

文章编号:1005-6947(2006)03-0206-04

· 实验研究 ·

肠日本血吸虫病与肠癌组织 c-erbB-2 及 DPC4 表达水平的研究

王宽松, 文继舫, 沈明

(中南大学湘雅基础医学院 病理学系, 湖南 长沙 410013)

摘要:目的 探讨慢性日本血吸虫病与大肠癌之间的关系。方法 用免疫组化两步法及 SP 法分别检测 15 例正常结肠黏膜, 15 例单纯血吸虫病结肠黏膜, 20 例血吸虫病并大肠癌, 20 例无血吸虫病大肠癌的 c-erbB-2 及 DPC4 的表达。结果 c-erbB-2 在 4 组中均有一定程度的表达, 但在血吸虫病肠黏膜中的表达最高 ($P < 0.05$)。DPC4 亦在 4 组中有一定程度的表达, 但在正常肠黏膜的表达水平最高 ($P < 0.05$)。结论 慢性日本血吸虫病与大肠癌之间存在一定的关系; 慢性日本血吸虫病引起黏膜上皮恶变时, c-erbB-2, DPC4 表达水平的改变可能是一早期分子事件。

关键词: 结直肠肿瘤/病因学; 血吸虫病, 日本/并发症; 基因表达; 基因 c-erbB-2; 基因 DPC4

中图分类号: R735.35; R532.21

文献标识码: A

Investigation of expression of c-erbB-2 and DPC4 in tissues of colonic schistosomiasis and colorectal carcinoma

WANG Kuang-song, WEN Ji-fang, SHEN Ming

(Department of Pathology, Basic Medical School, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To determine the relationship between chronic colonic schistosomiasis and colorectal carcinoma. **Methods** Expression levels of c-erbB-2 and DPC4 were detected by two-step and SP immunohistochemical method respectively in normal colonic mucosa of 15 cases, in colonic mucosa of 15 cases with simple schistosomiasis, 20 cases of colorectal carcinoma with schistosomiasis and 20 cases of colorectal carcinoma without schistosomiasis. **Results** c-erbB-2 was expressed in each group with different levels, but the level in colonic mucosa with schistosomiasis was the highest compared to other groups, which had statistical significance ($P < 0.05$). DPC4 was also expressed in each group with different levels, but the level in normal colonic mucosa was the highest compared to other groups, which had statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusions** There is a high correlation between chronic schistosomiasis japonica in colon and colorectal carcinoma. Alteration of expression levels of c-erbB-2 and DPC4 may be an early stage molecular event during the course of malignant change of mucosal epithelium caused by chronic colonic schistosomiasis.

Key words: Colorectal Neoplasms/etiol; Schistosomiasis, Japonica/compl; Gene Expression; Genes c-erbB-2; Genes DPC4

CLC number: R735.35; R532.21

Document code: A

大量研究表明, 部分寄生虫感染可以导致肿瘤

的发生, 但慢性日本血吸虫的感染与大肠癌的关系一直存在争议。部分研究表明, 血吸虫感染与大肠癌并无相关性^[1-2], 也有许多研究提示血吸虫感染后可引发大肠癌^[3-6]。它们两者之间是否有必然的联系? 以往的研究在流行病学方面较多, 分子水平的研究相对较少。

基金项目: 湖南省血防办 2002 年科研课题资助(02JJY2054)。

收稿日期: 2005-08-16; **修订日期:** 2006-01-23。

作者简介: 王宽松, 男, 湖南洞口人, 中南大学湘雅基础医学院博士研究生, 主要从事消化系统肿瘤的病理方面的研究。

通讯作者: 文继舫 电话: 0731-2650400。

文献报道^[5] c-erbB-2 癌蛋白在大肠癌的发生发展过程中起重要作用。大肠癌早期即有 c-erbB-2 的表达上调^[7]。DPC4 是一个新的肿瘤抑制基因,其在大肠癌中的作用亦不容忽视。本研究检测 c-erbB-2 及 DPC4 基因在日本血吸虫感染肠黏膜及合并血吸虫病的大肠癌中的表达,旨在从分子水平探讨慢性日本血吸虫病与肠癌之间的关系

1 材料与方法

1.1 标本来源及分组

所有标本均来源于本校湘雅医院病理科近 10 年的手术标本。诊断明确。其中正常大肠黏膜组 15 例(1 组),单纯性大肠血吸虫组 15 例(2 组),血吸虫病合并大肠癌组 20 例(3 组),无血吸虫病的大肠癌组 20 例(4 组)。两个大肠癌组中均包括高、中、低分化腺癌以及黏液癌几种组织学类型。各组内男女病例比例为 1:1,年龄范围为 35~70 岁。

1.2 材料

鼠抗 c-erbB-2 一抗及二抗均来源于上海长岛生物试剂公司,为即用型。鼠抗 DPC4 及试剂盒来源于美国 neomarkers 公司。DPC4 的浓度为 1:25。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学(免疫组化)两步法检测 c-erbB-2 切片常规脱蜡水化,加 3% H₂O₂ 室温处理 25 min,在 EDTA 缓冲液(pH7.0)中微波加热 10 min(92℃~98℃)抗原修复;冷却后加 5% 小牛血清处理 10 min 后,滴加即用型鼠抗 c-erbB-2,4℃ 孵育过夜,再滴加即用型羊抗鼠二抗,室温 30 min, DAB 显色,苏木素复染,脱水,透明,封固后光镜下观察。阳性、阴性对照组与处理组实验同时进行。

1.3.2 SP 法检测 DPC4 切片常规脱蜡水化,加 3% H₂O₂ 室温处理 25 min,在枸橼酸盐缓冲液(pH7.0)中微波加热 10 min(92℃~98℃)抗原修复,冷却后加 5% 小牛血清处理 10 min,再滴加 1:25 稀释的鼠抗 DPC4,4℃ 孵育过夜;再滴加即用型羊抗鼠二抗,室温 30 min;再加三抗室温处理 30 min, DAB 显色,苏木素复染,脱水,透明,封固后光镜下观察。阳性、阴性对照组与处理组实验同时进行。

1.3.3 免疫组化评分方法 以胞浆或胞膜或胞核出现棕黄色颗粒为阳性。参照 Krajewska 等^[8] 的评分方法,先按阳性细胞比例将无,1%~25%,26%~50%,51%~75%及 76%~100% 依次计为 0~4 分;再按染色强度将无、弱、中、强分别计为 0~3 分,最后综合两部分得分。如某片有 25% 弱阳性(1×1)、50% 中等阳性(2×2)及 25% 强阳性(1×3),则总分为 1+4+3=8。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 软件系统,方差检验。显著性检验水准为 0.05。

2 结果

2.1 c-erbB-2 的表达

c-erbB-2 的表达主要定位在细胞膜(图 1-4)。4 组的 c-erbB-2 均有不同程度的表达,其中单纯血吸虫组的平均评分最高,正常组的平均得分最低。方差分析表明:4 组间表达水平差异具统计学意义($P < 0.05$)。最小显著差数法(LSD)结果表明,第 2 组 c-erbB-2 的表达水平最高,与其他各组间差异有显著性($P < 0.05$),第 1 组表达最低,并与第 3 组及第 4 组之间差异亦有显著性($P < 0.05$),第 3、4 组之间的差异无显著性($P > 0.05$)(表 1)。

2.2 DPC4 的表达

DPC4 表达定位于细胞核,胞浆中有少许表达(图 5-8)。4 组的 DPC4 均有不同程度的表达。第 1 组 DPC4 的表达水平最高,与其他各组间差异有显著性($P < 0.05$),而第 2、3、4 组之间的表达水平差异无显著性($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 c-erbB-2 与 DPC4 在 4 组肠黏膜中的表达水平($\bar{x} \pm s$)

| 序号 | 分组 | 例数 | c-erbB-2 | DPC4 |
|----|--------|----|------------------------------|------------------------------|
| 1 | 正常肠黏膜 | 15 | 4.00 ± 0.81 ¹⁾ | 10.00 ± 2.16 ¹⁾ |
| 2 | 单纯血吸虫 | 15 | 10.60 ± 1.07 | 5.88 ± 2.10 ^{2),3)} |
| 3 | 血吸虫并肠癌 | 20 | 6.36 ± 2.34 ^{1),2)} | 5.54 ± 1.69 ^{2),3)} |
| 4 | 无血吸虫肠癌 | 20 | 6.21 ± 2.74 ^{1),2)} | 5.05 ± 1.70 ^{2),3)} |

注:1)与单纯血吸虫组比较, $P < 0.05$; 2)与正常组比较 $P < 0.05$; 3)与单纯血吸虫组比较 $P > 0.05$

图 1 c-erbB-2 在正常肠黏膜的表达($\times 400$)

图 2 c-erbB-2 在血吸虫病肠黏膜的表达($\times 100$)

图 3 c-erbB-2 在血吸虫病肠黏膜的表达($\times 400$)

图 4 c-erbB-2 在血吸虫病合并肠癌中的表达($\times 400$)

图 5 DPC4 在正常肠黏膜的表达(SP $\times 400$)

图 6 DPC4 在血吸虫肠黏膜的表达(SP $\times 100$)

图 7 DPC4 在血吸虫肠黏膜的表达(SP $\times 400$)

图 8 DPC4 在血吸虫合并肠癌中的表达(SP $\times 400$)

3 讨论

日本血吸虫感染与肠癌的关系一直是个争论的焦点。从 20 世纪 70 年代的流行病学调查至当今的流式细胞术分析,大量研究资料未能发现它们之间的关系^[1-2]。迄今尚无人从成虫或虫卵中分离出任何致癌物。在对肝脏血吸虫病所作的研究中亦未发现任何可以表明血吸虫与肝癌之间存在明显联系的证据^[9];然而,却又发现它们有相关性的大量依据。实际上,日本血吸虫虫卵肉芽肿的形成过程是一个慢性炎症反应过程,此过程中炎症灶处的巨噬细胞可释放活性氧和活性氮,破坏 DNA、蛋白质、细胞膜,改变酶的活性及基因的表达^[10]。因此从理论上说慢性血吸虫病可以促进肿瘤的发生。而且同为血吸虫家族的埃及血吸虫已被世界卫生组织(WHO)确认为人类致癌物,那么日本血吸虫是否也能致癌呢? Leoncio 等^[11]的研究发现,与老年人相比,40 岁以下年龄组的肠癌患者常伴有炎症性疾病,并且血吸虫病常伴发直肠癌;与一般大肠癌相比,与血吸虫病并存的大肠癌发生在直肠者相对较少,而发生在乙状结肠、降结肠、脾曲及横结肠者则多数倍,此结果符合血吸虫病灶在大肠的分布^[12]。有学者在基因水平上

作了研究, Soliman 等^[4]发现血吸虫病常伴有微卫星不稳定性及 ras 基因突变;刘荣辉等^[13]的结果亦表明并存血吸虫病且 c-erbB-2 阳性的结肠息肉具备癌前病变的特征;彭雁忠^[14], Zhang^[15]等分别发现 p53 基因在血吸虫病时发生改变。

c-erbB-2 癌蛋白是由该原癌基因编码的跨膜糖蛋白,其结构类似生长因子受体;它的过度表达可增加细胞与生长因子结合的敏感性,进而通过一系列信号传递,引起核的改变而使细胞呈旺盛增殖状态,这对肿瘤的发生、发展起重要作用^[16-17]。肿瘤细胞常有 c-erbB-2 基因扩增及蛋白产物的过度表达, c-erbB-2 表达产物的免疫组化染色结果与基因扩增拷贝数之间呈正相关^[18]。然而在大肠癌中,对其作用有截然不同的两种观点,部分学者^[3]认为它在大肠癌中阳性率很低,与预后无关^[18]。也有学者^[19]认为,在肠道的癌前病变中其表达水平常有上调,在癌前病变中其表达比癌组织中更高^[7],与癌组织的浸润和转移有关^[6,20],是一个独立的预后指标。对这种情况,可能与所用标本的早期处理、抗体的来源、实验条件以及评分的标准不同有关。本实验结果表明肠慢性血吸虫病的肠上皮细胞比正常肠上皮细胞的 c-erbB-2 基因表达水平高,说明血吸虫感染可以引

起 c-erbB-2 表达的上调,从而提示血吸虫感染在肠癌的发生过程中具有促进作用。另外慢性血吸虫病肠粘膜 c-erbB-2 基因高于血吸虫病并肠癌的表达水平。提示 c-erbB-2 在慢性血吸虫病肠上皮细胞癌变过程中可能是一早期分子事件,此结论与 Porcelli 等^[7]关于 c-erbB-2 在非血吸虫病性大肠癌中的表达结果一致。

Dpc4 是近年来发现的一个肿瘤抑制基因。Had jia, MacGrogan 等分别报道在大肠癌中 DPC4 的突变率高于 50%^[21-22],在大肠癌的发生发展过程中起非常重要的作用^[21],并且与转移有密切关系^[23]。目前 DPC4 在血吸虫病中的表达罕有报道。本实验结果表明,DPC4 在单纯血吸虫组中的表达比正常组低。提示血吸虫感染肠道以后,可以引起 DPC4 表达下调,导致肠上皮细胞的过度生长,这种上皮细胞具有恶变的潜能。其引起 DPC4 表达下调的机制亦有待研究。单纯血吸虫组、血吸虫并大肠癌组之间 DPC4 的表达无明显区别,提示 DPC4 的改变在血吸虫引起肠上皮恶变的过程中可能亦系一早期分子事件。然而不少学者发现,DPC4 的失活发生在肿瘤进展的后期,并与肿瘤的浸润和转移密切相关,属于晚期分子事件^[21]。据此推测,慢性血吸虫病引起上皮恶变的机制与普通大肠癌的发生机制可能并不一致,其具体机制尚待深入研究。综上所述,笔者认为慢性日本血吸虫病中大肠的病损可能是一种癌前病变,日本血吸虫感染与肠癌的发生之间存在一定的关系。

参考文献:

[1] 余金生,尹朝礼,刘南植,等. 血吸虫病与大肠癌关系的流式细胞术研究[J]. 胃肠病学与肝病学杂志, 1997, 6(4): 318-320.

[2] 汪祥辉,雷通海,马新源. 嘉善县结肠癌的危险因素[J]. 中国肿瘤, 2001, 10(7): 377.

[3] Ooi A, Takehana T, Li X, *et al.* Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study [J]. *Mod Pathol*, 2004, 17(8): 895-904.

[4] Soliman AS, Bondy ML, El-Badawy SA, *et al.* Contrasting molecular pathology of colorectal carcinoma in Egyptian and western patients [J]. *Br J Cancer*, 2001, 85(7): 1037-1046.

[5] Osako T, Miyahara M, Uchino S, *et al.* Immunohistochemical study of c-erbB-2 protein in colorectal cancer and the correlation with patient survival [J]. *Oncology*, 1998, 55(6): 548-555.

[6] Knosel T, Yu Y, Stein U, *et al.* Overexpression of c-erbB-2

protein correlates with chromosomal gain at the c-erbB-2 locus and patient survival in advanced colorectal carcinomas [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2002, 19(5): 401-407.

[7] Porcelli B, Frosi B, Terzuoli L, *et al.* Expression of p185 and p53 in benign and malignant colorectal lesions [J]. *Histochem J*, 2001, 33(1): 51-57.

[8] Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, *et al.* Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers [J]. *Am J Pathol*, 1996, 148(5): 1567-1576.

[9] Iida F, Iida R, Kamijo H. Chronic Japanese schistosomiasis and hepatocellular carcinoma: ten years of follow-up in Yamanashi Prefecture [J]. *Japan Bull World Health Organ*, 1999, 77(7): 573-5781.

[10] Arnaout AH, Dawson PM, Soomro S, *et al.* HER2 (c-erbB-2) oncoprotein expression in colorectal adenocarcinoma: an immunohistological study using three different antibodies [J]. *J Clin Pathol*, 1992, 45(8): 726-727.

[11] Leoncio L Kaw Jr, MD, Corazon K Punzalan, *et al.* Surgical Pathology of Colorectal Cancer in Filipinos: Implications for Clinical Practice [J]. *Am Coll Surg*, 2002, 195(2): 188-195.

[12] 许有生,沈纪林,陈家林,等. 血吸虫病并存疾病[J]. 现代医用影像学, 2000, 9(1): 7-10.

[13] 刘荣辉,刘蔚,刘勇,等. 伴血吸虫病的结肠癌和息肉中 c-erbB-2 表达及 AgNOR 的意义 [J]. 世界华人消化杂志, 1997, 5(8): 504-505.

[14] 彭雁忠,贾宏,张仁利,等. 日本血吸虫所致直肠癌的分型学分析 [J]. 中国热带医学, 2003, 3(2): 137-140.

[15] Zhang R, Takahashi S, Orita S, *et al.* p53 gene mutations in rectal cancer associated with schistosomiasis japonica in Chinese patients [J]. *Cancer Lett*, 1998, 131(2): 215-221.

[16] 李静喆,张辉,张仲良,等. NK-4 抑制结肠癌细胞增殖的机制初探 [J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(10): 744-747.

[17] 高鹏,周庚寅,魏军民,等. 乳腺癌 c-erbB2 过表达与生存率、内分泌治疗效果和预后的关系 [J]. 中国普通外科杂志, 2003, 12(10): 735-738.

[18] McKay JA, Loane JF, Ross VG, *et al.* c-erbB-2 is not a major factor in the development of colorectal cancer [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(4): 568-573.

[19] D'Emilia J, Bulovas K, D'Ercole K, *et al.* Expression of the c-erbB-2 gene product (p185) at different stages of neoplastic progression in the colon [J]. *Oncogene*, 1989, 4(10): 1233-1239.

[20] 张辉,张有成,王杉,等. 结直肠癌中 MEK2/ERK 信号传导通路的研究 [J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(4): 257-260.

[21] Had ija MP, Kapitanovic S, Radosevic S, *et al.* Loss of heterozygosity of DPC4 tumor suppressor gene in human sporadic colon cancer [J]. *J Mol Med*, 2001, 79(2): 128-132.

[22] MacGrogan D, Pegram M, Slamon D, *et al.* Comparative mutational analysis of DPC4 (Smad4) in prostatic and colorectal carcinomas [J]. *Oncogene*, 1997, 15(9): 1111-1114.

[23] Ohtaki N, Yamaguchi A, Goi T, *et al.* Somatic alterations of the DPC4 and Madr2 genes in colorectal cancers and relationship to metastasis [J]. *Int J Oncol*, 2001, 18(2): 265-270.