DOI:10.16016/j.1000-5404.201412227

论著

24-脱氢胆固醇还原酶在结直肠癌中的表达及临床意义

王灿灿,王 喆,秦 虹,彭 媛,张 月,梁后杰,阮志华 (400038 重庆,第三军医大学西南医院肿瘤科)

[摘要] **目的** 检测24-脱氢胆固醇还原酶(3β-hydor-xysteroid-△24 reducase,DHCR24)在结直肠癌及癌旁肠黏膜中的表达,探讨其临床意义。**方法** 应用组织芯片技术结合免疫组化法检测第三军医大学3所附属医院结直肠癌术后125例组织标本以及相应63例癌旁肠黏膜中DHCR24的表达。**结果** DHCR24在125例结直肠癌组织中阳性表达率显著高于癌旁肠黏膜(67.2% *vs* 39.7%,$P<0.01$),并与肿瘤的分化程度、临床分期、淋巴结转移等有关($P<0.05$),结直肠癌患者中DHCR24高表达组比低表达组预后差($P<0.01$),临床分期高的结直肠癌患者中,DHCR24的高表达提示了临床预后差($P<0.01$),但在临床分期低的患者中不存在这种差异($P>0.05$)。**结论** DHCR24在结直肠癌组织中高表达,且结直肠癌患者中DHCR24高表达组比低表达组预后差,提示其在结直肠癌的发生、发展中可能发挥着重要作用。

[关键词] 结直肠癌;组织芯片;24-脱氢胆固醇还原酶
[中图法分类号] R345; R730.43; R735.35 [文献标志码] A

Expression and clinical significance of 3β-hydor-xysteroid-△24 reducase in colorectal cancer

Wang Cancan, Wang Zhe, Qin Hong, Peng Yuan, Zhang Yue, Liang Houjie, Ruan Zhihua (Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression level of 3β-hydor-xysteroid-△24 reducase (DHCR24) in colorectal cancer and adjacent mucosa tissues, and explore its clinical significance. **Methods** Tissue microarray and immunohistochemical staining was applied for the detection of DHCR24 expression in 125 cases of colorectal cancer and 63 adjacent mucosa tissues through surgical treatment. The results were analyzed with the clinical data. **Results** The positive expression rate of DHCR24 was significantly higher in the colorectal cancer tissue than in the adjacent mucosa tissue (67.2% *vs* 39.7%, $P<0.01$). DHCR24 expression was significantly correlated with tumor differentiation degree, clinical stage and lymph node metastasis ($P<0.05$). The patients with high expression of DHCR24 had poorer prognosis ($P<0.01$). Among the patients who had advanced-stage colorectal cancer, higher DHCR24 expression suggested a poorer survival ($P<0.01$). But no such suggestion was seen in the patients at early stage disease ($P>0.05$). **Conclusion** DHCR24 is highly expressed in colorectal cancer tissue, and the patients with high expression predicts poorer prognosis. DHCR24 might play an important role in the malignant progression of colorectal cancer.

[**Key words**] colorectal cancer; tissue microarray; 3β-hydor-xysteroid-△24 reducase

Corresponding author: Ruan Zhihua, Tel:86-23-68765192, E-mail: rzh123@163.com

[通信作者] 阮志华,电话:(023)68765192,E-mail: rzh123@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150421.0953.002.html (2015-04-21)

结直肠癌(colorectal cancer,CRC)是人类最常见的消化系统恶性肿瘤之一,随着我国的环境及饮食结构的变化,发病率逐年上升[1-2]。代谢重编程是肿瘤发生、发展过程中的重要特征[3],其中胆固醇代谢在肿瘤的发生、发展中也发挥着重要的作用,对细胞的增殖和分化起决定作用[4]。24-脱氢胆固醇还原酶(3β-hydor-xysteroid-△24 reducase,DHCR24)是胆固醇生物合成中最末端的酶,将甾醇转化为胆固醇[5],并且具有抗细胞凋亡的作用[6]。其一般表达在脑、肾上腺、肝脏、肺、前列腺、肠道等正常组织,而在肾上腺肿瘤、垂体肿瘤等肿瘤组织中都表现为表达的上调[7-12]。有研究表明 DHCR24 可能通过促进胆固醇的合成或其抗凋亡作用,从而促进肿瘤的生长[13]。目前 DHCR24 在结直肠癌中的表达及其与患者预后的关系尚不十分清楚。因此,本研究检测了 DHCR24 在结直肠癌和癌旁肠黏膜组织中的表达情况,并探讨其与患者临床病理特征、预后等的关系。

1 资料与方法

1.1 临床病例

收集第三军医大学三所附属医院2007年1-6月手术切除结直肠癌标本125例,其中63例含癌旁肠黏膜标本(距肿瘤边缘3 cm以内)。切除标本用4%中性多聚甲醛固定,石蜡包埋,HE染色后由资深病理学医师进行病理学诊断。采用组织芯片制作仪(美国Beecher公司)制作组织芯片(取样针直径1 mm)。每例标本取1~2个点,共制作组织芯片蜡块2个,包含125例结直肠癌标本及63例癌旁肠黏膜标本。

1.2 试剂和仪器

兔抗人 DHCR24 单克隆抗体(美国 Cell Signalling Technology 公司),免疫组化试剂盒(S-P9001,中杉金桥公司),DAB 显色试剂盒(ZLI-9017,中杉金桥公司),EDTA(ZLI-9069,中杉金桥公司),中性树胶(G8590,Solarbio 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组化染色 采用免疫组化S-P法。石蜡组织芯片60 ℃烤片、二甲苯脱蜡、梯度酒精降序水化,双蒸水洗涮2次,磷酸盐缓冲液PBS洗4 min×3次;3%过氧化氢室温孵育10 min消除内源性过氧化物酶,双蒸水洗涮2次,PBS洗4 min×3次;EDTA缓冲液高温平台抗原修复10~15 min;自然冷却;双蒸水洗涮2次,PBS洗4 min×3次,山羊血清室温封闭非特异性抗原20 min后滴加DHCR24一抗(1∶350)放入湿盒中,室温下孵育1 h,4 ℃孵育过夜(总时间>16 h)。室温下复温1 h;PBS洗5 min×4次,滴加生物素标记山羊抗兔二抗孵育20 min;PBS洗5 min×4次,滴加辣根酶标记链霉卵白素孵育20 min;PBS洗5 min×4次,新鲜配制的DAB显色液显色(45 s);苏木精染核24 s,60℃双蒸水中返蓝10 min;梯度酒精升序及二甲苯脱水,自然风干后使用浓酸处理后的盖玻片及中性树胶封片。

1.3.2 结果判定 免疫组化染色结果由病理学专家参照已有相关DHCR24免疫组化结果进行判定[12],该蛋白阳性表达定位于细胞质,阳性结果为棕黄色或棕褐色。采用半定量法依据各点的染色强度及染色细胞百分比进行判定。染色强度计分:无阳性染色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;阳性染色细胞构成比计分:无阳性染色细胞为0分,阳性细胞百分比≤10%为1分,阳性细胞百分比11%~50%为2分,阳性细胞百分比51%~75%为3分,阳性细胞百分比>75%为4分。最终评分为染色强度计分与阳性细胞百分比计分的乘积,0~6分为低表达,7分以上为高表达。

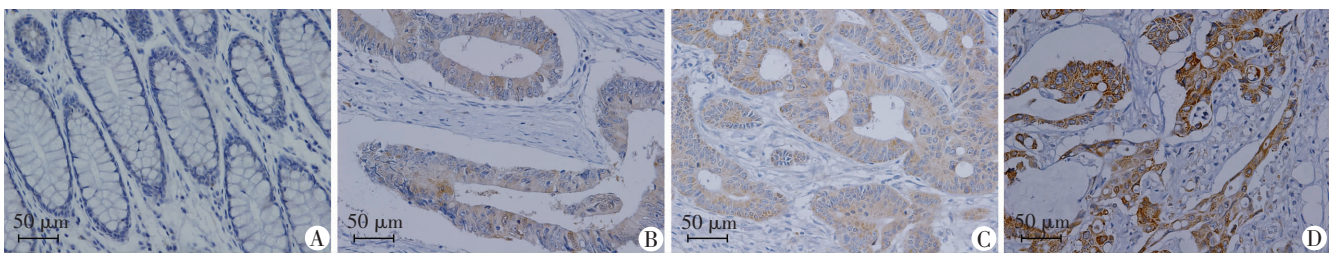
1.4 统计学处理

应用SPSS 18.0统计软件行χ^2检验、t检验、生存分析、COX回归分析。

2 结果

2.1 结直肠癌组织与癌旁肠黏膜中DHCR24的表达

经免疫组化染色显色,DHCR24的阳性表达位于细胞质,呈灶状和弥漫分布,以胞浆为主(图1)。125例结直肠癌组织中DHCR24高表达84例(67.2%),63例癌旁肠黏膜组织中DHCR24高表达25例(39.7%),二者之间差异有统计学意义($P<0.01$,表1)。



A:癌旁肠黏膜组织;B:高分化肿瘤组织;C:中分化肿瘤组织;D:低分化肿瘤组织

图1 DHCR24在结直肠癌组织和癌旁肠黏膜中表达 (EliVision)

表1 DHCR24在结直肠癌中表达与临床病理学参数的关系

临床参数	n	DHCD24蛋白的表达[例(%)]		P值
		低表达	高表达	
癌旁肠黏膜	63	38(60.3)	25(39.7)	0.001
癌组织	125	41(32.8)	84(67.2)	
年龄(岁)				
<68	63	16(25.4)	47(74.6)	0.076
≥68	62	25(40.3)	37(59.6)	
性别				
男	65	20(30.8)	45(69.2)	0.615
女	60	21(35.0)	39(65.0)	
肿瘤最大径				
≤5 cm	73	29(39.7)	44(60.3)	0.051
>5 cm	52	12(23.1)	40(76.9)	
分化程度				
高分化	31	14(45.2)	17(54.8)	
中分化	50	21(42.0)	29(58.0)	0.003
低分化	44	6(13.6)	38(86.4)	
淋巴结转移				
无转移	70	31(44.3)	39(55.7)	0.002
有转移	55	10(18.2)	45(81.8)	
T分期				
T1	1	0(0.0)	1(100.0)	
T2	9	5(55.6)	4(44.4)	0.380
T3	92	30(32.6)	62(67.4)	
T4	23	6(26.1)	17(73.9)	
N分期				
N0	70	31(44.2)	39(55.7)	0.002
N1	55	10(18.2)	45(81.8)	
M分期				
M0	123	41(33.3)	82(66.6)	0.319
M1	2	0(0.0)	2(100.0)	
临床分期				
Ⅰ期	7	4(57.1)	3(42.9)	
Ⅱ期	68	27(39.7)	41(60.3)	0.049
Ⅲ期	46	10(21.7)	36(78.2)	
Ⅳ期	4	0(0.0)	4(100.0)	
预后				
生存	64	29(45.3)	35(54.7)	0.002
死亡	61	12(19.7)	49(80.3)	

2.2 结直肠癌中DHCR24蛋白表达与临床病理参数的关系

结直肠癌组织中DHCR24蛋白表达高于癌旁肠黏膜,与肿瘤分化程度($P<0.01$)、临床分期($P<0.05$)、淋巴结转移($P<0.01$)及预后($P<0.01$)有关,即其表达愈高,结直肠癌分化程度愈低,临床分期愈晚,淋巴结愈易发生转移,预后愈差,但与患者性别、年龄、肿瘤最大径等无明显关联($P>0.05$,图1、表1)。

2.3 结直肠癌DHCR24蛋白表达与临床预后的关系

为了明确DHCR24在结直肠癌中的表达与临床预后的关系,我们对125例结直肠癌中DHCR24的表达与患者总生存时间进行了生存分析,发现DHCR24的高表达组与低表达组肿瘤患者的生存曲线分布差异有统计学意义($P<0.01$),表现为DHCR24高表达的患者比DHCR24低表达的患者预后更差。我们将患者按照临床分期、肿瘤大小、是否淋巴结转移分组后进行生存分析,发现在临床分期Ⅰ、Ⅱ期,淋巴结无转移及肿瘤最大径>5 cm的肿瘤患者中DHCR24的高表达组与低表达组的生存曲线分布差异无统计学意义($P=0.337$、$P=0.499$、$P=0.097$);临床分期Ⅲ、Ⅳ期,淋巴结有转移及肿瘤最大径≤5 cm的肿瘤患者中DHCR24的高表达组与低表达组的生存曲线分布差别有统计学意义($P=0.006$、$P=0.008$、$P=0.014$),都表现为DHCR24高表达组患者生存状况要显著差于DHCR24低表达组患者。此结果说明了在临床分期Ⅲ、Ⅳ期,淋巴结出现转移及肿瘤最大径≤5 cm的肿瘤患者中DHCR24高表达更具有作为预后不良指标的意义(图2)。

2.4 结直肠癌DHCR24蛋白表达作为临床诊断和预后指标多因素分析

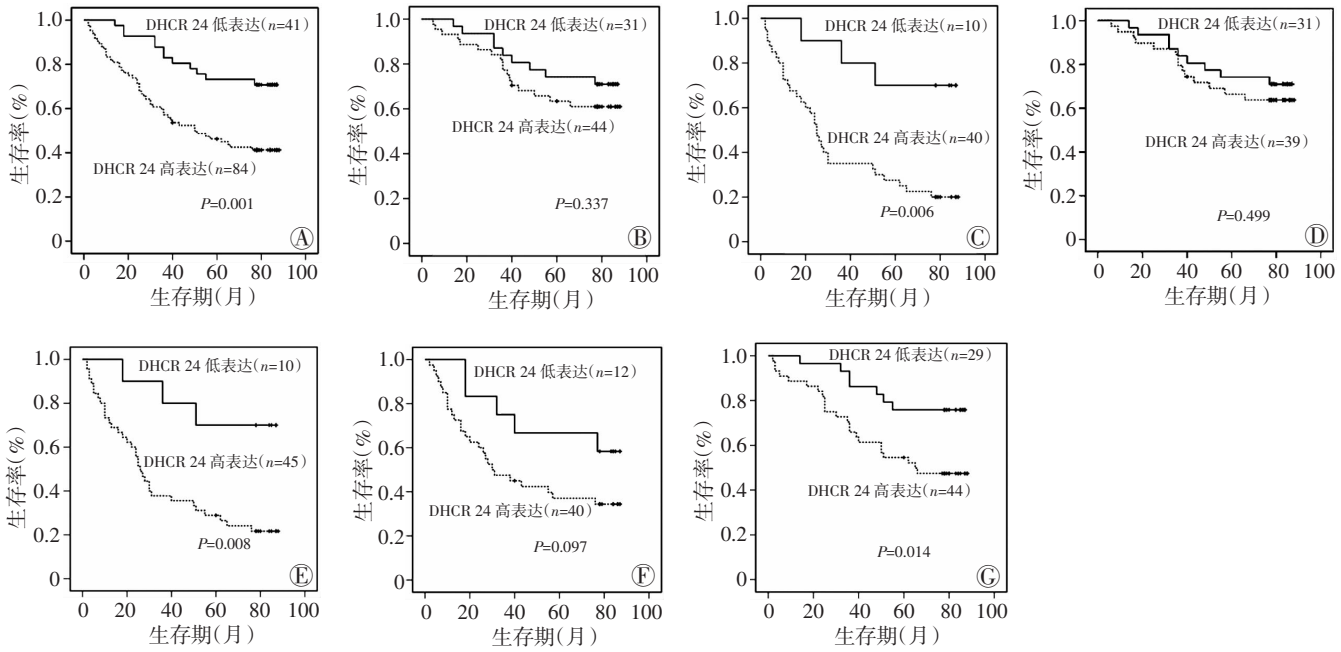
使用COX多因素回归分析对DHCR24的表达是否可以作为一个临床预后评判的指标进行评估,发现对患者生存有影响的是临床分期、分化程度、DHCR24的表达(表2),其中临床高分期、低分化程度、DHCR24高表达是结直肠癌患者预后的危险因素,DHCR24的表达、临床分期和分化程度可作为结直肠癌的预后指标。

表2 COX多因素回归分析结直肠癌患者预后的危险因素

变量	危险因素	HR(95% CI)	P值
临床分期	Ⅲ、Ⅳ期	0.940(1.520~4.316)	<0.001
分化程度	低分化	0.551(1.021~2.951)	0.042
DHCR24表达	高表达	0.716(1.058~3.956)	0.033

3 讨论

近年来,肿瘤代谢研究已经成为肿瘤研究的热点。已有研究报道高胆固醇饮食、高脂血症及高胆固醇血症可能是结直肠癌发生的危险因素[14-15]。胆固醇作为细胞膜及细胞质成分的重要组成部分,是细胞增殖



A:全部患者;B:临床分期Ⅰ期和Ⅱ期;C:临床分期Ⅲ期和Ⅳ期;D:淋巴结无转移;E:淋巴结有转移;F:肿瘤最大径>5 cm;G:肿瘤最大径≤5 cm

图2 结直肠癌患者 Kaplan-Meier 生存分析

的关键因素。胆固醇代谢可能作为炎性细胞因子引起细胞增殖、凋亡的改变[16]。已往有研究显示,肿瘤中胆固醇合成限速酶——HMGCoA 还原酶的表达升高,降低 HMGCoA 还原酶的表达或活性可以抑制肿瘤的生长[17]。还有研究显示减少羊毛脂甾醇向胆固醇的转化也可以抑制肿瘤细胞的增殖和分化[18]。胆固醇合成末端的酶 DHCR24 催化胆固醇生物合成中最后一步即甾醇转化为胆固醇[5]。DHCR24 最早发现于阿尔兹海默症,DHCR24 的下调与神经退化相关[19]。但是,DHCR24 在结直肠癌组织中的表达及与临床病理特征和患者预后的关系尚不清楚。

本研究应用高通量组织芯片及免疫组化技术检测了125例结直肠癌组织及63例癌旁肠黏膜组织中DHCR24的表达,结果发现在癌旁肠黏膜组织中DHCR24低表达,而癌组织中DHCR24表达上调和已有研究DHCR24在其他肿瘤中表达上调的结果相一致,并且癌组织中DHCR24表达的上调与临床分期、淋巴结转移、病理分级、生存预后相关(表1),DHCR24高表达提示结直肠癌患者预后较差,并且在结肠癌临床分期Ⅲ期、Ⅳ期,淋巴结出现转移的肿瘤患者中DHCR24高表达更具有独立作为预后不良指标的意义(图2)。这种分组后的预后差异出现可能由于DHCR24的表达与临床分期、淋巴结转移的相关性引起。COX回归分析显示DHCR24可以与临床分期及分化程度共同作为临床预后的一个指标(表2)。因此,我们认为DHCR24表达的上调可能促进结直肠癌的发生发展,在结直肠癌中作为一种肿瘤促进因子发挥作用。

DHCR24除了作为胆固醇合成末端重要的限速酶外,还参与了细胞的多种信号通路、脂筏的形成、细胞抗应激作用的调节、类固醇的合成等。有研究证明DHCR24在黑色素转移瘤中的表达高于原位肿瘤,DHCR24的高表达提高了转移性黑色素瘤细胞内的胆固醇水平,并且提高了其抗凋亡及氧化应激作用,进而促进了黑色素瘤细胞的转移[11]。非基层浸润型尿路上皮细胞癌中,DHCR24的高表达可增加肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭能力[12]。DHCR24的抑制剂U18666A在非小细胞肺癌,乳腺癌和神经系统相关肿瘤中具有抗肿瘤的作用[12]。另有研究报道原发性肝癌患者中HCV的感染可以上调DHCR24的表达,从而保护肿瘤细胞免受氧化应激的损伤,并且DHCR24能够结合到P53特定的氨基酸残基结构域上,取代P53上的E3辅酶连接Mdm2导致P53的累积,阻碍了P53入核发挥其抑癌作用,从而促进了肿瘤的发生[6,20]。既往研究显示DHCR24不仅作为胆固醇合成末端重要的酶,还可以作为一个多功能蛋白[21]参与肿瘤的发生发展。本研究结果也表明DHCR24在结直肠癌中可能作为一种促肿瘤因子发挥作用,并且能够作为预

测结直肠癌临床预后的指标。下一步的研究需扩大样本量统计 DHCR24 mRNA 及蛋白水平在结直肠癌组织中的表达,进一步在结肠癌细胞体系中进行体外细胞实验及体内动物实验,探明 DHCR24 的高表达是否可以促进结直肠癌发生、发展及其具体分子机制,以明确 DHCR24 是否可作为结直肠癌临床治疗的潜在靶点,为结直肠癌的临床治疗开辟新的途径。

参考文献:

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al*. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69 – 90.

[2] 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.

[3] Vander-Heiden M G. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens[J]. Nat Rev Drug Discov, 2011, 10(9): 671 – 684.

[4] Jacobs R J, Voorneveld P W, Kodach L L, *et al*. Cholesterol metabolism and colorectal cancers[J]. Curr Opin Pharmacol, 2012, 12(6): 0 – 695.

[5] Luu W, Zerenturk E J, Kristiana I, *et al*. Signaling regulates activity of DHCR24, the final enzyme in cholesterol synthesis [J]. J Lipid Res, 2014, 55(3): 410 – 420.

[6] Wu C, Miloslavskaya I, Demontis S, *et al*. Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by Seladin-1 [J]. Nature, 2004, 432(7017): 640 – 645.

[7] Doherty S C, McKeown S R, Lopez J A, *et al*. Gene expression in normal urothelium depends on location within the bladder: a possible link to bladder carcinogenesis[J]. Eur Urol, 2006, 50(2): 290 – 301.

[8] Sarkar D, Imai T, Kambe F, *et al*. The human homolog of Diminuto/Dwarf1 gene (hDiminuto): a novel ACTH-responsive gene overexpressed in benign cortisol-producing adrenocortical adenomas[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(11): 5130 – 5137.

[9] Luciani P, Gelmini S, Ferrante E, *et al*. Expression of the antiapoptotic gene seladin-1 and octreotide-induced apoptosis in growth hormone-secreting and nonfunctioning pituitary adenomas[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(11): 6156 – 6161.

[10] Bonaccorsi L, Luciani P, Nesi G, *et al*. Androgen receptor regulation of the seladin-1/DHCR24 gene: altered expression in prostate cancer[J]. Lab Invest, 2008, 88(10): 1049 – 1056.

[11] Di-Stasi D, Vallacchi V, Campi V, *et al*. DHCR24 gene expression is upregulated in melanoma metastases and associated to resistance to oxidative stress-induced apoptosis[J]. Int J Cancer, 2005, 115(2): 224 – 230.

[12] Yen H K, Fauzi A R, Din L B, *et al*. Involvement of Seladin-1 in goniothalamin-induced apoptosis in urinary bladder cancer cells[J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14: 295.

[13] Lee G T, Ha Y S, Jung Y S, *et al*. DHCR24 is an independent predictor of progression in patients with non-muscle-invasive urothelial carcinoma, and its functional role is involved in the aggressive properties of urothelial carcinoma cells[J]. Ann Surg Oncol, 2014, 21(Suppl 4): S538 – S545.

[14] Jarvinen R, Knekt P, Hakulinen T, *et al*. Dietary fat, cholesterol and colorectal cancer in a prospective study[J]. Br J Cancer, 2001, 85(3): 357 – 361.

[15] Yao X, Tian Z. Dyslipidemia and colorectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies[J]. Cancer Causes Control, 2015, 26(2): 257 – 268.

[16] Esteve E, Ricart W, Fernandez-Real J M. Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism[J]. Clin Nutr, 2005, 24(1): 16 – 31.

[17] Al-Haidari A A, Syk I, Thorlacius H. HMG-CoA reductase regulates CCL17-induced colon cancer cell migration *via* geranylgeranylation and RhoA activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 446(1): 68 – 72.

[18] Lasuncion M A, Martin-Sanchez C, Canfran-Duque A, *et al*. Post-lanosterol biosynthesis of cholesterol and cancer [J]. Curr Opin Pharmacol, 2012, 12(6): 717 – 723.

[19] Selkoe D J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy[J]. Physiol Rev, 2001, 81(2): 741 – 766.

[20] Salem N E, Saito M, Kasama Y, *et al*. Genomic polymorphisms in 3beta-hydroxysterol Delta24-reductase promoter sequences[J]. Microbiol Immunol, 2013, 57(3): 179 – 184.

[21] Khuda I I, Koide N, Noman A S, *et al*. Seladin-1 is a novel lipopolysaccharide (LPS)-responsive gene and inhibits the tumour necrosis factor-alpha production and osteoclast formation in response to LPS[J]. Immunology, 2010, 131(1): 59 – 66.

(**收稿**:2014-12-23;**修回**:2015-03-15)

(编辑　汪勤俭)