

β -catenin、干细胞标志物 Sox-2 表达与结肠癌术后复发转移的关系

李宁 邓文英 马懿辉 陈小兵 韩黎丽 罗素霞

【摘要】 目的 探讨结肠癌患者肿瘤组织中 β -catenin、Sox-2 表达情况及其对远处转移的预测作用。方法 采用免疫组化方法检测 80 例结肠癌患者 β -catenin、Sox-2 表达情况,RT-PCR 检测 20 例冰冻标本肿瘤组织及癌旁组织中 Sox-2 表达情况。结果 在 35 例转移组患者中有 23 例(65.71%) β -catenin 阳性表达,17 例(48.57%) Sox-2 阳性表达,均高于非转移组。不同的肿瘤分化程度、T 分期、N 分期 β -catenin、Sox-2 表达差异没有统计学意义。肿瘤组织中 Sox-2 表达明显高于癌旁组织。二者均为阳性表达转移率明显高于均为阴性表达转移率,生存分析显示不同表达状态其远处转移出现时间差异有统计学意义($P=0.0009$)。转移组 82.86% (29/35) 的患者血清癌胚抗原(CEA)水平升高,非转移组为 26.67% (12/45),两组差异有统计学意义($P=0.001$)。结论 血清 CEA 水平检测同结肠癌术后远处转移相关;组织 β -catenin、Sox-2 表达同结肠癌术后复发转移发生相关。

【关键词】 结肠肿瘤; β 连环素; 肿瘤转移; Sox-2

Expression of β -catenin and Sox-2 in colonal cancer and the relationship with metastasis LI Ning, DENG Wen-ying, MA Yi-hui, CHEN Xiao-bing, HAN Li-li, LUO Su-xia. Department of Medical Oncology, Henan Tumor Hospital, Zhengzhou 450000, China

Corresponding author: LUO Su-xia, Email: luo001suxia@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of β -catenin, Sox-2 in colonal carcinoma and the relationship with metastasis. **Methods** Immunohistochemical analysis was used to evaluate the expression of β -catenin and Sox-2. The level of Sox-2 were evaluated by RT-PCR in tumor tissue and normal tissue adjacent to tumor. **Results** In metastasis group, 23 patients (23/35, 65.71%) were with high level of β -catenin, and 17 patients (17/35, 48.57%) were with high level of Sox-2. The difference was significant. Expression of β -catenin and Sox-2 were not associated with differentiation, T stage or N stage. The positive expression rate of Sox-2 in colonal carcinoma tissues was significantly higher than that of normal tissues. Metastatic rate in positive expression was higher than that in negative expression. And the survival analysis showed that time of metastasis was significant different in two groups ($P=0.0009$). **Conclusions** The level of CEA can predict the metastasis of colonal cancer after operation. Both of β -catenin and Sox-2 are hopeful metastasis predictor for patients with colonal cancer.

【Key words】 Colonic neoplasms; Catenin, beta; Neoplasm metastasis; Sox-2

结肠癌术后的复发转移是临床亟待解决的问题,近几年出现的肿瘤干细胞理论为这个问题的解决带来了希望。目前相继在乳腺癌^[1]、胰腺癌^[2]、肝癌^[3]等多种恶性肿瘤中鉴定出具有干细胞性质的恶性肿瘤细胞,成为肿瘤生长、复发及转移的根源^[4]。

作为胚胎干细胞转录因子,Sox-2 在维持胚胎干细胞的干性方面发挥重要的作用。基础研究发现在多种肿瘤组织中可以检测到 Sox 家族成员,特别在低分化的肿瘤细胞中高表达^[5]。 β -catenin 是一种多功能的细胞质蛋白,一方面可以和 E-cadherin 结合成复合体调节细胞间黏附,一方面又是 wnt 信号通路中的下游分子,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.22.012

基金项目:卫生部科研基金资助项目(WKJ2007-2-026);河南省社会公益项目(胃癌肿瘤干细胞因子检测及临床研究)

作者单位:450000 郑州,河南省肿瘤医院内科(李宁、邓文英、陈小兵、韩黎丽、罗素霞);郑州大学第一附属医院病理科(马懿辉)

通讯作者:罗素霞,Email:luc001suxia@126.com

该信号传导通路的异常与结肠癌发生发展密切相关^[6]。目前,在结肠癌组织中 β -catenin、Sox-2表达情况如何,二者表达同结肠癌术后的复发转移关系如何目前还不清楚。

本研究旨在分析结肠癌组织中 β -catenin、Sox-2表达情况,探讨其表达情况同结肠癌术后复发转移的关系,为结肠癌干细胞研究提供一定的理论基础。

资料与方法

1. 研究对象:随机选取2008年1~12月在河南省肿瘤医院确诊的Ⅲ期结肠癌患者80例,其中20例患者保存新鲜冰冻组织。其中男38例,女42例,>60岁患者21例,≤60岁59例,中位年龄52岁。术前未行治疗,术前检查及术中探查均未发现远处转移。术后行辅助FOLFOX6方案化疗8~10个疗程,每例患者每3~4个月复查血清CEA(清晨空腹抽血),胸、腹部CT等,如CT提示肺、肝或局部淋巴结转移时,可再行局部穿刺、MRI、PET-CT等检查证实,以CT检查时间为转移发生时间。

2. cDNA抽提:剪取约100 mg肿瘤组织及癌旁正常组织分别放入1 ml PBS中,使用组织研磨器形成细胞悬液,过滤离心后取沉淀,加入一定量Trizol(Invitrogen),按常规提取总RNA,采用核酸蛋白检测仪检测总RNA浓度及纯度,样品的A260/A280须在1.7~2.0之间。采用琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量,使用逆转录系统试剂盒获取cDNA。

3. 引物设计:用Primer Premier 5.0引物设计软件跨外显子设计Sox-2与 β -actin基因上下游引物,见表1^[7]。

表1 Sox-2与 β -actin基因上下游引物

基因	引物序列	产物长度(bp)
Sox-2	上游 5'-TTGCTGCCTCTTTAAGACTAGGA-3'	75
	下游 5'-CTGGGGCTCAAACCTTCTCTC-3'	
β -actin	上游 5'-CATCCTGCGGCTGGACCT-3'	480
	下游 5'-TCAGGAGGAGCAATGATCTTG-3'	

4. RT-PCR:反应体系为25 μ l,分别含cDNA模板2 μ l,上下游引物(10 pmol/ μ l)各0.5 μ l,DNA聚合酶(2.5 U/ μ l)0.5 μ l,10 \times PCR缓冲液2.5 μ l,dNTP(10 mmol/L)0.5 μ l。扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min。取10 μ l扩增产物于15 g/L琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙啶染色后于凝胶成像仪紫外透射观察结果。

5. 免疫组化染色:采用S-P免疫组化方法,严格按照试剂盒说明书检测 β -catenin、Sox-2(一抗:北京中杉金桥生物技术有限公司)在肿瘤组织中的表达。

免疫组化评价标准:由有经验的病理科医师单盲阅片,在10 \times 40倍显微镜下观察记数,每张切片随机选择5个视野,每个视野记数200个细胞。 β -catenin从细胞膜、细胞质、细胞核三个方面进行结果判断:细胞膜>70%的癌细胞阳性为正常表达,反之为减弱表达;细胞质或胞核>10%为异位表达。胞膜减弱表达、细胞质胞核异位表达均为阳性表达^[8]。Sox-2蛋白为核染色阳性,判断标准为:0=无表达;1=<10%为阳性;2=10%~50%阳性;3=>50%为阳性。阴性表达为0~1分,阳性表达为2~3分(图1)。

6. 检测血清癌胚抗原(CEA)水平:采用化学发光法检测血清CEA水平,正常范围为0~5 ng/ml。

7. 统计学分析:采用SPSS 10.0统计软件包进行数据整理和统计分析。比较 β -catenin、Sox-2蛋白表达血清和CEA水平与转移关系时采用 χ^2 检验;比较表达情况对远处转移出现时间影响时采用Kaplan-Meier生存分析法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 可评价患者临床特征:所有患者,均可评价血清CEA水平和肿瘤组织 β -catenin、Sox-2染色。随访率100%,中位随访时间2.5年。以转移是否发生将患者分为转移组和非转移组。共有35例(43.75%)患者确

诊转移,其中21例为单个脏器转移,14例为多发脏器转移。

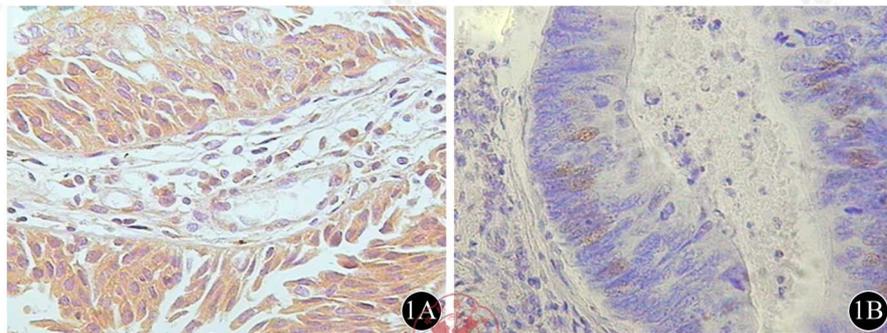


图1 β-catenin、Sox-2在结肠癌组织中表达(SP×400)。1A: β-catenin阳性表达;1B: Sox-2阳性表达

2. 血清 CEA 表达:在转移组中共有6例(17.14%)患者 CEA 在正常范围(0~5 ng/ml)内,其他29例患者出现不同程度 CEA 升高[(79±114.02)ng/ml]。在非转移组中共有12例(26.67%)患者出现 CEA 升高[(4.9±4.20)ng/ml],两组间差异有统计学意义($P=0.001$)。CEA 表达差异同其他临床病理特征间没有明显联系(表2)。

3. β-catenin 表达:在转移组中共有23例(65.71%)患者 β-catenin 阳性表达,而非转移组中共有14例(31.11%)患者阳性表达,两组差异有统计学意义($P=0.001$)。同时,在原发灶不同分化程度 β-catenin 表达也有差异,但不同分化程度、T分期和N分期 β-catenin 表达差异没有统计学意义(表2)。

表2 血清 CEA,组织中 Sox-2、β-catenin 表达同临床特征间的关系

临床特征	例数	血清 CEA 表达		Sox-2 表达		β-catenin 表达	
		阳性例数	P 值	阳性例数	P 值	阳性例数	P 值
分化程度			0.343		0.408		0.151
分化型	33	19		12		14	
未分化型	47	22		13		23	
T分期			0.276		0.832		0.082
T1/T2	43	25		13		23	
T3/T4	37	17		12		14	
N分期(阳性淋巴结)			0.178		0.124		0.407
<4个	41	18		16		14	
≥4个	39	23		9		27	
转移			0.001		0.001		0.001
有	35	29		17		23	
无	45	12		8		14	

4. Sox-2 在结肠癌组织中表达情况:在转移组中共有17例(48.57%)患者 Sox-2 阳性表达,而非转移组中共有8例(17.78%)患者阳性表达,两组差异有统计学意义($P=0.001$)。同时,虽然原发灶不同分化程度、不同T分期和N分期中 Sox-2 表达存在差异,但是差异没有统计学意义(表2)。

5. Sox-2 在新鲜冰冻组织中表达:采用 RT-PCR 方法检测结肠癌组织及癌旁组织发现癌组织中有8例患者检测出 Sox-2 表达,阳性表达率为40%,癌旁组织中有1例患者检测出阳性表达,表达率为5%,差异有统计学意义($P=0.02$)(图2)。

6. β-catenin 及 Sox-2 表达情况同术后转移关系:入组80例结肠癌患者,β-catenin 及 Sox-2 均为阳性表达的患者为13例,其中发生远处转移10例,任一指标为阳性表达36例,远处转移20例,均为阴性表达31例,

其中远处转移5例。不同表达状态同远处转移差异有统计学意义($P=0.0009$)。 β -catenin 及 Sox-2 均阳性表达者转移发生率明显高于均阴性表达者(图3)。



图2 RT-PCR 检测Sox-2在结肠癌组织及癌旁组织中的表达情况。T: 肿瘤组织; N: 癌旁组织; B: 空白对照; 数字123: 样本编号

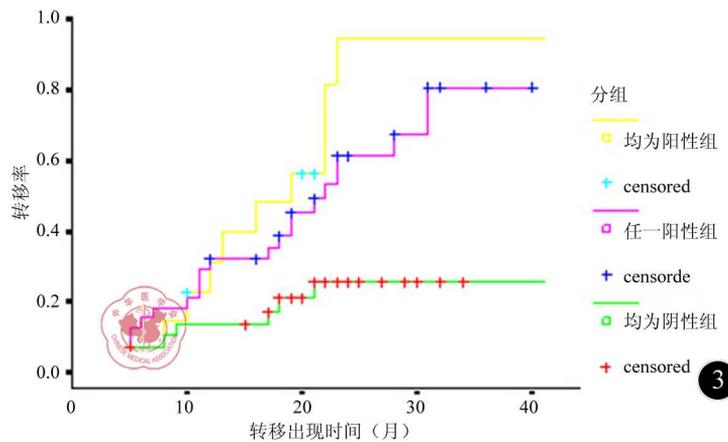


图3 Sox-2、 β -catenin 阳性表达同阴性表达转移出现时间比较 ($P=0.0009$) (以转移为截点研究)

讨 论

肿瘤干细胞理论认为,恶性肿瘤中存在一群数量极少的肿瘤干细胞,这群细胞具有无限增殖、自我更新及分化的能力,成为复发的根源^[9]。因此只有彻底清除肿瘤干细胞才有可能彻底治愈肿瘤。早期的研究表明 Sox-2 蛋白在器官发生及胚胎发育成其他组织时发挥重要作用^[10],是重要的干细胞标志物。在小细胞肺癌^[11]、脑膜瘤^[12]、胃^[13]及乳腺癌^[14]组织中均有 Sox-2 高表达。这些高表达都同肿瘤的高侵袭性、高复发转移率相关。

本研究中,80 例结肠癌有 25 例出现 Sox-2 蛋白阳性表达,其阳性表达细胞多呈点状聚集,少有灶状聚集,说明即使 Sox-2 阳性表达,也只是少部分细胞表达,这和肿瘤干细胞只占肿瘤组织的很少一部分理论是吻合的。同时,发生远处转移患者 Sox-2 阳性表达率要高于没有发生转移的患者,也说明 Sox-2 蛋白高表达的肿瘤侵袭性要高于低表达的肿瘤。对 20 例新鲜组织标本的分析发现,检测 Sox-2 的 mRNA 发现肿瘤组织的表达要明显高于癌旁组织,由于受例数限制,无法分析其与远处转移发生的关系。但是也应该看到仍然有很少部分的癌旁正常组织表达 Sox-2,说明可能存在正常细胞发生恶性转变。这样佐证了肿瘤是可能来源于成体干细胞恶性转变的学说。

恶性肿瘤发生复发转移首先要通过细胞间质,该过程有多个信号传导通路参与,包括 Wnt 通路^[15]、PI3K/AKT 通路、受体酪氨酸激酶 Ras-MAPK 通路等,这些通路还和干细胞的增殖和分化相关。其中 Wnt 通路(APC/ β -catenin/Tcf4)异常导致细胞中 β -catenin 蛋白含量增高,激活 survivin 基因,从而抑制细胞凋亡,促进包括干细胞在内的细胞过度增殖^[16]。

与以往研究结果相似^[17],本研究发现,在转移组中共有 65.71% 的患者 β -catenin 阳性表达,而非转移组中仅有 31.11% 的患者阳性表达,阳性表达患者转移出现时间早于阴性表达的患者。但是这种表达差异同肿瘤分化程度、T 分期和 N 分期没有相关性。对 β -catenin、Sox-2 两指标联合分析发现,均为阳性表达的患者转移发生时间最早,明显高于均为阴性患者。两项指标的高表达属于不良预后因素,提示肿瘤复发转移的

风险较高。

肿瘤的发生发展、复发转移是非常复杂的过程,众多基因、蛋白、信号传导通路参与其中。目前,随着肿瘤干细胞理论不断的完善和发展,虽然仍然缺乏高特异性的生物学标记,还有许多问题没有解决,但是利用干细胞理论靶向治疗肿瘤干细胞的研究已经处于基础试验阶段。因此,有理由相信干细胞标志物检测有重要的临床应用价值,干细胞理论为正确预测肿瘤术后复发、转移提供了有力的帮助。

参 考 文 献

- [1] Al-Hajj M, Wicha MS, Eeni-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 3983-3988.
- [2] Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Research*, 2007, 67: 1030-1037.
- [3] Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90⁺ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell*, 2008, 13: 153-166.
- [4] Shipitsin M, Polyak K. The cancer stem cell hypothesis in search of definitions, markers, and relevance. *Lab Invest*, 2008, 88: 459-463.
- [5] Ben Porath I, Thomson MW, Carey VJ, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature Genetics*, 2008, 40: 499-507.
- [6] Yamaguchi S, Kimura H, Tada M, et al. Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expr Patterns*, 2005, 5: 639-646.
- [7] 曹婧, 樊青霞, 索振河. 靛玉红对膀胱癌 ScaBer 细胞株增殖的影响及机制. *山东医药*, 2008, 48: 61-62.
- [8] Maruyama K, Ochiai A, Akimoto S, et al. Cytoplasmic Beta-Catenin Accumulation as a Predictor of Hematogenous Metastasis in Human Colorectal Cancer. *Oncology*, 2000, 59: 302-309.
- [9] 姜蒙, 李晓黎. 肿瘤干细胞与肿瘤的侵袭转移[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2010, 4: 450-452.
- [10] Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H. Pairing SOX off with partners in the regulation of embryonic development. *Trends in Genetics*, 2000, 16: 182-187.
- [11] Gure AO, Stockert E, Scanlan MJ. Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97: 4198-4203.
- [12] Comtesse N, Zippel A, Walle S, et al. Complex humoral immune response against a benign tumor: Frequent antibody response against specific antigens as diagnostic targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 9601-9606.
- [13] Li XL, Eishi YB, Bai YQ, et al. Expression of the SRY-related HMG box protein SOX2 in human gastric carcinoma. *Int J Oncol*, 2004, 24: 257-263.
- [14] Lenggerke C, Fehm T, Kurth R, et al. Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma. *BMC Cancer*, 2011, 11: 42.
- [15] 巩艳青, 辛钟成, 郭应禄. 肿瘤干细胞表明标记物的研究进展[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2010, 4: 2197-2200.
- [16] Boman BM, Huang E. Human colon cancer stem cells: A new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 2828-2838.
- [17] Chu P, Clanton DJ, Snipas TS, et al. Characterization of a subpopulation of colon cancer cells with stem cell-like properties. *Int J Cancer*, 2009, 124: 1312-1321.

(收稿日期: 2011-07-27)

(本文编辑: 马超)

李宁, 邓文英, 马懿辉, 等. β -catenin、干细胞标志物 Sox-2 表达与结肠癌术后复发转移的关系[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5(22): 6585-6589.