

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.02.041

直肠癌组织中 PTEN 和 Notch1 的表达及其与临床病理参数的关系

陈利华¹ 朱 艳² 万论论¹ 杨 莹¹ 赵文慧¹

(1 青岛大学附属医院健康管理中心 山东 青岛 266055; 2 青岛大学附属医院心脏超声室 山东 青岛 266055)

摘要 目的:探究直肠癌组织中 PTEN 和 Notch1 的表达及其与临床病理参数的关系。**方法:**收集 2014 年 1 月~2015 年 4 月,我院肿瘤外科确诊 48 例直肠癌病理组织标本与 20 例直肠癌患者癌旁正常组织标本为研究对象,应用免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(S-P 法)分析 PTEN 和 Notch1 蛋白在直肠癌病理组织和正常组织中的表达情况。**结果:**PTEN 和 Notch1 主要表达于直肠癌组织细胞质中,呈现棕黄色;Notch1 在直肠癌病理组织中表达率显著高于正常组织($P<0.05$);PTEN 在正常组织表达率显著高于在直肠癌组织($P<0.05$);Notch1 在淋巴转移、中底分化及分期为 C 期患者病理组织中表达率较高($P<0.05$);PTEN 在无淋巴转移、中底分化程度及 A+B 期患者病理组织表达率较高($P<0.05$);相关性分析显示,Notch1 和 PTEN 在直肠癌病理组织中表达呈现负相关关系($r=-0.534, P=0.000$)。**结论:**Notch1 和 PTEN 表达失调在直肠癌的发生、发展和淋巴转移中有重要作用;PTEN 表达可能对直肠癌的发生、发展具有抑制作用,Notch1 表达可能对直肠癌的发生、发展具有促进作用。

关键词: 直肠癌; PTEN; Notch1; 病理参数; 关系

中图分类号: R735.37 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)02-359-04

The Expression of PTEN and Notch1 in Rectal Cancer and Their Relationship with Clinical Pathological Parameters

CHEN Li-hua¹, ZHU Yan², WAN Lun-lun¹, YANG Xuan¹, ZHAO Wen-hui¹

(1 Health Management Center, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266055, China;

2 Department of Echocardiography, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266055, China)

ABSTRACT Objective: To explore the expression of PTEN and Notch1 in rectal cancer and their relationship with clinical pathological parameters. **Methods:** 48 cases of pathological tissues and 20 cases of carcinoma adjacent tissue were collected in oncology department of our hospital from January 2014 to April 2015 as research objects; Immunohistochemical method of the anti biotin peroxidase connection of streptomyces (S-P) was applied to analyse the expression of PTEN and Notch1 protein in colorectal cancer tissues and normal tissues. **Results:** PTEN and Notch1 were mainly expressed in the cytoplasm of the cells of rectal cancer, showed a brown yellow; The expression rate of Notch1 in colorectal cancer was significantly higher than that in normal tissues ($P<0.05$); The expression rate of PTEN in normal tissues was significantly higher than that in colorectal cancer tissues ($P<0.05$); The higher expression rate of Notch1 in lymph node metastasis, middle and bottom differentiation and C stage patients was higher ($P<0.05$); The expression rate of PTEN was higher in the patients with no lymph node metastasis, middle and bottom differentiation and A+B stage ($P<0.05$); Correlation analysis showed that the expression of Notch1 and PTEN in colorectal cancer was negatively correlated ($r=-0.534, P=0.000$). **Conclusion:** The dysregulation of PTEN and Notch1 expression may be associated with the occurrence and development of colorectal cancer and lymph node metastasis. PTEN expression has probable inhibitory effect on the occurrence and development of colorectal cancer and Notch1 expression can probably promote the occurrence and development of rectal cancer.

Key words: Rectal cancer; PTEN; Notch1; Pathological parameters; Relationship

Chinese Library Classification(CLC): R735.37 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)02-359-04

前言

直肠癌是常见的恶性肿瘤之一,全世界直肠癌发病率位居所有肿瘤的第 3 位,严重影响人们的生命健康^[1]。PTEN 是由美国科学家发现的一种抑癌基因,具有磷酸酶活性^[2],表现出多方面的抑癌作用,主要表现为两方面^[3,4],一方面,其能够作用于磷脂酰 3,4,5-三磷酸肌醇的去磷酸化过程影响细胞内生物信号

的传导,使细胞分裂阻滞在细胞周期的 G1 期,从而起到调节细胞分裂、分化及凋亡的作用;另一方面,PTEN 具有蛋白磷酸酶的功能,能够抑制 P130cas 与 FAK 整合形成复合物,导致细胞凋亡发生,影响细胞外基质与细胞的相互作用,抑制癌细胞扩散、迁移、及黏附^[5]。Notch1 受体是高度保守 I 型跨膜糖蛋白之一,胞内 Notch1 信号途径被触发后,可导致细胞膜释放 Notch 并转移到细胞核内,与转录激活子蛋白家族及 C 蛋白结合因子 1 结合生成转录因子三聚体复合物,调节下游基因,对细胞增殖、分化及凋亡产生影响^[6,7]。近年来,关于 PTEN 与 Notch1 信号通路在机体肿瘤发生、发展中作用的研究受到研究

作者简介:陈利华(1976-),女,本科,主治医师,从事普外科方面的研究,E-mail:suel2048@sina.com

(收稿日期:2016-08-31 接受日期:2016-09-26)

者的广泛关注,但关于二者表达情况与直肠癌疾病发生、发展的研究较少^[9]。因此,本研究研究直肠癌组织中 PTEN 和 Notch1 的表达及其与临床病理参数的关系,现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集 2014 年 1 月~2015 年 4 月我院肿瘤外科确诊 48 例直肠癌病理组织标本与 20 例直肠癌患者癌旁正常组织标本为研究对象,标本取出后置于 10% 的福尔马林中固定。纳入排除标准:(1)所有患者均为经病理组织检查,诊断为直肠癌,且入院前均未接受过化疗和放疗;(2)所有患者临床资料完整,均无远处器官转移;(3)所有患者均未合并其他严重恶性肿瘤;(4)所有患者及家属均知情同意,并签订《知情同意书》;本研究所有操作均经我院伦理委员会审核通过。其中 48 例直肠癌病理组织中男性患者 26 例,女性患者 22 例;年龄 38~76 岁,平均年龄(61.28 ± 10.37)岁;淋巴转移情况:有 19 例,无 29 例;分化程度:中分化 31 例,高分化 17 例;Dukes 分期:A+B 期 33 例,C 期 15 例;观察组 20 例患者癌旁正常组织为中男性 11 例,女性 9 例;年龄 40~79 岁,平均年龄(60.89 ± 8.47)岁;两组患者间性别、年龄无显著差异($P>0.05$),具有可比性。

1.2 试剂与方法

应用免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(S-P)法分析 PTEN 和 Notch1 蛋白在直肠癌病理组织和正常组织中的表达情况。将收集样本行免疫组织化学 S-P 处理,将石蜡制成为厚 $4 \mu\text{m}$ 的切片 3 张,分别行 Notch1、PTEN 免疫组化染色及 HE 染色。标本常规脱蜡于水中,采用 3% 的 H_2O_2 清除标本抗原修复及内源性过氧化物酶活性,滴加一抗,置于 4°C 环境过夜,然后依次严格按照说明书要求进行,最后行 DAB 显色后,给予苏木素进行复染。本研究使用 Notch1 兔抗多克隆抗

体、PTEN 兔抗人多克隆抗体及 S-P 试剂盒均购于北京中杉生物技术有限公司,其中一抗浓度为 1:100。

1.3 结果判定

以染色细胞膜与细胞质中出现棕黄色或棕色颗粒的百分比及染色强度判定阳性表达情况^[9]。每张切片随机取 10 个高倍视野,每个视野细胞计数不低于 100。按照染色细胞阳性的百分比判定 Notch1、PTEN 的表达情况:5%计 0 分,表示阴性; $>5\% \sim 25\%$ 计 1 分,表示弱表达; $>25\% \sim 50\%$ 计 2 分,表示中等表达; $>50\%$ 计 3 分,表示强表达;按染色强度判定 Notch1、PTEN 的表达情况:无着色计 0 分,浅黄色计 1 分,棕黄色计 2 分,强染、棕褐色计 3 分两项判定结果分数乘积得最后分数,其中,0~2 分计为阴性, ≥ 3 分计为阳性。

1.4 统计学方法

应用 SAS 9.3 统计软件对收集数据进行分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料间比较采用 χ^2 检验,相关性分析采用 spearman 秩相关,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTEN 和 Notch1 在直肠癌组织及正常组织中的表达情况

PTEN 和 Notch1 主要表达于直肠癌组织细胞质中,少数表达于细胞膜,呈现棕黄色;Notch1 在直肠癌病理组织中表达率高达 62.50%(30/48),在正常组织中表达率为 10%(2/20),Notch1 在直肠癌病理组织中的表达率显著高于正常组织($\chi^2=7.374$; $P=0.000$),见图 A、B; PTEN 在直肠癌组织中表达率为 35.42%(17/48),在正常组织中表达率为 90.00%(18/20),正常组织的表达率显著高于直肠癌病理组织($\chi^2=5.382$; $P=0.015$),见图 C、D。

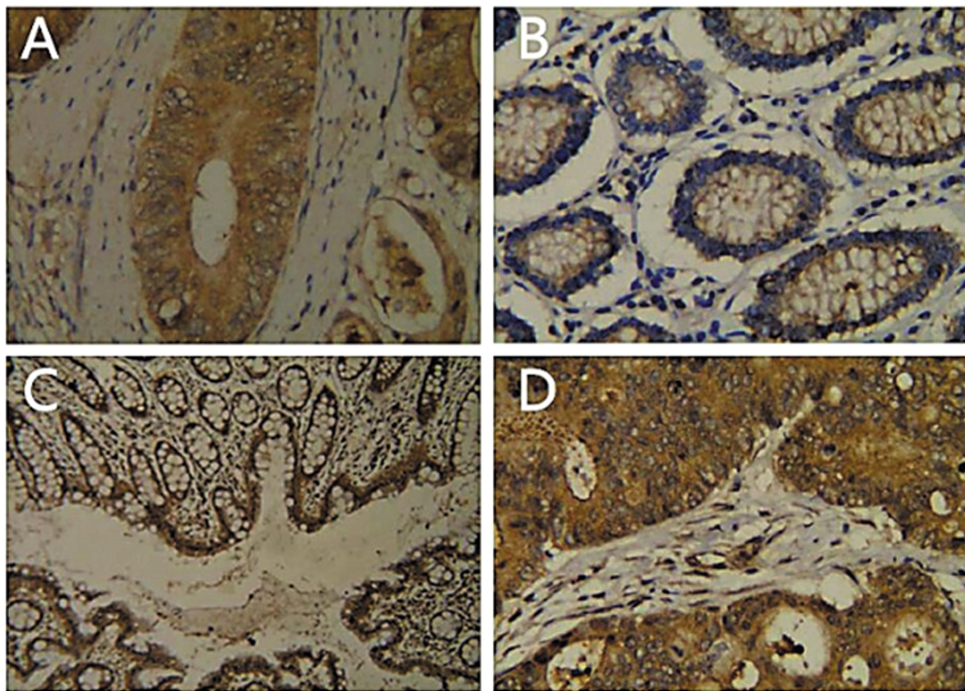


图 1 PTEN 和 Notch1 在直肠癌组织及正常组织中的表达($\times 400$)

Fig.1 Expression of PTEN and Notch1 in colorectal cancer tissues and normal tissues($\times 400$)

表 1 Notch1 和 PTEN 在直肠癌表达于临床病理特征的关系[n(%)]

Table 1 Relationship between Notch1 and PTEN expression and clinical pathological characteristics of colorectal cancer[n(%)]

Indexes		N	Notch1(+)	X ²	P	PTEN(+)	X ²	P
Ager(year)	<60	21	14(66.67)	1.213	0.343	7(33.33)	0.365	0.742
	≥ 60	27	16(59.25)			10(37.04)		
Gender	Male	26	18(69.23)	1.431	0.283	9(34.61)	0.135	0.849
	Female	22	12(54.55)			8(36.36)		
Lymph node metastasis	Yes	19	17(89.47)	9.485	0.001	3(10.52)	6.353	0.014
	No	29	13(44.83)			14(51.72)		
Degree of differentiation	high-differentiated	17	3(17.65)	13.374	0.000	3(5.88)	11.374	0.000
	Middle and bottom differentiation	31	27(87.10)			14(51.61)		
Dukes stages	A+B	33	18(54.55)	11.874	0.000	13(45.45)	6.454	0.012
	C	15	12(80.00)			4(13.33)		

2.2 Notch1 和 PTEN 在直肠癌表达与临床病理特征的关系

不同年龄、性别患者间 Notch1、PTEN 表达情况无差异 ($P>0.05$); Notch1 在淋巴转移、中低分化及分期为 C 期患者病理组织中表达率较高 ($P<0.05$); PTEN 在无淋巴转移、中底分化程度及 A+B 其患者病理组织的表达率较高 ($P<0.05$), 见表 1。

2.3 Notch1 和 PTEN 在直肠癌表达的相关性

病理组织检查表达显示, 48 例中 9 例患者 Notch1 和 PTEN 均表达为阳性, 9 例患者 Notch1 和 PTEN 均表达为阴性, 21 例患者 PTEN 表现阳性而 Notch1 表现阴性; 8 例患者 PTEN 表现阴性而 Notch1 表现阳性; 相关性分析显示, Notch1 和 PTEN 在直肠癌病理组织中表达呈现负相关关系 ($r=-0.534$, $P=0.000$)。

3 讨论

恶性肿瘤的发生、发展是由机体基因间相关作用的结果, 当机体中抑癌基因与癌基因的表达出现不平衡时, 会导致机体细胞过度增殖、凋亡等现象发生^[9]。既往报道^[10,11], PTEN 基因在恶性肿瘤患者病理组织出现表达缺失, 而肿瘤的发生、发展过程中伴随着 PTEN 的 mRNA 或蛋白表达水平下降, 且肿瘤进展的严重程度与 PTEN 蛋白的表达呈现负相关关系, 即患者肿瘤恶性程度越高, 机体 PTEN 的表达程度越低。国外研究者用 PTEN 和 GRP78 在小鼠模型中研究两者关系发现, 缺失 PTEN 的小鼠会影响小鼠蛋白质在内质网中折叠, 导致发生肝癌^[12]。另有研究报道^[13], 抑制 PTEN 表达, 会是结肠癌细胞正常代谢功能转变, 下调 PTEN 可促进病情的进展及迁移。本研究显示直肠癌病理组织中 PTEN 的表达率显著低于在癌旁正常组织中的表达率, 说明 PTEN 与癌症的发生存在密切联系, 进一步研究发现 PTEN 表达水平与恶性肿瘤的分化程度、淋巴转移情况及 Dukes 分期有关, 患者分化越低、出现淋巴转移及分期越严重 PTEN 表达率越低, 与国外多项研究结果一致^[14]。

既往报道^[15], Notch1 是机体重要的信号传导途径, 不仅在

机体细胞分化、生长发育起重要作用, 且与多种恶性肿瘤的发生、发展存在联系。既往研究发现^[16], 74% 的白血病小鼠机体存在 Notch1 表达, 其主要通过影响 T 细胞的正常发育发生作用。为探究 Notch1 表达在肿瘤发生、发展的作用, 研究者采用 RNA 干扰技术降低 Notch1 表达水平, 发现患者肿瘤的侵袭及迁移能力降低^[17]。此外, 研究者对宫颈癌疾病发生、发展过程中, Notch1 对能够促进疾病的进展, 且能够与乳头状瘤病毒产生协同作用加重患者病情^[18]。本研究显示, Notch1 表达水平与肿瘤分化程度、淋巴转移情况及 Dukes 分期相关, 且存在淋巴转移、分化程度越低、分期越晚, Notch1 表达就越高, 究其原因主要与 Notch1 能够细胞周期阻滞于细胞分裂的 G1 期, 改变细胞的形态及生长方式, 发挥抗肿瘤细胞作用^[19]。此外, 本研究显示直肠癌患者病理组织 PTEN 与 Notch1 的表达水平呈现负相关关系, 进一步说明 PTEN 表达水平下降, Notch1 表达水平升高会导致癌变的发生、进展等生物学行为。其原因可能与 Notch1 表达升高, Notch1 信号通路出现异常, 促进 PTEN 蛋白或 mRNA 的表达降低, 而 PTEN 表达水平降低会促进 Notch1 表达升高, 使信号通路维持异常状态。两组相互作用促进直肠癌的发生、进展, 与既往研究结果一致^[20], 但仍需要进一步研究证实。

综上所述, PTEN 表达对直肠癌患者病情的发生、发展具有抑制作用, Notch1 表达对直肠癌的发生、发展具有促进作用

参考文献(References)

- [1] Ho-Pun-Cheung A, Assenat E, Bascoul-Mollevis C, et al. EGFR and HER3 mRNA expression levels predict distant metastases in locally advanced rectal cancer[J]. Int J Cancer, 2011, 128(12): 2938-2946
- [2] Lan YT, Jen-Kou L, Lin CH, et al. Mutations in the RAS and PI3K pathways are associated with metastatic location in colorectal cancers [J]. J Surg Oncol, 2015, 111(7): 905-910
- [3] Mardjuadi FI, Carrasco J, Coche JC, et al. Panitumumab as a radiosensitizing agent in KRAS wild-type locally advanced rectal cancer[J]. Target Oncol, 2015, 10(3): 375-383

- [4] Bohn BA, Mina S, Krohn A, et al. Altered PTEN function caused by deletion or gene disruption is associated with poor prognosis in rectal but not in colon cancer[J]. *Hum Pathol*, 2013, 44(8): 1524-1533
- [5] Miyamae Y, Shimizu H, Naganuma A, et al. A Case of Rectal Neuroendocrine Carcinoma with Metachronous Liver Metastasis Treated with Multimodality Therapy [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2016, 43(8): 1009-1013
- [6] Wang H, Chen Y, Fernandez-Del Castillo C, et al. Heterogeneity in signaling pathways of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: a critical look at notch signaling pathway [J]. *Mod Pathol*, 2013, 26 (1): 139-147
- [7] Bi Z, Dong LD, Gu XM. Clinical significance of MMP-7 and PTEN expression in colorectal cancer [J]. *Hepatogastroenterology*, 2013, 60 (121): 32-36
- [8] Kim SY, Shim EK, Yeo HY, et al. KRAS mutation status and clinical outcome of preoperative chemoradiation with cetuximab in locally advanced rectal cancer: a pooled analysis of 2 phase II trials [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013, 85(1): 201-207
- [9] Slattery ML, Lundgreen A, Herrick JS, et al. Diet and colorectal cancer: analysis of a candidate pathway using SNPs, haplotypes, and multi-gene assessment[J]. *Nutr Cancer*, 2011, 63(8): 1226-1234
- [10] Jin JH, Rong YX, Wang F, et al. Expression of phosphatase and tensin homolog in lower rectal cancer on neoadjuvant chemoradiotherapy [J]. *National Medical Journal of China*, 2010, 90 (38): 2684-2688
- [11] Erben P, Ströbel P, Horisberger K, et al. KRAS and BRAF mutations and PTEN expression do not predict efficacy of cetuximab-based chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011, 81(4): 1032-1038
- [12] Herranz D, Ambesi-Impombato A, Sudderth J, et al. Metabolic reprogramming induces resistance to anti-NOTCH1 therapies in T cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Nat Med*, 2015, 21 (10): 1182-1189
- [13] Yu L, Liang H, Lu Z, et al. Membrane receptor-dependent Notch1/Hes1 activation by melatonin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury: in vivo and in vitro studies [J]. *J Pineal Res*, 2015, 59(4): 420-433
- [14] Bohn BA, Mina S, Krohn A, et al. Altered PTEN function caused by deletion or gene disruption is associated with poor prognosis in rectal but not in colon cancer[J]. *Hum Pathol*, 2013, 44(8): 1524-1533
- [15] Mu GG, Zhang LL, Li HY, et al. Thymoquinone Pretreatment Overcomes the Insensitivity and Potentiates the Antitumor Effect of Gemcitabine Through Abrogation of Notch1, PI3K/Akt/mTOR Regulated Signaling Pathways in Pancreatic Cancer [J]. *Dig Dis Sci*, 2015, 60(4): 1067-1080
- [16] Xiong Y, Zhang YY, Wu YY, et al. Correlation of over-expressions of miR-21 and Notch-1 in human colorectal cancer with clinical stages[J]. *Life Sci*, 2014, 106(1-2): 19-24
- [17] Gianfelici V, Chiaretti S, Demeyer S, et al. RNA sequencing unravels the genetics of refractory/relapsed T-cell acute lymphoblastic leukemia. Prognostic and therapeutic implications[J]. *Haematologica*, 2016, 101(8): 941-950
- [18] Malapelle U, Pisapia P, Sgariglia R, et al. Less frequently mutated genes in colorectal cancer: evidences from next-generation sequencing of 653 routine cases[J]. *J Clin Pathol*, 2016, 69(9): 767-771
- [19] Hosseini M, Shalchiantabrizi P, Yektaroudy K, et al. Prophylactic Effect of Rectal Indomethacin Administration, with and without Intravenous Hydration, on Development of Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography Pancreatitis Episodes: A Randomized Clinical Trial[J]. *Arch Iran Med*, 2016, 19(8): 538-543
- [20] Thorborg C, Horn EP, Mofid H, et al. Reversal by the specific antidote, idarucizumab, of elevated dabigatran exposure in a patient with rectal perforation and paralytic ileus [J]. *Br J Anaesth*, 2016, 117 (3): 407-409

(上接第 377 页)

- [42] Yuan JN, Liang YX, Cui S, et al. Angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activity of adlay (Coix lachrymal-jobi L. var. ma-yuen Stapf) glutelin hydrolysate [J]. *Italy Journal of Food Science*, 2014, 26(3): 282-288
- [43] 谢柳倩, 赵灵灵, 袁建娜, 等. 蜈蚣蛋白水解产物 ACE 抑制活性的初步研究[J]. *世界科学技术: 中医药现代化*, 2014, 16(10): 2214-2218
- Xie Liu-qian, Zhao Ling-ling, Yuan Jian-na, et al. Primary Study on Hydrolysis of Centipedes Protein and Evaluation of Its ACE Inhibitory Activity [J]. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology*, 2014, 16(10): 2214-2218
- [44] Kurdeka Vadiraj, Jadhav Hemant R. A new open source data analysis python script for QSAR study and its validation [J]. *Medicinal chemistry research*, 2015, 24(4): 1617-1625
- [45] Lunow D, Kaiser S, Ruckkriemen J. Tryptophan-containing dipeptides are C-domain selective inhibitors of angiotensin converting enzyme[J]. *Food Chem*, 2014, 166: 596-602
- [46] Wu J, Aluko RE, Nakai S. Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: quantitative structure-activity relationship modeling of peptides containing 4-10 amino acid residues[J]. *QSAR Comb Sci*, 2006, 25(10): 873-880
- [47] Hang Guo-Dong, Zhang Rong, Luo Yong-Ping, et al. Studies on the QSAR of ACE Inhibitory Tripeptides with Proline as C-Terminal and Determination Inhibitory Activities [J]. *Chinese journal of structural chemistry*, 2014, 33(12): 1741-1748
- [48] Sagardia I, Roa-Ureta RH, Bald C. A new QSAR model, for angiotensin I-converting enzyme inhibitory oligopeptides [J]. *Food Chem*, 2013, 136(3): 1370-1376
- [49] 孔静静. ACE 抑制肽类似物的合成及其性质研究 [D]. 郑州: 河南工业大学, 2012
- Kong Jing-jing. The synthesis and properties of similar ACE [D]. Zhengzhou: Henan university of technology, 2012