基础研究 文章编号:0253-3626(2009)03-0300-4

Notch1 与 Smad4 在大肠癌中的表达及其临床意义

刘 彬,程 勇,李 役

(重庆医科大学附属第一医院胃肠外科 重庆市普外科重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 Notch1 和 Smad4 的表达与大肠癌临床病理的关系,探讨二者在大肠癌演变中的作用。方法:采用免疫组化方法检测 51 例大肠癌标本中 Notch1 和 Smad4 的表达情况。结果:(1) Notch1 的表达明显高于正常组织的表达($P<0.05$),大肠癌组织中 Smad4 的表达明显低于正常组织($P<0.05$);(2) Notch1 表达与年龄、性别、Dukes 分期、淋巴结转移无关($P>0.05$),但与肿瘤的大体类型、组织分级有关($P<0.05$);(3) Smad4 表达与年龄、性别、大体类型无关($P>0.05$),但与肿瘤的 Dukes 分期、淋巴结转移、组织分级有关($P<0.05$);(4) Notch1、Smad4 联合表达与肿瘤的组织分级有关($P<0.05$),与其他临床病理学特性无关($P>0.05$)。结论:Notch1 的高表达和 Smad4 的低表达与大肠癌的发展,生物学行为和预后可能有关,可作为重要的生物学标志。

【关键词】Notch1;Smad4;大肠癌;免疫组化:

【中国图书分类法分类号】R735.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-10

Expression and clinical significance of Notch1 and Smad4 in colorectal carcinoma

LIU Bin et al

(*Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

[Abstract]*Objective:* To observe the expression of Notch1 and Smad4in colorectal carcinoma and their clinical significance. *Methods:* Immunohistochemistry staining was used to detect the expression of Notch1 and Smad4 in 51cases of colorectal carcinoma. *Results:* (1) The expression of Notch1 in colorectal carcinoma was higher than that in the normal tissue($P<0.05$).The expression of Smad4 in colorectal carcinoma was lower than that in the normal tissue($P<0.05$).(2) The expression of Notch1 in colorectal carcinoma was not correlated to age and sex of patients, Dukes stage and lymph node of metastasis of colorectal carcinoma($P>0.05$), except histological grading and pathological types of patients($P<0.05$). (3) The expression of Smad4 in colorectal carcinoma was not correlated to age and sex of patients, histological grading of colorectal carcinoma($P>0.05$), except Dukes stage, lymph node of metastasis and pathological types of patients ($P<0.05$). (4) The combined check on the expression of Notch1and Smad4 in colorectal carcinoma was correlated to histological grading, of patients($P<0.05$). *Conclusion:* Notch1 and Smad4 may be associated with the carcinogenesis, biological behaviors and prognosis of colorectal cancer. The two factors may be used as important biological markers for colorectal cancer.

[Key words]Notch1;Smad4;Colorectal carcinoma;Immunohistochemistry

Notch1 受体属于 Notch 受体家族,具有调节细胞分化、发育的功能。最近有研究发现,Notch1 信号通路可参与肿瘤的发生发展,并在不同肿瘤中呈现出抑癌或者促癌机制[1]。Smad4 是一种新近发现的抑癌基因,是 TGF-β 信号转导通路中起瓶颈作用的关键因子。其突变或缺失可使细胞对 TGF-β 介导的生长抑制效应失去反应,与人类多种肿瘤的发生发展有关。本研究利用免疫组化技术初步研究 Notch1 和 Smad4 在大肠癌和正常大肠组织中的表达情况,及其与临床病理特征的关系,探讨两者在大肠癌发生发展中的作用和关系。

作者介绍:刘 彬(1982-),男,硕士,

研究方向:胃肠肿瘤外科治疗。

通讯作者:程 勇,男,副教授,E-mail:chengyongcq@yahoo.com.cn。

1 资料与方法

1.1 临床资料

从重庆医科大学附属第一医院胃肠外科 2005 年 12 月至 2007 年 3 月收集保存的大肠癌病理标本。病例资料完整,所有病例均经术后组织病理学确诊。其中 51 例大肠癌标本,26 例正常大肠组织标本。其中男性患者 30 例,女性患者 21

例，术前均未接受放、化疗。高分化腺癌 20 例，中低分化腺癌 31 例；根据 Ducks 分期，A/B 期的病例 24 例，C/D 期的病例 27 例；51 例病例中有 16 例发生淋巴结转移，35 例无淋巴结转移。所有组织标本均经 10%甲醛固定，石蜡包埋。

1.2 试剂与方法

每个蜡块取 4 μm 厚连续切片做免疫组化染色。山羊抗人 Notch1 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司（工作液浓度 1∶50），鼠抗人单抗购自武汉博士德生物技术有限公司（工作液浓度 1∶50），SP 免疫组化试剂盒购自福州迈新生物公司。

免疫组化方法检测大肠癌组织中 Notch l 和 Smad4 的表达。先将切片置于二甲苯中室温脱蜡，每次 30 min，共 2 次，乙醇梯度水化处理，3% 双氧水消除内源性过氧化物酶，时间 10 min；EDTA（pH8.0）修复液常规修复：微波炉中高火 7 min、中低火 15 m in，加热以充分暴露抗原位点，待其自然冷却后，加 A 液室温封闭 15 min，山羊抗人 Notch l、鼠抗人 Smad4 单抗（1∶50，Santa Cruz，USA、武汉博士德生物技术有限公司）4℃孵育过夜，PBS 漂洗 3 次，每次 3 min；然后加 B 液（福州迈新）室温孵育 25 min，PBS 漂洗 3 次，每次 3 min：再加 C 液（福州迈新 T）室温孵育 25 min，PBS 漂洗 3 次，每次 3 min，DAB 显色 10 min，终止显色，苏木精复染，盐酸乙醇固定、封片、观察。

1.3 结果判定

光学显微镜下观察组织标本的着色程度。Notch l 蛋白阳性表达主要表现为胞浆内内呈现棕黄色或者棕褐色颗粒，也有少量细胞核呈现棕黄色颗粒。Smad4 蛋白主要表达于细胞浆中，以腺体的体部和底部最为明显，而细胞核内则几乎无表达。高倍镜下（放大 400 倍）随机取 4 个不同的视野，计数细胞总数及核阳性细胞数，计算阳性细胞的百分比。Notch1 细胞染色标准参考 Massi 等[9]报道文献，阳性细胞数大于 20% 为阳性表达。参照 Salovaara R 标准判定结果，Smad4 阳性细胞数大于 5%为阳性表达。

1.4 统计学分析

用 SPSS 13.0 统计软件对数据采用卡方检验、四格表概率法及计数资料的相关性分析进行统计学分析处理。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Notch1、Smad4 在大肠正常组织和癌组织中的表达

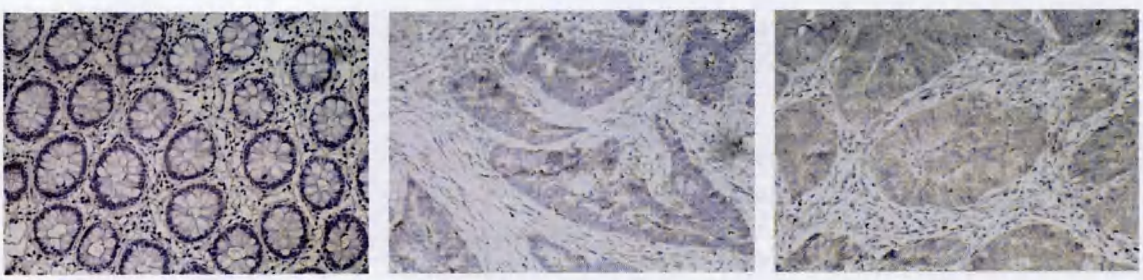
Notch l 在大肠癌组织中的表达见图 1。51 例大肠癌标本中 Notch l 的强阳性率为 62.7 %（32/51）。阳性表达主要集中在癌细胞核中，其中核强阳性率达 50.9%（26/51）。正常大肠组织的阳性表达率为 26.9%（7/26），两者相比有显著差异（$P<0.01$）。Smad4 在大肠癌组织中的表达见图 2。在大肠癌标本中 Smad4 的阳性率为 52.9%（27/51），正常大肠组织的的阳性表达率为 96.1%（24/26），两者相比有显著差异（$P<0.01$）。

2.2 Notch1、Smad4 在大肠癌癌组织中的表达与临床病理特征的关系

Notch1 阳性表达与结直肠癌患者的性别、年龄、淋巴转移、远处转移均无明显相关性（$P>0.05$），而于肿瘤大小、分化程度显著相关（$P<0.01$ 或 $P<0.05$）。在 Ducks 分期 A/B，C/D 两组患者中，两者相比 Notch1 阳性表达没有显著差异（$P>0.05$）。Smad4 阳性表达与结直肠癌患者的性别、年龄、肿瘤大小均无明显相关性（$P>0.05$），Smad4 与大肠癌组织的分化程度、淋巴转移和 Ducks 分期显著相关（$P<0.01$ 或 $P<0.05$）（表 1）。

2.3 Notch1、Smad4 蛋白在大肠癌中表达的关系

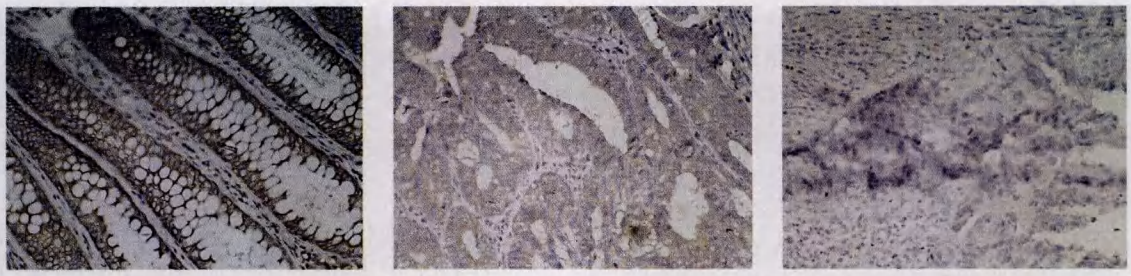
Notch1 阳性表达的大肠癌组织中，Smad4 的阳性率显著低于 Notch1 阴性达的大肠癌组织中 Smad4 的阳性率，19 例 Notch1 阴性性表达的病例中 Smad4 阳性表达 16 例，32 例 Notch1 阳性性表达的病例中 Smad4 阴性表达 22 例。Spearman 相关性分析显示，Notch1 与 Smad4 呈负显著相关，相关系数 $r=-0.326$（$P=0.014$）。



A B C

A. Notch1 在正常组织为阴性表达；B. Notch1 在结直肠癌组织弱表达；C. Notch1 在结直肠癌组织强表达

图 1 结直肠癌组织中的 Notch l 蛋白的表达（DAB 染色，×400）



A B C

A. Smad4 在正常组织为阳性表达;B. Smad4 在结直肠癌组织强表达;C. Smad4 在结直肠癌组织弱表达

图 2 结直肠癌组织中的 Smad4 蛋白的表达(DAB 染色,×400)

表 1 Notch 1 和 Smad4 的表达与大肠癌临床病理特征的关系

	分组	例数	Notch1(+)	Smad4 (+)
组织	正常	26	7**	24**
	肿瘤	51	32	26
年龄(岁)	<60	21	13	12
	≥60	30	19	14
性别	男性	30	18	15
	女性	21	14	11
肿瘤直径(cm)	≤3	32	16*	12*
	>3	19	16	14
分化程度	高分化	20	9*	6*
	中低分化	31	23	20
淋巴结转移	阴性	35	20	14*
	阳性	16	11	12
远处转移	阴性	42	26	18*
	阳性	9	6	18
Ducks 分期	A/B 期	24	13	8*
	C/D 期	27	18	18

注:*P<0.05,**P<0.01

3 讨 论

Notch 基因发现于 1919 年[3],其参与调节了各式各样细胞分化发育及调控的信号途径,其对细胞凋亡、增殖、分化及血管形成的效应具有广泛的影响。1991 年,Notch1 在人类 T 淋巴母细胞白血病中首先被鉴定出来,首次提示了 Notch 信号通路与肿瘤相关[4]。Notch1 受体信号通路与肿瘤发生发展关系密切,在不同肿瘤中具有促癌或抑癌作用。本研究发现,在结直肠癌中 Notch1 表达较正常结直肠组织明显上调(P<0.05),提示 Notch1 参与了结直肠癌的发生,说明 Notch1 蛋白的过度表达对于结直肠癌的发生是起促进作用的。图 1 中我们见到结直肠癌组织的腺管增粗,上皮细胞过度增生,细胞核深染,体积变大;并高度表达 Notch1 蛋白,说明其过表达可能导致结直肠腺上皮细胞增殖过度,凋亡减少,并通过上皮表型的恶性转化导致癌变,这在乳腺导管上皮细胞和乳腺癌的研究中也已得到证实[5]。

另有研究发现,Notch1 通路可调节肿瘤干细胞的分化,Notch1 抑制可导致脑胶质瘤干细胞比例减低,肿瘤细胞克隆形成受到抑制,细胞分化和凋亡增加[6]。肿瘤干细胞理论认为正是隐窝干细胞的异常增殖导致了大肠肿瘤的发生。Notch1 蛋白受体的配体 Hes1 可以作为结直肠癌干细胞的表面标志的参考指标[7]。本文证实 Notch1 表达与肿瘤大小、肿瘤分化程度显著相关,肿块大于 3 cm 及分化程度低得直肠癌组织往往有 Notch1 的高表达,由此推测Notch1 蛋

白的高表达可能与肿瘤的分化程度有关，分化程度越低，其表达就越高，表明 Notch1 蛋白的表达异常程度可能与结直肠癌组织的分化程度有关。由于 Notch1 和 Hes1 表达具有依从性，Notch1 表达越高，Hes1 表达越高，由此可间接推测 Notch1 可能通过调节结直肠肿瘤干细胞促进细胞增殖及保持细胞低分化状态，这与 Notch 通路抑制肠分泌细胞的正常分化而产生致瘤性的研究相符合[8]。

有研究者认为，Wnt/β-catenin、Notch、骨形成蛋白（Bone morphogenesis，BMP）的信号系统级联放大在上皮细胞自我更新与癌症发生中有重要作用。BMP 信号途径中包括 TGF-β 超家族在内的细胞信号传导家族成员[9]。其中 Smad4 做为重要的肿瘤抑制蛋白，乃 TGF-β1 信号传导系统的关键组成元件。当 Notch 信号系统出现异常调节，或者由于 Notch基因的异常表达，导致 Notch1 蛋白的异常表达，从而破坏了正常的 Wnt/β-catenin、Notch、BMP 的信号系统，导致肿瘤细胞内 Smad4 蛋白表达的减少，使细胞对TGF-β1 的生长抑制产生耐受，促进肿瘤的发展。研究已证实 TGF-β1 的表达与大肠癌淋巴结转移、临床病理分期（Dukes 分期）及患者术后复发率、生存率相关[10]。本文证实了这一点，Smad4 蛋白在大肠癌标本中 Smad4 的阳性率为52.9%(27/51)，正常大肠组织的的阳性表达率为 96.1%(24/26)，两者相比有显著差异($P<0.01$)说明其在结直肠癌发生、发展中的作用。伴随着 Notch 信号途径的异常表达，引起下游级联信号系统 TGF-β 超家族在内的细胞信号传导的异常，Smad4 对 TGF-β1 信号转导具有中具有关键作用，其缺失或突变可使细胞对 TGF-β1 的生长抑制产生耐受，促进肿瘤的发展。本研究也证实了这一点，正常组织中的 Smad4 蛋白的表达率在大肠癌组织中显著下降，Notch 1 阳性表达的大肠癌组织中 Smad4 的阳性率显著低于 Notch 阴性达的大肠癌组织中 Smad4 的阳性率。

Miyaki 等[11]用 P-SSCP 分析 176 例大肠癌肿瘤发现，伴远处转移的浸润癌 Smad4 的突变频率高于腺瘤，黏膜内癌及不伴远处转移的浸润癌，差异具有显著性意义。从本文结果来看，随着大肠癌浸润及转移的发展，Smad4 的阳性率明显下降，提示 Smad4 的低表达与大肠癌的发展及预后有密切关系。因此本文认为，Smad4 的低表达也可能独立促进肿瘤的浸润及转移，Smad4 可被视为一个独立的肿瘤抑制因子。

本文研究结果显示，大肠癌组织中 Notchl 阳性组 Smad4 的表达明显低于 Notchl 阴性组，二者表达呈明显负相关，提示 Smad4 基因的缺失或突变阻断了 Wnt/β-catenin、Notch、BMP 的信号系统中的 TGF-β 抑制肿瘤生长的转导通路，而这种阻断作用又可能通过负反馈作用使肿瘤细胞 Notch 1 增加，二者可能共同调节恶性肿瘤的发生发展及生物学行为。

综上所述，本实验结果提示 Wnt/β-catenin、Notch、BMP 的信号系统信号转导通路的紊乱可使细胞逃避 TGF-β 介导的生长抑制效应，在大肠癌的演进过程中起到了重要作用，因此，分析大肠癌组织标本中 Notch 1 和 Smad4 蛋白的表达情况，对于评估大肠癌的发展及预后判断具有重要意义，可作为重要的生物学标志，也为临床治疗大肠癌提供了一条新的思路。

参 考 文 献

[1] Leng K G, Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis [J]. Blood, 2006, 107(6): 222-223.

[2] Massi D, Tarantni F, Franchi A, et al. Evidence for differential expression of Notch receptors and their ligands in melanocytic nevi and cutaneous malignant melanoma[J]. Mod Pathol, 2006, 19(2): 246-254.

[3] Artavanis-Tsakonas S, Rand M D, Lake R J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development[J]. Science, 1999, 284 (5415): 770-776.

[4] Nickolof B J, Osborne B A, Miele L. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents[J]. Oncogene, 2003, 22(42): 6598-6608.

[5] Stvlianou S, Clarke R B, Brennan K. Aberrant activation of Notch signaling in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2006, 66(3): 1517-1525.

[6] Fan X, Matsui W, Khaki L, et al. Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors [J]. Cancer Res, 2006, 66(15): 7445-7452.

[7] Potten C S, Booth C, Tudor G L, et al. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker: musashi-1[J]. Differentiation, 2003, 71 (1): 28-41, 7445-7452.

[8] Katoh M, Katoh M. Notch signaling in gastrointestinal tract[J]. Int Joncol, 2007, 30(1): 247-251.

[9] Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer[J]. Nature, 2005, 434-843, 845.

[10] 唐 华，张才全. TGF-β1 蛋自在大肠癌组织的表达及意义[J]. 重庆医科大学学报，2004，29(1)：71-73.

[11] Miyaki M, Iijima T, Konishi M, et al. Higher frequency of Smad4 genemutation in human colorectal cancerwith distant metastasis[J]. Oncogene, 1999, 18(20): 3098-3103.

（责任编辑：冉明会）