

结直肠癌淋巴结转移与泛素结合酶 UbcH10 的表达

陈世敏, 陈英剑, 胡成进[△] (济南军区总医院实验诊断科, 济南 250031)

【摘要】 目的 检测结直肠癌中泛素结合酶 UbcH10 的表达, 并探讨其与结直肠癌患者临床病理特征和淋巴结转移的相关性。**方法** 采用免疫组织化学法检测结直肠癌组织及正常组织中 UbcH10 蛋白的表达量, 分析其与结直肠癌患者临床病理特征的关系。采用 Matrigel 侵袭实验分析 UbcH10 对结直肠癌 HT-29 细胞株侵袭能力的影响。**结果** UbcH10 蛋白在正常组织细胞中几乎不表达, 在结直肠癌组织的细胞核中高表达, 并且表达水平与肿瘤的分化程度、淋巴结转移相关 ($P < 0.05$)。Matrigel 侵袭实验结果显示 UbcH10 过表达可显著增加 HT-29 细胞的体外侵袭能力。**结论** UbcH10 基因在结直肠癌患者肿瘤组织中过度表达, 并与结直肠癌的疾病进展密切相关, 可作为结直肠癌诊断和淋巴结转移的潜在肿瘤标志物及结直肠癌基因治疗的新靶点。

【关键词】 结直肠癌; 泛素结合酶 UbcH10; 免疫组织化学; 淋巴结转移

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.20.025 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)20-3035-03

Lymph node metastasis of colorectal cancer and expression of UbcH10 CHEN Shi-min, CHEN Ying-jian, HU Cheng-jin[△] (Department of Clinical Laboratory, General Hospital of Jinan Military Region, Ji'nan, Shandong 250031, China)

【Abstract】 Objective To detect the expression of UbcH10 in colorectal cancer (CRC), and to investigate its correlation with the clinicopathological characteristics and lymph node metastasis. **Methods** The expression levels of UbcH10 in CRC tissues and the normal tissues in patients with CRC were detected by immunohistochemistry. Its correlation with the clinicopathological characteristics were analyzed. The influence of UbcH10 overexpression on the invasive ability of HT-29 cells was detected by using the Matrigel invasion assay. **Results** The UbcH10 protein was hardly expressed in normal control colorectal tissues, but highly expressed in the cell nucleus of CRC tissues, moreover its expression level was correlated with the differentiation degrees and lymph node metastasis of CRC ($P < 0.05$). The result of the Matrigel invasion assay showed that the UbcH10 overexpression could significantly increase the in vitro invasive ability of HT-29 cells. **Conclusion** UbcH10 gene is overexpressed in the tumor tissues of CRC patients, and is closely correlated with the progression of CRC, which may serve as a potential tumor marker of CRC diagnosis and lymphnode metastasis, and a new target point of CRC gene therapy.

【Key words】 colorectal cancer (CRC); UbcH10; immunohistochemistry; lymph node metastasis

结直肠癌是常见的消化道恶性肿瘤, 全国肿瘤登记中心发布数据显示, 近年来我国结直肠癌发病率呈逐年上升趋势, 病死率位居恶性肿瘤第 5 位, 并且有年轻化趋势。早期结直肠癌患者通过单纯手术治疗即可痊愈, 但是由于疾病早期症状不明显, 多数患者确诊时往往已到肿瘤晚期, 约 1/4 的患者首诊时就已经出现转移致使预后不良。因此寻找结直肠癌的肿瘤标志物对于结直肠癌的诊断与治疗尤为重要。

泛素结合酶 UbcH10 是第 10 个被识别的人泛素结合酶, 属于泛素结合酶 E2 家族的成员。泛素结合酶 UbcH10 不仅在泛素蛋白酶体系统中参与某些蛋白质的特异性降解, 而且参与细胞周期调控, 通过与细胞后期促进复合物 (APC) 相互作用影响有丝分裂纺锤体装配检测点, 驱动有丝分裂中期细胞向有丝分裂后期转换^[1]。有研究报道泛素蛋白酶系统与肿瘤的发生及进展密切相关^[2]。近年来关于靶定泛素蛋白酶系统用于肿瘤治疗的报道也越来越受到研究人员的关注^[3-4]。本研究采用免疫组化方法检测了 45 例结直肠癌患者组织中 UbcH10 的表达变化, 分析了 UbcH10 的表达与结直肠癌患者临床病理特征的关系, 以及 UbcH10 的表达与结直肠癌淋巴结转移的关系, 为结直肠癌的基因诊断及预后评估的方法学研究提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集手术切除的原发性结直肠癌患者肿瘤组织标本 45 例, 以相应癌旁正常组织 (距离肿瘤组织 > 5 cm) 为对照。入选病例术前均未进行放、化疗, 并且无长期服用非甾体类消炎药物史。结直肠癌诊断标准参照消化系统肿瘤世界卫生组织 (WHO) 分类 2010 年第 4 版第 8 章结肠与直肠肿瘤部分。人结直肠癌细胞株 HT-29 购自中国科学院上海细胞所, UbcH10 真核表达载体 pcDNA3.1-UbcH10 的构建与鉴定见文献^[5]。

1.2 主要试剂 UbcH10 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品; SP-9000 HistostainTM-Plus Kits 免疫组化染色试剂盒和辣根过氧化物酶标记的二抗为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; Matrigel 试剂和 Transwell 小室购自美国 BD 公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化染色方法及结果判定 免疫组化染色采用链霉卵白素-辣根过氧化物酶 (SP) 法。UbcH10 阳性染色呈深棕色, 主要位于细胞核或细胞核伴细胞质内。实验结果通过显微镜计数阳性细胞百分比判定, 每张切片选择 5 个高倍视野

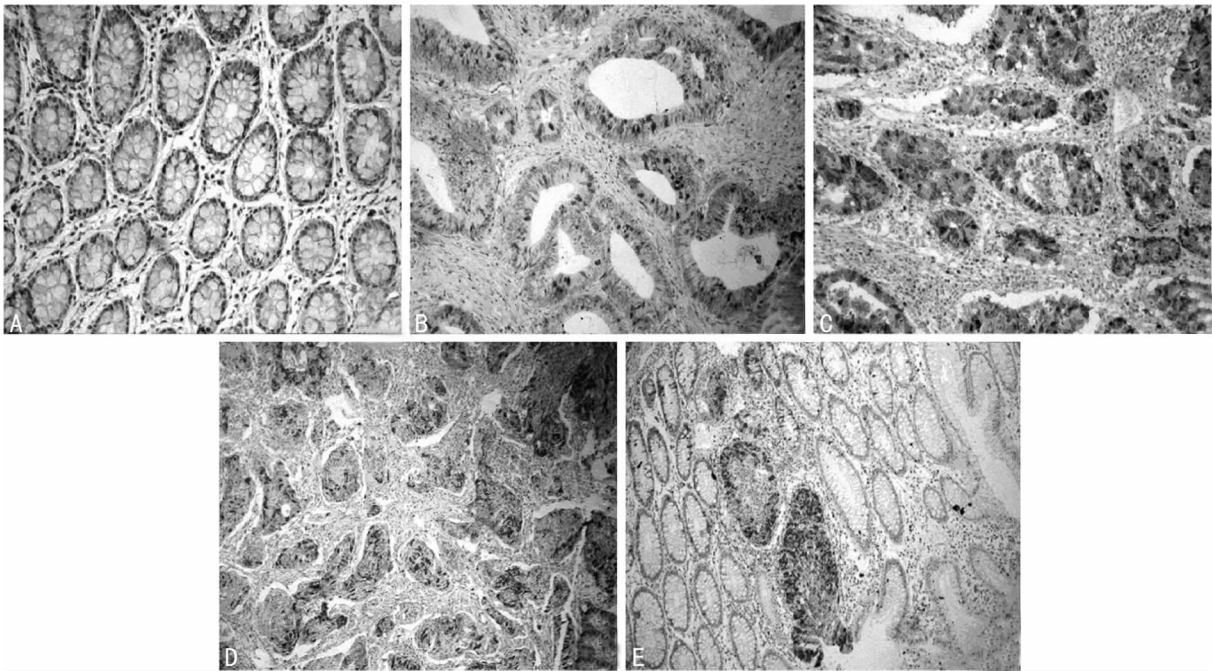
(HP), 每个 HP 计数 100 个细胞。具体判断标准按照: 组织完全不着色或阳性细胞数不足 5% 为阴性(-); 组织阳性细胞数为 5% ~ 25% 为 UbcH10 表达的阳性(+); 阳性细胞数 > 25% ~ 50% 为中阳性(++); 阳性细胞数占 50% 以上为强阳性(+++), 视为 UbcH10 高表达。

1.3.2 Matrigel 侵袭实验 Transwell 小室(孔径 8 μm, 直径 6.5 mm)表面覆盖 60 μL 浓度为 1 mg/mL 的 Matrigel, 放至 24 孔板中室温干燥 2 h。24 孔板内加入含 15% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液 0.5 mL, 小室上层加入浓度为 5×10^5 /mL 的细胞悬液 0.1 mL。37 ℃、5% CO₂ 孵育 24 h。棉签抹去小室上层未穿过的细胞并固定小室底部细胞, 然后用结晶紫染色。200 倍显微镜下观察并计数穿过小室的细胞个数, 每孔选取 5 个不同的区域。

1.4 统计学处理 采用 SPSS15.0 统计软件进行统计学分析, 计数资料比较采用 χ^2 检验, 计量资料比较采用配对 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 结直肠癌肿瘤组织中 UbcH10 的表达水平 组织细胞中 UbcH10 阳性染色呈深棕色, 主要位于细胞核, 部分是细胞核伴细胞质内。正常对照组织细胞中几乎不表达(图 1A), 而所有结直肠癌肿瘤组织中均有 UbcH10 蛋白表达(图 1B~D), 二者差异明显(*P* < 0.01)。肿瘤组织中 UbcH10 蛋白表达与结直肠癌分化程度相关, 高分化肿瘤组织中表达相对较低, 而预后较差的低分化肿瘤组织中表达较高, 浸润灶中可见 UbcH10 表达明显增强(图 1E)。



注: A 为正常结肠组织; B 为高分化结直肠癌组织; C 为中分化结直肠癌组织; D 为低分化结直肠癌组织; E 为局部转移灶。

图 1 结直肠癌肿瘤组织中 UbcH10 的表达(×100)

表 1 结直肠癌 UbcH10 蛋白表达与临床病理特征的关系				
组别		<i>n</i>	+ ~ ++	+++
性别	男性	25	14(56.0)	11(44.0)
	女性	20	9(45.0)	11(55.0)
年龄	<60 岁	23	11(47.8)	12(52.2)
	≥60 岁	22	12(54.5)	10(45.5)
肿瘤大小	≤5 cm	24	11(45.8)	13(54.2)
	>5 cm	21	12(57.1)	9(42.9)
淋巴结转移	未转移	27	18(66.7)	9(33.3)
	转移	18	5(27.8)	13(72.2)*
肿瘤分化程度	高分化	8	7(87.5)	1(12.5)
	中分化	27	13(48.1)	14(51.9)
	低分化	10	3(30.0)	7(70.0)#

注: 与淋巴结未转移相比, * *P* < 0.05; 与高分化相比, # *P* < 0.05。

2.2 UbcH10 的表达与临床病理特征的关系 所有结直肠癌肿瘤组织中均有 UbcH10 表达, 表达的强弱与患者年龄、性别及肿瘤大小无关(*P* > 0.05)。肿瘤组织中 UbcH10 表达与肿瘤的分化程度及有无淋巴结转移相关(*P* < 0.05)。高分化肿

瘤组织中 UbcH10 表达以中等(+ ~ ++)程度为主(87.5%), 而低分化肿瘤组织中 UbcH10 高表达(+++), 可占 70.0%。与未见淋巴结转移的结直肠癌患者(33.3%)相比, 有淋巴结转移的患者肿瘤组织中 UbcH10 高表达的百分比(72.2%)也明显升高。见表 1。

2.3 UbcH10 对大肠癌 HT-29 细胞体外侵袭能力的影响 Matrigel 侵袭实验结果显示, 通过细胞转染获得的过表达 UbcH10 的大肠癌 HT-29 细胞组(pcNDA3.1-UbcH10 组)平均每个 HP 有(120 ± 10)个细胞穿过 Transwell 小室, 而作为对照的 PBS 组和空载体组(pcNDA3.1 组)大肠癌 HT-29 细胞穿过的细胞数分别是(71 ± 9)和(66 ± 7)个, 差异有统计学意义(*P* < 0.05)。结果表明 UbcH10 能明显增强大肠癌 HT-29 细胞的体外侵袭能力。

3 讨 论

泛素蛋白酶系统介导的蛋白降解是机体调节细胞内蛋白水平与功能的重要机制, 不仅能高效并高度选择性地对细胞内蛋白质的降解, 还参与和调控多种细胞生物学过程如细胞周期、基因转录、抗原提呈、细胞分化和凋亡等^[6]。近年来随着对泛素蛋白酶体系统研究的深入, 发现该系统在真核细胞增殖、

凋亡、血管生成、运动等正常生理过程中起着重要的作用,而且系统异常造成的细胞内重要功能蛋白质降解失常与恶性肿瘤的发生和发展有着密切的关系^[2]。有研究表明,泛素蛋白酶体系不但参与调控结直肠癌上皮细胞的增殖与分化,还参与调控结直肠癌发病机制的常见损害^[7-8]。

结直肠癌肿瘤组织及其癌旁正常组织中 UbcH10 表达的检测结果(图 1)表明:泛素结合酶 UbcH10 的表达与肿瘤的发生、发展密切相关,特别是局部浸润灶组织中泛素结合酶 UbcH10 的表达更是与其周围正常组织形成了鲜明对比。在此基础上对收集标本中泛素结合酶 UbcH10 的表达与临床病理特征进行统计分析发现:UbcH10 在结直肠癌肿瘤组织中的表达水平明显高于癌旁正常组织中 UbcH10 基因的蛋白表达水平($P<0.01$),而且表达水平与肿瘤分化程度、淋巴结是否转移密切相关。因此,本研究认为 UbcH10 基因与结直肠癌的发生、发展密切相关,可作为结直肠癌诊断的潜在肿瘤标记物及结直肠癌基因治疗的新靶点。

结直肠癌淋巴结转移与肿瘤的分期和临床治疗方案的制订密切相关,也是影响其预后的最重要因素之一。目前,诊断淋巴结转移的金标准是病理组织学检查,然而它会受到手术中淋巴结清扫范围、取检淋巴结的方法及淋巴结微转移的客观存在等因素的影响。临床上一些病理分期为早期的患者出现预后差的情况,就可能与没有发现存在的淋巴结转移灶有关。本研究中,结直肠癌患者肿瘤组织标本的免疫组化结果(图 1E)及临床病理学特征分析(表 1)均提示 UbcH10 表达与肿瘤的侵袭转移有关。UbcH10 在结直肠癌淋巴结转移患者中的表达明显高于无淋巴结转移患者,而且 UbcH10 在局部的肿瘤浸润灶中表达升高。

众所周知,恶性肿瘤是一种人体细胞异常而且无限制的增生。除了细胞生长失控的基本生物学特性外,肿瘤细胞的转移侵袭性也是其重要生物学特征之一。为了进一步探寻泛素结合酶 UbcH10 的表达与结直肠癌淋巴结转移的关系,在细胞水平研究了 UbcH10 对结直肠癌细胞 HT-29 侵袭能力的影响。根据实验结果推测结直肠癌淋巴结转移的潜在原因可能是 UbcH10 的表达改变影响到细胞侵袭能力的变化而导致的。因此,认为 UbcH10 的检测不仅可以作为结直肠癌的肿瘤预后标志物,而且可用于结直肠癌淋巴结转移的辅助诊断。

越来越多的研究表明,恶性肿瘤是一类细胞周期性疾病,

细胞分裂周期中所涉及的相关蛋白和基因的改变都会导致肿瘤的发生。结直肠癌是经多阶段多基因改变而发生的,从目前的研究来看,细胞周期调控系统和结直肠癌的发生、发展有密切联系,但其基因调控机制不十分清楚。对于 UbcH10 作用的分子机制是直接参与细胞周期调控引起肿瘤的发生、发展,还是通过泛素蛋白酶途径间接引起,值得进一步研究来阐明。

参考文献

- [1] Gramont A, Ganier O, Cohen-Fix O. Before and after the spindle assembly checkpoint——an APC/C point of view [J]. Cell Cycle, 2006, 5(18): 2168-2171.
- [2] Engel K, Bassermann F. The ubiquitin proteasome system and its implications for oncology[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2013, 138(22): 1178-1182.
- [3] Grande E, Earl J, Fuentes R, et al. New targeted approaches against the ubiquitin-proteasome system in gastrointestinal malignancies [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2012, 12(4): 457-467.
- [4] Shen M, Schmitt S, Buac D, et al. Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2013, 17(9): 1091-1108.
- [5] 陈世敏, 徐春晓, 刘斌, 等. UbcH10 及其 siRNA 真核表达载体的构建与表达[J]. 放射免疫学杂志, 2009, 22(4): 382-384.
- [6] Thompson SJ, Loftus LT, Ashley MD, et al. Ubiquitin-proteasome system as a modulator of cell fate[J]. Curr Opin Pharmacol, 2008, 8(1): 90-95.
- [7] Aragaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, et al. Proteasomal degradation of Atoh1 by aberrant Wnt signaling maintains the undifferentiated state of colon cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 368(4): 923-929.
- [8] Voutsadakis IA. Peroxisome proliferator activated receptor- γ and the ubiquitin-proteasome system in colorectal cancer[J]. World J Gastrointest Oncol, 2010, 2(5): 235-241.

(收稿日期: 2015-03-26 修回日期: 2015-07-10)

(上接第 3034 页)

展不确定度均大于 10% 的情况, 均需改善检测系统性能及稳定性, 提高检测的准确度和精密度。

综上所述, 临床检验作为分析领域较为复杂、影响因素多的检测过程, 利用室内质控数据和室间质评回报结果, 对临床检测指标进行测量不确定度的评估, 可以为改善临床检验质量提供科学有效的依据。

参考文献

- [1] International Organization for Standardization. ISO5189 Medical laboratories: particular requirements for quality and competence[S]. Geneva, Switzerland: ISO, 2003: 39.
- [2] Fuentes-Arderiu X. Uncertainty of measurement in clinical laboratory sciences[J]. Clin Chem, 2000, 46(9): 1437-1438.
- [3] 王治国, 王蔽, 李小鹏, 等. 测量不确定度及其在临床检验

中应用[J]. 中国卫生统计, 2005, 22(2): 85-86.

- [4] 张晓红, 刘向祥, 文江平, 等. 利用“室内质控和室间质评”数据评估临床生化检验中的测量不确定度[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(5): 457-462.
- [5] Magnusson B, Ossowicki H, Rienitz O, et al. Routine internal-and external-quality control data in clinical laboratories for estimating measurement and diagnostic uncertainty using GUM principles[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2012, 72(3): 212-220.
- [6] 严能兵, 吕辉, 李俊枫, 等. 医学实验室常规血凝检验项目测量不确定度的评定[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(8): 997-998.
- [7] 严欣亮. 临床凝血检验项目测量不确定度的评定[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(23): 3199-3200.

(收稿日期: 2015-03-25 修回日期: 2015-07-15)