

新辅助化疗对中低位直肠癌组织中 AP-4、CEA 和 VEGF-A 表达的影响

陈转鹏 曹杰 杨平 张伟健 曾山崎 孙政 张通 王成兴

【摘要】 目的 研究转录因子激活蛋白4(AP-4)、癌胚抗原(CEA)、血管内皮生长因子A(VEGF-A)在中低位直肠癌新辅助化疗前后的表达,探讨新辅助化疗对直肠癌细胞凋亡、增殖及侵袭能力的影响。**方法** 选取60例术前经新辅助化疗的中低位直肠癌患者(试验组)及60例术前未行新辅助化疗的中低位直肠癌患者(对照组)术后石蜡包埋组织进行研究。免疫组化SP法检测与直肠癌生物特性相关的指标,包括AP-4、CEA、VEGF-A,比较两组之间的表达差异。**结果** 试验组和对照组AP-4在直肠癌组织中的阳性表达率分别为46.67%(28/60),73.33%(44/60),两组比较差异有统计学意义($P<0.05$);试验组和对照组CEA在直肠癌组织中的阳性表达率分别为36.67%(22/60),75.00%(45/60),两组比较差异有统计学意义($P<0.05$);试验组和对照组VEGF在直肠癌组织中的阳性表达率分别为40.00%(24/60),80.00%(48/60),两组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 直肠癌生物特性相关因子AP-4、CEA和VEGF-A的表达水平对新辅助化疗的疗效判断有重要意义,新辅助化疗能够降低上述因子的表达,促进直肠癌肿瘤细胞的凋亡,降低肿瘤细胞增殖和侵袭能力,可能有利于直肠癌患者的预后。

【关键词】 新辅助化疗; 中低位直肠癌; 转录因子激活蛋白4; 癌胚抗原; 血管内皮生长因子A

Effects of neoadjuvant chemotherapy on the expressions of AP-4, CEA and VEGF-A in low rectal carcinoma CHEN Zhuan-peng, CAO Jie, YANG Ping, ZHANG Wei-jian, ZENG Shan-qi, SUN Zheng, ZHANG Tong, WANG Cheng-xing. Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510180, China
Corresponding author: CAO Jie, Email: caoczp@126.com

【Abstract】 Objective To explore the expressions of transcription factor activator protein 4 (AP-4), carcinoembryonic antigen (CEA), vascular endothelial growth factor (VEGF-A) in the low rectal carcinoma after neoadjuvant chemotherapy and investigated the effects of neoadjuvant chemotherapy on rectal carcinoma cells with death, proliferation and invasion abilities. **Methods** 120 patients with low rectal carcinoma were divided into two groups, 60 cases in the experimental group adopted neoadjuvant chemotherapy and another 60 cases in control group adopted operation only. The biological characteristics of rectal carcinoma-related indicators, including the transcription factor activator protein 4 (AP-4), carcinoembryonic antigen (CEA), vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) was detected by SP immunohistochemical assay and then compared the differential expressions between the two groups. **Results** The positive expression rate of AP-4, CEA and VEGF-A between experimental group and control group was 46.67% vs 73.33%, 36.67% vs 75.00% and 40.00% vs 80.00% and the difference was statistically significant. **Conclusion** It is significantly important to judgment whether neoadjuvant chemotherapy was useful for low rectal carcinoma through detecting the expression level of the biological characteristics of rectal cancer associated factor AP-4, CEA and VEGF-A. In the present research, neoadjuvant chemotherapy can reduce the expression of the above three factors and may promote tumor cell apoptosis and reduce tumor cells proliferation and invasion in rectal cancer, thus may be beneficial for the prognosis of patients with rectal cancer.

【Key words】 Neoadjuvant chemotherapy; Low rectal carcinoma; Transcription factor activator protein 4; Carcinoembryonic antigen; Vascular endothelial growth factor A

侵袭和转移是恶性肿瘤的重要生物学特性,同时也影响患者预后和导致肿瘤复发的关键因素^[1]。据研究表明,新辅助放化疗能够降低中低位直肠癌的肿瘤分期,提高其手术切除率和增加保肛率,也可以降低复发率^[2]。目前新辅助化疗的临床疗效明确但其具体作用机制尚不清楚,为此研究新辅助化疗的作用机制将利于指导临床医生治疗直肠癌。本文通过检测中低位直肠癌组织中转录因子4(AP-4)、癌胚抗原(CEA)和血管内皮生长因子A(VEGF-A)在新辅助化疗前后的表达差异,从而探讨新辅助化疗对直肠癌细胞凋亡、增殖以及侵袭能力的影响,为新辅助化疗在直肠癌治疗中的应用提供可靠依据。

资料与方法

一、一般资料

选取广州市第一人民医院胃肠外科2012年11月至2013年7月间行新辅助化疗的中低位直肠癌患者(试验组)及未行新辅助化疗的中低位直肠癌患者(对照组)术后石蜡标本各60例。入组患者根据肠镜提示肿瘤下缘距齿状线距离1.00~10.00 cm^[3]。两组患者的年龄、性别、分化程度、组织学类型、TNM分期、浸润程度及淋巴结转移情况差异无统计学意义,基线资料平整。见表1。

二、主要试剂及仪器

鼠抗人AP-4单克隆抗体,鼠抗人CEA单克隆抗体,鼠抗人VEGF单克隆抗体(均为广东安必平医药科技有限公司,浓缩型);SP系列工作液试剂盒(美国DAKO公司,通用型);DAB试剂盒(北京中杉金桥公司,浓缩型);石蜡切片机(德国Leica公司);电热恒温烤箱(上海跃进医疗器械厂);恒温水浴箱(上海森信实验仪器有限公司);数控抗原热修复仪(深圳深达有限公司)。

三、治疗方法

1. 试验组:入选的试验组患者均接受外周静脉植入中间静脉导管(PICC),以便接受持续静脉滴注化疗。化疗方案为奥沙利铂、氟尿嘧啶和亚叶酸钙双周静脉给药FOLFOX6方案,奥沙利铂85 mg/m²静脉滴注2 h第1天,亚叶酸钙200 mg/m²静脉滴注2 h第1天,氟尿嘧啶(5-FU)400 mg/m²静脉推注第1天后

5-FU 2.0 g/m²加入化疗泵静脉持续滴注维持48 h,每2周重复,患者入选后接受4个疗程的FOLFOX6。

2. 对照组:对照组患者仅行手术治疗,术前未经任何放疗和化疗治疗。

四、试验方法

采用免疫组化SP法。所有载玻片均预先经多聚赖氨酸防脱片处理,组织标本经用10%中性甲醛溶液固定,石蜡包埋,厚4 μm连续切片。脱蜡水化后于3%过氧化氢溶液封闭,pH 6.0 EDTA(枸橼酸盐)修复液中进行抗原热修复,自然冷却至室温,血清封闭加一抗(AP-4、CEA和VEGF-A抗体稀释比例1:200),4℃过夜,复温加二抗,37℃反应,DAB显色,苏木素复色,盐酸酒精分化,脱水透明,中型树胶封片。用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照,用已知阳性表达的直肠癌标本作阳性对照。

五、结果判定标准

AP-4、CEA和VEGF-A蛋白染色以细胞质出现棕黄色颗粒为阳性。于光学显微镜(400倍)下随机选3个有代表性的不同视野,计算后取其平均值得出分数。每个视野的评分结果计算为:阳性细胞百分率分数×着色强度分数,所得分数为0~2分时,为(-),3~5分为(+),6~8分为(++),9~12分为(+++)。(一)为阴性,(+)为弱阳性表达,(++)~(+++)为强阳性表达。阳性细胞数得分标准:0分为无阳性细胞和阳性细胞数<5%,1分为阳性细胞数6%~25%,2分为阳性细胞数26%~50%,3分为阳性细胞数51%~75%,4分为阳性细胞数>75%。染色强度得分标准:0分为无染色,1分为弱染色,2分为中等强度染色,3分为强染色。

六、统计学分析

统计学处理采用SPSS 13.0统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料比较采用 χ^2 检验,计量资料比较采用t检验。

结 果

1. AP-4、CEA和VEGF-A在直肠癌组织中的表达(图1):AP-4主要位于直肠癌细胞的胞浆,呈棕黄色,部分间质细胞有弱着色,阳性产物呈弥漫或散在的棕黄颗粒(图1A);CEA表达于直肠癌细胞的细

表1 两组患者一般临床资料的比较(例)

组别	年龄		性别		分化程度			组织学类型			TNM 分期		浸润程度		淋巴结转移	
	≥65 岁	<65 岁	男	女	高分化	中分化	低分化	腺癌	黏液腺癌	印戒细胞癌	T1+T2	T3+T4	未及浆膜	突破浆膜	有	无
试验组	27	33	29	31	15	36	9	31	13	16	16	44	14	46	40	20
对照组	30	30	32	28	12	41	7	35	15	10	21	39	17	43	43	17
χ ² 值	0.301		0.300		0.908			1.770			0.977		0.391		0.352	
P 值	0.583		0.584		0.635			0.413			0.323		0.532		0.553	

胞质中,呈棕褐色,阳性产物呈弥漫的棕褐色颗粒(图1C); VEGF-A 主要表达于直肠癌细胞的细胞质和部分基质血管内皮细胞的胞浆中,呈棕褐色,阳性产物呈弥漫或散在的棕褐色颗粒(图1E)。

2. AP-4 在两组直肠癌组织中的表达: 试验组和对照组 AP-4 在直肠癌组织中的阳性表达率分别为 46.67% (28/60), 73.33% (44/60), 两组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。其中强阳性表达率试验组为 15% (9/60), 对照组为 23.33% (14/60), 提示化疗后 AP-4 蛋白表达较对照组中降低 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 AP-4 在两组直肠癌组织中表达的比较 (例)

组别	AP-4 表达强度				χ^2 值	P 值
	-	+	++	+++		
试验组	32	10	9	9	8.8203	0.0303
对照组	16	15	15	14		

3. CEA 在两组直肠癌组织中的表达: 试验组和对照组 CEA 在直肠癌组织中的阳性表达率分别为 36.67% (22/60), 75.00% (45/60), 两组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。其中强阳性表达率试验组为 8.33% (5/60), 对照组为 21.67% (13/60), 提示化疗后 CEA 蛋白表达较对照组中降低 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 CEA 在两组直肠癌组织中表达的比较 (例)

组别	CEA 表达强度				χ^2 值	P 值
	-	+	++	+++		
试验组	38	10	7	5	18.443	0.003
对照组	15	16	16	13		

4. VEGF-A 在两组直肠癌组织中的表达: 试验组和对照组 VEGF-A 在直肠癌组织中的阳性表达率分别为 40.00% (24/60), 80.00% (48/60), 两组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。其中强阳性表达率试验组为 10.00% (6/60), 对照组为 23.33% (14/60), 提示化疗后 VEGF-A 蛋白表达试验组较对照组中降低 ($P<0.05$)。见表 4。

表 4 VEGF-A 在两组直肠癌组织中表达的比较 (例)

组别	VEGF-A 表达强度				χ^2 值	P 值
	-	+	++	+++		
试验组	36	8	10	6	20.5	0.001
对照组	12	12	22	14		

讨 论

随着人们饮食结构的变化及寿命的延长, 直肠癌

的发病率逐年提高, 我国直肠癌发病的流行病学特点以中、低位居多, 约占直肠癌的 65%~75%, 临床上一般将距齿状线 5~10 cm 直肠癌称中、低位直肠癌^[4]。Miles 手术曾一度是治疗中低位直肠癌的金标准, 但术后永久性携带的人工肛袋给患者带来极大的痛苦。伴随着治疗理念的改变和治疗方法的进一步发展, 中低位直肠癌治疗目标应由单纯根治向保留功能并重转变^[5]。新辅助化疗是指在恶性肿瘤局部实施手术或放疗前应用的全身性化疗, 在局部治疗前先以全身化疗为第一步治疗, 局部治疗(手术或加放疗)后继之完成全程化疗而言。新辅助化疗是肿瘤外科治疗的一种新辅助方法, 它能够降低临床病理分期, 缩小原发病灶及转移的淋巴结, 为无手术条件的患者提供手术的可能, 提高根治性手术的切除率, 减少手术中转移, 术后并发症的发生, 有利于患者术后恢复, 同时有助于通过体内化疗敏感试验了解癌细胞对化疗药物的敏感程度用以指导临床^[6]。

恶性肿瘤是以细胞增殖和转移为特点的一大类疾病, 其发生、发展与多基因、多因素的调节有关。直肠癌组织中的 AP-4、CEA 及 VEGF 的表达程度能够反映肿瘤的生物特性, 与肿瘤的浸润能力及术后复发转移密切相关, 因此常用来反映肿瘤细胞的凋亡、增殖及侵袭能力进而评估患者的预后。

作为转录增强结合因子, 人类 AP-4 基因定位于人类 16 号染色体短臂 16P13 区, cDNA 全长 1.1 kb, 迄今已发现的 AP 家族成员包括 AP-1、-2、-3、-4、-5、-6。研究表明, AP-4 由于具有螺旋-环-螺旋(helix-loop-helix, HLH)基序和两个不同的亮氨酸重复元件 LR1、LR2、HLH 的二聚体化功能域, 所以能够与特异性 DNA 结合^[7]。活化的 AP-4 单体聚合, 以同源二聚体的形式穿越核膜, 识别并结合 DNA 上的特异性序列 CAGCTG, 以调控靶基因表达, 包括参与恶性肿瘤细胞增殖、转移、血管生成、DNA 修复等^[8]。AP-4 在消化道恶性肿瘤中起着促进作用, Jung 等^[9]发现其能够干扰 p53 基因介导的细胞周期阻滞和诱导细胞凋亡, 同时阻断了角化细胞中转化生长因子- β 诱导 p21 基因, 干扰 p21 基因上调及在单核细胞分化中干扰细胞周期。本研究中实验组癌组织的 AP-4 阳性表达率低于对照组, 两者之间的差异有统计学意义, 表明新辅助化疗能明显降低癌组织中 AP-4 的阳性表达, 提示新辅助化疗可以抑制癌细胞的增殖。

CEA 作为临床上最常见的肿瘤标记物之一, 目前被广泛用于各种消化系统肿瘤的诊断及监测^[10]。CEA 是从结肠癌和胚胎组织中提取的一种肿瘤相关抗原, 它属于肿瘤细胞表面的结构抗原, 在细胞质中形成,

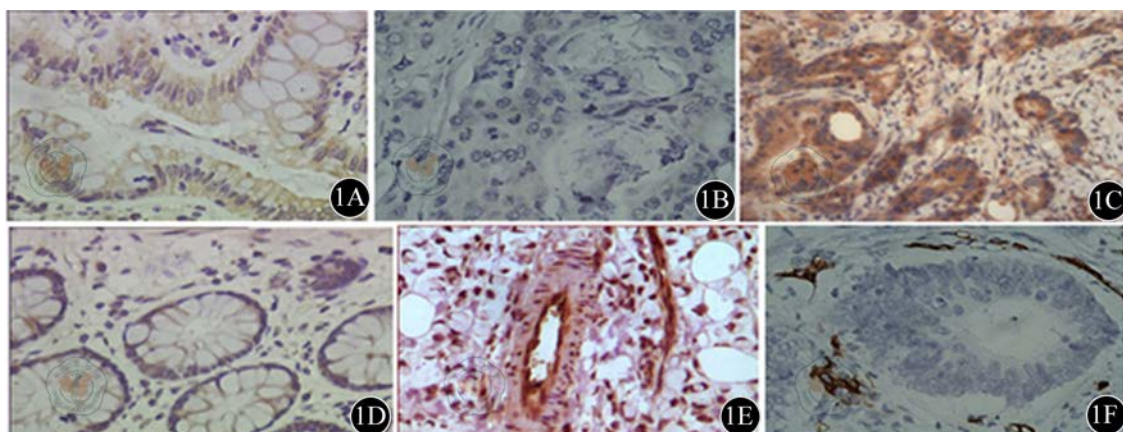


图1 直肠癌组织中AP-4、CEA和VEGF-A的表达(DAB×400)。1A: AP-4阳性表达; 1B: AP-4阴性表达; 1C: CEA阳性表达; 1D: CEA阴性表达; 1E: VEGF-A阳性表达; 1F: VEGF-A阴性表达

通过细胞膜进入周围体液中,可以在多种体液中检出^[11]。CEA 最常见于消化道和胎儿血清中,是非特异性肿瘤标志物,在消化系统肿瘤均有较高的阳性率,且升高程度与肿瘤浸润、大小及转移有关^[12]。CEA 是反映结肠直肠癌临床生物学特性的指标,与肿瘤病理分化、浸润深度、淋巴结转移、术后转移复发及生存期密切相关。本研究中试验组癌组织的 CEA 阳性表达率低于对照组,两者之间的差异有统计学意义,表明新辅助化疗能明显降低癌组织中 CEA 的阳性表达,提示新辅助化疗可以降低术后肿瘤的复发率,可判断肿瘤患者的病情严重程度及预后,同时也表明了新辅助化疗的肯定疗效。

血管生成是在已存在的微血管床上芽生出新的血管系统的过程,是肿瘤由休眠状态转向恶性状态的基础步骤^[13]。在 1971 年美国学者 Folkman 率先提出肿瘤生长依赖血管生成的理论假说,并提出当实体瘤体积超过 $3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ 就要需要新的血管生成提供细胞生长需要的氧气和营养成分,一旦新生血管形成,肿瘤就进入快速增殖阶段,即肿瘤的侵袭和转移可能是血管新生依赖性的。肿瘤的远处侵袭和转移是肿瘤治疗失败的主要原因,而血管生成在肿瘤的侵袭转移中发挥重要的作用。VEGF 是一种重要的促肿瘤生长因子,其可以通过旁分泌途径刺激肿瘤血管内皮细胞增生迁移,诱导血管形成从而促进肿瘤生长;还具有增强血管通透性,促进肿瘤转移的活性^[13-14],与结肠直肠癌的血管发生、肿瘤进展、预后转移以及治疗均有密切关系。本研究中试验组癌组织的 VEGF-A 阳性表达率低于对照组,两者之间的差异有统计学意义,表明新辅助化疗能明显降低癌组织中 VEGF-A 的阳性表达,提示新辅助化疗可以降低癌组织的血管生成,从而抑制癌细胞的增殖与转移。

综上所述,直肠癌生物特性相关因子 AP-4、CEA 和 VEGF-A 的表达水平对新辅助化疗的疗效判断有重

要意义,新辅助化疗能够降低上述因子的表达,对进展期直肠癌患者具有良好的耐受性,能显著诱导直肠癌肿瘤细胞的凋亡,抑制直肠癌肿瘤细胞的增殖,双向抑癌的同时且术后并发症并未增加,可作为一种有效的术前辅助治疗手段。

参考文献

- [1] Ieta K, Tanaka F, Haraguchi N, et al. Biological and genetic characteristics of tumor-initiating cells in colon cancer. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15: 638-648.
- [2] 黄金亮, 王继见. 结直肠癌新辅助化疗的研究进展. *中外医疗*, 2012, 6: 188-189; 192.
- [3] 中国抗癌协会大肠癌专业委员会. 中下段直肠癌外科治疗规范(草案). *中华胃肠外科杂志*, 2005, 8: 181-183.
- [4] Platell CF. Changing patterns of recurrence after treatment for colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*, 2007, 22: 1223-1231.
- [5] 沈象吉. 保肛手术与 Miles 手术治疗低位直肠癌效果对比观察. *山东医药*, 2011, 51: 69.
- [6] 汪劲婷, 朱朝晖, 李小毅. 胃癌新辅助化疗疗效临床评价方法及进展. *中国普外基础与临床杂志*, 2010, 17: 200-204.
- [7] Schmiedel R, Kuettner EB, Keim A, et al. Structure and function of the abasic site specificity pocket of an AP endonuclease from *Archaeoglobus fulgidus*. *DNA Repair (Amst)*, 2009, 8: 219-231.
- [8] Egawa T, Littman DR. Transcription factor AP4 modulates reversible and epigenetic silencing of the Cd4 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 14873-14878.
- [9] Jung P, Menssen A, Mayr D, et al. AP4 encodes a c-MYC-inducible repressor of p21. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 15046-15051.
- [10] 黄艳春. 胃粘膜癌前病变患者胃液中 CEA、CA19-9、CA72-4 检测的临床意义. *牡丹江医学院学报*, 2009, 30: 11-13.
- [11] 李炬, 胡守友. 胃癌患者血清 CEA、CA724、CA242、VEGF 联合测定的临床意义. *中国血液流变学杂志*, 2007, 17: 453-455.
- [12] 刘永馨, 张晓燕. 肿瘤标志物 CEA、CA19-9、CA12-5 和铁蛋白联合检测的临床应用. *中国实验诊断学*, 2008, 12: 125-126.
- [13] Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*, 2003, 161: 1163-1177.
- [14] Eichmann A, Simons M. VEGF signaling inside vascular endothelial cells and beyond. *Curr Opin Cell Biol*, 2012, 24: 188-193.

(收稿日期: 2013-11-01)

(本文编辑: 马超)