

文章编号:1000-5404(2012)09-0899-03

论著

脂肪酰胺水解酶在结直肠癌中的表达及临床意义

邓佳, 谢贇丰, 舒秋霞, 王宁, 梁后杰 (400038 重庆, 第三军医大学西南医院肿瘤科)

[摘要] 目的 检测脂肪酰胺水解酶(fatty acid amide hydrolase, FAAH)在结直肠癌及正常肠黏膜中的表达,探讨其临床意义。方法 应用 Western blot 和组织芯片技术结合免疫组化法检测结直肠癌组织以及对应正常肠黏膜中 FAAH 蛋白的表达。结果 FAAH 在结直肠癌组织中的表达低于正常肠黏膜,169 例结直肠癌组织中 FAAH 的阳性表达率显著低于正常肠黏膜(56.8% vs 97.4%, $P < 0.01$),并与肿瘤的分化程度密切相关($P < 0.01$)。结论 FAAH 在结直肠癌组织中低表达,在正常肠黏膜中高表达,在结直肠癌的恶性增殖中发挥着重要作用。

[关键词] 结直肠癌;组织芯片;脂肪酰胺水解酶

[中图分类号] R341.5; R730.23; R735.35

[文献标志码] A

Expression of fatty acid amide hydrolase in colorectal cancer and its clinical significance

Deng Jia, Xie Ganfeng, Shu Qiuxia, Wang Ning, Liang Houjie (Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of fatty acid amide hydrolase (FAAH) in colorectal cancer and normal intestinal mucosa, and to explore the clinical significance of FAAH. **Methods** Western blotting and immunohistochemical staining were applied for the detection of FAAH expression in 169 cases of colorectal cancer tissues and 38 cases of normal intestinal mucosae. **Results** The expression level of FAAH in the colorectal cancer tissues was lower than that in the normal intestinal mucosae. The positive expression rate of FAAH in the colorectal cancer tissues was significantly lower than that in the normal intestinal mucosae (56.8% vs 97.4%, $P < 0.01$). FAAH expression was significantly correlated with tumor differentiation degree ($P < 0.01$). **Conclusion** FAAH, which is mildly expressed in colorectal cancer tissue but highly expressed in normal intestinal mucosa, plays an important role in the malignant proliferation of colorectal cancer.

[Key words] colorectal cancer; tissue microarray; fatty acid amide hydrolase

Corresponding author: Liang Houjie, Tel:86-23-68754128, E-mail:lianghoujie@sina.com

结直肠癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,随着我国饮食结构和环境的改变,其发病率逐年上升。其恶性增殖能力是影响患者预后的重要因素。内源性大麻素被认为能抑制恶性肿瘤的增殖,是潜在的抑癌药^[1]。花生四烯酰乙醇胺(Anandamide, AEA)和花生四烯酰甘油(2-Arachidonoylglycerol, 2-AG)为目前已知的最主要的两种内源性大麻素^[2]。AEA 在体内代谢主要是通过脂肪酰胺水解酶(fatty acid amide hydrolase, FAAH)降解为花生四烯酸和乙醇胺,而 2-AG 是通过脂肪酰胺水解酶和单酰基甘油脂肪酶(monoacylglycerol lipase, MAGL)降解为花生四烯酸和甘油^[3]。FAAH 通过灭活 AEA 影响肿瘤细胞的增殖,目前在结

直肠癌中的表达及与临床病理特征的关系尚不清楚。为此,本研究检测了 FAAH 在结直肠癌及正常肠黏膜中的表达情况及与临床病理特征的关系。

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野战外科研究所 2011 年 4-9 月手术切除结直肠癌标本 169 例(其中 38 例取正常肠黏膜作为对照),其中 20 例新鲜组织冻存于液氮罐中备用。其余标本经 40 g/L 中性甲醛固定,常规石蜡包埋,制作成 4 μm 厚切片供定位用。每例经由资深病理医师做病理学诊断并标记出癌组织和正常肠黏膜组织部位。采用组织芯片制作仪(Beecher 公司,美国)制作组织芯片(取样针直径为 1 mm)。每例标本取 2~3 个点,共制作蜡块 3 个,蜡块 A 含 38

[通信作者] 梁后杰,电话:(023)68754128, E-mail:lianghoujie@sina.com

例结直肠癌及对应的正常肠黏膜样本,蜡块 B 含 45 例结直肠癌样本,蜡块 C 含 86 例结直肠癌样本。

1.2 试剂和仪器

兔抗人 FAAH 多克隆抗体(Cayman chemical 公司),Western 细胞裂解液,BCA 蛋白浓度测定试剂盒,辣根过氧化物酶标记二抗(碧云天公司),免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒(S-P9001,中杉公司)。

1.3 方法

1.3.1 Western blot 检测 利用液氮、研钵粉碎组织块,Western 细胞裂解液裂解细胞并提取结直肠癌组织、正常肠黏膜总蛋白。BCA 法测定蛋白质浓度。制备 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶,每孔上样 40 μg 蛋白。电泳分离蛋白后电转移至硝酸纤维素膜。抗 FAAH 一抗(1:4 000)4 °C 孵育过夜。TBST 漂洗后辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:6 000)室温孵育 1 h。超敏 ECL 化学发光试剂显色。

1.3.2 免疫组化染色 石蜡切片脱蜡、水化,PBS 洗 3 × 3 min;3% 过氧化氢室温下避光孵育 10 min,PBS 洗 3 × 3 min;柠檬酸缓冲液微波抗原修复;山羊血清抗原封闭 20 min 后滴加 FAAH 一抗(1:2 000),4 °C 孵育过夜。PBS 洗 5 × 5 min,滴加生物素标记羊抗兔二抗;PBS 洗 5 × 5 min,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液;PBS 洗 5 × 5 min,DAB 显色,苏木精复染,脱水,封片。结果判定: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,按染色程度计分:0 分为无色,1 级为淡黄色,2 级为棕黄色,3 级为棕褐色;再根据阳性细胞在所观察细胞中所占的百分比计分:0 分为阳性细胞 < 5%,1 分为阳性细胞 5% ~ 25%,2 分为阳性细胞 26% ~ 50%,3 分为阳性细胞 51% ~ 75%,4 分为阳性细胞 > 75%。染色强度与阳性细胞百分比得分相加,0 分(-),1 分(±),2~3 分(+),4~5 分(++),6~7 分(+++)。0~1 分为阴性表达,2~7 分为阳性表达。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件行 χ^2 检验。

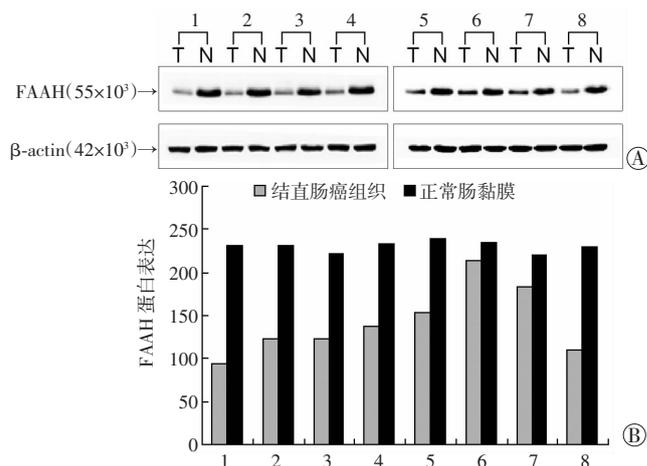
2 结果

2.1 结直肠癌组织与正常肠黏膜中 FAAH 蛋白的表达

Western blot 检测了 8 例结直肠癌患者肿瘤组织与对应的正常黏膜中 FAAH 蛋白的表达,结果显示,FAAH 蛋白在正常肠黏膜中表达显著,而在对应结直肠癌组织中有不同程度的表达降低(图 1)。半定量灰度分析显示在结直肠癌组织(142.3 ± 39.5)和正常肠黏膜中 FAAH 表达(230.1 ± 6.3)差异有统计学意义($P < 0.01$)。免疫组化染色显色 FAAH 蛋白的阳性表达位于细胞质,呈灶状和弥漫分布,以腺腔缘明显(图 2)。169 例结直肠癌组织 FAAH 阳性表达 96 例(56.8%),38 例正常肠黏膜组织 FAAH 阳性表达 37 例(97.4%),二者之间有差异($P < 0.01$)。

2.2 结直肠癌中 FAAH 蛋白表达与临床病理参数的关系

结直肠癌组织中 FAAH 蛋白表达低于正常肠黏膜,与肿瘤分化程度有关($P < 0.01$);与患者性别、年龄、浸润深度、TNM 分期等无相关性($P > 0.05$),见表 1。

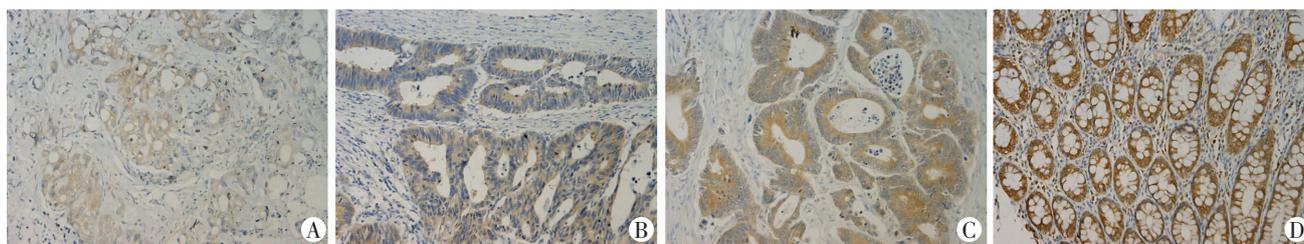


1~8: 8 例患者;A: Western blot 检测 T: 结直肠癌组织;N: 正常肠黏膜;B: 半定量分析

图 1 8 例人结直肠癌组织及对应正常肠黏膜中 FAAH 蛋白表达

表 1 结直肠癌中 FAAH 蛋白表达与临床病理参数的关系

临床病理参数	n	FAAH 蛋白表达 (%)			P
		- / ±	+ / ++	+++	
年龄(岁)					0.577
< 60	76	34(44.7)	26(34.2)	16(21.1)	
≥ 60	93	39(41.9)	28(30.1)	26(28.0)	
性别					0.533
男	107	43(40.2)	35(32.7)	29(27.1)	
女	62	30(48.4)	19(30.6)	13(21.0)	
器官					0.955
结肠	139	60(43.2)	45(32.4)	34(24.5)	
直肠	30	13(43.3)	9(30.0)	8(26.7)	
分化程度					0.001
高分化	31	6(19.4)	10(32.3)	15(48.4)	
中分化	90	37(41.1)	31(34.4)	22(24.4)	
低分化	48	30(62.5)	13(27.1)	5(10.4)	
浸润深度					0.859
T1	1	1(100.0)	0(0)	0(0)	
T2	10	5(50.0)	4(40.0)	1(10.0)	
T3	40	19(47.5)	11(27.5)	10(25.0)	
T4	118	48(40.7)	39(33.1)	31(26.3)	
淋巴结转移					0.875
N0	109	47(43.1)	35(32.1)	27(24.8)	
N1	41	17(41.5)	12(29.3)	12(29.3)	
N2	19	9(47.4)	7(36.8)	3(15.8)	
远处转移					0.139
无	132	55(41.7)	47(35.6)	30(22.7)	
有	37	18(48.6)	7(18.9)	12(32.4)	
临床分期					0.486
I	10	6(60.0)	3(30.0)	1(10.0)	
II	85	34(40.0)	29(34.1)	22(25.9)	
III	38	15(39.5)	15(39.5)	8(21.1)	
III	36	18(50.0)	7(19.4)	11(30.6)	



A:低分化腺癌;B:中分化腺癌;C:高分化腺癌;D:正常肠黏膜

图2 结直肠组织 FAAH 免疫组织化学染色观察 (EliVision ×200)

3 讨论

近年来,内源性大麻素系统在人体各个系统中的作用成为一个研究热点^[4]。大麻中的主要精神活性物质四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol, THC)通过识别大麻素受体 CB1 和 CB2,参与调节免疫、心血管、呼吸等人体许多重要的生理病理活动^[5-7]。除此之外,人体内还发现了 CB 受体的两种天然配体,AEA 和 2-AG,以及将 AEA 和 2-AG 分解灭活的关键酶 FAAH。包括 THC、AEA 和 2-AG 在内的内源性大麻素能抑制神经生长因子介导的乳腺癌细胞增殖^[8];能激活 CB1 受体,通过下调表皮生长因子受体和上调神经酰胺的表达,抑制表皮生长因子介导的前列腺癌细胞的增殖^[9-10];在体内还参与结直肠癌细胞的生长^[11]。

结直肠癌细胞中 AEA 和 2-AG 的表达是正常肠黏膜上皮细胞中的 2~3 倍,发挥内源性抑制剂的作用^[12]。FAAH 被证实为将 AEA 和 2-AG 分解为花生四烯酸和乙醇胺或甘油的最主要关键酶^[13],FAAH^{-/-}小鼠脑中 AEA 的含量是 FAAH^{+/+}小鼠的 15 倍^[14]。但是在结直肠癌中,FAAH 的表达情况及可能的效应尚少见报道。我们检测了 8 例结直肠癌组织和对应正常肠黏膜中 FAAH 蛋白的表达,发现结直肠癌组织中 FAAH 的表达明显低于正常肠黏膜。我们还应用高通量组织芯片技术及免疫组化方法,检测了 169 例结直肠癌组织(其中 38 例有对应的正常肠黏膜)中 FAAH 的表达情况。结果发现,FAAH 在正常肠黏膜上皮中恒定高表达,部分结直肠癌中有表达减低或缺失的情况,与肿瘤的病理学分级有关,即分化程度越低,其表达量越低。FAAH 在结直肠癌中的表达与其他研究者报道的 AEA 和 2-AG 在结直肠癌细胞中的表达结论一致,证实 FAAH 在结直肠癌确实发挥灭活 AEA 和 2-AG 的作用。FAAH 在结直肠癌组织中的表达缺失,提升了 AEA 和 2-AG 浓度,使二者发挥内源性抑癌剂的作用,提示 FAAH 的表达与肿瘤的恶性增殖有关。将来可进一步研究 FAAH 抑制剂作为抗肿瘤药物的可能性。

参考文献:

- [1] Guzman M. Cannabinoids: potential anticancer agents[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(10): 745-755.
- [2] Pushkarev V M, Kovzun O I, Tronko M D. Antineoplastic and apoptotic effects of cannabinoids. N-acyl ethanolamines: protectors or killers? [J]. Exp Oncol, 2008, 30(1): 6-21.
- [3] Petrosino S, Di-Marzo V. FAAH and MAGL inhibitors; therapeutic opportunities from regulating endocannabinoid levels[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2010, 11(1): 51-62.
- [4] Izzo A A, Camilleri M. Cannabinoids in intestinal inflammation and cancer[J]. Pharmacol Res, 2009, 60(2): 117-125.
- [5] Cencioni M T, Chiurciu V, Catanzaro G, et al. Anandamide suppresses proliferation and cytokine release from primary human T-lymphocytes mainly via CB2 receptors[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8688.
- [6] Hiley C R, Hoi P M. Oleamide: a fatty acid amide signaling molecule in the cardiovascular system? [J]. Cardiovasc Drug Rev, 2007, 25(1): 46-60.
- [7] Tree K, Caravagna C, Hilaire G, et al. Anandamide centrally depresses the respiratory rhythm generator of neonatal mice [J]. Neuroscience, 2010, 170(4): 1098-1109.
- [8] De-Petrocellis L, Bisogno T, Ligresti A, et al. Effect on cancer cell proliferation of palmitoylethanolamide, a fatty acid amide interacting with both the cannabinoid and vanilloid signalling systems[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2002, 16(4): 297-302.
- [9] Nithipatikom K, Isbell M A, Endsley M P, et al. Anti-proliferative effect of a putative endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol ether in prostate carcinoma cells [J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2011, 94(1/2): 34-43.
- [10] Mimeault M, Pommery N, Watzel N, et al. Anti-proliferative and apoptotic effects of anandamide in human prostatic cancer cell lines; implication of epidermal growth factor receptor down-regulation and ceramide production[J]. Prostate, 2003, 56(1): 1-12.
- [11] Linsalata M, Notarnicola M, Tutino V, et al. Effects of anandamide on polyamine levels and cell growth in human colon cancer cells[J]. Anticancer Res, 2010, 30(7): 2583-2589.
- [12] Ligresti A, Bisogno T, Matias I, et al. Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth [J]. Gastroenterology, 2003, 125(3): 677-687.
- [13] 乔雷, 陈春生, 张树成. 正常结肠壁内 FAAH 的表达及意义[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(22): 2266-2271.
- [14] Cravatt B F, Demarest K, Patricelli M P, et al. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(16): 9371-9376.

(收稿:2012-01-11;修回:2012-03-05)

(编辑 汪勤俭)