

肠道恶性肿瘤中 Trx - 1 表达及生物学意义研究

牛桂军 陈卓琳 李西融 唐澄海

摘 要 **目的** 检测大、小肠癌中 Trx - 1 的表达情况,并探讨该癌蛋白在两者之间的相关性。**方法** 用免疫组化法分别检测 36 例小肠癌、20 例癌旁正常小肠黏膜中 Trx - 1 和 60 例结直肠癌、22 例癌旁正常大肠黏膜中 Trx - 1 的表达情况。用半定量方法对免疫组化染色做评分,结合临床和病理数据进行分析。**结果** Trx - 1 定位于细胞质和胞核,在大、小肠恶性肿瘤中过度表达,均较癌旁正常组织的表达显著增高。其在两部位的表达与对应正常肠组织的表达有统计学差异,且与病理分化不同有关($P < 0.01$)。它们在中低分化肿瘤比高分化者表达增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);也同淋巴结转移($P < 0.05$)和 TNM 分级密切相关($P < 0.01$)。Trx - 1 在大、小肠癌中的表达呈正相关($r = 0.756, P < 0.05$)。**结论** Trx - 1 在肠癌组织中的过度表达并与其发生发展有关,可能参与了大、小肠癌恶化的调控。

关键词 小肠癌 大肠癌 Trx - 1 表达

Expression and Singnificance of TRX - 1 in Small Bowel and Colorectal Cancer. Niu Guijun, Chen Zhuolin, Li Xirong, et al. Department of Digestion Nanxishan Hospital, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guangxi 541002, China

Abstract Objective To investigate the expression of Trx - 1 in small bowel and colorectal cancer and the relationship between them. **Methods** The expression of Trx - 1 in small bowel and colorectal cancer, and in corresponding paracarcinoma normal tissues was detected by immunohistochemical method, respectively. Then the semiquantitative analysis results and clinical data were statistically analyzed. **Results** In small bowel and colorectal cancers with strong Trx - 1 straining, the straining was seen in nucleus as well as in the cytoplasm. The expression levels of Trx - 1 in small bowel and colorectal cancer, and in corresponding paracarcinoma normal tissues had statistical significance and the difference had relation to histological differentiation ($P < 0.01$). The expression of Trx - 1 increased in small bowel and colorectal cancer and was different based on differentiation tissues ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression of Trx - 1 was higher in moderate and poor differentiation degree cancer than that in high differentiation degree. Also, the expression levels of Trx - 1 were related to lymph node metastasis ($P < 0.05$) and TNM stage ($P < 0.01$). There was a positive correlation between small bowel and colorectal cancer ($r = 0.756, P < 0.05$) in expression. **Conclusion** The overexpression of Trx - 1 may play an important role in the occurrence and development of small bowel and colorectal cancer, moreover, participate in the regulation of carcinogenesis.

Key words Small bowel cancer; Colorectal cancer; Thioredoxin - 1; Expression

消化道恶性肿瘤中是多基因突变,多阶段演进参与了其进展^[1]。硫氧还蛋白 - 1 (thioredoxin - 1, Trx - 1) 作为组织细胞氧化应激的重要的小分子蛋白,其过度激活导致细胞的异常增生和凋亡障碍,促进正常细胞发生恶性转化,特别是与许多肿瘤性疾病有密切关系,已成为许多恶性肿瘤研究的热点^[2,3]。消化道恶性肿瘤中结直肠癌是最常见的恶性肿瘤,而小肠癌却少见,两者对比研究缺乏。Trx - 1 在大、小肠癌演变中的表达和作用尚不清楚,尚鲜见这方面研究的报道。本研究用免疫组化法同时检测大、小肠癌中 Trx - 1 的表达情况,分析它们与临床病理特征的关

系,并探讨其在大、小肠癌两者之间表达的相关性,为深入进行肠癌的研究提供有益依据。

对象与方法

1. 对象:临床资料收集笔者医院、柳州市人民医院、桂林市 181 医院和桂林市第五人民医院外科 2004 年 1 月 ~ 2009 年 10 月手术切除病理证实的小肠腺癌 36 例(术前均未行放疗或化疗)。其中男性 22 例,女性 14 例;年龄 24 ~ 85 岁,中位年龄 56 岁, < 50 岁 9 例, ≥ 50 岁 27 例;恶性肿瘤位置分布:12 指肠恶性肿瘤 24 例,空肠 5 例,回肠 7 例;肿瘤大小 < 5cm 22 例, ≥ 5cm 14 例。按组织学分化程度分为:高分化 12 例,中分化 10 例,低分化 14 例。临床和病理上证实有淋巴结转移 19 例,无淋巴结转移 17 例。腺癌按 AJCC 的 TNM 分期^[4]:其中 I、II 期 15 例, III、IV 期 21 例。另外,选取笔者医院外科 2007 年 1 月 ~ 2009 年 10 月手术切除,病理证实的大肠腺癌 60 例(术前均未行放疗或化疗)。其中男性 31 例,女性 29 例;年龄 26 ~ 80 岁,中位年龄 57 岁, < 50 岁 20 例, ≥ 50 岁 40 例;直肠癌 27 例,结肠癌 33 例;肿瘤大小 < 5cm 28 例, ≥ 5cm

基金项目:广西壮族自治区卫生厅科研课题(Z2009194)

作者单位:541002 桂林,广西壮族自治区南溪山医院消化内科

通讯作者:牛桂军,电子邮箱:glngj65@sina.com

32 例;按组织学分化程度分为:高分化腺癌 27 例,中分化腺癌 21 例,低分化腺癌 12 例;临床和病理上证实有淋巴结转移 21 例,无淋巴结转移 39 例。同样按照 TNM 分期原则将大肠癌分为 4 期^[4]。其中 I、II 期 39 例,III、IV 期 21 例。同时,分别切取距肿瘤边缘 10cm 以上的远癌的正常大、小肠黏膜组织 22 例和 20 例作为对照。免疫组化所用试剂 Thiodoxin 1 一抗:单克隆抗体,浓缩型。即用型第 2 代免疫组化广谱试剂盒 SuperPicTure (Mouse/Rabbit KIT, Zymed 分装,编号:87 - 8963)购自天津津脉生物技术公司分装。DAB 显色试剂盒 (DAB - 0031)等购自福州迈新生物技术公司。

2. 方法:(1)免疫组织化学染色:采用 Super PicTure 法(一步法)免疫组化所用试剂 Thiodoxin 1 一抗工作浓度为 1:200。STAT3 一抗工作浓度为 1:100。分别以一抗试剂说明书建议的已知阳性人乳腺癌组织的石蜡切片为阳性对照片;阴性对照片所用组织同阳性对照片,在染色过程中用 PBS 代替一抗,其余步骤同上述。(2)结果判断:参考相关文献,对免疫组化染色结果,结合染色强度与阳性细胞百分比两者的乘积,主要进行半定量分析^[5]。由病理研究人员采用单盲法观片,每张切片均随机观察 5 个高倍视野(×400),每个视野中 200 个细胞被记数。首先将染色强度打分:0 分为无色,1 分为淡黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色。再将阳性细胞所占百

分比打分:0 分为阴性,1 分为阳性细胞≤10%,2 分为 11% ~ 50%,3 分为 51% ~ 75%,4 分为 >75%。计算染色强度与阳性细胞百分比的乘积,>3 分为阳性^[6]。(3)统计学处理:实验资料以 Excel 建立数据库文件,用 SPSS15.0 统计软件对资料进行统计分析:率的比较采用 χ^2 检验;免疫组化评分用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数比较用 t 检验,多组均数比较采用方差分析,多样本均数的两两比较用 LSD 检验;Trx - 1 在大肠癌和小肠癌阳性表达结果的相关性,用计数资料列联表的相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Trx - 1 在正常小肠和大肠黏膜及恶性肿瘤中的表达:结果见表 1、表 2 和第 136 页彩图 2。Trx - 1 定位于细胞质和胞核,在小肠癌的阳性率为 75.0% (免疫组化染色平均评分 4.88 ± 2.16),正常小肠黏膜组织阳性率 30.0% (免疫组化染色平均评分 1.27 ± 1.01),两者差异有统计学意义($P < 0.01$);Trx - 1 在大肠癌的阳性率为 78.33% (免疫组化染色平均评分 4.03 ± 1.92),正常大肠黏膜组织阳性率 31.82% (免疫组化染色平均评分 1.42 ± 1.20),两者差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 正常小肠黏膜、小肠癌 Trx - 1 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组织类型	<i>n</i>	阳性数(<i>n</i>)	阳性率(%)	χ^2	<i>P</i>	免疫组化分值	<i>t</i>	<i>P</i>
正常小肠黏膜	20	6	30.0	10.757	0.001	1.27 ± 1.01	6.376	<0.001
小肠腺癌	36	27	75.0			4.88 ± 2.16		

表 2 正常大肠黏膜、大肠癌 Trx - 1 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组织类型	<i>n</i>	阳性数(<i>n</i>)	阳性率(%)	χ^2	<i>P</i>	免疫组化半定量分值	<i>t</i>	<i>P</i>
正常大肠黏膜	22	7	31.82	14.165	<0.001	1.42 ± 1.20	5.74	<0.001
大肠癌	60	47	78.33			4.03 ± 1.92		

2. Trx - 1 在小肠癌和大肠癌中的表达与临床病理指标的关系:见表 3 和表 4。Trx - 1 在大小肠恶性肿瘤高、中、低分化组织间差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),组织分化程度越低,则 Trx - 1 表达

越强;有淋巴结转移时表达较强,反之弱($P < 0.05$);III、IV 期中的表达高于 I、II 期。但它的表达与患者性别、年龄、肿瘤大小、部位均无关($P > 0.05$)。

表 3 小肠癌患者 Trx - 1 表达与临床病理特征的关系 ($n = 36, \bar{x} \pm s$)

临床病理参数	小肠癌 Trx - 1						
	<i>n</i>	阳性数	阳性率(%)	<i>P</i>	免疫组化分值	<i>t</i>	<i>P</i>
分化程度							
高分化	12	6	50.0		2.87 ± 0.87	$F = 25.265$	<0.001
中分化	10	8	80.0	0.038	4.44 ± 1.29		
低分化	14	13	92.9		6.91 ± 1.91		
淋巴结转移							
阴性	17	8	47.1	0.033	4.05 ± 1.13	2.430	0.021
阳性	19	16	84.2		5.44 ± 2.10		
TNM 分期							
I、II	15	7	46.7	0.001	3.72 ± 2.28	2.844	0.007
III、IV	21	20	95.2		5.69 ± 1.90		

* 与高分化组相比

表 4 大肠癌患者 Trx-1 表达与临床病理特征的关系 ($n=60, \bar{x} \pm s$)

临床病理参数	大肠癌 Trx-1							
	n	阳性数	阳性率 (%)	χ^2	P	免疫组化分值	t	P
高分化	27	13	48.1	8.399	0.015	2.80 ± 1.02	$F=28.644$	<0.001
中分化	21	16	76.2			4.24 ± 1.31		
低分化	12	11	91.7			6.40 ± 2.07		
淋巴结转移								
阴性	39	23	59.0	4.51	0.034	3.65 ± 1.50	2.165	0.036
阳性	21	18	85.7			4.73 ± 2.41		
TNM 分期								
I、II	39	18	46.2	11.344	0.001	3.54 ± 1.39	2.365	0.024
III、IV	21	19	90.5			4.63 ± 2.31		

3. Trx-1 在大、小肠癌中表达的相关性分析 (表 5): Trx-1 在大、小肠癌中的表达呈正相关 ($r=0.756, P<0.05$)。

表 5 大、小肠癌 Trx-1 的表达的相关性分析

大肠	小肠		合计	r	P
	+	-			
阳性	23	4	27	0.756	0.037
阴性	4	5	9		
合计	27	9	36		

讨 论

消化道恶性肿瘤中结直肠癌是最常见的恶性肿瘤,而小肠癌却少见,缺乏两者对比研究。Trx-1 在大、小肠癌演变中的表达和作用尚不十分清楚,尚鲜见这方面研究的报道。硫氧还蛋白-1 是小分子氧化还原蛋白家族的一个重要成员。它具有抗氧化特性,还能促进细胞生长、抑制凋亡并调节许多基本的炎症过程。癌细胞有高水平表达,它抑制凋亡、刺激细胞增生和血管发生,增加转录因子活性,诱导血管生成和远处转移^[7]。硫氧化还原蛋白系统广泛地参与肿瘤的发生、发展、浸润和转移等各个环节。许多肿瘤细胞都分泌 Trx-1,并且在癌症病人血浆中水平增高。如在结肠、直肠癌、食管癌、胃癌、胰腺癌、肝癌等出现了硫氧化还原蛋白及其还原酶的高表达,提示其与肿瘤发生、发展有关。

大量研究显示 Trx-1 在许多肿瘤中高表达,但在不是在所有肿瘤中都如此,本研究证实了该癌蛋白在小肠癌中表达上调^[2]。Trx-1 定位于细胞质和胞核,在小肠癌的阳性率为明显高于正常小肠黏膜组织 ($P<0.01$);并与癌组织分化程度密切相关,其在各种程度分化中的表达趋势,分化越低表达越高,有淋巴结转移和分期高者强,反之则弱,提示其在肿瘤进

展中的促进作用。同样,在许多大肠癌标本中,相比较远癌正常组织表达增强;并与癌组织分化程度密切相关,其在各种程度分化中的表达趋势同 Jennifer 等^[8]在结直肠癌中的报道一致,他们用免疫组化法研究 Trx-1 在结直肠癌癌旁正常组织、原发或转移性恶性肿瘤的表达。12 例结肠癌较 8 例正常直肠黏膜,该蛋白表达显著增加 ($P<0.01$);且 Trx-1 高表达大都集中在低中分化和恶性程度高组织,随恶性程度增高和分化下降而增高。肿瘤中 Trx-1 水平的升高与肿瘤过度增长及降低病人生存率有关。Trx-1 表达水平和细胞增生呈显著正相关,和凋亡呈显著负相关^[2, 8, 9]。在癌细胞株的研究表明,Trx-1 增加肿瘤细胞生长,并抑制凋亡。其机制可能涉及到氧化还原敏感转录因子,如 NF- κ B、P53、AP-1;以及由 Trx-1 的凋亡抑制可能由前凋亡蛋白如 ASK-1 和肿瘤抑制子蛋白 PTEN 的抑制所致^[8]。氧化还原蛋白 Trx-1 在癌细胞中增加缺氧诱导因子蛋白表达;Trx-1 过表达导致增加血管内皮生长因子合成并提高肿瘤血管生成^[10]。在结直肠癌出现 Trx-1 和 TR 的高表达,与肿瘤发生、发展有关,可能和病人生存期短有关^[11, 12]。

本研究提示 Trx-1 无论在大肠癌或小肠癌中,组织分化程度越低,其表达强度越强;有淋巴结转移较无转移者强;分期晚者较分期早者更强。但不管在大肠癌或小肠癌,它的表达均与患者性别、年龄、肿瘤大小、部位均无关。说明同大肠癌一样,Trx-1 高表达与小肠癌的进展有关,与癌肿的发生发展和恶性进展有密切关系。本研究在大、小肠癌中联合检测 Trx-1,其在大肠癌和小肠癌的表达呈正相关 ($r=0.756, P<0.05$)。说明 Trx-1 作为公认的癌蛋白,与结直肠癌等癌肿组织表达上调一样,在小肠癌也表达增强;也说明它们的表达程度影响肿瘤的恶性程

度,可在一定程度上预示肠道恶性肿瘤的预后。提示可能在大肠和小肠腺癌的发生上,有着相似的基因调控和氧化应激基础。总之,Trx - 1 在大、小肠癌组织中的过度表达并与其发生发展有关,可能参与了肠道恶性肿瘤恶化的调控。

参考文献

- 1 李小燕,黄缘. 小肠癌分子生物学机制的研究进展[J]. 中华消化杂志,2007,27(4):286-288
- 2 Elias S J Arner, Arne Holmgren. The Thioredoxin System in Cancer [J]. *Seminars in Cancer Biology*,2006,16(6):420-426
- 3 牛桂军,唐国都,梁志海,等. 硫氧还蛋白-1 在实验性急性坏死性胰腺炎大鼠肺表达及褪黑素干预的影响[J]. 世界华人消化杂志,2010,18(6):550-556
- 4 金懋林. 消化道恶性肿瘤化学治疗[M]. 北京:北京大学医学出版社,2008:199-228
- 5 Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel anti-apoptosis gene-survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas [J]. *Cancer Res*,1998, 58(9):1808-1812
- 6 许良中,杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. 中国癌症杂志,1996,6(4):229-230

- 7 Lim CP, Cao X. Structure, function, and regulation of STAT proteins [J]. *Mol Biosyst*,2006,2(11):536-550
- 8 Jennifer R, Achyut K, Bhattacharyya AG, *et al.* Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival[J]. *J Lab Clin Med*,2003,142(1):46-51
- 9 Mukherjee A, Martin SG. The thioredoxin system: a key target in tumour and endothelial cells[J]. *Br J Radiol*,2008,81(1):57-68
- 10 Welsh SJ, Bellamy WT, Briehl MM, *et al.* The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression; Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis [J]. *Cancer Res*,2002,62(17):5089-5095
- 11 Sun Y, Rigas B. The thioredoxin system mediates redox-induced cell death in human colon cancer cells: implications for the mechanism of action of anticancer agents[J]. *Cancer Res*,2008,68(20):8269-8277
- 12 Noike T, Miwa S, Soeda J, *et al.* Increased expression of thioredoxin-1, vascular endothelial growth factor, and redox factor-1 is associated with poor prognosis in patients with liver metastasis from colorectal cancer[J]. *Hum Pathol*,2008,39(2):201-208

(收稿:2010-05-05)

ER 阳性乳腺癌患者 Her-2 和 PR 表达的相关性研究

王 宁 王 斌 王雅杰

摘 要 **目的** 研究雌激素受体(ER)阳性的乳腺癌患者中人表皮生长因子受体 2(Her-2)和孕激素受体(PR)表达的关系以及对预后的影响。**方法** 对 1362 例乳腺癌患者进行回顾性分析,确立 ER 状态,将 PR 与 Her-2 表达的关系进行比较,明确两者之间的相关性。**结果** 对 588 名 ER 阳性乳腺癌患者进行分析发现,Her-2 表达与 PR 状态(阴性 vs 阳性,OR:2.55,95% CI:1.29~5.03)和组织病理学分级(3 级 vs 1/2 级,OR:4.69,95% CI:2.16~10.19)相关。绝经前的 ER 阳性乳腺癌患者 Her-2 的表达只与组织学分级(3 级 vs 1/2 级,OR:4.92,95% CI:1.41~17.17)相关,而与 PR 表达无关。相反,绝经后的 ER 阳性乳腺癌患者 Her-2 表达与组织病理学分级无关,仅仅和 PR 表达(阴性 vs 阳性,OR:3.02,95% CI:1.22~7.52)有关。ER 阳性乳腺癌 Her-2 过表达和 PR 表达呈负相关,与绝经状态无关。**结论** ER 阳性乳腺癌 Her-2 表达与 PR 状态和组织病理学分级有关。绝经前的患者 Her-2 的表达只与组织学是否 3 级相关,而与 PR 表达无关。绝经后的患者 Her-2 表达与组织病理学分级无关,仅仅和 PR 表达有关。

关键词 雌激素受体 孕激素受体 Her-2 乳腺肿瘤 绝经

Association between Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 and Progesterone Receptor Expression in the Estrogen-receptor Negative Breast Cancer Patients. Wang Ning, Wang Bin, Wang Yajie. Department of Oncology, Changhai Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract Objective To understand association between PR status and Her-2 overexpression in the ER-positive breast cancer, we divided the patients by menopausal status and the relationship between PR and Her-2 was evaluated. **Methods** ER-positive status

基金项目:2010 年上海市卫生局科研计划项目(2009113);上海市重点学科建设项目(B905)

作者单位:200433 上海,第二军医大学长海医院肿瘤科

通讯作者:王雅杰,电子信箱:yajiewa0459@163.com