

• 临床检验研究论著 •

脑型糖原磷酸化酶在人结、直肠肿瘤中的表达

汤 菲, 安黎云[△], 贾克然

(解放军白求恩国际和平医院, 河北石家庄 050082)

摘 要:目的 探讨脑型糖原磷酸化酶(GPBB)在结、直肠肿瘤中表达时间和临床病理参数之间的联系。方法 选取本院 40 例结、直肠癌标本和 18 例结、直肠不典型增生腺瘤标本,用自制的特异抗人脑型糖原磷酸化酶抗体和 P53 抗体,研究 GPBB 和 P53 在结、直肠肿瘤中的表达。结果 GPBB 在结、直肠癌中的阳性表达率为 80.0%,显著高于结直肠不典型增生腺瘤,并且在其中,重庆不典型增生腺瘤和乳头状腺瘤中先于 P53 基因表达。结论 GPBB 是在癌和癌前病变表达的酶,因此可作为预示结、直肠癌发生的早期生物标记酶。

关键词:脑型糖化原磷酸化酶; 结直肠肿瘤; 免疫组织化学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.23.014

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)23-3187-03

Expression of brain-type glycogen phosphorylase in human colorectal neoplasia

Tang Fei, An Liyun[△], Jia Keran

(Bethune International Peace Hospital of PLA, Shijiazhuang, Hebei 050082, China)

Abstract:Objective To investigate the expression of brain-type glycogen phosphorylase(GPBB) as a new biomarker in colorectal carcinomas, to understand its expression timing in colorectal neoplasia and its relation with the clinical pathological parameters, and to compare it with the P53 gene. **Methods** 40 specimens of colorectal carcinoma and 18 specimens of colorectal neoplasia were selected. The expression of GPBB and P53 in colorectal tumor was investigated by self-made specific anti-human GPBB antibody and P53 antibody. **Results** The positive expression rate of GPBB in colorectal carcinoma was 80%, which was significantly higher than that in colorectal carcinoma, moreover its expression in moderate and severe atypical hyperplasia adenoma and papillary adenoma was earlier than P53 gene expression. **Conclusion** GPBB is an enzyme expressed in carcinoma and precancerous lesion, therefore it may be taken as early biomarker enzyme for predicting the occurrence of colorectal carcinoma.

Key words: brain-type glycogen phosphorlylase; colorectal neoplasms; immunohistochemistry

糖原磷酸化酶(glycogen phosphorylase, GP)是糖原分解代谢的关键酶,人类组织中有 3 种 GP 同工酶:脑型(BB)、肝型(LL)和肌型(MM)。国内外已经证实,脑型 GP(GPBB)对缺血型心肌损伤的早期诊断及某些消化道肿瘤的病因学研究具有重要意义。迄今国内尚未见有关用免疫组织化学方法研究 GPBB 和消化道肿瘤关系的报道。笔者应用合成的两段 GPBB 肽段制备的多克隆抗体来研究 GPBB 在结、直肠肿瘤中的表达。

1 资料与方法

1.1 一般材料 选取本院病理诊断为结、直肠肿瘤的标本 58 例,其中诊断为结、直肠癌的标本 40 例,结、直肠腺瘤标本 18 例。结、直肠癌标本中,男 19 例,女 21 例,年龄 30~78 岁,平均年龄为 57.6 岁;高分化腺瘤 10 例,中分化腺瘤 22 例,低分化腺瘤 8 例。18 例结、直肠不典型增生腺瘤标本,轻度不典型增生 4 例,中度不典型增生 7 例,重度不典型增生 7 例。

1.2 抗体 应用 RASWIN 三维结构分析软件进行 GPBB 的立体结构分析,选取两段空间位置上有一定距离的 GPBB 的特异性抗原表位氨基酸序列片断,应用多肽抗原合成技术合成具有 8 分枝结构的合成肽,免疫新西兰兔得到 2 种 GPBB 多肽抗原的多克隆抗体,分别命名为 GPBBP1(N590-N601, RIKRD-PAKAFVP)和 GPBBP2(N786-N804, AQVDQLYRPKEWT-

KKVIP)作为一抗。P53 抗体购自上海长岛生物有限公司,免疫组织化学 SP 试剂购自北京生物有限公司。

1.3 检测方法 标本经甲醛固定、石蜡包埋。石蜡切片(5 μ m),常规脱蜡至水。加入 3% H_2O_2 室温孵育 15 min。蒸馏水洗 3 次。P53 抗体热修复,电磁炉煮沸后再加热 12 min,放置冷却(GPBB 不需此步)。0.01 mmol/L PBS 洗 5 min \times 3 次。用 1%BSA 封闭组织内电荷,室温 15 min。滴加一抗(1:50 倍稀释的 GPBBP1 或 GPBBP2),P53 为即用型,微波 5 档 15 min,4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 洗 5 min \times 3 次。滴加生物素标记的二抗,微波 5 档 15 min, PBS 洗 5 min \times 3 次。滴加 SP 复合物,微波 5 档 15 min; PBS 洗 5 min \times 3 次。滴加 PBS 4 mL、DAB 5 g、 H_2O_2 5 μ L,显色 15 min。苏木素复染 1 min,水洗,1%盐酸乙醇分化,脱水、透明、封固。

1.4 染色评价 按阳性物质的量和颜色深浅分为:“+++”,阳性颜色为棕褐色,阳性细胞 $>60\%$;“++”,阳性颜色为棕黄色,阳性细胞 30%~60%;“+”阳性颜色为黄色,阳性细胞 10%~30%;“-”细胞质、核无染色,阳性细胞 $<10\%$ 。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 进行统计学分析,计数资料以率表示,采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

GPBBP1 和 GPBBP2 在结、直肠癌中的阳性表达率见表

1。GPBBP1 和 GPBBP2 对结、直肠癌都有表达,但两者之间表达差异有统计学意义($P<0.05$)。GPBBP1 在结、直肠肿瘤中的阳性产物定位于胞质,见图 1~4。GPBBP1 及 P53 在结、直肠癌和各程度不典型增生腺瘤中的阳性表达的比较见表 2。GPBBP1 在结、直肠癌和结、直肠肿瘤中有显著差异。GPBBP1 在结、直肠癌中的阳性表达及临床病理联系见表 3。

表 2 GPBBP1 和 P53 在结、直肠肿瘤中的表达情况 (n)

表达	不典型增生腺瘤						结、直肠癌	
	轻度		中度		重度		GPBBP1	P53
	GPBBP1	P53	GPBBP1	P53	GPBBP1	P53		
—	4	4	4	6	3	5	8	17
+	0	0	1	1	1	1	10	9
++	0	0	2	0	1	1	14	8
+++	0	0	0	0	2	0	8	6

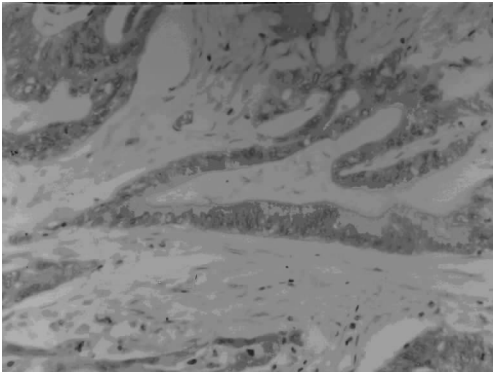


图 1 GPBBP1 在结、直肠癌中的表达 (×200)

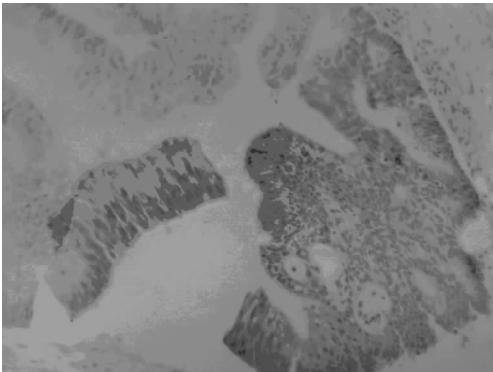


图 2 GPBBP1 在重度不典型增生的表达 (×200)

表 3 GPBBP1 表达与结、直肠癌临床病理相关性 (n)

项目	GPBBP1		阳性率 (%)	P
	阳性	阴性		
分化程度				
高分化	7	3	70.0	>0.05
中分化	18	4	81.1	
低分化	7	1	87.5	
淋巴结转移				
未见	16	2	88.9	>0.05
可见	16	6	72.7	

表 1 GPBBP1 和 GPBBP2 在结、直肠癌中的表达结果

抗体	结、直肠癌		阳性率 (%)	P
	阳性 (n)	阴性 (n)		
GPBBP1	32	8	80.0	<0.005
GPBBP2	11	19	27.5	

续表 3 GPBBP1 表达与结、直肠癌临床病理相关性 (n)

项目	GPBBP1		阳性率 (%)	P
	阳性	阴性		
性别				
男	12	7	63.2	<0.05
女	20	1	95.2	
年龄				
30~55	14	3	82.4	>0.05
55~80	16	5	76.2	

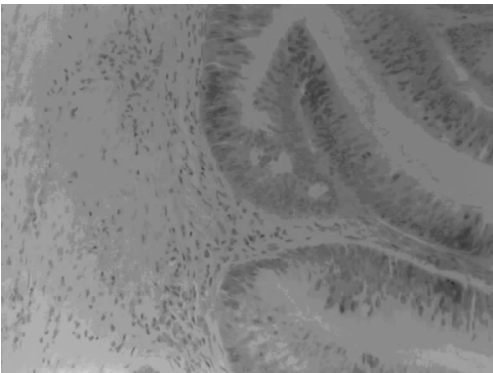


图 3 GPBBP1 在中度不典型增生的表达 (×200)

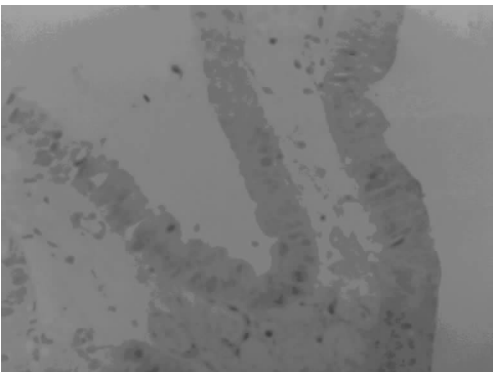


图 4 GPBBP1 在乳头状腺瘤中的表达 (×200)

3 讨 论

糖原磷酸化同工酶以同源二聚体形式存在,单相对分子质量为 94×10^3 , GP 有 3 种同工酶,其中 GPBB 的 83% 与 GPMM 具有同源性,80% 与 GPLL 有同源性,但 GPBB 的 C-终端分别有 21 和 16 个氨基酸残基,这就决定了 GPBB 的特异性。因此,应用 GPBB 作为生物学、免疫组化学研究具有更重要的意义。并且,国外学者已证实,3 种糖原磷酸化酶只有脑型在腺癌恶性细胞和腺瘤不典型增生区着色,其他两型均不着色^[1]。笔者依据此结论,分析了 GPBB 的空间立体结构筛选出两段有特异性抗原表位的氨基酸片段命名为:GPBBP1 和 GPBBP2。经免疫组织化学研究,GPBBP1 在结、直肠癌中的表达占绝对优势,但 GPBBP2 也可低量表达。笔者用 GPBBP1 作免疫组织化学研究发现,其在肿瘤组织和部分癌前病变中有阳性表达,并且发现在某些癌前病变中先于 P53 表达。GPBBP1 和 P53 在 40 例结、直肠癌标本中的阳性表达有显著差异,GPBBP1 和 P53 在结、直肠癌中的阳性表达区域无明显差别。GPBBP1 在中、重度不典型增生结直肠腺瘤中表达,并和腺瘤发展有相关性。不表达 GPBBP1 的部位在远离癌旁的表形正常的黏膜上。而 P53 基因虽然在中、重度不典型增生结直肠腺瘤中也有表达,但阳性率要低于 GPBBP1,并且 GPBB1 在同一中、重度不典型增生腺瘤标本中高度表达,P53 不表达或弱表达,这与 Tashima 等^[1]报道的有些不符。GPBBP1 表达的阳性区可以被看作癌前病变的标志。另外,笔者还发现 40 例结、直肠腺瘤标本中,9 例乳头状腺瘤有 3 例 GPBBP1 表达阳性,即 GPBBP1 在 33.3% 的乳头状腺瘤上表达,并且在管状乳头状腺瘤病理标本中,也只在乳头状腺瘤中表达,而不表达管状腺瘤,这和以前的研究结果有一致性,乳头状腺瘤的癌变率要高于管状腺瘤,也就是说可能约有 33.3% 的乳头状腺瘤可能起源于 GPBBP1 表达阳性的细胞,而 P53 基因在此区不表达。因此,对于 GPBBP1 阳性的乳头状腺瘤应注意其恶变及预后。上述结果与肠正常上皮向癌的恶性转

化和演变过程相一致。GPBBP1 阳性表达随着结、直肠癌恶变程度的增高有上行趋势。腺瘤到腺癌的发展已被证实是分阶段发展的过程,而 P53 是抑癌基因,在抗肿瘤中起着重要作用,它的出现也就是预后不良的标志。GPBBP1 比 P53 更早出现于癌前病变。因此,本研究为结、直肠癌前病变早期诊断和预防提供了一项新的分子生物学指标。

参考文献

- [1] Tashima S, Shimada S, Yamaguchi K, et al. Expression of brain-type glycogen phosphorylase is a potentially novel early biomarker in the carcinogenesis of human colorectal carcinomas[J]. Am J Gastroenterol, 2000, 95(1): 255-634.
- [2] Shimada S, Marutsuka T. Gastric and intestinal phenotypes of gastric carcinoma with reference to expression of brain (fetal)-type glycogen phosphorylase[J]. J Gastroenterol, 2001, 36(4): 457-464.
- [3] Shimada S, Tashima S, Yamaguchi K, et al. Carcinogenesis of intestinal-type gastric cancer and colorectal cancer is commonly accompanied by expression of brain (fetal)-type glycogen phosphorylase[J]. J Exp Clin Res, 1999, 18(1): 111-118.
- [4] 万涛,孙涛,吴家金. 蛋白顺序性抗原决定簇的多数参数综合预测[J]. 中国免疫学杂志, 1997, 16(3): 329-332.
- [5] Newgard CB, Hwang PK, Fletterick RJ. The family of glycogen phosphorylase: structure and function[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1989, 24(1): 69-99.
- [6] Hashimoto K, Tamaura K, Otani H, et al. Histochemical and immunohistochemical studies related to the role of glycogen in human developing digestive organs[J]. Anat Embry, 1995, 192(6): 497-505.

(收稿日期:2014-01-08)

(上接第 3186 页)

- 治疗进展[J]. 国际骨科学杂志, 2010, 31(2): 164-168.
- [2] 刘雄. 骨质疏松性骨折诊断和防治[J]. 内蒙古中医药, 2012, 31(1): 106-107.
 - [3] 廖二元, 张红. 骨质疏松诊断中的几个关键问题[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2011, 27(2): 101-105.
 - [4] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2011, 4(1): 155-167.
 - [5] 黄火强. 骨质疏松症发病机理及临床药物治疗[J]. 标记免疫分析与临床, 2010, 17(3): 205-208.
 - [6] 许洁, 赵东宝, 刘文斌. 老年性骨质疏松症的防治进展[J]. 中国全科医学, 2010, 13(11): 1246-1248.
 - [7] 杨春云, 邱清芳, 翟学君, 等. 胶东半岛健康成年人群骨代谢生化指标与骨密度相关性研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2011, 17(6):

493-497.

- [8] 黎卓华, 崔敏涛, 吴丽川, 等. 种骨标志物在绝经后妇女骨质疏松诊断中的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(7): 914-915.
- [9] 苏燕, 范光磊, 赵骏, 等. 骨代谢生化指标在评价绝经后女性骨质疏松治疗中的应用[J]. 放射免疫学杂志, 2011, 24(4): 422-424.
- [10] 周洁, 李茵茵, 车晓琪, 等. 老年男性骨代谢生化指标和骨密度的关系[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2011, 10(2): 132-134.
- [11] 王仲伟. 血清学骨转化指标在诊断老年女性骨质疏松症中的作用[J]. 中国医师进修杂志, 2012, 35(1): 27-30.
- [12] 丁晓凯, 薛增奇, 金领微, 等. 胰岛素样生长因子与血液透析患者骨质疏松症关系的研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(6): 506-508.

(收稿日期:2014-05-05)