

瘦素与 p-mTOR 在大肠癌中的表达及临床意义

汪砥¹, 陈健¹, 陈辉¹, 段智¹, 许奇美¹, 韦妹艳¹, 王亮华¹, 钟美佐²

(1. 湖南省长沙市第一医院病理科, 长沙 410005; 2. 中南大学湘雅医院肿瘤科, 长沙 410008)

[摘要] **目的:** 探讨瘦素和 p-mTOR 蛋白表达与大肠癌发生、发展及其临床病理特征之间的关系。**方法:** 采用免疫组织化学 SP 法检测瘦素、p-mTOR 在 40 例正常大肠黏膜, 40 例大肠腺瘤性息肉和 108 例大肠癌中的表达。**结果:** 瘦素在正常大肠黏膜组织、大肠腺瘤性息肉、大肠癌组织中的阳性表达率分别为 10%(4/40), 27.5%(11/40), 71.3%(77/108), 各组之间差异有统计学意义 ($P<0.05$)。p-mTOR 在正常大肠黏膜组织、大肠腺瘤性息肉、大肠癌组织中的阳性表达率分别为 2.5%(1/40), 20%(8/40), 61.1%(66/108), 各组之间差异有统计学意义 ($P<0.05$); 瘦素与 p-mTOR 的高表达与大肠癌的浸润深度、临床分期、淋巴结转移、远处转移、分化程度密切相关 ($P<0.05$), 而与患者的年龄、性别和部位无关 ($P>0.05$); 大肠癌组织中瘦素与 p-mTOR 的表达呈正相关 ($P<0.01$)。**结论:** 瘦素与 p-mTOR 可能在大肠癌的发生、发展中起相互协同作用, 二者可能作为判断大肠癌预后及指导临床治疗的指标。

[关键词] 瘦素; mTOR; 大肠癌; 免疫组织化学

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.03.004

Expression of leptin and p-mTOR and their clinicopathological significance in human colon carcinoma

WANG Di¹, CHEN Jian¹, CHEN Hui¹, DUAN Zhi¹, XU Qimei¹, WEI Meiyuan¹, WANG Lianghua¹, ZHONG Meizuo²

(1. Department of Pathology, The First Hospital of Changsha City, Changsha 410005;
2. Department of Tumor, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

ABSTRACT

Objective: To investigate the relationship between the expression of leptin, p-mTOR protein and the pathogenesis, development and clinicopathological features in colon carcinoma.

Methods: The expression of leptin and p-mTOR protein was evaluated by immunohistochemical methods in 40 normal colon mucosas, 40 colon adenomatous polyps and 108 cases of colon carcinomas. The relationship between the staining pattern and clinicopathological features was examined.

Results: The positive rates of detection of leptin in normal colon mucosa, adenomatous polyps and colon carcinomas were 10% (4/40), 27.5% (11/40), and 71.3% (77/108), respectively; with significant differences among the three groups ($P<0.05$). The positive rates of p-mTOR protein in the normal colon mucosa, the adenomatous polyps, and the colon carcinomas were 2.5% (1/40), 20% (8/40), and 61.1% (66/108), respectively; with significant differences among the three groups ($P<0.05$). The expression of leptin and p-mTOR proteins were related to invasive depth, TNM stages, lymph node metastasis, distant metastasis and tumor differentiation ($P<0.05$), but not to

收稿日期 (Date of reception): 2011-11-01

作者简介 (Biography): 汪砥, 博士, 主治医师, 主要从事恶性肿瘤的临床及基础研究

通信作者 (Corresponding author): 钟美佐, Email: meizuo_zhong@yahoo.com

基金项目 (Foundation item): 湖南省科技厅计划项目 (2010SK3179)。This work was supported by the Hunan Provincial Department of Science and Technology (2010SK3179).

age, sex, or site ($P>0.05$). In colon carcinoma tissues, leptin expression was positively correlated with p-mTOR expression ($P<0.01$).

Conclusion: Leptin and p-mTOR proteins may play important roles in the occurrence and development of colon carcinoma. The detection of leptin and p-mTOR may be helpful for evaluation of the prognosis of the patient with colon carcinoma.

KEY WORDS

leptin; mTOR; colon carcinoma; immunohistochemistry

大肠癌是一种常见的恶性肿瘤,在西方发达国家其发病率居恶性肿瘤的第2位。大肠癌也是我国常见的恶性肿瘤之一,最近国内大肠癌的发病率已经在升高,目前发病率及死亡率已经上升至前5位。大肠癌的发生是多基因变异、多因素参与的复杂过程,主要由于癌基因的激活、抑癌基因突变或失活、凋亡调控机制异常,导致正常细胞异常增殖、异型增生最终导致癌变^[1]。

肥胖是多种慢性疾病的危险因素,包括高血压,糖尿病,冠心病;同时大量资料证明,肥胖已经成为多种恶性肿瘤的危险因素,尤其是大肠癌^[2]。瘦素是肥胖基因的表达产物,是脂肪细胞来源的多肽类激素,由167个氨基酸组成,分子质量为16 kD。瘦素与食欲,骨骼形成,生殖功能,血管的形成,体质量的调节均有关系。最近研究^[3]发现瘦素与大肠癌的发病及进展密切相关。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammal target of rapamycin, mTOR)是信号转导的重要组成部分,它参与细胞的生长及mRNA的翻译及机体生长代谢。瘦素通过诱导mTOR的活化,参与肥胖相关的疾病例如癌症^[4]。本研究采用免疫组织化学方法检测瘦素和磷酸化mTOR(p-mTOR)在大肠癌、腺瘤性息肉及正常肠黏膜中的表达情况,探讨其与临床病理参数的关系,及瘦素和p-mTOR之间的相关性,为大肠癌的诊断及治疗寻找新的靶点。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

收集长沙市第一医院从2003年1月到2008年8月手术切除大肠癌患者的癌组织标本108例,另取同时期肠镜下的大肠腺瘤性息肉40例以及因意外伤害后肠外伤行部分大肠切除的正常大肠黏膜组织40例作为对照。大肠癌患者术前均未进行化疗、放疗,临床分期采用2009年国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)TNM分期法。

兔抗人瘦素多克隆抗体购自美国Santa Cruz生物技术公司,工作液浓度为1:200;兔抗人p-mTOR

多克隆抗体购自美国Bioworld生物技术公司,工作液浓度为1:250;SP免疫组织化学试剂盒购自上海太阳生物技术公司。

1.2 方 法

染色步骤按照SP免疫组织化学试剂盒说明书进行操作。组织切片脱蜡,水化,微波抗原修复,阻断内源性过氧化物酶10 min;非特异性血清封闭10 min;一抗4℃孵育过夜;二抗孵育10 min,上述各步骤后均以PBS冲洗10 min×3次。DAB显色,苏木精复染细胞核,脱水,透明,封片,光学显微镜下观察,拍照。以预试验反复多次证实为阳性的组织切片作为阳性对照,以PBS代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判断

瘦素和p-mTOR染色阳性为胞质内出现棕褐色颗粒。对实验结果进行半定量判定:染色强度依次为0分(无色)、1分(淡黄色)、2分(棕黄色)、3分(棕褐色);染色范围以染色细胞所占的百分比评分,阳性细胞占总细胞的比率≤10%为0分,≤50%为1分,≤75%为2分,>75%为3分。染色强度得分与阳性细胞百分比得分的乘积为免疫组织化学结果,结果≥1分为阳性,0分为阴性。

1.4 统计学处理

计数资料采用 χ^2 及精确概率法检测,应用SPSS 13.0 统计数据包软件进行数据处理, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 瘦素和 p-mTOR 蛋白在正常大肠黏膜、大肠腺瘤性息肉及大肠癌组织中的表达

瘦素在正常大肠黏膜组织、大肠腺瘤性息肉以及大肠癌组织中的阳性表达率分别为10%, 27.5%和71.3%,各组之间的差异具有

统计学意义 (图 1A~1C, $P < 0.05$)。p-mTOR 在正常大肠黏膜组织、大肠腺瘤性息肉以及大肠癌组织中的阳性表达率分别为 2.5%, 20% 和 61.1%, 各组之间的差异具有统计学意义 (图 1D~1F, $P < 0.05$)。

2.2 瘦素和 p-mTOR 的表达与临床病理参数之间的关系

瘦素和 p-mTOR 的表达率均与患者的年龄、性别、部位无关 ($P > 0.05$), 而与大肠癌浸润深度、临

床分期、淋巴结转移、远处转移、分化程度密切相关, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 瘦素和 p-mTOR 在大肠癌中表达的相关性

大肠癌组织瘦素阳性表达病例中, p-mTOR 有 60 例阳性表达, 17 例阴性表达; 大肠癌瘦素阴性表达病例中, p-mTOR 有 25 例阴性表达, 6 例阳性表达者。经过统计学相关分析, 二者之间阳性表达呈显著正相关 ($\chi^2 = 31.9$, $r = 0.543$, $P < 0.001$, 表 3)。

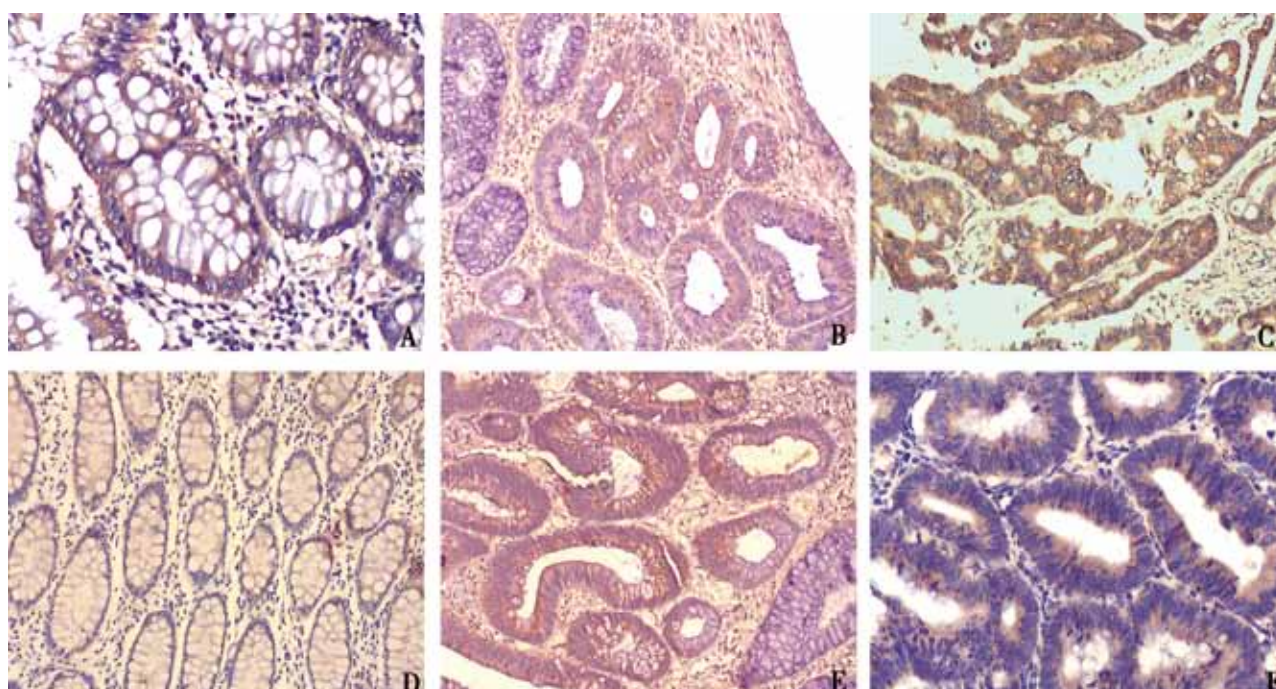


图 1 瘦素在正常大肠黏膜 (A)、大肠腺瘤性息肉 (B) 及大肠癌组织 (C) 中的阳性表达和 p-mTOR 蛋白在正常肠黏膜 (D)、大肠腺瘤性息肉 (E) 及大肠癌组织 (F) 中的阳性表达 (SP, $\times 200$)。

Figure 1 Leptin positive expression in normal colon mucosa (A), colon adenomatous polyps (B) and adenocarcinoma (C); p-mTOR positive expression in normal colon mucosa (D), colon adenomatous polyps (E) and adenocarcinoma (F) (SP, $\times 200$).

表 1 瘦素和 p-mTOR 在正常大肠黏膜、大肠腺瘤性息肉、大肠癌组织中的表达水平

Table 1 Expression of leptin and p-mTOR in normal colon mucosa, adenomatous polyps and adenocarcinoma

组别	n	瘦素的表达			p-mTOR 的表达		
		阳性 /%	阴性 /%	χ^2	阳性 /%	阴性 /%	χ^2
正常黏膜	40	4 (10.0)	36 (90.0)		1 (2.5)	39 (97.5)	
大肠腺瘤性息肉	10	11 (27.5)	29 (72.5)	53.232	8 (20.0)	32 (80.0)	101.84
大肠癌	108	77 (71.3)	31 (28.7)		66 (61.1)	42 (38.9)	
P		<0.05			<0.05		

表 2 瘦素和 p-mTOR 与大肠癌患者临床病理参数之间的关系

Table 2 Relation between the expression of leptin and p-mTOR and clinicopathology parameters of colon cancer patients

临床病理参数	n	瘦素阳性表达数		p-mTOR 阳性表达数	
		n	P	n	P
性别					
男	57	38	0.261	38	0.211
女	51	39		28	
年龄 / 岁					
<60	41	28	0.589	25	0.982
≥ 60	67	49		41	
部位					
结肠	78	57	0.435	47	0.769
直肠	30	20		19	
浸润深度					
T1/T2	26	12	=0.001	8	<0.001
T3/T4	82	65		58	
临床分期					
I / II	51	27	<0.001	21	<0.001
III / IV	57	50		45	
淋巴结转移					
无	58	33	<0.001	26	<0.001
有	50	44		40	
远处转移					
无	97	66	=0.032	56	=0.026
有	11	11		10	
分化程度					
高	10	4	<0.001	5	=0.001
中	56	33		25	
低	42	40		36	

表 3 大肠癌组织中瘦素和 p-mTOR 表达的相关性

Table 3 Correlation of leptin and p-mTOR expression in colon cancer

Leptin	p-mTOR		χ^2	P
	-	+		
-	25	6	31.9	<0.001
+	17	60		

3 讨论

瘦素是肥胖基因的表达产物, 主要由脂肪细胞合成并分泌的 16 kD 的细胞因子, 主要的生物学功能是调节食物的摄取及机体新陈代谢的平衡。肥胖病人的瘦素水平增高主要与机体的脂肪含量有关。最近有研究^[5]表明: 肥胖病人患结肠癌风险增高, 这可能与瘦素的生物学作用有关, 机体的瘦素水平

可能是大肠癌的一个重要的风险因素。FitzGerald 等^[6]发现, 瘦素能促进肠黏膜细胞的增殖及癌变。Ratke 等^[7]证明, 瘦素能通过多条信号转导途径促进大肠癌细胞的侵袭及浸润, 提示瘦素可能参与大肠癌的发生及进展。瘦素在大肠黏膜的生物学作用非常复杂, 其在大肠癌变中的作用机制未完全阐明。

本研究结果显示: 瘦素在大肠癌组织中的表达明显高于正常大肠黏膜及癌前病变大肠腺瘤性息肉, 且瘦素的表达率与患者的性别、年龄、部位无关, 而与大肠癌浸润深度、临床分期、淋巴结转移、远处转移、分化程度密切相关。

mTOR 是 PI3K 激酶信号通路下游的信号分子, 其生理学作用是调节真核细胞的生长、增殖、生存、移动、血管生成^[8]。同时有研究证明, mTOR 过表达于各种实体恶性肿瘤中, 例如肝癌^[9]、乳腺癌^[10]、前列腺癌^[11]、胃癌^[12]、肾癌^[13]。Lang 等^[14]证明: p-mTOR 过表达于 60% 的肠型及 64% 的广泛型人

胃癌组织中,抑制 mTOR 的表达能明显地抑制胃癌的侵袭及增殖。提示 mTOR 可能成为各种实体恶性肿瘤治疗的一个新的靶点。

本研究结果显示: p-mTOR 在大肠癌组织中的表达明显高于正常肠黏膜及癌前病变大肠腺瘤性息肉的表达率,且瘦素的表达率均与患者的年龄、性别、部位无关,而与大肠癌浸润深度、临床分期、淋巴结转移、远处转移、分化程度密切相关。

最近有研究证明, mTOR 参与瘦素的信号转导通路。Shan 等^[15]发现,瘦素能通过活化 mTOR 及 PIK3 促进血管平滑肌细胞的增殖及侵袭。Maya-Monteiro 等^[16]发现,瘦素通过活化 mTOR 及 PIK3 促进巨噬细胞脂肪小体的形成,证实瘦素和 mTOR 可能参与心血管疾病的发生。但瘦素及 mTOR 是否也参与大肠癌的发生及进展还不清楚。

本研究结果证实,大肠癌组织中,瘦素的表达与 p-mTOR 的表达呈正相关,提示 p-mTOR 可能参与瘦素的信号转导通路。

综上所述,在大肠癌组织中,瘦素与 p-mTOR 的高表达可能与大肠癌的发生、侵袭及转移密切相关,两者可能协同参与大肠癌的发生、发展及浸润转移,检测大肠癌组织中瘦素与 p-mTOR 的表达将可能作为判断大肠癌患者预后及指导临床治疗的一个重要的靶点。

参考文献

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005,55 (2):74-108.
2. Pischon T, Nöthlings U, Boeing H. Obesity and cancer[J]. Proc Nutr Soc, 2008,67(2):128-145.
3. Jaffe T, Schwartz B. Leptin promotes motility and invasiveness in human colon cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways[J]. Int J Cancer, 2008,123(11):2543-2556.
4. Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Leptin and mTOR: Partners in metabolism and inflammation[J]. Cell Cycle, 2008,7(12):1713-1717.
5. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms[J]. Nat Rev Cancer, 2004,4(8):579-591.
6. FitzGerald AJ, Mandir N, Goodlad RA. Leptin, cell proliferation and crypt fission in the gastrointestinal tract of intravenously fed rats[J]. Cell Prolif, 2005,38(1):25-33.
7. Ratke J, Entschladen F, Niggemann B, et al. Leptin stimulates the migration of colon carcinoma cells by multiple signaling pathways[J]. Endocr Relat Cancer, 2010,17(1):179-189.
8. Wiedmann MW, Caca K. Molecularly targeted therapy for gastrointestinal cancer[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2005,5(3):171-193.
9. Sahin F, Kannangai R, Adegbola O, et al. mTOR and p70S6 kinase expression in primary liver neoplasms[J]. Clin Cancer Res, 2004,10(24):8421-8425.
10. Bose S, Chandran S, Mirocha JM, et al. The Akt pathway in human breast cancer: a tissue-array-based analysis[J]. Mod Pathol, 2006,19(2):238-245.
11. Saucier C, Papavasiliou V, Palazzo A, et al. Use of signal specific receptor tyrosine kinase oncoproteins reveals that pathways downstream from Grb2 or Shc are sufficient for cell transformation and metastasis[J]. Oncogene, 2002,21(12):1800-1811.
12. Saito H, Osaki T, Murakami D, et al. Effect of age on prognosis in patients with gastric cancer[J]. ANZ J Surg, 2006,76(6):458-461.
13. Robb VA, Karbowniczek M, Klein-Szanto AJ, et al. Activation of the mTOR signaling pathway in renal clear cell carcinoma[J]. J Urol, 2007,177(1):346-352.
14. Lang SA, Gaumann A, Koehl GE, et al. Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model[J]. Int J Cancer, 2007,120(8):1803-1810.
15. Shan L, Nguyen TB, Totary-Jain H, et al. Leptin-enhanced neointimal hyperplasia is reduced by mTOR and PI3K inhibitors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008,105(48):19006-19011.
16. Maya-Monteiro CM, Almeida PE, D'Avila H, et al. Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism[J]. J Biol Chem, 2008, 283(4):2203-2210.

(本文编辑 郭征)