

MTA2 及 p53 在结直肠癌中的表达及临床意义

万 鸿 孟翔凌 吴文涌

摘要 目的 通过检测肿瘤转移相关基因 2 (MTA2) 及 p53 在结直肠癌中的表达水平,探讨两者与结直肠癌各项临床病理因素之间的关系及临床意义。方法 收集手术切除的 120 例结直肠癌标本,均取其原发病灶,并收集距肿瘤组织 5 cm 以上的非肿瘤性结直肠黏膜组织 30 例作为对照。用免疫组织化学法检测其 MTA2、p53 的表达。并根据不同的临床病理因素进行分组,分别比较两者的阳性表达与年龄、性别、病变部位、病理大体类型、浸润深度、有无淋巴结转移、有无远处转移及 TNM 分期的关系,分析其临床意义。结果 免疫组化结果显示结直肠癌组织中 MTA2 阳性表达率为 59.16% (71/120),p53 阳性表达率为 61.67% (74/120),两者在正常结直肠黏膜组织表达率均为 0,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。MTA2 阳性表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、远处转移及 TNM 分期具有显著相关性 ($P < 0.05$),与其余各因素无显著相关性 ($P > 0.05$)。p53 阳性表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移有显著相关性 ($P < 0.05$),与其余各因素无显著相关性 ($P > 0.05$)。结论 MTA2 可作为新的结直肠癌临床标志物及治疗靶点,其临床意义可能优于 p53。

关键词 结直肠癌;MTA2;p53;肿瘤转移

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1298-04

全世界每年约 60 万人死于结直肠癌^[1],而在我国结直肠恶性肿瘤发病率和死亡率已位列第三和第五位^[2]。结直肠癌治疗失败的主要原因是肿瘤的复发与转移,而转移相关基因家族作为组蛋白去乙酰基酶 (nucleosome remodeling deacetylase, NuRD) 的一个重要组成部分,通过影响核染色质的重塑来控制调节基因转录过程,其家族成员肿瘤转移相关基因 2 (metastasis-associated gene 2, MTA2) 在组织中的过度表达已经被证实与乳腺癌、胃癌、食管癌及肝细胞肝癌等有着密切联系^[3-6],但在结直肠癌中的表达情况鲜有报道。同时,MTA2 也参与了非组蛋

白乙酰化修饰调控,MTA2 与 p53 结合后可以直接引起 p53 乙酰化水平的降低,造成 p53 更易被泛素蛋白连接酶降解^[7]。该研究采用免疫组织化学法检测 MTA2 及 p53 在结直肠癌组织中的表达,评价 MTA2、p53 的表达与患者的各项临床病理因素之间的相关性,探讨两者在结直肠癌浸润和转移中可能发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2010 年~2012 年安徽医科大学第一附属医院经手术切除的 120 例结直肠癌手术标本,患者均取原发病灶癌组织标本,并随机抽取上述 120 例中的 30 例手术标本,取距离肿瘤外缘 5 cm 以上的正常结直肠黏膜作为对照组。对照标本均经过病理医师确认无肿瘤细胞浸润。患者均有完整的临床病例资料,按照 2009 年 AJCC 及 UICC 共同制定的第七版 AJCC 肿瘤分期标准进行 TNM 分期。120 例患者中,男 64 例,女 56 例;年龄 23~82 岁,中位年龄 63 岁。

1.2 实验材料 手术标本均固定后石蜡包埋切片,切片厚度 4 μm 。MTA2 一抗:MTA2 山羊抗人抗体 (SC-9447,工作浓度为 1:50,美国 Santa Cruz 公司)。二抗:辣根过氧化物酶标记的抗山羊 IgG (ZB-2306,工作浓度为 1:400)、p53 一抗:p53 兔抗人单克隆抗体 (ZA-0501,工作浓度为 1:100)、二抗:辣根过氧化物酶标记的通用型 IgG (SP-9000,工作浓度为 1:400) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。均使用 DAB 进行免疫组化显色,标记均有阳性对照并使用 PBS 液代替一抗作为阴性对照。

1.3 实验方法 将标本切片脱蜡、水化,PBS 液冲洗 5 min \times 3 次,微波法进行抗原修复;置入 3% 过氧化氢浸泡 30 min 以灭活组织内源性过氧化物酶;PBS 液冲洗 5 min \times 3 次;血清封闭,至切片于 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒内孵育 30 min;滴加一抗,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒内孵育过夜;PBS 液冲洗 5 min \times 3 次;加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:400),37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒内孵育 30 min;PBS 溶液冲洗 5 min \times 3 次;加入新配制的 DAB 显色液,显色约 2 min;自来水冲洗后行苏木精细胞核复

2014-05-07 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1208085MH169)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院普通外科,合肥 230022

作者简介:万 鸿,男,硕士研究生;

孟翔凌,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-

mail:xianglingm@medmail.com.cn

染 0.1% 盐酸酒精浸泡 3 min, 自来水冲洗, PBS 冲洗返蓝; 梯度乙醇溶液脱水干燥, 中性树脂封片。镜下观察 MTA2、p53 在结直肠癌组织及对照组结直肠黏膜组织中的表达情况。

1.4 免疫组化染色及结果判定 MTA2、p53 主要定位表达于细胞核中, p53 少量表达于细胞质中, 均呈棕黄色颗粒表现。MTA2 计算平均 5 个高倍镜 ($\times 400$ 倍) 视野下染色阳性的肿瘤细胞比例。在镜下未见明显阳性表达细胞者为 0 分, 阳性细胞数占细胞总数的比例 $< 1/3$ 者为 1 分, $1/3 \sim 2/3$ 为 2 分, $> 2/3$ 者为 3 分。将 0 ~ 1 分的患者归为阴性表达, 2 ~ 3 分为阳性表达^[6]。p53 同样计算 5 个高倍镜视野下阳性细胞比例, 以阳性细胞数 $> 25\%$ 为阳性组织, $\leq 25\%$ 为阴性。基于上述评分标准, 由两位病理专科医师各自独立观察并复检一次。细胞核染色强度与计分无关。

1.5 MTA2 和 p53 表达与结直肠癌相关因素的关系 选择了患者的年龄、性别、病变部位、病理大体类型、浸润深度、淋巴结转移、远处转移及 TNM 分期等临床因素进行统计学分析。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。各组间阳性率及各组与 MTA2、p53 的关系采用 χ^2 检验 (Pearson χ^2 检验, Fisher 精确概率法)。

2 结果

2.1 MTA2、p53 在结直肠癌组织及正常结直肠黏膜组织中表达情况 MTA2、p53 在结直肠癌组织中表达显著高于对照组结直肠黏膜组织, 免疫组化染色检测结果显示, 主要定位于细胞核的 MTA2, 在对照组结直肠黏膜上皮细胞内呈阴性表达 (图 1A), 在肿瘤细胞核内呈现阳性表达 (图 1B)。MTA2 在结直肠癌组织中的阳性表达率为 59.16%, 明显高于正常结直肠黏膜组织 (0%), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 33.703, P < 0.01$)。p53 主要定位于细胞核中, 细胞质中也有部分表达, 其在肿瘤组织中的表达亦显著高于对照组, 其在结直肠癌组织中的阳性表达率为 61.67%, 在正常结直肠黏膜组织中为阴性, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 36.513, P < 0.01$)。

2.2 MTA2 表达与结直肠癌临床相关因素的关系

通过分析 120 例患者的各项临床资料与 MTA2 的表达情况, 发现 MTA2 的表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、远处转移及 TNM 分期显著相关 ($P < 0.05$)。MTA2 的表达与患者的年龄、性别、病变部

位和病理大体类型无关 ($P > 0.05$), 见表 1。

2.3 p53 表达与结直肠癌临床相关因素的关系

120 例患者中共有 74 例患者呈阳性表达, 统计学分析各因素后结果显示 p53 的表达与结直肠癌的浸润深度、淋巴结转移亦具有显著相关性 ($P < 0.05$)。p53 的表达与患者的年龄、性别、病变部位、病理大体类型、有无远处转移及 TNM 分期无关 ($P > 0.05$), 见表 1。

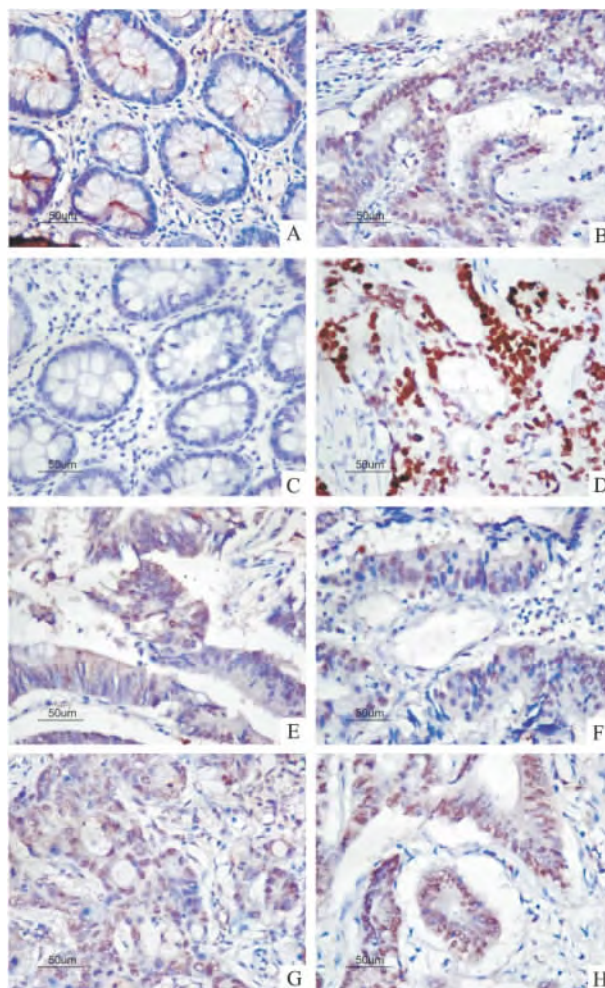


图 1 正常结直肠黏膜和结直肠癌组织 MTA2 和 p53 的表达 $\times 400$

A: MTA2 在正常结直肠黏膜组织呈阴性表达; B: MTA2 在结直肠癌组织中呈阳性表达; C: p53 在正常结直肠黏膜呈阴性表达; D: p53 在结直肠癌中呈阳性表达; E: MTA2 在 I 期结直肠癌组织中的表达; F: MTA2 在 II 期结直肠癌组织中的表达; G: MTA2 在 III 期结直肠癌组织中的表达; H: MTA2 在 IV 期结直肠癌组织中的表达

3 讨论

本研究结果表明, MTA2 在结直肠癌组织中的表达明显高于对照组结直肠黏膜, 其阳性表达率高达 59.16%, 而在对照组组织则未见明显表达。同

表1 MTA2、p53 表达与结直肠癌患者各项病理参数关系

指标	n	MTA2		χ ² 值	P 值	p53		χ ² 值	P 值
		(-)	(+)			(-)	(+)		
年龄 (岁)									
<60	58	23	35	0.064	>0.05	22	36	0.008	>0.05
≥60	62	26	36			24	38		
性别									
男	64	26	38	0.002	>0.05	25	39	0.031	>0.05
女	56	23	33			21	35		
病变部位									
结肠	65	28	37	0.295	>0.05	20	45	3.433	>0.05
直肠	55	21	34			26	29		
病理大体类型									
溃疡型	39	18	21			16	23		
浸润型	43	15	28	4.018	>0.05	12	31	3.409	>0.05
肿块型	38	16	22			18	20		
浸润深度									
T1	14	11	3			9	5		
T2	19	13	6	19.700	<0.01	11	8	12.141	<0.05
T3	63	19	44			22	41		
T4	24	6	18			4	20		
淋巴结转移									
无	62	34	28	10.415	<0.05	30	32	5.485	<0.05
有	58	15	43			16	42		
远处转移									
无	92	43	49	5.692	<0.05	35	57	1.012	>0.05
有	28	6	22			11	17		
TNM 分期									
I	28	23	5			15	13		
II	31	12	19	27.959	<0.01	13	18	7.023	>0.05
III	33	8	25			7	26		
IV	28	6	22			11	17		

时在实验过程中也观察到 MTA2 的表达多集中于肿瘤的边缘和血管周围,癌巢边缘 MTA2 阳性表达的细胞数目也高于癌巢中心,这一现象与 MTA1 在肝细胞癌中的表现类似^[8],已有文献^[9]指出 MTA1 可能通过如促进肿瘤血管生成及降低细胞间黏附性促进肿瘤的转移。MTA2 与 MTA1 在蛋白结构上同源性达到 65%,也提示 MTA2 在促进肿瘤浸润和转移过程中可能具有与 MTA1 类似的生物学效应。周尘飞等^[4]研究发现,在胃癌组织中 MTA2 与核转录因子 sp1 的表达呈正相关,sp1 的异常活化可导致其下游基因如血管内皮生长因子过表达,增强了肿瘤细胞血管生成和转移的能力,而 sp1 自身的转录活性也受到乙酰化修饰的调控,其乙酰化上调后肿瘤组织内的 p21 等增殖抑制因子表达增强,不利于肿瘤血管的生成。MTA2 在细胞内通过组成 NuRD 复合体发挥其生物学功能^[10],NuRD 复合体具备 ATP 依赖的核小体重构及组蛋白去乙酰化酶活性,其中 MTA2 调控该复合物中组蛋白去乙酰化酶 1 (histone

deacetylase 1,HDAC1) 的活性,两者的联合作用机制目前尚不明确。进一步对入组患者分析后发现 MTA2 的阳性表达与结直肠癌的肿瘤浸润深度、淋巴结转移、远处转移及 TNM 分期间具有显著相关性,这也印证了 MTA2 在其他各种常见恶性肿瘤的表达情况与各项临床病理因素的联系。

p53 分为野生型 (wt-p53) 及突变型 (mt-p53),wt-p53 在正常组织通常表达水平较低,且半衰期短,检测较为困难,本研究中检测的 p53 为 mt-p53,其在 120 例结直肠癌标本中的阳性表达率为 61.67%,与文献^[11]报道相类似。p53 的抑癌活性主要是由 p53 的稳定性以及翻译后的修饰作用如乙酰化等来决定的。Luo et al^[12]对 p53 的抑癌作用研究显示 HDAC1 能够调控 p53 的脱乙酰作用,且 MTA2 参与组成的 NuRD 复合体在 p53 抑制肿瘤发展的通路有着一定的调节作用。MTA2 与 p53 结合后可以引起 p53 乙酰化水平的降低,导致 p53 更易被 MDM2 降解,导致 p21 的转录受到抑制^[7],p53 的抑

癌作用被抑制,从而造成肿瘤的进一步发展。

本研究显示,MTA2 的表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、远处转移及 TNM 分期显著相关,p53 与其浸润深度、淋巴结转移具有显著相关性,提示两者对于肿瘤的浸润及转移起到促进的作用。但与 p53 相比,MTA2 的表达不仅与结直肠癌的浸润深度、淋巴结转移具有相关性,而且对于远处转移及高 TNM 分期亦有临床意义。因此,可推测 MTA2 对于结直肠癌的分期及预后的评价意义可能高于 p53,并且 MTA2 可作为新的结直肠癌临床标志物及治疗靶点,其临床意义可能优于 p53。

参考文献

- [1] Garcia-Albeniz X, Chan A T. Aspirin for the prevention of colorectal cancer[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011 25(4-5):461-72.
- [2] 郑荣寿,张思维,吴良有,等. 中国肿瘤登记地区 2008 年恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. *中国肿瘤* 2012 21(1):1-12.
- [3] Cui Y, Niu A, Pestell R, et al. Metastasis-associated protein 2 is a repressor of estrogen receptor alpha whose overexpression leads to estrogen-independent growth of human breast cancer cells[J]. *Mol Endocrinol* 2006 20(9):2020-35.
- [4] 周尘飞,计骏,袁菲,等. 转移相关基因 2 在胃癌中的表达及其与核转录因子 Sp1 的相关性[J]. *中华肿瘤杂志* 2012 34(8):592-5.
- [5] Liu Y P, Shan B E, Wang X L, et al. Correlation between MTA2 overexpression and tumour progression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Exp Ther Med* 2012 3(4):745-9.
- [6] Lee H, Ryu S H, Hong S S, et al. Overexpression of metastasis-associated protein 2 is associated with hepatocellular carcinoma size and differentiation[J]. *J Gastroenterol Hepatol* 2009 24(8):1445-50.
- [7] Dai C, Gu W. p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis[J]. *Trends Mol Med* 2010 16(11):528-36.
- [8] 王建祥,王平,周锐,等. 肿瘤转移相关基因在原发性肝癌细胞癌中的表达及其临床意义[J]. *中华实验外科杂志* 2011 28(4):561-3.
- [9] Yao Y L, Yang W M. The metastasis-associated proteins 1 and 2 form distinct protein complexes with histone deacetylase activity[J]. *J Biol Chem* 2003 278(43):42560-8.
- [10] Toh Y, Nicolson G L. The role of the MTA family and their encoded proteins in human cancers: molecular functions and clinical implications[J]. *Clin Exp Metastasis* 2009 26(3):215-27.
- [11] 曹立宇,张洪福. 大肠肿瘤中 p53、bcl-2 及 PCNA 表达的关系[J]. *安徽医科大学学报* 2000 35(6):438-41.
- [12] Luo J, Su F, Chen D, et al. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis[J]. *Nature* 2000 408(6810):377-81.

The expression and clinical significance of metastasis-associated gene 2 and p53 in colorectal cancer

Wan Hong, Meng Xiangling, Wu Wenyong

(Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To determine the expression of metastasis-associated gene 2 (MTA2) and p53 in colorectal cancer and non-cancerous mucosa, analyze their relationship with clinicopathological parameters, and discuss the clinical significance. **Methods** 120 colorectal neoplasm patients' cancer tissues and clinical information were collected from the first affiliated hospital of Anhui medical university. 30 patients of them were chosen to collect non-cancerous mucosa which was 5 cm away from the tumor. Immunohistochemistry staining was used to detect the expression of MTA2 and p53. According to the clinicopathological parameters, the positive and negative expression of MTA2, p53 were counted each group, discussed the relationship between positive expression and clinicopathological parameters by SPSS 19.0. **Results** The immunohistochemistry showed that the positive expression rate of MTA2 was 59.16%, and the positive expression rate of p53 was 61.67%. The expression of MTA2 and p53 in colorectal cancer were significantly higher than non-cancerous mucosa ($P < 0.05$). The MTA2 expression was positively correlated with the depth of invasion, lymphatic metastasis, distant metastasis and TNM stages ($P < 0.05$). The p53 protein expression was positively correlated with depth of invasion and lymphatic metastasis ($P < 0.05$). **Conclusion** MTA2 could be used as a new clinical biomarker and therapeutic target for colorectal cancer probably, which might be more effective than p53.

Key words colorectal cancer; metastasis-associated gene 2; p53; tumor metastasis