癌原发灶和转移灶样本。

1.2 试剂和仪器

兔抗人 PHD2 单克隆抗体(Epitomics 公司,美国),免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒(S-P9001,北京中杉公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组化染色 石蜡切片脱蜡、水化,PBS 洗 3 次 × 3 min;3% 过氧化氢室温下避光孵育 8 ~ 10 min,PBS 洗 3 次 × 5 min;EDTA 缓冲液微波高温抗原修复;山羊血清室温抗原封闭 15 ~ 20 min 后滴加 PHD2 一抗(1∶1 500),室温孵育 1 h 后 4 ℃孵育过夜。PBS 洗 4 次 ×5 min,滴加生物素标记羊抗兔二抗孵育 15 ~ 20 min;PBS 洗 4 次 ×5 min,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液孵育 15 ~ 20 min;PBS 洗 4 次 ×5 min,DAB 显色,苏木精复染,脱水,中性树胶封片。

1.3.2 结果判定 参照上海医科大学附属肿瘤医院病理教研室许良中、杨文涛关于免疫组织化学反应结果的判断标准[14],以细胞出现棕黄色颗粒为阳性标记结果。结果判定采用半定量法,按染色强度计分:0 分为无色;1 分为淡黄色;2 分为棕黄色;3 分为棕褐色;再根据阳性细胞在所观察细胞中所占的百分比计分:0 分为阴性;1 分为阳性细胞≤10%;2 分为阳性细胞 11% ~ 50%;3 分为阳性细胞 > 50% ~ 75%;4 分为阳性细胞 > 75%。染色强度与阳性细胞百分比得分相乘,0 ~ 2 分为阴性表达,> 2 ~ 8 分为阳性表达,8 分以上为强阳性表达。

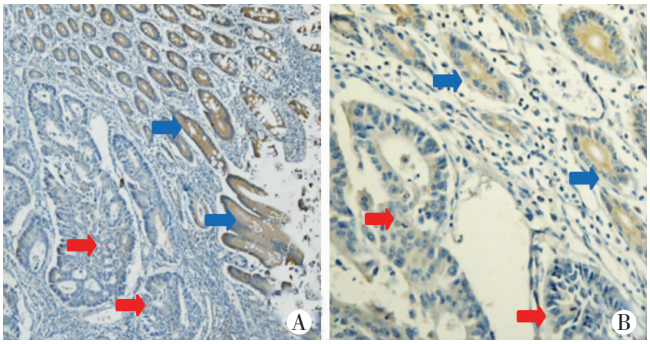
1.4 统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计软件行 χ^2 检验和 t 检验。

2 结果

2.1 结直肠癌组织与癌旁肠黏膜中 PHD2 蛋白的表达

经免疫组化染色显色,PHD2 蛋白的阳性表达位于胞浆及胞膜,呈灶状和弥漫分布,以胞浆为主(图 1)。149 例结直肠癌组织 PHD2 阳性表达 73 例(48.9%),50 例癌旁肠黏膜组织 PHD2 阳性表达 36 例(72.0%),二者之间有差异($P < 0.01$),即 PHD2 在结直肠癌组织中表达下调或缺失,而在癌旁肠黏膜组织中高表达。

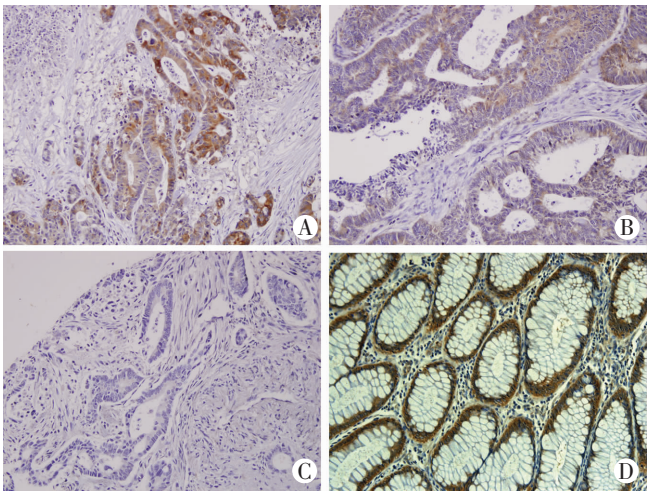


A:×50;B:×200 红色箭头为癌组织;蓝色箭头为癌旁黏膜

图 1 PHD2 在结直肠癌组织和癌旁肠黏膜组织中的表达 (EliVision)

2.2 结直肠癌中 PHD2 蛋白表达与临床病理参数的关系

结直肠癌组织中 PHD2 蛋白表达低于癌旁肠黏膜,与肿瘤分化程度($P < 0.001$)、临床分期($P < 0.001$,图 2)及转移密切相关($P < 0.01$),即分化越低,临床分期越晚,其表达越低,与患者性别、年龄、部位等无明显关联($P > 0.05$)。见表 1。



A:Ⅰ或Ⅱ期;B:Ⅲ期;C:Ⅳ期;D:正常肠黏膜

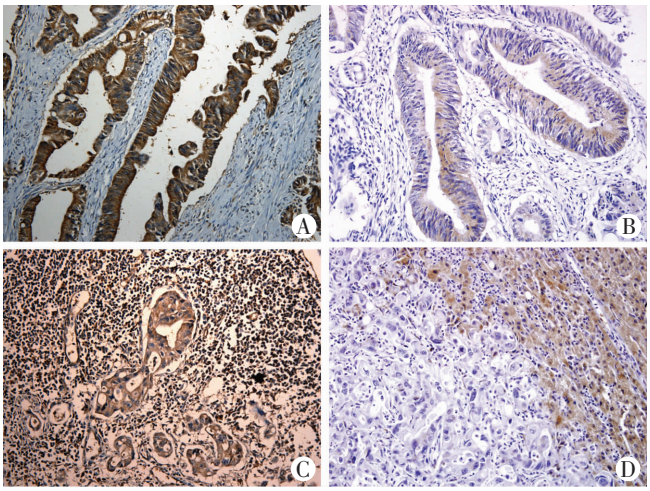
图 2 PHD2 在不同临床分期结直肠癌组织和正常肠黏膜中表达 (EliVision ×200)

表 1 PHD2 在结直肠癌中表达与临床病理学参数的关系 [例(%)]

临床参数	n	PHD2 蛋白表达			P
		<3 分	3 ~ 8 分	>8 分	
年龄(岁)					0.149
<60	69	35(50.7)	25(36.2)	9(13.1)	
≥60	80	41(51.3)	20(25.0)	19(23.7)	
性别					0.509
男	87	48(55.2)	25(28.7)	14(16.4)	
女	62	29(46.8)	19(30.6)	14(22.6)	
部位					0.150
结肠	82	40(48.8)	22(26.8)	20(24.4)	
直肠	67	37(55.2)	22(32.8)	8(12.0)	
分级					0.000
1	13	4(30.7)	2(15.4)	7(53.9)	
2	100	41(41.0)	40(40.0)	19(19.0)	
3	36	33(91.7)	1(2.8)	2(5.5)	
T 分期					0.000
T1	3	2(66.7)	1(33.3)	0(0.0)	
T2	22	4(18.2)	7(31.8)	11(50.0)	
T3	70	32(45.7)	29(41.4)	9(12.9)	
T4	54	39(72.2)	7(13.0)	8(14.8)	
N 分期					0.184
N0	93	41(44.1)	32(34.4)	20(21.5)	
N1	34	21(61.8)	9(26.5)	4(11.7)	
N2	22	15(68.2)	4(18.2)	3(13.6)	
M 分期					0.003
M0	122	55(45.1)	41(33.6)	26(21.3)	
M1	27	22(81.5)	3(11.1)	2(7.4)	
临床分期					0.000
Ⅰ	16	4(25.0)	4(25.0)	8(50.0)	
Ⅱ	62	27(43.5)	25(40.3)	10(16.2)	
Ⅲ	44	28(63.6)	11(25.0)	5(11.4)	
Ⅳ	27	18(66.7)	4(14.8)	5(18.5)	

2.3 结直肠癌原发灶及转移灶中 PHD2 蛋白的表达

结果显示,在 50 例结直肠癌原发灶中 PHD2 蛋白阳性表达 32 例(64%),50 例结直肠癌转移灶中 PHD2 蛋白阳性表达 23 例(46%),即 PHD2 蛋白在结直肠癌原发灶中表达高于相应转移灶组织($P<0.05$)。见图 3。



A、C:原发灶及淋巴结转移灶;B、D:原发灶及肝转移灶

图 3 PHD2 在结直肠癌原发灶和转移灶中表达 (EliVision ×200)

3 讨论

近年来,PHD 已成为肿瘤研究的一大热点。它在许多肿瘤细胞系中都有不同程度的表达,含有 α、β 两个亚基,其中 α 亚基有脯氨酸羟化酶活性,主要通过氧依赖性途径催化缺氧诱导因子特定的脯氨酸残基(402 和 564),使之发生羟化反应,从蛋白质含量和转录活性两方面介导缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor,HIF)的降解[7]。而 HIF 是肿瘤细胞缺氧适应的一种关键性转录因子,它能调节多种缺氧反应性靶基因的表达,使肿瘤细胞能适应外周环境中氧浓度的变化[8]。因此研究肿瘤组织中 PHD 的表达及其作用具有重要的临床意义。

PHD2 是肿瘤血管生成和肿瘤形成的重要调节因子[6,9-11],但其对结直肠癌恶性进展的影响目前尚不清楚。在本研究中我们应用高通量组织芯片技术及免疫组化方法,检测了 149 例结直肠癌组织标本(其中 50 例含癌旁肠黏膜)中 PHD2 的表达。结果发现,PHD2 在癌旁肠黏膜组织中高表达,部分结直肠癌组织中有表达下调或缺失的情况,它的表达与肿瘤的分化程度、临床分期和是否转移等关系密切,即分化程度越低,临床分期越晚,其表达水平越低;这与文献[5-6]报道 PHD2 在其他肿瘤中的表达情况相符。因此我们认为 PHD2 表达下调或缺失可能与结直肠癌的恶性进展密切相关,在结直肠癌中可能作为一种肿瘤抑制因子发挥作用。

PHD2 与肿瘤的侵袭转移密切相关[12-13],在本研究中我们发现 PHD2 的表达与结直肠癌的远处转移密切相关,即有远处转移者的 PHD2 表达显著降低;而后进一步检测了 50 例结直肠癌原发灶组织和转移灶组织(含淋巴结及肝转移灶)中 PHD2 的表达情况,结果表明 PHD2 在结直肠癌原发灶组织表达高于相应转移灶组织,因此我们推测 PHD2 可能与结直肠癌的侵袭转移密切相关。该相关性尚需要进一步的体外细胞学实验验证。

研究[15]发现,在恶性肿瘤发生、发展过程中,缺氧是实体肿瘤局部微环境的基本特征。它能引起肿瘤细胞出现一系列生物学特性改变,其中上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是其重要的表型特征,也是肿瘤细胞获得侵袭转移能力的形态学基础[16];而我们所研究的脯氨酸羟化酶是一种重要的缺氧感受器,且我们课题组前期研究发现结肠癌细胞中 PHD2 表达改变可以影响 NF-κB 信号通路的活性,而 NF-κB 信号通路可以调控 EMT 的发生[17],所以 PHD2 有可能通过感受缺氧状态,并将缺氧状态信息传递给细胞内信号系统通过影响 NF-κB 信号通路的活性来诱导或抑制 EMT 的发生,从而调控结直肠癌细胞的侵袭和转移。因此根据本研究结果表明,PHD2 可能与结直肠癌的恶性进展密切相关,在结直肠癌发展中发挥了很重要的作用,将来有可能作为抗肿瘤治疗的潜在作用靶点。

参考文献:

[1] 高晓虹, 安庆玉, 李晓枫. 大肠癌相关因素的条件 logistic 回归分析[J]. 中国卫生统计, 2009, 26(6): 605-607.

[2] Hilska M, Roberts P J, Collan Y U, *et al*. Prognostic significance of matrix metalloproeinases-1, -2, -7 and -13 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2, -3 and -4 in colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 2007, 121(4): 714-723.

[3] Rhim A D, Mirek E T, Aiello N M, *et al*. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation[J]. Cell, 2012, 148(1/2): 349-361.

[4] Prabhu V, Guruvayoorappan C. Prolyl hydroxylase and hypoxia inducible factor: potential targets for cancer therapy[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2011, 33(3): 568-575.

[5] Su Y, Loos M, Giese N, *et al*. Proly1 hydroxylase-2(PHD2) exerts tumor-suppressive activity in pancreatic cancer[J]. Cancer, 2012, 118(4): 960-972.

[6] Chan D A, Kawahara T L, Sutphin P D, *et al*. Tumor vasculature is regulated by PHD2-mediated angiogenesis and bone marrow-derived cell recruitment[J]. Cancer Cell, 2009, 15(6): 527-538.

[7] Appelhoff R J, Tian Y M, Raval R R, *et al*. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor[J]. J Biol Chem, 2004, 279(37): 38458-38465.

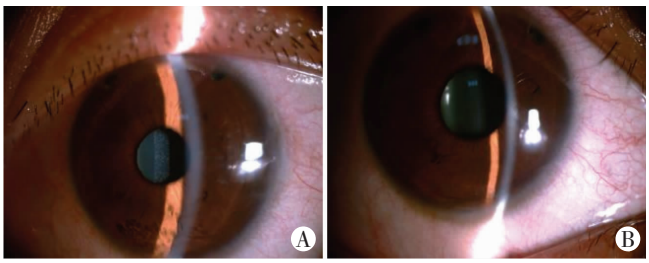
[8] Adams J M, Difazio L T, Rolandelli R H, *et al*. HIF-1: a key mediator in hypoxia[J]. Acta Physiol Hung, 2009, 96(1): 19-28.

[9] Kato H, Inoue T, Asanoma K, *et al*. Induction of human endometrial cancer cell senescence through modulation of HIF-1alpha activity by EGLN1 [J]. Int J Cancer, 2006, 118(5): 1144 – 1153.
[10] Lee K A, Lynd J D, O'Reilly S, *et al*. The biphasic role of the hypoxia-inducible factor prolyl-4-hydroxylase, PHD2, in modulating tumor-forming potential[J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(5): 829 – 842.
[11] Aprelikova O, Pandolfi S, Tackett S, *et al*. Melanoma antigen-11 inhibits the hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 and activates hypoxic response[J]. Cancer Res, 2009, 69(2): 616 – 624.
[12] Couvelard A, Deschamps L, Rebours V, *et al*. Overexpression of the oxygen sensors PHD-1, PHD-2, PHD-3, and FIH Is associated with tumor aggressiveness in pancreatic endocrine tumors[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(20): 6634 – 6639.
[13] Jokilehto T, Rantanen K, Luukkaa M, *et al*. Overexpression and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase PHD2 in head and neck squamous cell carcinoma is associated with tumor aggressiveness[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(4): 1080 – 1087.
[14] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. 中国癌症杂志, 1996, 6(4): 229 – 231.
[15] Gooke V G, LeBleu V S, Keskin D, *et al*. Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway[J]. Cancer Cell, 2012, 21(1): 66 – 81.
[16] Wu M Z, Tsai Y P, Yang M H, *et al*. Interplay between HDAC3 and WDR5 is essential for hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. Mol Cell, 2011, 43(5): 811 – 822.
[17] Maier H J, Schmidt-Strassburger U, Huber M A, *et al*. NF-kappaB promotes epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells[J]. Cancer Lett, 2010, 295(2): 214 – 228.

(**收稿**:2013-09-23;**修回**:2013-11-18)
(编辑 汪勤俭)

(上接 330 页)

2 536.6 个/mm^2,左 1830.3 个/mm^2;UBM 显示:前房深度右 2.57 mm,左 2.52 mm,人工晶体回声可见,人工晶体与自身晶状体间距离(拱高)右 0.40 mm,左 0.31 mm,全周房角开放,睫状体未见明显脱离回声。



A:术后 3 d;B:术后 3 个月

图 1 有晶状体眼后房悬浮型人工晶体植入术后不同时间眼前节照相观察

2 讨论

我们知道,对于中、低度近视,准分子激光手术能够达到很好的效果,但是,对于超过 10D 甚至 20D 的超高度近视,激光近视手术则显得无能为力。可植入式后房悬浮型人工晶体(PC-PRL)是矫治超高度近视的一种新型人工晶体,矫治范围:-10.0 ~ -30.0 D,大大拓展了近视矫治的范畴。PC-PRL 屈光指数为 1.46,悬浮于后房,通过流体静力使襻轻推虹膜后表面维持稳定。这样能尽可能避免 PRL 与自身晶状体的贴近或接触,而且人工晶状体的后表面光滑曲率基本与自然晶状体一致,也进一步避免术后晶状体前囊膜混浊的发生。

本例患者为成年男性,术前屈光度:双眼约 -25 D,前房深度:右 3.04 mm,左 3.08 mm,手术指征明确,未见明显禁忌证。手术顺利,于术后第 3 天发生晶状体前囊全面积混浊,经抗炎治疗后随着时间的延长逐渐减轻,于术后 3 个月时只见晶体前囊仅残留少量面积轻度混浊。对于植入人工晶体引起的晶状体或晶状体前囊混浊,目前认为与多种因素有关,包括:①手术过程中机械性操作引起的躁动,使得房水中产生的炎性因子和渗出物,并且逐渐形成沉淀引起晶状体或晶状体前囊混浊[1];②植入的人工晶体与自身晶状体之间的距离过于接近,Gonvers 等[2]报道其二者之间的距离应≥0.09 mm,当≥0.15 mm 时就可以完全避免它们的接触。③房水循环的影响。由于人工晶体的植入改变了房水的循环流动,影响了晶状体的自然代谢,刺激晶状体上皮细胞的化生,导致晶状体混浊[1]。④粘弹剂和眼内缩瞳剂对晶状体囊膜的刺激[3]。本例患者术后第 1 天时前房及后房反应轻微,而且直到术后第 3 天才出现后房渗出及晶状体前囊混浊,基本可以排除手术躁动引起的炎症反应;术后 UBM 检查发现人工晶体与自身晶状体间距离(拱高)右 0.40 mm,左 0.31 mm,远高于 Gonvers 等[2]提出的最低高度 0.15 mm 的标准,故由拱高异常导致的继发性白内障的可能性大大降低;术后初期眼压正常:左眼 13 mmHg,说明房水循环影响有限;同时该患者术中未使用缩瞳剂。

PC-PRL 是后房型人工晶状体,植入后房以后要求能够"悬浮"于房水中,可能在加工中前、后表面均进行了一定的特殊处理。因此,我们认为该患者的发生机制可能是:PC-PRL 经过特殊处理,同时该品牌型号的粘弹剂由于分子量、黏稠度等原因容易黏附该人工晶体表面,从而使术后 PC-PRL 表面光滑度下降,致使房水中的炎性因子和渗出物易于在其表面黏附。随着时间的推移,粘弹剂逐渐代谢,渗出也得到吸收,晶状体前囊又逐渐向透明的方向恢复,残留少面积的轻微混浊,最后能否完全透明,我们还将进一步观察。

甲基纤维素作为常用的粘弹剂之一,在本例中也导致后房渗出及晶状体前囊全面积混浊。因此我们一方面要求厂商提高生产工艺,一方面要求手术医师应进一步规范手术操作,减少术后炎症反应,同时保证 PC-PRL 与晶状体的安全距离,并减少粘弹剂在后房的残留,尽量避免及减少该情况的发生。

参考文献:

[1] 左志高, 尹黎, 刘苏冰, 等. ICL 或 TICL 植入术矫治超高度近视的应用研究[J]. 眼科新进展, 2011, 31(5): 460 – 463.
[2] Gonvers M, Bornet C, Othenin-Girard P. Implantable contact lens for moderate to high myopia: relationship of vaulting to cataract formation [J]. J Cataract Refract Surg, 2003, 29(5): 918 – 924.
[3] 董喆, 王宁利, 李俊红, 等. 粘弹剂选择对百康复视伦有晶状体眼人工晶状体的影响[J]. 眼科, 2010, 19(2): 93 – 96.

(**收稿**:2013-12-02;**修回**:2013-12-23)
(编辑 张 维)