

ATF2 与 ATF3 在结直肠癌中表达及临床病理意义

王 成¹ 唐 衡¹ 刘志红²

(1 湖南省祁阳县中医院病理科湖南 湖南 祁阳 426100 2 湖南省肿瘤医院病理科 湖南 长沙 410013)

摘要 目的 观察结直肠癌组织中活化转录因子 2(ATF2)和活化转录因子 3(ATF3)的表达并分析其表达的临床病理意义。方法: 收集结直肠癌病例,明确其病理诊断并收集临床资料,应用免疫组织化学 SP 法检测活化转录因子 2 和活化转录因子 3 蛋白的表达。结果: ATF2 在癌旁肠组织、腺瘤、腺癌组的阳性表达率分别为 38%、32%、64%,差异有统计学意义,其中癌旁肠组织、腺瘤分别与腺癌有显著性差异。ATF3 在癌旁肠组织、腺瘤、腺癌组的阳性表达率分别为 56%、44%、52%,差异无统计学意义。ATF2 表达与浸润肠壁深度、淋巴结转移有关,而与肿块大小、部位、分化程度无关。ATF3 表达与肿块直径、浸润肠壁深度,而与淋巴结转移、部位、分化程度无关。结论: ATF2 与结直肠癌反生和发展有关,而 ATF3 与结直肠癌的恶性演进有关。

关键词 结直肠癌;活化转录因子;免疫组化检测;临床病理

中图分类号 R735.3 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2011)08-1505-04

Expression of ATF2 and ATF3 in colorectal carcinoma and their clinical significance

WANG Cheng¹, TAN Heng¹, LIU Zhi-hong²

(1 Department of Pathology, Qi-Yang Traditional Chinese medical hospital, Qi-Yang 426100 P.R.China; 2 Department of Pathology, Hunan Tumor Hospital, Changsha 410013 P.R.China)

ABSTRACT Objective: Activating transcription factor2 (ATF2) and Activating transcription factor3 (ATF3) expression were observed, and its clinicopathological significance were analyzed. **Methods:** Pathological and clinical documents of patients with colorectal carcinoma were collected, and immunohistochemical method was applied. **Results:** positive rate of ATF2 expression in para-cancer tissues, adenoma, adenocarcinoma tissues were 38%, 32%, 64% and there is a significant difference; positive rate of ATF3 expression in para-cancer tissues, adenoma, cancer tissues were 56%, 44%, 52% and there is no significant difference; ATF2 expression was associated with lymph node metastasis and invasive depth and not related to lump size, locus, differentiation degree. ATF3 expression was associated with lump size and invasive depth and not related to locus, lymph node metastasis, differentiation degree. **Conclusions:** ATF2 expression was associated with carcinogenesis and development, and ATF3 expression was associated with malignant progression in colorectal carcinoma.

Key Words: colorectal carcinoma; activating transcription factor; immunohistochemical assay; clinicopathology

Chinese Library Classification(CLC):R735.3 **Document code:**A

Article ID:1673-6273(2011)08-1505-04

活化转录因子家族(activating transcription factor-2 ATF)是转录因子 AP-1 家族的亚家族,其重要的结构和功能为亮氨酸拉链(leucine zipper),即碱性拉链(bZIP),由 C 端的亮氨酸二聚化结合区和 N 端的碱性 DNA 结合区组成^[1,2]。ATF 在大部分正常细胞中呈低浓度稳态表达,作为应激早期快反应基因,体内外可被一系列损伤性应激信号快速诱导表达,不仅在应激反应中作为关键性的调控因子,还广泛参与机体稳态维持、创伤愈合、细胞粘附、肿瘤形成、凋亡以及信号传导等生理和病理过程^[1,2]。在本研究中,将探讨 ATF2 和 ATF3 在结直肠癌中的表达及分析其临床病理意义。

1 材料与方法

1.1 实验标本

结直肠癌组织标本为湖南省祁阳县中医院病理科 2007 年 1 月~2009 年 12 月间住院病例。病例均经结直肠癌根治术治疗,

常规固定取材,制备蜡块并行 HE 染色,随机抽取结直肠癌病例 50 例,其中无淋巴结转移的 25 例,有淋巴结转移的 25 例;结肠癌 24 例,直肠癌 26 例;男性患者 27 例,女性患者 23 例,年龄 23—76,平均年龄 51.42 岁。病理诊断经 2 名病理学专家诊断核实,均为腺癌,其中高分化 11 例,中分化 25 例,低分化 14 例。癌旁肠组织为结直肠癌根治标本的切缘(距肿块边缘 15cm 或以上),经 HE 切片观察无癌浸润。

1.2 试剂

ATF-2 (N-96) 兔多克隆抗体(sc-6233),ATF-3 (C-19)为兔多克隆抗体(sc-188 P, 100μg/0.5 ml, Santa cruz 公司)工作浓度均为 1:100,SP 免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司。

1.3 免疫组织化学方法

石蜡切片常规脱蜡脱水,3% H₂O₂ 孵育 20min, PBS 洗, 0.01M 枸橼酸盐缓冲液中微波处理进行抗原修复, PBS 洗,滴加封闭血清孵育 20min,滴加一抗 4℃孵育过夜, PBS 洗,滴加辣根过氧化物酶标记二抗抗体 15min, PBS 洗, DAB 溶液显色,自来水冲洗,苏木素复染脱水封片,光镜观察。对照:阴性对照用

作者简介:王成(1969—),男,主治医师,主要研究方向:胃肠道肿瘤的病理学诊断

(收稿日期:2010-11-06 接受日期:2010-11-30)

计学分析方法 :蛋白以胞核或胞浆出现棕黄色颗粒为阳性 ,采用 Bresalier 半定量公式判断染色结果。用双盲法在每张切片中随机选取 10 个视野 ,根据细胞染色强度分为四级 ,并分别记分 :阴性细胞(-)无显色(0) ;弱阳性细胞(+)显色为浅黄色(1) ;中度阳性细胞(++)显色为棕黄色(2) ;强阳性细胞(+++)显色为棕褐色(3) ,记数每一强度的视野数 ,根据以下公式计算每一张切片的平均染色强度 :IS (intensity score)=Σ {(0× F0)+ (1× F1)+(2× F 2)+(3×F3)} F=%× 10 视野。

1.4 统计学方法

本实验免疫组化结果为计数分级资料 ,主要的统计方法为配对样本的卡方检验(χ²) ,确定 p<0.05 为差异有显著性意义。使用 SPSS13.0 统计软件包。

2 结果

2.1 ATF2 和 ATF3 在结直肠癌组织中的表达

ATF2 的阳性表达主要定位于细胞核 ,为浅黄色到棕褐色不等 ,灶性至弥漫分布。癌旁肠组织组(正常组) ,腺瘤 ,腺癌组的阳性表达率分别为 38% ,32% ,64% ,总体方差分析显示有统计学差异 ,组间两两比较显示 ATF2 在正常组和腺瘤组的表达分别与腺癌组有显著性差异 ,而正常组和腺瘤组无显著性差异。ATF3 的阳性表达主要定位于细胞核 ,为浅黄色到棕褐色不

等 ,灶性至弥漫分布。癌旁肠组织组 ,腺瘤组 ,腺癌组的阳性表达率分别为 56% ,44% ,52% ,方差分析提示无统计学差异。

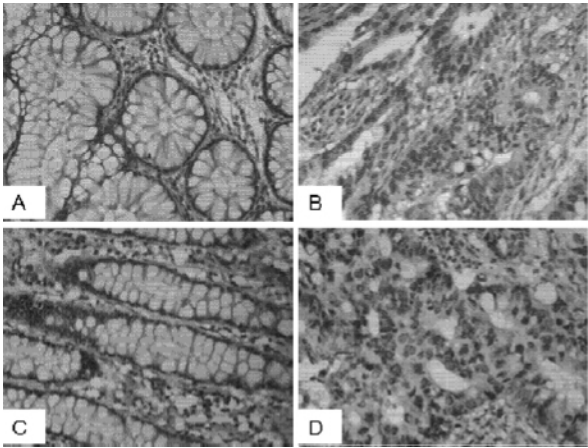


图1 ATF2 和 ATF3 在癌旁肠组织和结直肠癌中的表达 200x
Fig 1 Expression of ATF2 and ATF3 in colorectal carcinoma and para-cancer tissues 200x

- A: ATF2 expression in para-cancer tissue;
- B: ATF2 expression in cancer tissue;
- C: ATF3 expression in para-cancer tissue;
- D: ATF3 expression in cancer tissue.

表1 ATF2 和 ATF3 在癌旁肠组织、腺瘤和结直肠癌中的表达

分组 Group	例数 No.	ATF2		ATF3	
		阳性例数	阳性率(%)	阳性例数	阳性率(%)
		positivity number	positivity rate	positivity number	positivity rate
癌旁组 Para-cancer group	50	19	38	28	56
腺瘤组 Adenoma group	25	8	32	11	44
腺癌组 Adenocarcinoma group	50	32	64	26	52
χ ²		9.678		0.962	
P		0.008		0.618	

2.2 ATF2 在结直肠癌组织中表达的临床病理分析

免疫组织化学结果显示 ,
ATF2 的阳性表达率与肿瘤浸润肠壁深度和淋巴结转移有关

(P<0.05) ,而与肿块大小(直径) ,部位 ,分化程度无关(P>0.05) ,见表 2。

表2 ATF2 在结直肠癌中表达的临床病理分析

临床病理指标 Clinopathological index	例数 NO.	阳性数 Positivity number	阳性率(%) Positivity rate	χ ²	P
肿块直径 lump diameter(cm)					
>=5	31	22	71.0	1.719	0.157
<5	19	10	52.6		
部位 locus					
结肠(colon carcinoma)	25	14	56.0	1.389	0.189
直肠(rectal carcinoma)	25	18	72.0		
分化 differentiation					
低分化 poorly differentiated	19	11	57.9		

中分化 moderately differentiated	21	14	67.7	0.528	0.768
高分化 well differentiated	10	7	70.0		
浸润深度 infiltrating depth					
肌层以内	12	4	33.3	6.445	0.015
intra- muscular layer					
浆膜及浆膜外	38	28	73.7		
serous membrane and exo-serous membrane					
淋巴结转移					
lymph node metastasis					
无 none	28	14	50.0	5.414	0.020
有 exist	22	18	81.8		

2.3 ATF3 在结直肠癌组织中表达的临床病理分析

肠壁深度有显著相关性($P<0.05$) ,与肿瘤发生部位 ,淋巴结转移和分化程度无关($P>0.05$) ,见表 3。

免疫组织化学结果显示 ,ATF3 的表达与肿块直径和浸润

表 3 ATF3 在结直肠癌中表达的临床病理分析
Table 3 Clinicopathological analysis of ATF3 expression in colorectal carcinoma

临床病理指标 Clinopathological index	例数 NO.	阳性数 positivity number	阳性率(%) positivity rate	χ^2	P
肿块直径 lump diameter(cm)					
>/=5	31	20	64.5	5.120	0.024
<5	19	6	31.6		
部位 locus					
结肠(colon carcinoma)	25	11	44.0	1.282	0.198
直肠(rectal carcinoma)	25	15	60.0		
分化					
低分化 poorly differentiated	19	10	52.6		
中分化 moderately differentiated	21	9	42.9	2.004	0.367
高分化 well differentiated	10	7	70.0		
浸润肠壁深度 infiltrating depth					
肌层以内	12	3	25.0	4.162	0.034
intra- muscular layer					
浆膜及浆膜外	38	23	60.5		
serous membrane and exo-serous membrane					
淋巴结转移					
无 none	28	16	57.1	0.674	0.296
有 exist	22	10	45.5		

2.4 ATF2 和 ATF3 在结直肠癌组织中表达的相关性分析

50 例结直肠癌组织的 ATF2 和 ATF3 的阳性表达一致率为 54.5% ,无显著相关性($r=0.194$ $P=0.388$)。

3 讨论

结直肠癌(colorectal cancer ,CRC)是我国常见恶性肿瘤 ,

其发病率和死亡率逐年增高的趋势。阐明大肠癌发生及恶性演进的分子机制 ,确定在大肠癌发生发展中起关键作用的特异性标志物和基因干预的靶基因 ,是大肠癌防治的迫切任务 ,大肠癌侵袭和转移的分子生物学机制 ,是近几年中研究的热点。研究发现,一些癌基因和抑癌基因以及一些蛋白水解酶、金属蛋白酶类等 在肿瘤细胞的侵袭转移行为起着重要作用。在本研究

中将关注趋化因子与结直肠癌转移的关系。

ATF-2 是 ATF/CAMP 反应成分结合蛋白家族成员, 具有生长因子非依赖性增殖和转化能力。如磷酸化 ATF-2 表达可反映鼠皮肤致癌模型的发生阶段。在乳腺癌中 ATF2 稳定表达而与肿瘤细胞对 DNA 损伤剂耐受有关^[3,4]。本研究结果显示 ATF2 在癌旁肠组织、腺瘤、腺癌中均有一定的表达,但在腺癌中的表达较正常组和腺瘤中的表达显著增强,而正常组和腺瘤组无显著性差异。并且进一步的临床病理学分析发现 ATF2 的阳性表达率与肿瘤浸润肠壁深度和淋巴结转移有关,在浸润肠壁较深或伴有肠旁淋巴结转移的病例中表达越强,而与肿块大小(直径)、部位、分化程度无关。这些数据说明 ATF2 过表达与结直肠癌发生、侵袭和转移呈正相关性。关于 ATF2 与肿瘤发生和发展的研究有一些报道,如磷酸化的 ATF2 和 STAT3 在乳腺外派杰氏病中表达均强于正常皮肤,而在进展期 EMPD 中的表达强于非侵袭性的 EMPD,说明这两个因子可能有肿瘤分期有关^[5]。促癌剂 TPA 能促进肝细胞癌中 ATF2 的磷酸化和活化^[6]。但 ATF2 也作为信号分子参与一些抗癌物质的作用过程,如阿司匹林和芹菜素(Apigenin)具有防癌作用,可诱导 ATF2 的表达^[7,8]。综上所述,ATF2 在致癌和防癌中的功能有待进一步深入研究。

ATF3 也是 AP-1 家族超家族成员,作为应激早期快反应基因,体内外可被一系列损伤性应激信号快速诱导表达,在大部分正常细胞中呈低浓度稳态表达。此外还广泛参与了机体稳态维持、创伤愈合、细胞粘附、肿瘤形成、凋亡以及信号传导等生理和病理过程。本研究观察 ATF3 在癌旁肠组织组、腺瘤组、腺癌组的阳性表达情况,发现在癌旁肠组织、腺瘤、腺癌中均有一定的表达且没有明显差异,但 ATF3 表达与肿块直径和浸润肠壁深度有显著相关性,与肿瘤发生部位、淋巴结转移和分化程度无关。说明 ATF3 的表达主要与肿瘤生长和侵袭有一定关系,在肿瘤发生和发展的一定阶段起作用。但也有报道 ATF3 参与肿瘤发生,如在皮肤癌的研究中发现 ATF3 表达增加可抑制 p53 依赖性的细胞衰老从而增加肿瘤发生的可能性。对鼠乳腺癌模型的研究发现 ATF3 是乳腺癌发生的癌基因,人乳腺癌表达高水平的 ATF3 在乳腺癌发生中起着重要作用^[9,10]。在肺癌细胞的研究中发现阻断 ATF3 将减弱顺铂的细胞毒作用,并且 ATF3 表达是 MAPK 通路依赖性的^[11]。

在本研究中未发现 ATF2 和 ATF3 表达间具有相关性,可能是这两种因子在结直肠癌中作用不同或作用的阶段不同,并

且它们仅仅是作为信号通路上的分子起作用,还是能独立行使癌基因功能还有待深入研究。

参考文献(References)

- [1] Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins[J]. Science, 1988, 240: 1759-1764
- [2] Glover JN, Harrison SC. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA[J]. Nature, 1995, 373: 257-261
- [3] Papassava P, Gorgoulis VG, Papaevangelou D. Overexpression of activating transcription factor-2 is required for tumor growth and progression in mouse skin tumors [J]. Cancer Res. 2004, 64 (23): 8573-84
- [4] Hayakawa J, Depatie C, Ohmichi M, The activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) by DNA-damaging agents serves to promote drug resistance via activating transcription factor 2 (ATF2)-dependent enhanced DNA repair[J]. J Biol Chem. 2003, 278(23):20582-92
- [5] Chen SY, Takeuchi S, Moroi Y, Concordant overexpression of phosphorylated ATF2 and STAT3 in extramammary Paget's disease [J]. J Cutan Pathol. 2009, 36(4):402-8
- [6] Bauer I, Al Sarraj J, Vinson C, Interleukin-1beta and tetradecanoylphorbol acetate-induced biosynthesis of tumor necrosis factor alpha in human hepatoma cells involves the transcription factors ATF2 and c-Jun and stress-activated protein kinases [J]. J Cell Biochem. 2007, 100(1):242-55
- [7] Hundley TR, Rigas B. Nitric oxide-donating aspirin inhibits colon cancer cell growth via mitogen-activated protein kinase activation[J]. J Pharmacol Exp Ther. 2006, 316(1):25-34
- [8] Van Dross R, Xue Y, Knudson A, The chemopreventive bioflavonoid apigenin modulates signal transduction pathways in keratinocyte and colon carcinoma cell lines [J]. J Nutr. 2003, 133 (11 Suppl 1): 3800S-3804S
- [9] Wu X, Nguyen BC, Dziunycz P, Opposing roles for calcineurin and ATF3 in squamous skin cancer[J]. Nature, 2010, 465(7296):368-72
- [10] Wang A, Arantes S, Yan L, The transcription factor ATF3 acts as an oncogene in mouse mammary tumorigenesis[J]. BMC Cancer, 2008, 8:268
- [11] Germain C, Niknejad N, Ma L, Cisplatin induces cytotoxicity through the mitogen-activated protein kinase pathways and activating transcription factor 3[J]. Neoplasia, 2010, 12(7):527-38