

[文章编号] 1000-2200(2009)04-0290-04

· 基础医学 ·

生存素、骨桥蛋白在大肠腺瘤癌变过程中的表达

路亮^{1,2}, 许建明¹, 梅俏¹

[摘要] 目的: 观察生存素(survivin)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)在大肠正常黏膜、低危性腺瘤、高危性腺瘤及癌变的腺瘤中的表达, 探讨 survivin、OPN 在大肠腺瘤癌变以及早期大肠癌诊断中的价值。方法: 按照 2006 年美国《大肠息肉切除术后随访指南》诊断标准, 对结肠镜检查并经病理证实的 164 例大肠腺瘤进行危险分层, 选取 78 例大肠腺瘤组织蜡块, 其中 30 例低危性大肠腺瘤, 40 例高危性大肠腺瘤, 8 例癌变的大肠腺瘤; 另选取 20 例正常的大肠黏膜组织蜡块, 利用免疫组化 S-P 法染色, 检测 survivin 和 OPN 在各组的表达情况。结果: survivin 在大肠正常黏膜、低危性腺瘤、高危性腺瘤、癌变的腺瘤间表达的阳性率差异有统计学意义($P < 0.01$)。OPN 在正常大肠黏膜与低危性腺瘤中表达的阳性率无统计学意义($P > 0.05$), 在低危性腺瘤和癌变的腺瘤中表达的阳性率高于正常大肠黏膜($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 而低危性腺瘤和高危性腺瘤 OPN 表达阳性率与癌变的腺瘤相比, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论: survivin 在大肠正常黏膜、低危性大肠腺瘤、高危性大肠腺瘤及癌变的大肠腺瘤中的表达逐渐升高, 提示 survivin 是大肠癌发生的早期事件, 可能成为诊断大肠腺瘤及大肠腺瘤癌变的一个参考指标。OPN 在低危性大肠腺瘤、高危性大肠腺瘤及癌变的大肠腺瘤中的表达逐渐升高, 提示 OPN 可能成为诊断大肠腺瘤癌变的一个参考指标。

[关键词] 大肠肿瘤; 危险分层; 癌变; 免疫组织化学; 生存素; 骨桥蛋白

[中国图书资料分类法分类号] R 735.34 **[文献标识码]** A

Expression of survivin and osteopontin in the canceration of colonic adenomas

LU Liang^{1,2}, XU Jian-ming¹, MEI Qiao¹

(1. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui 230022;

2. Department of Gastroenterology, Chaohu First People's Hospital, Chaohu Anhui 238000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the expressions of survivin and osteopontin (OPN) in normal tissues, low risk colonic adenoma, high risk colon adenoma and cancerated adenoma, and to investigate the value of survivin and OPN in the canceration of colorectal adenoma and the diagnosis of colorectal cancer at the early stage. **Methods:** According to the diagnostic criteria of "the Guidelines for Colonoscopy Surveillance after Polypectomy" in 2006, the risk stratification of 164 cases of colorectal adenoma who had undergone colonoscopy and verified by pathology was carried out. Seventy-eight cases of colon adenoma including 30 cases of low risk colon adenoma, 40 cases of high risk colon adenoma, 8 cases of cancerated adenoma and 20 cases of normal tissue were chosen to identify the expressions of survivin and OPN by S-P immunohistochemical method in each group; related analysis was made with reference to the clinicopathologic features. **Results:** The positive expressions of survivin in normal tissues, low risk colon adenoma, high risk colon adenoma and cancerated adenoma were obviously different ($P < 0.01$). The positive rates of OPN in normal tissues and low risk colon adenoma have no difference ($P > 0.05$). The positive rate of OPN in high risk colon adenoma and cancerated colon adenoma was higher than that in normal tissues ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). The positive rate of OPN in low risk colon adenoma and high risk colon adenoma was obviously lower compared with that of cancerated colon adenoma ($P < 0.05$). **Conclusions:** The expression of survivin in normal tissues, low risk colon adenoma, high risk colon adenoma and cancerated adenoma increases gradually, which indicates that survivin may be an early event in the development of colorectal cancer. It can be regarded as a reference index in colon adenoma and adenoma canceration. The expression of OPN increases gradually in low risk colon adenoma, high risk colon adenoma and cancerated adenoma, indicating that OPN may act as a reference index in colorectal adenoma canceration.

[Key words] colonic neoplasms; risk stratification; canceration; immunohistochemistry; survivin; osteopontin

正常黏膜→腺瘤→癌演变学说是目前比较公认的大肠癌发生学说^[1], 95% 以上的早期大肠癌是从

腺瘤演变的。长期以来, 大肠腺瘤癌变的研究一直受到国内外学者的重视。寻找早期发现大肠腺瘤癌变的分子生物学标志对大肠癌的早期诊断及分子学治疗具有重要的临床意义。研究表明^[2,3], 生存素(survivin)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)与大肠癌关系密切, 本实验通过观察 survivin 及 OPN 在正常大肠黏膜、大肠腺瘤、癌变的大肠腺瘤中的表达, 旨在评价 survivin 及 OPN 在大肠肿瘤发生、发展中的作

[收稿日期] 2008-08-20

[作者单位] 1. 安徽医科大学第一附属医院 消化内科, 安徽 合肥 230022; 2. 安徽省巢湖市第一人民医院 消化内科, 238000

[作者简介] 路亮(1967-), 男, 硕士研究生, 副主任医师。

[通讯作者] 许建明, 研究生导师, 主任医师, 教授。

用及地位,从而为大肠癌的早期诊断及靶点治疗提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 1990 年 8 月至 2006 年 12 月,巢湖市第一人民医院经肠镜检出大肠腺瘤患者 164 例,选取术后经病理确诊为癌变的大肠腺瘤存档蜡块,经肠镜下电切的大肠低危性腺瘤 30 例、高危性腺瘤 40 例,并选取 20 例正常的大肠黏膜活检组织,进行甲醛固定、包埋,制成蜡块作为对照组。

1.2 试剂与方法 兔抗人 survivin 多克隆抗体 (RAB-0536)、兔抗人 OPN 多克隆抗体 (RAB-0295),产品批号: survivin 70805536C2、OPN 70910295C,购自福州迈新生物技术开发有限公司。S-P 免疫组化试剂盒、多聚赖氨酸、PBS (0.01 mol/L, pH 7.4)、柠檬酸盐抗原修复缓冲液 (粉剂) (0.01 mol/L, pH 6.0)、DAB 显色试剂盒均购自福州迈新生物技术开发有限公司。切片常规脱蜡水化,高温高压组织抗原修复, survivin、OPN 多克隆抗体按 1:400 稀释。

1.3 临床病理诊断标准

1.3.1 危险分层 按照 2006 年美国《关于大肠息肉切除术随访指南》^[4] 对大肠腺瘤进行分类: (1) 高危性腺瘤: 腺瘤 ≥ 3 个, 高度异型增生, 腺瘤含有绒毛组织, 或单发腺瘤直径 ≥ 1.0 cm; (2) 低危性腺瘤: 腺瘤 1~2 个, 直径 < 1.0 cm 的管状腺瘤, 无高度异型增生; (3) 非肿瘤性息肉: 炎性息肉、增生性息肉。

1.3.2 大肠腺瘤癌变诊断标准 大肠腺瘤癌变指癌组织内或表面找到残留的腺瘤结构, 其重要特征是腺管排列不规则, 细胞增生异型性明显, 极性消失并向间质浸润生长, 癌细胞浸润黏膜肌层和黏膜下层^[5]。

1.4 结果判定 survivin 及 OPN 阳性染色均主要定位在间质细胞及腺上皮细胞胞质, 根据染色面积和染色强度分级。 (1) 染色面积: $< 10\%$ 为 0 分; $> 10\% \sim 25\%$ 为 1 分; $> 25\% \sim 50\%$ 为 2 分; $> 50\% \sim 75\%$ 为 3 分; $\geq 75\%$ 为 4 分。 (2) 染色强度: 不显色或背景着色, 着色部位不清晰为 0 分; 浅棕色为 1 分; 深棕色为 2 分; 深褐色为 3 分。上述两项相加: < 2 分为阴性; ≥ 2 分为阳性。

1.5 统计学方法 采用逐步 Logistic 分析、 χ^2 检验和秩和检验。

2 结果

2.1 大肠镜检查临床病理资料及危险分层 腺瘤

性息肉 164 例 (61.65%), 其中管状腺瘤 102 例 (62.20%), 混合型腺瘤 44 例 (26.83%), 绒毛状腺瘤 18 例 (10.97%)。164 例腺瘤性息肉中, 轻度异型增生 9 例 (5.49%), 中度异型增生 12 例 (7.32%), 重度异型增生 11 例 (6.71%), 癌变 8 例 (4.88%)。根据大肠息肉的临床病理资料, 结合诊断标准, 164 例腺瘤中有高危性腺瘤 112 例 (68.29%), 低危性腺瘤 52 例 (31.71%)。112 例高危性腺瘤中, 男 65 例 (58.04%), 女 47 例 (41.96%), 男女比为 1.38:1, 年龄 38~78 岁, 癌变 8 例 (7.14%)。在 52 例低危性腺瘤中, 男 36 例 (69.23%), 女 16 例 (30.77%), 男女比为 2.25:1; 年龄 18~82 岁, 无癌变病例。

2.2 多因素逐步 Logistic 分析结果 排除各因素间的相互干扰后显示, 与腺瘤癌变独立相关的因素有息肉大小、黏膜情况、病理类型和异型增生程度。以相对危险度 (OR) 显示对腺瘤是否癌变的影响。从大到小依次为腺瘤大小、数目、黏膜情况、病理类型和异型增生程度。腺瘤越大、数目 ≥ 3 个、异型增生程度越重、黏膜有糜烂、溃疡、分叶, 以上因素符合的越多, 该腺瘤癌变的可能性越大 (见表 1)。

表 1 腺瘤癌变相关因素逐步 Logistic 分析

| 因变量 | 相对危险度 | 标准差 | 95% 可信区间 | P |
|------|-------|-------|--------------|--------|
| 病理类型 | 0.712 | 0.112 | 0.471~0.900 | <0.001 |
| 黏膜 | 2.681 | 0.601 | 1.842~3.881 | <0.001 |
| 大小 | 6.982 | 2.810 | 3.551~15.072 | <0.001 |
| 数目 | 4.596 | 1.750 | 1.951~6.810 | <0.001 |
| 异型增生 | 1.612 | 0.324 | 1.252~2.172 | <0.001 |

2.3 survivin、OPN 的表达 survivin、OPN 阳性产物定位于胞质中, 为棕黄色深染颗粒。survivin 在正常的大肠黏膜中表达阳性率 15.00%, 低危性腺瘤中表达阳性率为 43.33%, 高危性大肠腺瘤阳性率为 57.50%, 癌变的大肠腺瘤中表达阳性为 6/8, survivin 在大肠正常黏膜、低危性大肠腺瘤、高危性大肠腺瘤和癌变大肠腺瘤间表达阳性率差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。OPN 在正常的大肠黏膜中表达阳性率为 10.00%, 低危性大肠腺瘤中表达阳性率为 23.33%, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); OPN 在高危性大肠腺瘤中阳性率为 47.50%, 在癌变的大肠腺瘤中阳性为 7/8, 二者表达与正常大肠黏膜差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。低危性大肠腺瘤 OPN 表达的阳性率与高危性大肠腺瘤差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而低危性大肠腺瘤和高危性腺瘤 OPN 表达的阳性率与癌变的大肠腺瘤差

异均有统计学意义 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$) (见表 2)。

表 2 在大肠腺瘤及大肠正常黏膜中 survivin、OPN 的表达比较

| 病理类型 | n | survivin | | | OPN | | |
|-------|----|----------|----|---------|----------------|----|----------------------|
| | | 阳性 | 阴性 | 阳性率(%) | 阳性 | 阴性 | 阳性率(%) |
| 正常黏膜 | 20 | 3 | 17 | 15.00 | 2 | 18 | 10.00 |
| 低危性腺瘤 | 30 | 13 | 17 | 43.33 | 7 | 23 | 23.33 |
| 高危性腺瘤 | 40 | 23 | 17 | 57.50** | 19 | 21 | 47.50* |
| 癌变腺瘤 | 8 | 6 | 2 | 6/8* | 7 | 1 | 7/8 $\Delta\Delta$ * |
| 合计 | 98 | 45 | 53 | 45.92 | 35 | 63 | 35.71 |
| Hc | — | 12.54 | | | 19.33 Δ | | |
| P | — | <0.01 | | | <0.01 | | |

两两比较秩和检验;与正常大肠黏膜中 survivin 和 OPN 的表达比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与低危性大肠腺瘤 OPN 的表达比较 $\Delta\Delta P < 0.01$;与高危性大肠腺瘤 OPN 的表达比较 # $P < 0.05$; Δ 示 χ^2 值

2.4 癌变的大肠腺瘤中 survivin 蛋白与 OPN 阳性表达的相关性 8 例癌变的大肠腺瘤中, survivin 与 OPN 共同阳性表达者 5 例, 共同阴性表达者 1 例, 两者在癌变的大肠腺瘤中的表达无相关关系(列联系数 $r = 0.333$, $P > 0.05$) (见表 3)。

表 3 OPN 表达与 survivin 在癌变的大肠腺瘤中表达的相关关系

| OPN 表达 | survivin 表达 | | 合计 |
|--------|-------------|----|----|
| | 阳性 | 阴性 | |
| 阳性 | 5 | 1 | 6 |
| 阴性 | 1 | 1 | 2 |
| 合计 | 6 | 2 | 8 |

3 讨论

3.1 大肠腺瘤危险分层 大肠癌是我国常见的恶性肿瘤, 其发病率呈上升趋势, 早期诊断率较低, 而 95% 以上的早期大肠癌是从腺瘤演变而来的, 因此, 对大肠腺瘤癌变的研究是提高大肠癌早期诊断率的有效手段之一, 但是临床判断大肠腺瘤是否恶变比较困难。早期诊断首选方法仍然为肠镜加病理检查, 国外有多项研究对基础大肠镜发现的大肠息肉进行长期随访, 发现初发息肉特性对日后形成进展期腺瘤(结肠癌或高度异型性腺瘤)以及癌变风险有显著影响, 因此采用危险分层对大肠息肉进行分类, 可为患者制定安全且个性化的随访方案, 切实降低大肠癌的发病率。

众多学者研究发现: (1) 多发性腺瘤日后出现进展期腺瘤可能性高。van Stolk 等^[6]发现, 腺瘤数目 ≥ 3 个的患者比只有 1 个或 2 个的患者在随访中

出现继发腺瘤的可能性要大 ($OR = 2.25$; 95% CI : 1.20 ~ 4.21)。(2) 腺瘤的大小对评估日后发生进展期腺瘤的风险十分重要; 但也有学者认为其不是独立因素。Martínez 等^[7]研究发现, 腺瘤大小超过 1.0 cm 是日后发生进展期腺瘤的一个指征。(3) 病理类型是提示日后发生恶性肿瘤风险的一个重要指标。Atkin 等^[8]发现, 绒毛状管状腺瘤患者癌变的 $SIR = 3.8$ (95% CI : 2.2 ~ 6.0), 而绒毛状腺瘤患者 $SIR = 5.0$ (95% CI : 2.2 ~ 9.9)。(4) 息肉部位、患者年龄、性别、息肉肉史及大肠癌家族史等对腺瘤风险也有一定的影响。

因此认为, 腺瘤多发性 (≥ 3 个)、大小 (≥ 1.0 cm)、腺瘤含绒毛组织、高度异型性是提示日后进展期腺瘤和恶性肿瘤发生的指征, 而对家族史等其他因素研究尚不充分。过去许多学者强调腺瘤病理类型, 特别是腺瘤的异型增生程度在大肠腺瘤癌变中的作用和重要性。近来研究发现腺瘤的大小、数目、部位、黏膜有无糜烂甚至溃疡、是否呈分叶状等因素在大肠腺瘤癌变中的作用得到重视。采用多因素方法对这些指征的相对重要性分析发现, 腺瘤大小和病理是最重要的因素, 但少数学者认为是多发性最重要。

本研究通过对 164 例大肠腺瘤进行危险分层, 发现高危性腺瘤 112 例, 其中癌变 8 例 (7.14%); 低危性腺瘤 52 例, 无癌变病例。通过对腺瘤癌变相关因素进行逐步 Logistic 分析发现, 腺瘤癌变的影响因素从大到小依次为腺瘤的大小、数目、黏膜情况、病理类型和异型增生程度。腺瘤越大、数目 ≥ 3 枚、异型增生程度越重、黏膜有糜烂、溃疡、分叶, 以上因素符合的越多, 该腺瘤癌变的可能性越大。

3.2 survivin、OPN 与大肠肿瘤 survivin 是凋亡抑制蛋白家族的最新成员, 在除胚胎组织和成人的正常胸腺组织外的正常组织中都不表达, 而在胃癌、食管癌、乳腺癌、膀胱癌、肺癌、神经母细胞瘤等恶性肿瘤中高表达。这种特异性表达, 可用于作为良、恶性肿瘤判断的一个新标志物。本实验采用免疫组化方法检测 survivin 在大肠正常组织、低危性腺瘤、高危性腺瘤及癌变的腺瘤中的表达, 结果显示在正常组织中表达率为 15.00%, 低危性大肠腺瘤表达率为 43.33%, 高危性大肠腺瘤表达率为 57.50%, 癌变的腺瘤表达 6/8, 表明 survivin 在正常组织、低危性大肠腺瘤、高危性大肠腺瘤、癌变腺瘤间表达逐渐升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 提示 survivin 是大肠癌发生的早期事件, 其异常表达是大肠腺瘤癌变过程中细胞凋亡受抑制的一种潜在机制, 在大肠

腺瘤的发生及腺瘤癌变过程中可能起重要作用。survivin 在癌变的大肠腺瘤中的高表达,使得以 survivin 为靶点的抗肿瘤治疗成为可能。

OPN 是最新从骨基质中分离而得的一种含有特异的 Ang-Gly-Asp (RGD) 序列的磷酸化糖蛋白,这个序列是蛋白质分子中与细胞黏附有关的重要功能域。OPN 在肿瘤的发生、发展中起重要作用,特别是它与肿瘤转移的关系日益引起人们的关注,大量研究证实,OPN 在多种人类肿瘤中过表达,在部分患者的血清中也以较高水平存在,可能是肿瘤发生、发展的一个标志物。Yeatman 等^[9]筛选了大约 12 000 个癌基因,OPN 被确定为结肠癌临床上首选的肿瘤标志物。本实验通过免疫组化方法检测 OPN 在大肠正常黏膜、低危性腺瘤、高危性腺瘤及癌变的腺瘤中的表达,结果显示表达率分别为 10.00%、23.33%、47.50%、7/8,OPN 表达阳性率在正常黏膜与低危性腺瘤间表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而低危性腺瘤和高危性腺瘤与癌变的大肠腺瘤的表达差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),提示 OPN 在大肠腺瘤癌变过程中可能起重要作用。本研究中,8 例癌变的大肠腺瘤中 survivin 与 OPN 的表达无相关关系,可能与病例数较少有关。

目前国内外尚无 survivin 与 OPN 直接联系的研究报道。本研究中 survivin 与 OPN 在大肠腺瘤癌变过程中表达的变化情况如此相似,是否意味着二者在蛋白水平或基因水平上有着某种联系?据报道 survivin 除具有凋亡抑制作用外,还有血管保护、促进肿瘤血管生成等功能,在肿瘤的浸润转移中有作用,伴血管侵袭中 survivin 的表达率有增高的趋势。血管内皮生长因子(VEGF)是促血管形成的主要因子,survivin 与 VEGF 在促血管生成方面有协同作用。OPN 通过充当细胞外的纤溶蛋白酶对细胞外基质(ECM)进行改造,促进肿瘤新生血管形成,这是 OPN 在肿瘤转移中的作用之一,OPN 在新生血管形成过程中起着关键作用,Hirama 等^[10]认为通过干扰 OPN 的功能来抑制血管生成是将来从分子水平治疗肿瘤的一个有效途径。VEGF 可能是 OPN 促进肿瘤血管生成通路的重要中介之一。survivin 与 OPN 在大肠腺瘤癌变过程中表达的一致性,也证明了两者的密切相关关系。因此,推测 survivin 与 OPN 可能通过 VEGF 在抑制细胞凋亡和促进肿瘤血管生成中存在协同或相互调节机制,并通过不同途径促

进大肠癌的发生、发展,但其具体分子机制有待进一步探讨。

总之,survivin 在大肠正常黏膜、低危性大肠腺瘤、高危性大肠腺瘤至癌的演变阶段起重要作用;survivin 的表达增强是大肠癌发生的早期事件,在大肠癌的发生、发展中扮演着重要角色;OPN 在高危性腺瘤癌变和癌细胞浸润、转移等过程中发挥关键作用;survivin 与 OPN 共同促进肿瘤的发生、发展、浸润和转移。对大肠黏膜组织活检,必要时行 survivin、OPN 联合检测,有助于大肠癌的早期病理诊断,并为临床治疗和预后判断提供有价值的参考指标。

[参 考 文 献]

- [1] O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, *et al.* The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas [J]. *Gastroenterology*, 1990, 98 (2): 371 - 379.
- [2] Mori F, Piro FR, Della Rocca C, *et al.* Survivin and Cyclooxygenase-2 are co-expressed in human and mouse colon carcinoma and in terminally differentiated colonocytes [J]. *Histol Histopathol*, 2007, 22 (1): 61 - 77.
- [3] Wai PY, Mi Z, Gao C, *et al.* Ets-1 and runx2 regulate transcription of a metastatic gene, osteopontin, in murine colorectal cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (28): 18973 - 18982.
- [4] Winawer SJ, Zauber AG, Fletcher RH, *et al.* Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society [J]. *CA Cancer J Clin*, 2006, 56 (3): 143 - 159.
- [5] 陆云飞. 大肠息肉的癌变问题及手术远期疗效分析 [J]. *实用外科杂志*, 1990, 10 (11): 581 - 582.
- [6] van Stolk RU, Beck GJ, Baron JA, *et al.* Adenoma characteristics at first colonoscopy as predictors of adenoma recurrence and characteristics at follow-up. The Polyp Prevention Study Group [J]. *Gastroenterology*, 1998, 115 (1): 13 - 18.
- [7] Martínez ME, Sampliner R, Marshall JR, *et al.* Adenoma characteristics as risk factors for recurrence of advanced adenomas [J]. *Gastroenterology*, 2001, 120 (5): 1077 - 1083.
- [8] Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas [J]. *N Engl J Med*, 1992, 326 (10): 658 - 662.
- [9] Yeatman TJ, Chambers AF. Osteopontin and colon cancer progression [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2003, 20 (1): 85 - 90.
- [10] Hirama M, Takahashi F, Takahashi K, *et al.* Osteopontin overproduced by tumor cells acts as a potent angiogenic factor contributing to tumor growth [J]. *Cancer Lett*, 2003, 198 (1): 107 - 117.