

HIF-1 α 及Shp-2在结直肠癌组织中的表达及临床意义

虞舒静 胡涵光 葛维挺 郑 树

摘要 目的:研究缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor 1 alpha, HIF-1 α)和Shp-2(src homology protein tyrosine phosphatase-2)在结直肠癌组织中的表达,并分析这两种蛋白的表达情况与患者临床病理因素和预后之间的关系。**方法:**采用免疫组织化学法检测HIF-1 α 和Shp-2在124例患者结直肠癌组织中的表达,统计学分析HIF-1 α 和Shp-2的表达与临床病理参数及预后的关系,并同时分析这两种蛋白表达的相关性。**结果:**HIF-1 α 和Shp-2在结直肠癌中的阳性表达率分别为54.0%(67/124)和23.4%(29/124),两者表达呈负相关($r=-0.293, P=0.001$)。HIF-1 α 的表达阳性率在手术中发现远处转移及术后出现复发转移的患者中较高,Shp-2的表达阳性率在肿瘤浸润程度较深及术后出现复发转移的患者中较低($P<0.05$)。Kaplan-Meier分析显示,HIF-1 α 表达阴性者预后好于表达阳性者($P=0.041$),Shp-2表达阳性者预后好于表达阴性者($P=0.025$);HIF-1 α (-)Shp-2(+)组结直肠癌患者的预后显著优于HIF-1 α (+)Shp-2(-)组($P=0.009$)。**结论:**HIF-1 α 和Shp-2与结直肠癌患者预后及多个临床病理因素显著相关,提示这两种蛋白与结直肠癌的浸润转移密切相关,且可作为临床判断预后的标志物。

关键词 结直肠癌 缺氧诱导因子-1 α Shp-2

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.15.021

Expression and Clinical Significance of HIF-1 α and Shp-2 in Colorectal Carcinoma

Shujing YU, Hanguang HU, Weiting GE, Shu ZHENG

Correspondence to: Shu ZHENG, E-mail: zhengshu@zju.edu.cn

Cancer Institute, Key Laboratory of Cancer Prevention and Intervention, China National Ministry of Education, the Second Affiliated Hospital, Zhejiang University College of Medicine, Hangzhou 310009, China

Abstract Objective: To investigate the expression of hypoxia induced factor-1 α (HIF-1 α) and Src homology protein tyrosine phosphatase-2 (Shp-2) in colorectal carcinoma (CRC), and to explore the relationship of their expression with the survival and clinicopathologic parameters of CRC patients. **Methods:** The expression of HIF-1 α and Shp-2 in CRC specimens was detected by immunohistochemistry, and the correlation between the expression of these two proteins and several clinicopathologic parameters of CRC patients was statistically analyzed. **Results:** The positive rates of HIF-1 α and Shp-2 in CRC specimens were 54.0% (67/124) and 23.4% (29/124), respectively. Negative correlation was observed between the expression of these two proteins ($r = -0.293, P = 0.001$). HIF-1 α expression was significantly correlated with distant metastasis at the time of surgery and also the recurrence and metastasis after surgery in CRC patients ($P < 0.05$). Shp-2 expression was significantly correlated with the depth of tumor invasion and post-surgery recurrence and metastasis ($P < 0.05$). Moreover, Kaplan-Meier survival analyses revealed that the expression of low HIF-1 α and high Shp-2 expression was significantly correlated with better survival of CRC patients ($P = 0.041$ and 0.025 , respectively). After combining these 2 markers, CRC patients with the expression pattern of HIF-1 α (-) Shp-2 (+) had longer survival time than those with HIF-1 α (-) Shp-2 (+). **Conclusion:** The expression of HIF-1 α and Shp-2 was significantly correlated with several clinicopathologic characteristics and survival of CRC patients, suggested that these two proteins may play important roles in the invasion and metastasis process of CRC, and could be used as potential prognostic markers.

Keywords Colorectal carcinoma; Hypoxia induced factor-1 α ; Shp-2

结直肠癌是一种常见的恶性肿瘤,在我国及西方发达国家其发病率及死亡率均居恶性肿瘤前列。结直肠癌的发生、发展与多种癌基因及抑癌基因的表达异常密切相关。HIF-1 α 可通过调节多个靶基因,使肿瘤细胞适应乏氧环境,目前研究已发现HIF-1 α 蛋白在多种肿瘤组织中高表达,提示其可能与肿瘤的增殖、侵袭及转移等相关^[1]。Shp-2是非受

体酪氨酸蛋白磷酸酶家族中的一员,近年来一些研究发现,Shp-2与白血病、乳腺癌、肝癌等肿瘤关系密切,但与大肠癌发生、发展的关系鲜见报道。本研究通过免疫组织化学法检测HIF-1 α 及Shp-2蛋白在结直肠癌组织中的表达情况,分析其与患者临床病理因素和生存情况之间的关系,探讨HIF-1 α 及Shp-2在结直肠癌发生、发展中的作用,为其应用于临床诊

治尤其是预后判断方面提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床病例资料 选取1999年3月至2004年6月浙江大学医学院附属第二医院结直肠癌手术切除标本124例,组织学诊断均经术后病理证实。其中结肠癌68例,直肠癌56例;男性68例,女性56例,年龄20~88岁,中位年龄60岁。按国际抗癌联盟制定的TNM分期标准分为I期21例,II期38例,III期56例,IV期9例;按肿瘤浸润深度(T),T1为6例,T2为21例,T3为94例,T4为3例;按淋巴结转移(N),N0为60例,N1为36例,N2为28例;按手术时有无远处转移(M),M0为115例,M1为9例;按分化程度,高分化72例,中分化38例,低、未分化14例。本研究经浙江大学医学院附属第二医院伦理委员会认可,符合其制定的伦理学规定。

1.1.2 主要试剂 即用型免疫组织化学MaxVision试剂盒购自福州迈新生物公司。鼠抗人HIF-1 α 单克隆抗体、兔抗人Shp-2单克隆抗体均购自美国Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法检测HIF-1 α 及Shp-2在结直肠癌组织中的蛋白表达情况 标本均经10%甲醛固定,脱水,常规石蜡包埋制成组织蜡块,4 μ m厚连续切片,免疫组织化学MaxVision二步法检测标本中HIF-1 α 及Shp-2在结直肠癌组织中的蛋白表达情况。免疫组织化学的具体步骤严格按照MaxVision试剂盒说明书进行。HIF-1 α 和Shp-2一抗工作浓度均为1:100,以TBS代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 阳性结果的判断 显微镜下结果观察,HIF-1 α 和Shp-2蛋白表达均定位于细胞质,阳性染色呈棕黄色或棕褐色。每例标本随机检测5个高倍镜视野($\times 400$),计数视野中的阳性细胞,阳性细胞 $< 10\%$ 为阴性, $\geq 10\%$ 则为阳性。

1.2.3 随访 随访通过电话和信访方式进行,同时获得患者的生存及术后复发转移等情况。所有生存病例随访均至少36个月,随访时间以月为单位。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0软件包进行数据统计分析。HIF-1 α 和Shp-2蛋白的表达情况与临床病理因素间的关系采用 χ^2 检验,HIF-1 α 和Shp-2之间的相关性采用Spearman等级相关分析,病例生存分析及生存曲线的绘制采用Kaplan-Meier法,生存率的比较采用Log rank检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIF-1 α 和Shp-2蛋白在结直肠癌组织中的表达

情况及与临床病理各因素间的关系

结直肠癌组织中HIF-1 α 蛋白表达阳性率为54.0% (67/124) (图1),Shp-2蛋白表达阳性率为23.4% (29/124) (图2)。HIF-1 α 的表达阳性率在手术时发现远处转移及术后出现复发转移的患者中较高($P < 0.05$),而在不同年龄、性别、分化程度、肿瘤浸润深度、淋巴结转移、TNM分期间差异无统计学意义;Shp-2的表达阳性率在术后出现复发转移的患者中较低($P < 0.05$),肿瘤浸润程度T3的患者Shp-2的表达阳性率低于T2者($P < 0.05$),而在不同年龄、性别、分化程度、淋巴结转移、患者手术时远处转移情况、TNM分期间Shp-2的表达差异无统计学意义(表1)。

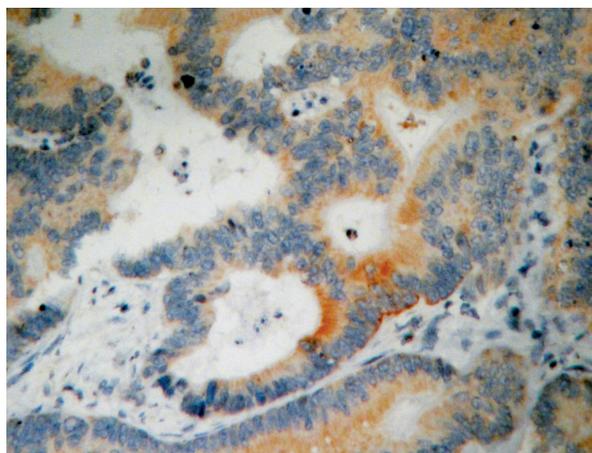


图1 HIF-1 α 在结直肠癌组织中的表达(免疫组织化学染色 $\times 200$)
Figure 1 Expression of HIF-1 α in colorectal carcinoma (IHC $\times 200$)

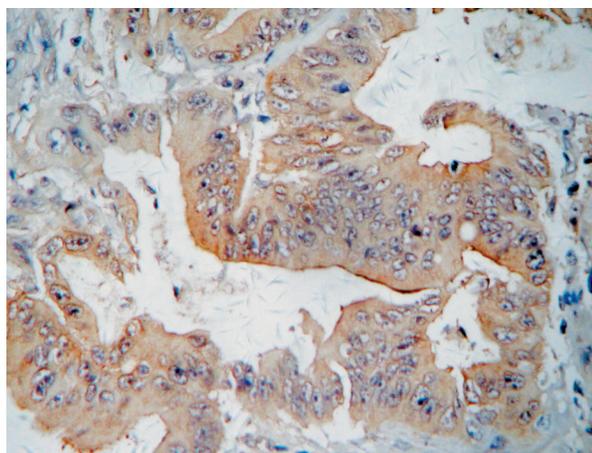


图2 Shp-2在结直肠癌组织中的表达(免疫组织化学染色 $\times 200$)
Figure 2 Expression of Shp-2 in colorectal carcinoma (IHC $\times 200$)

2.2 结直肠癌组织中HIF-1 α 和Shp-2蛋白表达的相关性

Spearman等级相关分析显示,结直肠癌组织中HIF-1 α 和Shp-2的蛋白表达呈负相关($r = -0.293$, $P = 0.001$,表2)。

表1 HIF-1 α 和Shp-2蛋白表达与结直肠癌临床病理参数的关系Table 1 Relationship of HIF-1 α and Shp-2 expression with clinicopathologic parameters of CRC

临床病理	例数	HIF-1 α 阳性例数	χ^2	<i>P</i>	Shp-2 阳性例数	χ^2	<i>P</i>	
性别	男	68	34(50.0)	0.986	15(22.1)	1.148	0.832	
	女	56	33(58.9)					14(25.0)
年龄(岁)	<60	59	29(49.2)	1.079	14(23.7)	0.007	0.932	
	≥ 60	65	38(58.5)					15(23.1)
浸润程度	T1	6	5(83.3)	2.641	1(16.7)	8.891	0.033	
	T2	21	10(47.6)					10(47.6)
	T3	94	50(53.2)					18(19.1)
	T4	3	2(66.7)					0(0)
淋巴结转移	阴性	60	28(46.7)	2.539	18(30.0)	2.837	0.092	
	阳性	64	39(60.9)					11(17.2)
远处转移	无	115	59(51.3)	4.747	28(24.3)	0.816	0.366	
	有	9	8(88.9)					1(11.1)
TNM分期	I	21	11(52.4)	6.820	9(42.9)	6.158	0.106	
	II	38	16(42.1)					9(23.7)
	III	56	32(57.1)					10(17.9)
	IV	9	8(88.8)					1(11.1)
分化程度	高	72	36(50.0)	3.896	21(29.2)	5.732	0.051	
	中	38	20(52.6)					8(21.1)
	低/未	14	11(78.6)					0(0)
术后复发转移	无	81	38(46.9)	4.766	24(29.6)	5.080	0.027	
	有	43	29(67.4)					5(11.6)

注:()内为%

表2 HIF-1 α 和Shp-2蛋白表达在结直肠癌中的关系Table 2 Relationship between the expression of HIF-1 α and Shp-2 in CRC

HIF-1 α	Shp-2		合计
	阴性例数	阳性例数	
阴性	36	21	57
阳性	59	8	67
合计	95	29	124

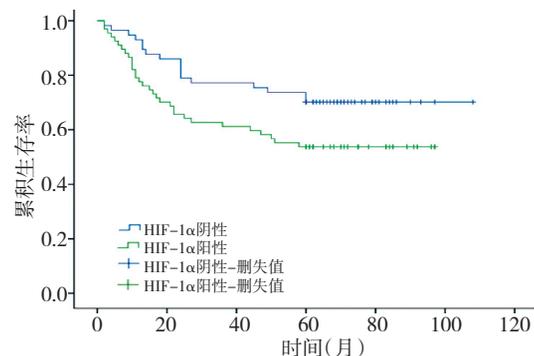
2.3 HIF-1 α 和Shp-2蛋白表达与结直肠癌患者术后生存情况间的关系

124例患者术后随访时间为2~108个月,中位随访时间为62个月,随访过程中43例出现术后复发或远处转移。HIF-1 α 阳性表达和阴性表达的结直肠癌患者的术后1、3、5年累积生存率分别为77.6%、61.2%、53.7%和93.0%、77.2%、70.2%,HIF-1 α 阳性表达组预后较差,两组间的生存差异有统计学意义($P=0.041$,图3)。Shp-2阳性表达的结直肠癌患者术后1、3、5年累积生存率为96.6%、79.3%、79.3%,而阴性表达组为88.4%、62.1%、55.8%,Shp-2阳性表达组预后较好,其生存差异亦有统计学意义($P=0.025$,图4)。

将Shp-2和HIF-1 α 指标进行组合,124例患者分为HIF-1 α (-)Shp-2(-)、HIF-1 α (-)Shp-2(+)、HIF-1 α (+)Shp-2(-)、HIF-1 α (+)Shp-2(+)4组。对其进行生存分析,结果发现,HIF-1 α (-)Shp-2(+)组

的预后相对最好,HIF-1 α (+)Shp-2(-)组的预后相对最差,而HIF-1 α (-)Shp-2(-)、HIF-1 α (+)Shp-2(+)这两组居中,但这4组患者的累积生存率差异无统计学意义($P=0.076$,图5)。分别进行两两比较后发现,HIF-1 α (-)Shp-2(+)组的预后显著优于HIF-1 α (+)Shp-2(-)组($P=0.009$),但其他各组间的生存差异则无统计学意义。

另外,各临床病理特征中,分化程度、肿瘤浸润程度、淋巴结转移、患者手术时远处转移情况、TNM分期、术后复发转移情况均是影响预后的因素($P<0.001$),而年龄、性别与患者预后情况无相关性。

图3 HIF-1 α 在阳性组和阴性组表达的生存曲线Figure 3 Survival curves of groups with and without HIF-1 α expression

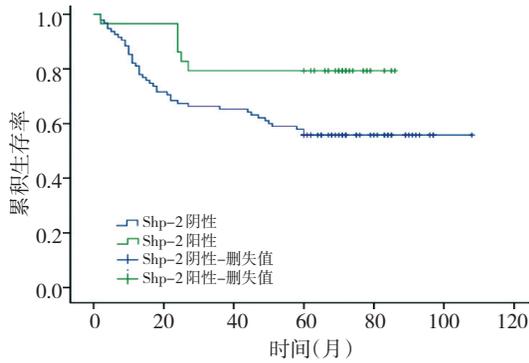
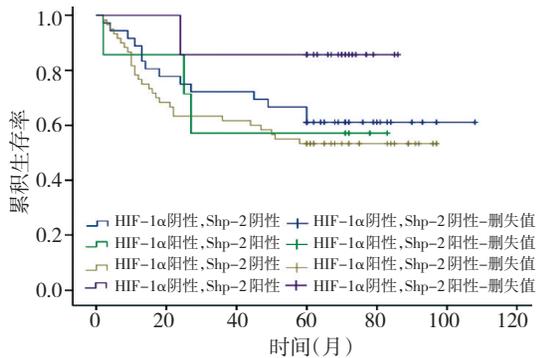


图4 Shp-2在阳性组和阴性组表达的生存曲线

Figure 4 Survival curves of groups with and without Shp-2 expression

图5 HIF-1 α 和Shp-2两指标组合后各组的生存曲线Figure 5 Survival curves of groups after combining of HIF-1 α and Shp-2

3 讨论

HIF-1 是 1992 年首先在低氧诱导的肝癌细胞株 Hep3B 细胞核提取物中发现的一种蛋白质,由 α 和 β 两个亚基构成,其中 α 亚基是控制 HIF-1 的活性的主要亚基。在缺氧等因素刺激下,HIF-1 α 可与 HIF-1 β 结合,促进血管内皮生长因子、一氧化氮合酶等下游基因的转录,使细胞对缺氧产生相应的适应性调整^[2]。HIF-1 α 与肿瘤能量代谢的关系十分密切。HIF-1 α 能减少肿瘤细胞的氧耗,同时参与了糖酵解过程的激活,而糖酵解正是肿瘤细胞获得能量的重要途径^[3],因此 HIF-1 α 对于维持肿瘤细胞的生存是至关重要的^[4]。

本研究发现,HIF-1 α 蛋白的表达情况与患者手术时远处转移情况、术后复发转移情况呈正相关。Muñoz-Nájjar 等^[5]发现低氧环境可诱导基质金属蛋白酶表达上调,从而促进恶性肿瘤转移;Krishnamachary 等^[6]发现,HIF-1 α 表达增加可导致黏附分子 E-cadherin 表达下降,使细胞间黏附降低,便于肿瘤细胞分离、移动而最终转移。另外,本研究发现,结直肠癌患者肿瘤组织中 HIF-1 α 阳性表达者的生存率明显低于阴性表达者,且两组间生存差异具有统计学意义,这与以往在其他肿瘤中的研究结果一致。Shibaji 等^[7]用免疫组织化学法检测胰腺癌中的 HIF-1 α 表达情

况,发现有 40% 的病例呈阳性表达,且 HIF-1 α 表达情况与胰腺癌患者的转移和生存预后情况呈正相关。Daponte 等^[8]在低分化的浆液性卵巢癌中发现,HIF-1 α 阳性与阴性病例相比,总生存期更短,认为 HIF-1 α 是独立的不良预后因素。HIF-1 α 不仅与肿瘤复发转移的关系密切,还与肿瘤细胞的化疗抵抗有关。HIF-1 α 在实体肿瘤多药耐药的形成过程中有着重要作用;HIF-1 α 能调控某些参与 DNA 修复过程的因子表达,放疗时使电离辐射对肿瘤细胞 DNA 的损伤无法固定,还通过促进无氧代谢,使残留的肿瘤细胞获得必要的生存条件^[9]。

作为蛋白磷酸酶家族中的一员,Shp-2 具有两个 SH2 功能域和一个 PTP 功能域,其中 SH2 功能域是与酪氨酸磷酸蛋白质的结合位点,两者结合后使 PTP 酶激活,从而作为下游信号分子参与信号转导。Shp-2 广泛表达于哺乳动物的细胞和组织中,参与细胞生长、分化、移动、死亡的调控,并且参与多种信号转导过程,如 ras-RAF-MAPK, JAK-STAT 以及 PI3K、ERK 等通路。近年来一些研究已发现在多种类型的白血病中均存在 Shp-2 基因 (PTPN11) 的突变,而在一些实体瘤中却存在着异常的激活。在宫颈癌中,Shp-2 的阳性表达情况与人乳头状瘤病毒的感染显著相关^[10]。在乳腺癌中,Shp-2 蛋白的高表达与 HER-2 的高表达、激素受体 (ER、PR) 的核内积聚、高肿瘤分级及淋巴结转移呈正相关^[11];在乳腺癌中抑制 Shp-2 的表达,可导致上皮性标志物 E-cadherin 表达的上调和间质标志物纤连蛋白和波形蛋白的表达下调,提示 Shp-2 可能促进上皮向间质方向的转化,而抑制 Shp-2 则导致间质向上皮方向的转化^[11-12]。已有的研究显示,Shp-2 与恶性肿瘤关系密切,但目前关于 Shp-2 与大肠癌发生、发展关系的报道甚少。本研究免疫组织化学法检测了 Shp-2 在大肠癌组织中表达水平,发现其与肿瘤浸润程度、术后复发转移情况呈负相关,与患者预后呈正相关。这一结果似乎与以往报道 Shp-2 在乳腺癌等多种肿瘤中促进肿瘤发生发展的作用相反,但最近在肝癌中的一些研究发现,在肝细胞中选择性敲除 Shp-2 基因,Shp-2 缺失引发的炎症信号促进了肝癌发生,导致小鼠自发性肿瘤及二乙基亚硝胺诱导的肝癌风险显著增高^[13];人肝癌样本中 Shp-2 的 RNA 和蛋白表达水平,在癌组织中显著高于癌旁正常组织,生存分析提示,Shp-2 低表达的肝癌患者生存期相对较短^[14]。因此,Shp-2 在肿瘤中的表达可能存在着复杂的调控机制,在不同肿瘤中发挥不同的作用,即具有组织特异性^[14],但其机制还需要更多研究来进一步阐明。

本研究还发现,在结直肠癌组织中 HIF-1 α 和

Shp-2的表达呈负相关($r=-0.293, P=0.001$),表明在结直肠癌的发生发展过程中,两者可能存在着某种不一定是直接发生的内在联系。在HIF-1 α 所参与的肿瘤细胞的无氧糖酵解能量获取过程中,STAT3(signal transducer and activator of transcription 3)发挥着重要作用,STAT3能加速HIF-1 α 蛋白的积聚,延长后者的半衰期,从而稳定HIF-1 α 蛋白在实体瘤细胞中的水平^[15]。而近年在肝癌中的研究中发现,Shp-2在肝细胞中对STAT3有重要的负调控作用,在肝细胞中敲除Shp-2可导致STAT3磷酸化水平显著增高,使肝脏中的炎症信号增强,从而推动了炎症引发的肝癌形成^[13]。结合本研究的预后分析结果,HIF-1 α (-)Shp-2(+)组结直肠癌患者的预后相对最好,而HIF-1 α (+)Shp-2(-)组的预后相对最差,Shp-2和HIF-1 α 可能在结直肠癌的发生发展过程中有着协同作用,但这两者协同作用的具体机制,是否共同参与了糖酵解过程,还有待进一步的研究明确。

综上所述,本研究发现,结直肠癌组织中HIF-1 α 蛋白的表达情况与复发转移情况呈正相关,并不是不良的预后因素,提示HIF-1 α 作为一种缺氧诱导的重要因子,在结直肠癌的浸润转移等恶性生物学过程中发挥着重要作用。本研究首次提示Shp-2可能在结直肠癌的侵袭、转移等过程中发挥着重要作用,具有判断预后的价值,且与HIF-1 α 的表达存在一定程度的相关性,但其中的具体作用及机制,还需要更多更深入的研究来证明。

参考文献

- 1 Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked[J]? *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(11): 1603-1616.
- 2 Li L, Madu CO, Lu A, et al. HIF-1 α Promotes A Hypoxia-Independent Cell Migration[J]. *Open Biol J*, 2010, 3: 8-14.
- 3 Milane L, Duan Z, Amiji M. Role of hypoxia and glycolysis in the development of multi-drug resistance in human tumor cells and the establishment of an orthotopic multi-drug resistant tumor model in nude mice using hypoxic pre-conditioning[J]. *Cancer Cell Int*, 2011, 11: 3.
- 4 Lu X, Kang Y. Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(24): 5928-5935.
- 5 Muñoz-Néjar UM, Neurath KM, Vumbaca F, et al. Hypoxia stimulates breast carcinoma cell invasion through MT1-MMP and MMP-2 activation[J]. *Oncogene*, 2006, 25(16): 2379-2392.
- 6 Krishnamachary B, Zagzag D, Nagasawa H, et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFH1A, and ZFH1B[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(5): 2725-2731.

- 7 Shibaji T, Nagao M, Ikeda N, et al. Prognostic significance of HIF-1 alpha overexpression in human pancreatic cancer[J]. *Anti-cancer Res*, 2003, 23(6C): 4721-4727.
- 8 Daponte A, Ioannou M, Mylonis I, et al. Prognostic significance of Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha(HIF-1 alpha) expression in serous ovarian cancer: an immunohistochemical study[J]. *BMC Cancer*, 2008, 8: 335.
- 9 Nakano T, Ohno T, Ishikawa H, et al. Current advancement in radiation therapy for uterine cervical cancer[J]. *J Radiat Res*, 2010, 51(1): 1-8.
- 10 Tao XH, Shen JG, Pan WL, et al. Significance of SHP-1 and SHP-2 expression in human papillomavirus infected Condyloma acuminatum and cervical cancer[J]. *Pathol Oncol Res*, 2008, 14(4): 365-371.
- 11 Zhou X, Coad J, Ducatman B, et al. SHP2 is up-regulated in breast cancer cells and in infiltrating ductal carcinoma of the breast, implying its involvement in breast oncogenesis[J]. *Histopathology*, 2008, 53(4): 389-402.
- 12 Zhou XD, Agazie YM. Inhibition of SHP2 leads to mesenchymal to epithelial transition in breast cancer cells[J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(6): 988-996.
- 13 Bard-Chapeau EA, Li S, Ding J, et al. Ptpn11/Shp2 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinogenesis[J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(5): 629-639.
- 14 Jiang C, Hu F, Tai Y, et al. The tumor suppressor role of Src homology phosphotyrosine phosphatase 2 in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(4): 637-646.
- 15 Demaria M, Giorgi C, Lebedzinska M, et al. A STAT3-mediated metabolic switch is involved in tumour transformation and STAT3 addiction[J]. *Aging (Albany NY)*, 2010, 2(11): 823-842.

(2012-03-26收稿)

(2012-06-27修回)

(本文编辑:张侃)