

• 基础实验研究论著 •

Dermokine- β 在结肠癌组织中的表达及临床意义*付汉东¹, 张爱华², 刘汉忠³, 袁岸龙⁴, 张秀玲⁴, 魏 威¹(湖北省孝感孝感市中心医院/华中科技大学同济医学院附属孝感医院:1. 中心实验室;
2. 普外科;3. 病理科;4. 消化内科, 湖北孝感 432000)

摘要:目的 研究 Dermokine- β (Dk- β) 在结肠癌组织中的表达和临床意义。方法 用免疫组化法检测结肠癌组织、癌旁组织和各对照组结肠组织中 Dk- β 表达, 对结肠癌不同临床参数间组织 Dk- β 表达进行比较, 并进行统计学分析。结果 Dk- β 在正常结肠黏膜组织、结肠息肉、溃疡性结肠炎(UC)、结肠癌、癌旁黏膜组织中表达阳性检出率是不同的, Dk- β 在癌旁黏膜组织中表达最高, 正常结肠组织表达最低, UC 组织中仅比正常结肠组织高($P < 0.01$)。结肠癌患者的年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位对 Dk- β 的表达没有直接影响($P > 0.05$), 结肠癌不同组织学分级和 Dukes 分期以及有无淋巴结转移 Dk- β 的表达水平间比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 结肠癌 Dk- β 表达与结肠癌患者黏膜上皮细胞受损密切相关, 早期结肠癌 Dk- β 表达呈显著升高, 因此组织 Dk- β 检测对提高结肠癌早期诊断率有重要意义。

关键词: 结肠肿瘤; 免疫组织化学; 肿瘤分期

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)18-2353-02

Dermokine- β expression in colon adenocarcinoma and clinical significance*Fu Handong¹, Zhang Aihua², Liu Hanzhong³, Yuan Anlong⁴, Zhang Xiulin⁴, Wei Wei¹

(1. Central Laboratory; 2. Department of General Surgery; 3. Department of Pathology; 4. Department of Gastroenterology, Hubei Xiaogan Central Hospital/Tongji Medical College Hospital Xiaogan, Xiaogan, Hubei 432000, China)

Abstract: Objective To study of dermokine- β expression in colon adenocarcinoma and iclinical significance. Methods Used immunohistochemical assay for the detection of colon cancer, carcinoma tissue and control group tissue expression of Dk- β . And compared the different clinical parameters between colon cancer tissue expression of Dk- β , and statistical analysis. Results The positive rate of Dk- β expression in normal colon mucosa, colon polyps, UC, colon cancer and adjacent mucosa was different. Dk- β expression in the adjacent mucosa was the highest, in normal colon was the lowest, UC than the normal colon was higher ($P < 0.01$). Colon cancer patients by age, gender, tumor size, tumor location on the expression of Dk- β had no direct effect ($P > 0.05$). Colon carcinoma of different histologic grading and Dukes period and lymph node metastasis of Dk- β expression level had significant difference. Conclusion Dk- β expression in colon cancer patients with colon cancer epithelial cell damage is closely related to, early colon cancer Dk- β expression is significantly increased. So the tissue Dk- β detection to improve the early diagnosis rate is of great significance.

Key words: colonic neoplasms; immunohistochemistry; neoplasm staging

结肠癌是常见的恶性肿瘤,近 20 多年来,我国结肠癌发病率上升十分明显,严重威胁着人们的健康,结肠癌患者的生存和预后取决于肿瘤的检出时间,但目前结肠癌的早期诊断仍于较低水平,约 1/3 的患者明确诊断时已处于进展期^[1-2],由于结肠癌的延误诊断是影响预后的重要原因^[3],因此提高早期诊断率对于改善预后至关重要, Dermokine(Dk)是角化细胞分泌的缩氨酸,可在早期结直肠癌(CRC)患者中高度表达,但其与结肠癌的相关性及其作用机制目前还不清楚,为此,研究者通过检测 Dk- β 在结肠癌患者组织中表达水平变化来研究 Dk- β 可否作为一种新的肿瘤标志物适用于国内人群早期结肠癌的诊断。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008 年 1 月~2012 年 6 月在本院住院治疗的结肠癌患者 214 例,其中,男性 143 例,女性 71 例;年龄 19~81 岁,平均 61.5 岁;结肠癌 Dukes 临床分期为 A 期 47 例、B 期 68 例、C 期 59 例、D 期 40 例。以上病例均通过病理确诊,符合结肠癌诊断标准^[4]。按参考文献^[4]将年龄分组: >60 岁

的老年患者 137 例,40~60 岁的中年患者 62 例, <40 岁青年患者 15 例;结肠癌肿瘤大小以 5 cm 为临界值^[5](CT 或 MRI 测量直径,多个肿瘤时取直径最大者): ≥ 5 cm 86 例,小于 5 cm 128 例;有淋巴结转移的 104 例,未见淋巴结转移的 110 例;淋病变部位:升结肠 62 例、横结肠 34 例、降结肠 26 例、乙状结肠 71 例、升结肠+横结肠 9 例、降结肠+乙状结肠 12 例。同期从门诊和住院结肠息肉和溃疡性结肠炎(UC)患者中各随机抽取 20 例作为对照组,其中男性 12 例,女性 8 例;年龄 20~67 岁,平均 45.6 岁。同时从健康体检人群中随机抽取 30 例作为正常对照组,其中男性 18 例,女性 12 例;年龄 18~65 岁,平均 44 岁。

1.2 仪器与试剂 JJQ-L2016 低温冷冻切片机(武汉俊杰公司)、JKT-5 生物组织快速脱水仪(武汉俊杰公司)、奥林巴斯 BX43-72P02 显微镜(日本 Olympus 公司)等。检测中所有操作严格按试剂和仪器说明书要求进行。Dk- β 单抗(英国 abcama 公司),酶标二抗(抗鼠 Ig-HRP)(美国 pierce 公司),甘油、石

* 基金项目:湖北省孝感市科技局基金支持项目(2011XKF042)。
作者简介:付汉东,男,副主任技师,主要从事肿瘤早期诊断和肿瘤标志物研究。

作者简介:付汉东,男,副主任技师,主要从事肿瘤早期诊断和肿瘤标志物研究。

蜡、苏木素等。

1.3 标本采集 手术取患者肿瘤及周围组织, 癌旁正常组织为距肿瘤边缘至少 5 cm 的肠段组织(病理证实肿瘤标本切缘肿瘤细胞残留均为阴性), 对照组在胃镜下取结肠息肉和炎症组织, 正常对照组在胃镜下取少许结肠组织, 以上所有标本-80℃保存待测。

1.4 结果判断 标准光镜下观察免疫组化染色切片, 阳性为细胞核被染为褐色或棕褐色, 并呈颗粒状, 背景呈蓝色, 阴性细胞核呈淡蓝色, 无棕黄色反应物, 选择组织平坦无皱褶、色彩清晰的部位, 随机选取 5 个高倍视野观察并记数 500 个细胞中的阳性细胞数, 以平均数为最后的评定。按阳性细胞所占比例进行分级: <25% 为(-), 25%~50% 为阳性(+), <50%~75% 为强阳性(++), 75% 以上为极强阳性(+++)。质量控制: 所有染色结果判定均在完全不知道样本临床资料情况下, 由两名经卫生部病理诊断与质量控制评价中心培训合格的副高以上职称的病理科医师分别对试验结果进行阅片评判, 所有评判过程均重复 2 次, 不一致者共同读片后确定。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计分析, 率比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Dk- β 的表达 Dk- β 在正常结肠黏膜组织阳性率为 [1 (3.33%)], 结肠息肉为 [5 (25%)], UC 为 [2 (10%)], 结肠癌为 [134 (62.62%)], 癌旁黏膜组织为 [157 (73.36%)], 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。Dk- β 在正常结肠黏膜组织、结肠癌组织中表达见图 1~4 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 Dk- β 表达与结肠癌患者临床病理参数关系 见表 1。

表 1 Dk- β 的表达与结肠癌患者临床病理参数的关系

临床病理参数	n	Dk- β 表达 [n(%)]		χ^2	P
		阳性率	阴性率		
性别					
男	143	106 (74.13)	37 (25.87)	0.13	>0.05
女	71	51 (71.83)	20 (28.17)		
年龄 (岁)					
老年 >60	137	103 (75.18)	34 (24.82)	0.76	>0.05
中年 40~60	62	44 (70.97)	18 (29.03)		
青年 <40	15	10 (66.67)	5 (33.33)		
肿瘤大小					
≥5 cm	86	65 (75.58)	21 (24.42)	0.36	>0.05
<5 cm	128	92 (71.87)	36 (28.13)		
肿瘤部位					
升结肠	62	45 (72.58)	17 (27.42)	2.05	>0.05
横结肠	34	23 (67.65)	11 (32.35)		
降结肠	26	20 (76.92)	6 (23.08)		
乙状结肠	71	53 (74.65)	18 (25.35)		
升+横结肠	9	7 (77.78)	2 (22.22)		
降+乙状结肠	12	9 (75.0)	3 (25.0)		
组织学分级					
I 级	40	23 (57.5)	17 (42.5)	10.14	<0.01
II 级	76	64 (84.21)	12 (15.79)		
III 级	63	46 (73.02)	17 (26.98)		
IV 级	35	24 (68.57)	11 (31.43)		

续表 1 Dk- β 的表达与结肠癌患者临床病理参数的关系

临床病理参数	n	Dk- β 表达 [n(%)]		χ^2	P
		阳性率	阴性率		
Dukes 分期					
A 期	47	32 (68.09)	15 (31.91)	12.14	<0.01
B 期	68	57 (83.82)	11 (16.18)		
C 期	59	35 (59.32)	24 (40.68)		
D 期	40	30 (75.0)	10 (25.0)		
淋巴结转移					
无	110	71 (64.55)	39 (35.45)	9.01	<0.01
有	104	86 (82.69)	18 (17.31)		

3 讨 论

研究表明^[6-7]DK (sk30/89) 作为一种新的角质形成细胞分泌的肽, 它与其他两个角质形成细胞分泌肽形成一个新的分层上皮细胞基因复合体 (SCC), Dk (sk89/30) 位于人类染色体 19q13.12, 其中包含一定数量的表皮特异基因, 原位杂交显示, Dk 基因的表达主要集中在上皮细胞的棘层和颗粒表皮, Dk 编码由 18 个外显子, 超过 17 Kb 基因组 DNA, 目前研究显示 Dk 至少 13 种不同的亚型, 编码 10 种不同的蛋白质, 其中 α 型 (7×10^3) 和 β 型 (45×10^3) 拥有自己的启动子, α 和 β 亚型似乎重叠在表皮上表达, Dk- β 是以高度分化的上皮细胞层分泌的形式表达^[8]。研究表明炎症条件下相关组织的上皮细胞层的 Dk 基因有差异表达, 也促进炎症状态的差异性^[9], 在上皮细胞层广泛受损中存在 Dk- β 有高水平的表达^[8]。

Dk- β 在正常结肠黏膜组织、结肠息肉、UC、结肠癌、癌旁黏膜组织中表达阳性检出率是不同的, Dk- β 在癌旁黏膜组织中表达最高, 正常结肠组织表达最低, UC 组织中仅比正常结肠组织高 ($P < 0.01$), 这由于癌细胞对周围组织浸润, 导致结肠局部黏膜上皮细胞层受损, 从而引起 Dk- β 高水平的表达。结肠癌患者的年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位对 Dk- β 的表达没有直接影响 ($P > 0.05$), 结肠癌不同组织学分级和 Dukes 分期以及有无淋巴结转移 Dk- β 的表达水平比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

结肠黏膜上皮角化细胞排列紧密, 相互嵌合, 细胞之间以桥粒连接, 其间隙由膜被颗粒排出物充填。这样角化细胞就组成了具有保护作用的角化层, 能阻止有害物质的侵入从而起到屏障作用, 结肠黏膜在生物学上具有独特性, 结肠黏膜上皮受到损伤, 溃疡性结肠黏膜炎癌变的可能机制是在一定的遗传因素作用下炎症黏膜组织发生异型增生 (如腺瘤性息肉), 并逐渐发生癌变, 在早期 APC 基因发生突变, 中期 ras 基因突变, 而到晚期 p53 突变^[10], 使病变一步步发展, 最终导致癌变, 这是一个较长期过程, 在此过程中伴有黏膜组织的异型增生和炎症的长期存在, 这些导致黏膜上皮细胞的角化和增生, 当 APC 基因和/或 ras 基因发生突变时这种监控机制可能被打破, 导致角化细胞分泌 Dk- β 增加, 其中低分化腺癌 Dk- β mRNA 表达更显著, Dukes 分期中 B 期表达更显著, 有淋巴结转移的比无淋巴结转移表达更显著。因此 Dk- β 的表达在结肠癌早期和进展期表达是显著升高的, Dk- β 的检测对结肠癌的早期诊断是有价值的。

参考文献

[1] 陆再英, 钟南山. 内科学 [M]. 7 版. 北京: 人民 (下转第 2357 页)

3 讨 论

组织激肽释放酶-激肽系统(KKS)是动物体多种组织中广泛存在的生物活性物质,包括激肽释放酶原、激肽释放酶、激肽原、激肽和激肽受体。激肽释放酶以激肽原酶原的形式在组织中合成,再经胰蛋白酶激活形成组织激肽释放酶。组织激肽释放酶是一组联系紧密的丝氨酸蛋白酶类,相对分子质量在(24~45)×10³之间,等电点为 3.5~4.4,大量存在于肾、胰腺、胃肠道黏膜及中枢神经系统等多种组织中,并可释放至血液循环,它可通过多种方式产生不同的生物学作用,参与多器官功能调节和多种病理生理过程,如心血管、肾脏和神经系统的调节,细胞增殖、炎症、凋亡等过程^[1],其活性能被抑肽酶或它的内源性抑制剂 kallistatin 所抑制^[6-7]。较早的研究一直认为 KLK 基因家族只有 3 个基因:KLK1、KLK2 和 KLK3。KLK1 对心血管、肾脏和中枢神经系统具有重要的保护作用,而 KLK2 和 KLK3(也称为前列腺特异性抗原,PSA)则被认为是前列腺癌的标志物。最新研究表明,组织激肽释放酶基因家族至少有 15 个基因组成(KLK1~KLK15),并且这 15 个激肽释放酶相关基因都处于 19q13.4 这条染色体上^[8]。

KLK8 是 KLK 家族成员之一,以往的研究表明,KLK8 可作为卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌等疾病的肿瘤标志物,对这些疾病的发展和预后起到一定的指导作用^[9-10];在癫痫及阿兹海默氏症等中枢神经系统损伤的疾病中,KLK8 表达增高^[11-12],提示 KLK8 在此过程中有一定作用,但具体机制尚未明确;同时,KLK8 基因结构与 KLK1 具有很大的相似性,那么它是否具有与 KLK1 相同心脏保护作用,这是一个非常有意义、值得深入研究的课题。

本实验成功构建了携带外源性 KLK8 基因的重组腺病毒表达载体,并在 AD-293 细胞中包装获得重组腺病毒 Ad-KLK8,应用 RT-PCR 及 Western-blot 鉴定结果表明 Ad-KLK8 重组腺病毒可在靶细胞中高效转录及表达蛋白,进一步为研究 KLK8 对心肌细胞作用奠定了实验基础。

参考文献

[1] Yin H, Chao L, Chao J. Kallikrein/kinin protects against myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion via Akt-glycogen synthase kinase-3 and Akt-Bad. 14-3-3 signaling pathways[J]. J Biol Chem, 2005, 280(9): 8022-8030.

[2] Silva JA, Jr., Araujo RC, Baltatu O, et al. Reduced cardiac hypertrophy and altered blood pressure control in transgenic rats with the human tissue kallikrein gene[J]. FASEB J, 2000, 14(13): 1858-1860.

[3] Li HJ, Yin H, Yao YY, et al. Tissue kallikrein protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy through kinin B2 receptor and glycogen synthase kinase-3beta activation[J]. Cardiovasc Res, 2007, 73(1): 130-142.

[4] Kishi T, Cloutier SM, Kundig C, et al. Activation and enzymatic characterization of recombinant human kallikrein 8 [J]. Biol Chem, 2006, 387(6): 723-731.

[5] Elliott MB, Irwin DM, Diamandis EP. In silico identification and Bayesian phylogenetic analysis of multiple new mammalian kallikrein gene families[J]. Genomics, 2006, 88(5): 591-599.

[6] Chao J, Chai KX, Chen LM, et al. Tissue kallikrein-binding protein is a serpin. I. Purification, characterization, and distribution in normotensive and spontaneously hypertensive rats[J]. J Biol Chem, 1990, 265(27): 16394-16401.

[7] Zhou GX, Chao L, Chao J. Kallistatin: a novel human tissue kallikrein inhibitor. Purification, characterization, and reactive center sequence[J]. J Biol Chem, 1992, 267(36): 25873-25880.

[8] Yousef GM, Chang A, Scorilas A, et al. Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3-q13.4 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 276(1): 125-133.

[9] Yousef GM, Polymeris ME, Yacoub GM, et al. Parallel overexpression of seven kallikrein genes in ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2003, 63(9): 2223-2227.

[10] Kishi T, Grass L, Soosaipillai A, et al. Human kallikrein 8, a novel biomarker for ovarian carcinoma[J]. Cancer Res, 2003, 63(11): 2771-2774.

[11] Momota Y, Yoshida S, Ito J, et al. Blockade of neuropsin, a serine protease, ameliorates kindling epilepsy[J]. Eur J Neurosci, 1998, 10(2): 760-764.

[12] Shimizu-Okabe C, Yousef GM, Diamandis EP, et al. Expression of the kallikrein gene family in normal and Alzheimer's disease brain [J]. Neuroreport, 2001, 12(12): 2747-2751.

(收稿日期:2013-04-28)

(上接第 2354 页)

卫生出版社, 2009: 420-421.

[2] Onouchi S, Matsushita H. New method for colorectal cancer diagnosis Based on SSCP analysis of DNA from exfoliated colonocytes in naturally Evacuated feces[J]. Anticancer Res, 2008, 28(1): 145-150.

[3] Hewitson P, Glasziou P, Irwig L, et al. Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, Hemoccult [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2007, 24(1): CD001216.

[4] 林汉利, 李俊达, 王亚东, 等. 不同年龄组大肠癌发病特点与病理分析[J]. 广东医学, 2003, 24(11): 1191-1192.

[5] 翟志伟, 顾晋. 肿瘤大小对结肠癌患者预后的影响[J]. 中华胃肠外科杂志, 2012, 15(5): 495-497.

[6] Moffat P, Salois P, St-Amant N, et al. Identification of a conserved cluster of skin-specific genes encoding secreted proteins[J]. Gene, 2004, 334(1): 123-131.

[7] Matsui T, Hayashi-Kimumi F, Kinoshita Y, et al. Identification of novel keratinocyte-secreted peptides dermokine-β/γ and a new stratified epithelium-secreted protein gene complex on human chromosome 19q13.12[J]. Genomics, 2004, 84(2): 384-397.

[8] Toulza E, Galliano MF, Jonca N, et al. The human dermokine gene: description of novel isoforms with different tissue-specific expression and subcellular location[J]. J Invest Dermatol, 2006, 126(2): 503-506.

[9] Naso MF, Liang B, Huang CC, et al. Dermokine: an extensively differentially spliced gene expressed in epithelial cells[J]. J Invest Dermatol, 2007, 127(7): 1622-1631.

[10] 徐艳松, 唐卫中, 高枫, 等. 散发性结直肠癌 APC、K-ras、p53、MMR 基因突变检测[J]. 结直肠肛门外科, 2009, 15(4): 229-232.

(收稿日期:2012-11-08)