

·基础研究·

APC、 β -catenin、C-myc 和 Cyclin D1 在大肠癌组织中的表达及其意义

戴文斌, 任占平, 陈蔚麟, 杜娟, 石喆, 唐德艳

Expression and Significance of APC, β -catenin, C-myc, and Cyclin D1 Proteins in Colorectal Carcinoma

DAI Wen-Bin, REN Zhan-Ping, CHEN Wei-Lin, DU Juan, SHI Zhe, TANG De-Yan

柳州市人民医院
病理科,
广西 柳州 545001

Department of Pathology,
People's Hospital of Liuzhou City,
Liuzhou, Guangxi, 545001,
P. R. China

通讯作者: 戴文斌

Correspondence to: DAI Wen-Bin
Tel: 86-772-2812439
E-mail: daiwenbin1973@sina
.com

基金项目: 广西柳州市科技攻关
项目 (No. 20030217)

Grant: Sci-Tech Project
Foundation of Liuzhou City
(No. 20030217)

收稿日期: 2006-12-13
修回日期: 2007-03-26

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: The abnormal oncogenes and antioncogenes in Wnt signaling transduction pathway activate downstream specific target genes, and may play important roles in tumorigenesis and tumor progression. This study was to examine the expression of adenomatous polyposis coli (APC), β -catenin, C-myc, and Cyclin D1 in different colorectal tissues, and investigate their possible roles in the carcinogenesis of colorectal carcinoma. **METHODS:** The expression of APC, β -catenin, C-myc, and Cyclin D1 in 30 specimens of normal colorectal mucosa, 30 specimens of colorectal adenoma, 10 specimens of colorectal adenoma with malignancy, and 50 specimens of colorectal carcinoma was examined by immunohistochemistry. The expression of β -catenin on cell membrane was regarded as normal, and its expression in cytoplasm and nuclei was defined as ectopic expression. **RESULTS:** The positive rate of APC was significantly lower in colorectal carcinoma and colorectal adenoma with malignancy than in colorectal adenoma and normal colorectal mucosa (44.0% and 40.0% vs. 86.7% and 100.0%, $P<0.01$). The ectopic expression rate of β -catenin was significantly higher in colorectal carcinoma, colorectal adenoma with malignancy, and colorectal adenoma than in normal colorectal mucosa (62.0%, 50.0%, and 30.0% vs. 0%, $P<0.01$), and significantly higher in colorectal carcinoma than in colorectal adenoma ($P<0.01$). The positive rate of C-myc was significantly higher in colorectal carcinoma, colorectal adenoma with malignancy, and colorectal adenoma than in normal colorectal mucosa (56.0%, 60.0%, and 46.7% vs. 0%, $P<0.01$). The positive rate of Cyclin D1 was significantly higher in colorectal carcinoma, colorectal adenoma with malignancy, and colorectal adenoma than in normal colorectal mucosa (66.0%, 60.0%, and 30.0% vs. 0%, $P<0.01$), and significantly higher in colorectal carcinoma than in colorectal adenoma ($P<0.01$). The ectopic expression of β -catenin was positively correlated to the expression of C-myc and Cyclin D1 ($r=0.63$, $P<0.01$; $r=0.57$, $P<0.01$), and negatively correlated to the expression of APC ($r=-0.39$, $P<0.05$). **CONCLUSION:** The reduced expression of APC, ectopic expression of β -catenin, overexpression of C-myc and Cyclin D1 exist in colorectal carcinoma, which may play important roles in the carcinogenesis of colorectal carcinoma.

KEYWORDS: Colorectal neoplasm; APC; β -catenin; C-myc; Cyclin D1; Immunohistochemistry

【摘要】 背景与目的: Wnt 信号转导通路成员各癌基因、抑癌基因的异常, 激活下游相关靶基因的转录, 在肿瘤发生发展中起重要作用。本研究通过检测不同大肠组织中 APC、 β -catenin、C-myc 和 Cyclin D1 的表达情况, 探讨其在大肠癌发生中的意义。方法: 应用免疫组织化学方法检测 30 例正常大肠粘膜、30 例大肠腺

瘤、10 例大肠腺瘤恶变及 50 例大肠癌组织中 APC、 β -catenin、C-myc 和 Cyclin D1 蛋白的表达情况。以 β -catenin 在细胞膜表达为正常表达,而在胞浆和/或胞核表达为异位表达。结果:大肠癌和大肠腺瘤恶变组织 APC 阳性率分别为 44.0%和 40.0%,显著低于大肠腺瘤(86.7%)和正常大肠粘膜(100%)($P<0.01$)。大肠癌、大肠腺瘤恶变组织和大肠腺瘤 β -catenin 胞浆和/或胞核异位表达率分别为 62.0%、50.0%、30.0%,均显著高于正常大肠粘膜(0%)($P<0.01$)。大肠癌 β -catenin 异位表达率显著高于大肠腺瘤($P<0.01$)。大肠癌、大肠腺瘤恶变组织、大肠腺瘤中 C-myc 表达率分别为 56.0%、60.0%、46.7%,均显著高于正常大肠粘膜(0%)($P<0.01$)。而 Cyclin D1 阳性率分别为 66.0%、60.0%、30.0%,均显著高于正常大肠粘膜(0%)($P<0.01$)。大肠癌 Cyclin D1 表达率显著高于大肠腺瘤($P<0.01$)。大肠癌中 β -catenin 异位表达与 C-myc 和 Cyclin D1 表达呈正相关关系($r=0.63, P<0.01; r=0.57, P<0.01$),而与 APC 表达呈负相关关系($r=-0.39, P<0.05$)。结论:大肠癌组织中存在 APC 低表达和/或 β -catenin 异位表达,以及 C-myc 和 Cyclin D1 的过度表达,4 种基因蛋白可能在大肠癌发生过程中起重要作用。

关键词:大肠肿瘤; APC; β -catenin; C-myc; Cyclin D1; 免疫组织化学

中图分类号:R735.3

文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2007)09-0963-04

Wnt 信号转导通路是调控细胞增殖和分化的重要通路,该通路成员各癌基因、抑癌基因的异常,激活下游相关靶基因的转录与肿瘤的发生密切相关^[1]。杨剑锋等^[2]研究发现, β -catenin 的异常表达可能通过促使或激活 Cyclin D1 的过表达导致乳腺癌的发生。Van de Wetering 等^[3]指出:结肠癌中 Wnt/ β -catenin 通路控制着细胞增殖,即 β -catenin 的靶基因 C-myc 可以抑制 p21 转录,促进细胞增殖,从而更加突出了该通路的重要作用。本研究应用免疫组织化学技术检测结肠腺瘤性息肉蛋白(adenomatous polyposis coli, APC)、 β -catenin、C-myc 及 Cyclin D1 蛋白在正常大肠粘膜、大肠腺瘤、大肠腺瘤恶变和大肠癌中的表达及其关系,以探讨 Wnt 信号转导通路异常在大肠癌发生过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

抽取 1998 年 1 月至 2002 年 12 月,在柳州市人民医院行大肠癌根治性切除,并经病理确诊的 50 例大肠腺癌,及同期手术切除和结肠镜活检并经病理确诊的 30 例大肠腺瘤,10 例大肠腺瘤

恶变。取其中癌旁 10 cm 以上正常大肠粘膜组织 30 例作为正常对照组。大肠腺瘤标本中,管状腺瘤 19 例,混合型腺瘤 8 例,绒毛状腺瘤 3 例;腺瘤伴低级别和高级别异型增生分别为 20 例和 10 例。

1.2 主要试剂与免疫组织化学方法

1.2.1 主要试剂 浓缩型兔抗人 APC 多克隆抗体 C-20、鼠抗人 β -catenin 单克隆抗体 SC-7963 和鼠抗人 C-myc 单克隆抗体 SC-40 均购自美国 Santa Cruz 公司,鼠抗人 Cyclin D1 单克隆抗体 DCS-6 购自 DAKO 公司,工作浓度分别为 1:200、1:100、1:100、1:100。EnVision 试剂盒购自福州迈新公司。

1.2.2 免疫组织化学方法 所有标本均做 4 μ m 厚连续切片,行 HE 和免疫组织化学染色。按 EnVision 二步法进行免疫组织化学染色,4 种抗体孵育前,切片均经微波抗原修复,具体方法参照说明书。以 PBS 代替一抗作为阴性对照,以已知大肠癌阳性组织作阳性对照。

1.3 结果判断标准

免疫组织化学染色阳性信号为细胞出现棕黄色细小颗粒。 β -catenin 染色结果判断标准按照 Maruyama 等^[4]方法,细胞浆和/或细胞核>10%细胞阳性为胞浆和/或胞核阳性,反之为阴性;胞浆和/或胞核表达称为异位表达。APC 主要表达于细胞浆,而 C-myc 和 Cyclin D1 以细胞核>10%细胞阳性为阳性表达,反之为阴性。

1.4 统计学处理

运用 SPSS 10.0 统计软件进行 χ^2 检验和相关性检验。

2 结果

2.1 APC、 β -catenin、C-myc 和 Cyclin D1 蛋白在不同大肠组织中的表达

APC 表达定位于上皮细胞浆(图 1A)。 β -catenin 正常表达定位于上皮细胞膜,大肠腺瘤、大肠腺瘤恶变和大肠癌组织 β -catenin 呈不同程度的胞浆和/或胞核异位表达(图 1B)。C-myc 和 Cyclin D1 主要呈胞核表达(图 1C,图 1D)。正常大肠粘膜组织、大肠腺瘤、大肠腺瘤恶变、大肠癌组织中 APC、 β -catenin、C-myc 和 Cyclin D1 的表达情况见表 1。

2.2 大肠癌中 β -catenin 表达与 APC、C-myc、Cyclin D1 表达的相关性

大肠癌中 β -catenin 表达与 APC、C-myc、Cyclin D1 表达的相互关系见表 2。经统计学分析, β -catenin 异位表达与 C-myc 和 Cyclin D1 表达呈正相

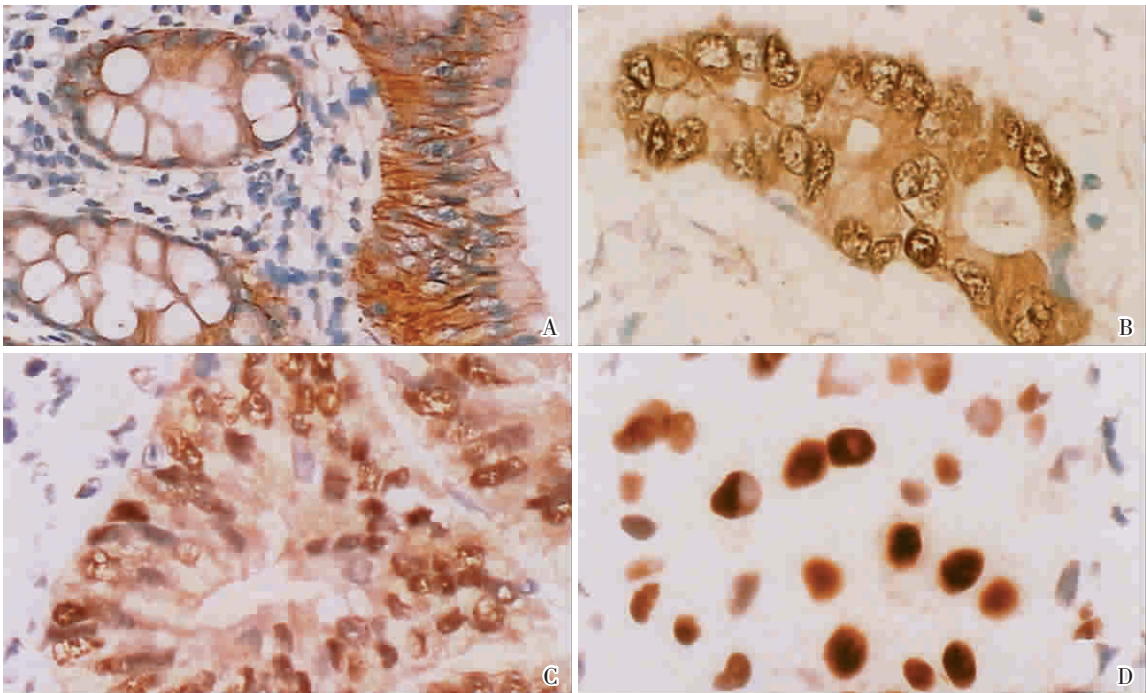


图 1 APC、β-catenin、C-myc 和 Cyclin D1 在大肠组织中的表达 (EnVision ×400)

Figure 1 The expression of APC, β-catenin, C-myc, and Cyclin D1 in colorectal tissues (EnVision ×400)

- A: Positive expression of APC in cytoplasm of normal colorectal mucosa cells.
- B: Positive expression of β-catenin in cytoplasm and nuclei of colorectal carcinoma cells.
- C: Positive expression of C-myc in nuclei of colorectal carcinoma cells.
- D: Positive expression of Cyclin D1 in nuclei of colorectal carcinoma cells.

表 1 APC、β-catenin、C-myc 和 Cyclin D1 蛋白在不同大肠组织中的表达

Table 1 Expression of APC, β-catenin, C-myc, and Cyclin D1 proteins in different colorectal tissues [cases (%)]

Group	Cases	APC	β-catenin	C-myc	Cyclin D1
Normal colorectal mucosa	30	30 (100.0) ^a	0 (0) ^b	0 (0) ^b	0 (0) ^b
Colorectal adenoma	30	26 (86.7) ^a	9 (30.0) ^c	14 (46.7)	9 (30.0) ^c
Low grade dysplasia	20	18 (90.0)	5 (25.0)	8 (40.0)	5 (25.0)
High grade dysplasia	10	8 (80.0)	4 (40.0)	6 (60.0)	4 (40.0)
Colorectal adenoma with malignancy	10	4 (40.0)	5 (50.0)	6 (60.0)	6 (60.0)
Colorectal carcinoma	50	22 (44.0)	31 (62.0)	28 (56.0)	33 (66.0)

^a $P<0.01$, vs. colorectal adenoma with malignancy, and colorectal carcinoma; ^b $P<0.01$, vs. colorectal adenoma, colorectal adenoma with malignancy, and colorectal carcinoma; ^c $P<0.01$, vs. colorectal carcinoma.

关关系($r=0.63, P<0.01; r=0.57, P<0.01$), 而与 APC 表达呈负相关关系($r=-0.39, P<0.05$)。

表 2 大肠癌中 β-catenin 表达与 APC、C-myc、Cyclin D1 表达的相关性

Table 2 Correlation of β-catenin expression to APC, C-myc, and Cyclin D1 expression in colorectal carcinoma (cases)

β-catenin	APC		P value	C-myc		P value	Cyclin D1		P value
	+	-		+	-		+	-	
+	9	22	< 0.05	25	6	< 0.01	27	4	< 0.01
-	13	6		3	16		6	13	

3 讨 论

正常成熟细胞中没有 Wnt 信号, β-catenin 大部分与胞膜上的 E-cadherin 结合, 参与同型细胞间粘附, 少部分与胞浆的 APC、Axin、Gsk-3β 结合形成降解复合物, 最终被降解, 因而胞浆的 β-catenin 水平降低, 不能进入细胞核。肿瘤细胞中存在异常的 Wnt 信号转导通路, APC 或 β-catenin 基因突变或蛋白结构、功能异常导致 β-catenin 在胞浆内集聚, 并进入细胞核内与 Tcf/Lef 结合激活相关靶癌基因如 C-myc、Cyclin D1 等的转录, 导

致细胞癌变。

APC 是 Wnt 信号转导通路的重要组成部分,在 Wnt 信号转导通路中起负向调节作用,抑制其异常激活,它的突变或蛋白异常与大多数散发性大肠肿瘤发生有关。黄凯等^[5]应用免疫组化技术证实在大肠腺癌中 APC 蛋白表达显著低于大肠腺瘤和正常大肠粘膜,提出 APC 蛋白失表达可能与大肠癌的发生密切相关。本研究发现,APC 蛋白定位于胞浆,正常大肠粘膜均呈阳性,而在大肠腺瘤、大肠腺瘤恶变及大肠癌组织中其表达率依次下降,在大肠腺瘤恶变时下降尤为明显,提示 APC 蛋白表达缺失可能与大肠腺瘤的恶变密切相关,且发生于大肠癌的早期阶段。 β -catenin 作为 Wnt 信号转导通路中的正向调节分子,在正常大肠粘膜中呈胞膜表达,无胞浆和/或胞核表达,而在大肠腺瘤、大肠腺瘤恶变和大肠癌中均不同程度存在异位表达和膜表达缺失,且呈逐渐升高的趋势,大肠癌异位表达率(62.0%)显著高于大肠腺瘤(30.0%)。大肠腺瘤恶变 β -catenin 异位表达率(50.0%)亦高于大肠腺瘤(30.0%),但差异无统计学意义,可能与大肠腺瘤恶变组例数较少(10例)有一定关系。腺瘤恶变是腺瘤由良性向恶性转化的最早期阶段,本研究发现 β -catenin 异位表达率在腺瘤恶变组织中显著增高,提示 β -catenin 的胞浆集聚并进入核内,导致 β -catenin 的肿瘤性活化并激活下游靶癌基因可能在腺瘤恶变过程中发挥关键作用。本研究结果同时显示,腺瘤伴高级别异型增生 β -catenin 异位表达率(40.0%)显著增高,提示 β -catenin 异位表达在癌变前的腺瘤晚期阶段就已发生,可能是大肠癌发生的早期事件。C-myc 作为 Wnt 信号转导通路下游的一个靶癌基因,与细胞的持续增殖关系密切,在肿瘤发生过程中起重要作用, β -catenin 可通过 Tcf-4 连接 C-myc 启动子位点来激活其表达^[6,7]。Cyclin D1 是细胞周期调节的正性调控因子,其含量及活化程度在细胞增殖周期卡点 G_1/S 转换过程中起限速作用,其过度表达可导致细胞周期调控异常,从而发生肿瘤^[8,9]。近年发现 Cyclin D1 同时也是 Wnt 信号转导通路下游重要的靶癌基因之一,Cyclin D1 基因是 β -catenin/Lef-1 途径激活的直接靶基因,通过 Lef-1 连接 Cyclin D1 启动子位点,激发 Cyclin D1 基因过度表达,导致细胞周期失控,进而促进肿瘤转化^[7]。本实验结果显示,大肠腺瘤、腺瘤恶

变、大肠癌组织中 C-myc 和 Cyclin D1 均有不同程度的过度表达,而正常大肠粘膜未见表达,表明 C-myc 和 Cyclin D1 过度表达在大肠癌的发生过程中是一种频发事件。此外,通过对大肠癌中 β -catenin 表达与 APC、C-myc、Cyclin D1 表达的相关性分析发现, β -catenin 异位表达与 C-myc 和 Cyclin D1 表达呈正相关关系,而与 APC 表达呈负相关关系,提示 APC 蛋白表达失表达和/或 β -catenin 基因突变或蛋白结构异常可能导致 β -catenin 免于降解,游离的 β -catenin 在胞浆内集聚并进入核内, β -catenin 异位表达可能是原癌基因 C-myc 和 Cyclin D1 激活的重要原因,并在大肠癌的发生过程中起重要作用,且可能是大肠癌发生的早期事件。在 Wnt 信号转导通路中, β -catenin 是正向调节因子,APC 是负向调节因子,而 C-myc 和 Cyclin D1 可能是核内受异常 Wnt 信号转导通路调控的两个最重要的靶癌基因。

[参 考 文 献]

- [1] Michaelson J S, Leder P. Beta-catenin is a downstream effector of Wnt-mediated tumorigenesis in the mammary gland [J]. *Oncogene*, 2001,20(37):5093-5099.
- [2] 杨剑锋,陈森林,刘志红,等. 乳腺癌组织中 E-cadherin、 β -catenin 及 cyclin D1 表达的相关性研究 [J]. *癌症*, 2004,23(7):799-802.
- [3] Van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells [J]. *Cell*, 2002,111(2):241-250.
- [4] Maruyama K, Ochiai A, Akimoto S, et al. Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer [J]. *Oncology*, 2000,59(4):302-309.
- [5] 黄 凯,叶建新,陈祥锦,等. 大肠肿瘤 APC 基因蛋白产物的表达及其意义 [J]. *福建医药杂志*, 2003,25(2):53-54.
- [6] Giles R H, van Es J H, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003,1653(1):1-24.
- [7] 吴文新,张祥宏. β -catenin 及其通路相关基因在大肠腺瘤癌变中的意义 [J]. *癌症*, 2001,20(9):1005-1007.
- [8] 戴文斌,任占平,阮 伶,等. 胃癌及癌前病变中 p16、p21^{WAF1}、CDK4、cyclin D1 蛋白的表达及其意义 [J]. *癌症*, 2001,20(10):1074-1077.
- [9] Krecicki T, Smigiel R, Fraczek M, et al. Studies of the cell cycle regulatory proteins P16, cyclin D1 and retinoblastoma protein in laryngeal carcinoma tissue [J]. *J Laryngol Otol*, 2004,118(9):676-680.

[编辑:张菊;校对:杨允贵]