

结直肠癌组织 *BCL9* 和 *VEGF* 的表达与临床意义

吴 帅^a, 张才全^{a*}, 赵 林^a, 林传彬^a, 汤为学^b

(重庆医科大学 a. 附属第一医院 胃肠外科; b. 基础医学院 病理生理学教研室, 中国重庆 400016)

摘要: 探讨结直肠癌中 B 细胞淋巴瘤因子 9 (B-cell lymphoma 9, *BCL9*) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, *VEGF*) 表达与临床病理的关系及其临床意义. 采用免疫组织化学 SABC 染色法, 检测 83 例结直肠癌组织和 10 例癌旁正常组织中 *BCL9* 及 *VEGF* 蛋白的表达情况, 并且分析其与临床病理特征的关系. *BCL9* 和 *VEGF* 在癌组织中表达率分别为 67.47%(56/83) 和 69.88%(58/83), 而癌旁正常组织中均不表达. *BCL9* 在结直肠癌中的表达与肿瘤分化程度、浸润深度、Dukes 分期、有无淋巴结转移相关 ($P < 0.05$). *VEGF* 在结直肠癌中的表达与肿瘤分化程度、浸润深度无关, 而与肿瘤 Dukes 分期、有无淋巴结转移密切相关 ($P < 0.01$). 结直肠癌中 *VEGF* 的表达随 *BCL9* 表达的升高而升高 ($P < 0.01$). *BCL9*、*VEGF* 可能在结肠癌的发生发展过程中起重要作用. *BCL9* 可能通过上调 *VEGF* 的表达, 促进肿瘤浸润和转移.

关键词: 结直肠肿瘤; 细胞淋巴瘤因子 9 (*BCL9*); 血管内皮生长因子 (*VEGF*); 免疫组化; 治疗新靶点

中图分类号: R735.3+ 5/7

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2010)03-0246-04

The Expression of *BCL9* and *VEGF* in Colorectal Cancer and Their Clinical Significance

WU Shuai^a, ZHANG Cai-quan^{a*}, ZHAO Lin^a, LIN Chuan-bin^a, TANG Wei-xue^b

(a. Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital; b. Department of Pathophysiology, Basic Medical College, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: To explore the relationship between the expression of B-cell lymphoma 9 (*BCL9*) and vascular endothelial growth factor (*VEGF*) in colorectal cancer and their clinical pathological features, and their clinical significance. Immunohistochemistry SABC method was used to detect the expression of *BCL9* and *VEGF* in 83 cases of colorectal carcinomas and 10 cases of cancer adjacent normal tissue, and the relationship between protein expression and clinical pathological features was analyzed. The expression rate of *BCL9* and *VEGF* protein in cancer tissue were 67.47%(56/83) and 69.88%(58/83), respectively. While both had no expression in cancer adjacent normal tissue. The *BCL9* expression was correlated with differentiation degree, depth of infiltration, Dukes stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$). There was no correlation between the *VEGF* expression and differentiation degree, depth of infiltration, but that was closely correlated with Dukes stage and lymph node metastasis ($P < 0.01$). The expression of *VEGF* increased with *BCL9* ($P < 0.01$). *BCL9* and *VEGF* may play an important role in development of colorectal carcinoma. The tumor invasion and metastasis may be promoted by *BCL9* which works by up-regulating the expression of *VEGF*.

Key words: colorectal carcinoma; B-cell lymphoma 9 (*BCL9*); vascular endothelial growth factor (*VEGF*); immunohistochemistry; a new target for therapy

(Life Science Research, 2010, 14(3): 246~249)

收稿日期: 2009-12-31; 修回日期: 2010-03-08

作者简介: 吴帅(1981-), 男, 四川巴中人, 硕士研究生, 主要从事胃肠外科研究, E-mail: wushuai19831120@sohu.com; * 通讯作者: 张才全(1944-), 男, 重庆人, 重庆医科大学附属第一医院胃肠外科教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事胃肠道肿瘤基础与临床研究, E-mail: zhangyu0323@21cn.com.

WNT 通路是一个由高度保守、紧密调节的受体介导信号转导系统构成^[1]。BCL9 是最近在细胞核 Wnt 通路中发现的新成员,已被证实具有强有力的转录激活域,在 β -catenin 结合核内转录因子 TCF/LEF 家族成员的转录活性方面起着重要作用^[2-4]。BCL9 通过增强癌细胞增殖、转移和血管新生能力促进肿瘤的发展,最重要的是, Mala Mani 等通过 BCL9 基因敲减显著增加了小鼠的人结肠癌移植模型的生存率,其作用是通过下调肿瘤细胞 C-Myc 基因、细胞周期蛋白 DI(cyclin DI)、CD44 和血管内皮生长因子(VEGF)的表达进而减少肿瘤负荷、转移和肿瘤血管新生^[5]。这些发现表明, BCL9 可能作为一种癌基因,为 β -catenin 的活化和靶基因的激活提供一个替代途径。BCL9 参与肿瘤的发展,可作为 Wnt 活性相关肿瘤治疗的新靶点。本文旨在分析 BCL9、VEGF 在结肠癌组织中的表达,探讨其与结肠癌病理特征的关系,为结肠癌的治疗提供新的途径和依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料

2007 年 12 月至 2009 年 1 月结肠癌根治术切除后存档在重庆市重庆医科大学附属第一医院病理科的石蜡包埋标本 83 例,男 40 例,女 43 例,年龄 33~82 岁,平均 63.9 ± 10.96 岁。所有病例术前均未行放疗和化疗。用 10 例癌旁正常结肠组织(距离肿块 5~10 cm)做对照。所有标本均病理证实为恶性肿瘤。

1.2 主要试剂

兔抗人 BCL9 多克隆抗体(ab37305,英国 Abcam (Hong Kong)Ltd.),兔抗人 VEGF 单克隆抗体(bs-0279R,北京博奥森生物技术有限公司),液体 DAB 酶底物显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术公司)。

1.3 方法

1.3.1 染色方法

标本经福尔马林固定、石蜡包埋、连续切片,厚 5 μ m。二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化, SABC 法染色,显微镜下观察,用已知的结肠腺癌切片为阳性对照,以 PBS 代替一抗为阴性对照。切片分别做常规免疫组织化学染色。

1.3.2 结肠腺癌病理分型分期

结肠癌以管状腺癌为主。根据分化程度分为:高分化腺癌 12 例,中分化腺癌 38 例,低分

化腺癌 33 例;Dukes 分期: A、B 期 43 例, C、D 期 40 例;浸润程度:未及浆膜 30 例,侵及浆膜及浆膜外层 53 例;淋巴结转移:阳性组 37 例,阴性组 46 例。按手术记录描述肿瘤生长的部位和大小。

1.4 免疫组织化学染色结果的判断

BCL9 蛋白阳性染色为细胞核呈棕黄色细颗粒,在结肠腺癌组织样本中,图片评分:染色强度(a),无染色(如正常结肠上皮)记为 0 分,弱、中、强染色分别记为 1、2、3 分;样本被染肿瘤细胞比率(b),无细胞染色记为 0 分,染色细胞比率 1%~10%、11%~50%、>50%分别记为 1、2、3 分;两种评分的乘积($a*b$)计分: 0: 0 分(阴性); 1+: 1 和 2 分(弱阳性); 2+: 3 和 4 分(阳性); 3+: 6 和 9 分(强阳性), 1+~3+均视为阳性。VEGF 蛋白阳性染色为细胞胞浆和胞膜呈棕黄色细颗粒,评分方法同 BCL9。

1.5 统计学方法

实验数据采用 SPSS17.0 统计学软件进行统计分析,两组样本间的比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BCL9 和 VEGF 的表达

BCL9 在癌组织中 56 例(67.47%)阳性表达(图 1a),在癌旁正常结肠组织中不表达(图 1b)。VEGF 在癌组织中 58 例(69.88%)阳性表达(图 1c),癌旁正常结肠组织不表达(图 1d)。

2.2 BCL9 和 VEGF 表达与临床病理因素的关系

BCL9 在结肠癌中的表达与肿瘤分化程度、浸润深度、Dukes 分期、有无淋巴结转移相关($P < 0.05$)。BCL9 在低分化肿瘤中表达明显高于高-中分化肿瘤($P < 0.01$)。VEGF 在结肠癌中的表达与 Dukes 分期、有无淋巴结转移密切相关($P < 0.01$),而与肿瘤分化程度和浸润深度无明显相关性。见表 1。

2.3 结肠癌中 BCL9 和 VEGF 表达的关系

VEGF 的表达随 BCL9 表达的升高而升高。在 BCL9 表达阴性的 27 例中 VEGF 阳性表达 11 例(40.7%),而 BCL9 阳性表达的 56 例中 VEGF 阳性表达 47 例(83.9%),两者间差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 2。

3 讨论

直肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一,因其易

发生转移和扩散、术后复发率较高,探讨其转移机制一直是众多学者的研究重点^[6]. Wnt 通路成员 *BCL9* 是一个新的癌基因,异常表达于人类多种恶性肿瘤组织中,包括多发骨髓瘤、结肠癌、乳腺癌、肾母细胞瘤(Wilms tumor)等^[5,7-9]. 全长 *BCL9 cDNA* 克隆是在 1998 年由 T.G.Willis 等首

次从正常人胎脑 *cDNA* 文库 5'-和 3'-末端快速扩增(5'-and 3'-RACE)获得^[10]. 在核 Wnt 信号通路中, *BCL9* 与 β -catenin、TCF/LEF 和 Pygo 形成核复合物,激活经典 Wnt 靶基因,如 *VEGF* 等. 肿瘤血管新生对肿瘤生长和转移有重要作用,并受多种细胞因子调节, *VEGF* 是其中之一.

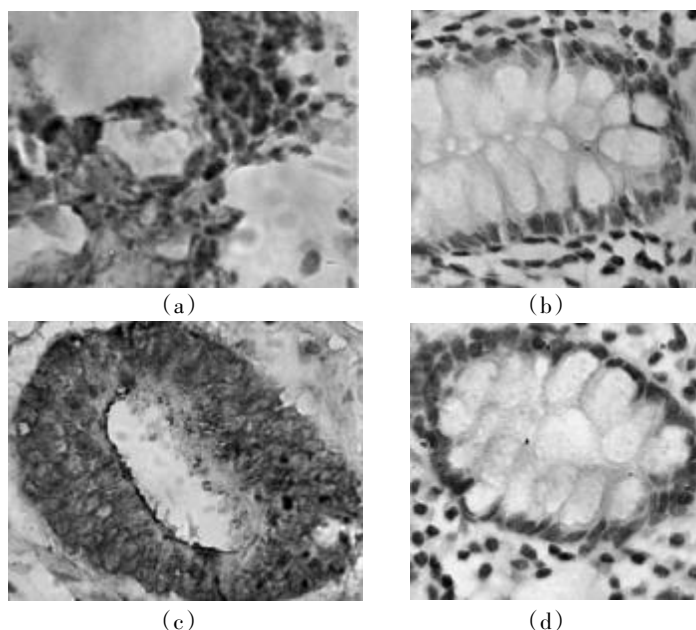


图 1 结肠癌(a, c)和癌旁正常组织(b, d)中 *BCL9*(a, b)和 *VEGF*(c, d)的表达(SABC 法, $\times 400$)

Fig.1 The expression of *BCL9*(a, b) and *VEGF*(c, d) in colorectal cancer(a, c) and cancer adjacent normal tissue (b, d)SABC method($\times 400$)

表 1 结肠癌中 *BCL9* 和 *VEGF* 的表达与临床病理参数的关系

Table 1 The relationship between the expression of *BCL9* and *VEGF* in colorectal cancer and their clinical pathological features

Group	n	<i>BCL9</i>		<i>VEGF</i>	
		Positive	χ^2	Positive	χ^2
Age					
≥ 64	42	29		33	
< 64	41	27	0.60	25	3.05
Sex					
M	39	24		28	
F	44	32	1.18	30	0.13
Differentiation					
Well/Moderate	50	28		38	
Poor	33	28	7.53*	20	0.21
Infiltration					
Under Serosal	30	14		19	
Beyond Serosal	53	42	9.26*	39	0.96
Duke's period					
A+B	43	24		24	
C+D	40	32	5.52*	34	8.38*
Lymph node metastasis					
Yes	37	30		32	
No	46	26	5.63*	26	8.74*

注: χ^2 检验, *, $P < 0.05$.

Notes: Chi-square test, *, $P < 0.05$.

表2 结肠癌中 BCL9 与 VEGF 表达的关系
Table 2 The relationship between the expression of BCL9 and VEGF in colorectal cancer

	n	VEGF		P
		Positive	Negative	
BCL9	Positive	56	47	<0.01
	Negative	27	11	

大量事实证明如 Wnt 途径中成员 (APC、Axin 等) 发生突变和异常, 均可导致该途径的失活或异常激活, 使细胞或机体发生异常反应, 或者诱导与肿瘤有关的靶基因的转录, 最终导致肿瘤的发生. 本研究发现, 结肠癌中 BCL9 蛋白呈阳性表达, 而在癌旁正常结肠组织中不表达, 提示 BCL9 参与了结肠癌的发生; BCL9 蛋白在结肠癌中的表达率与病理分级、肿瘤浸润深度、Dukes 分期及有无淋巴结转移有关, 且在低分化结肠癌中的表达明显高于中分化结肠癌. 一方面提示 BCL9 蛋白异常表达可能与 Wnt 通路失活或异常激活、BCL9 基因突变、甲基化和翻译后修饰及以上这些方面共同作用有关, 从而促进肿瘤细胞增殖、转移和血管新生; 另一方面也提示 BCL9 基因可作为临床判定肿瘤恶性程度的新指标.

BCL9 在癌旁正常结肠组织中不表达而在结肠癌中明显表达, 这将为研发针对癌中 BCL9 的小分子抑制剂和抗体提供理论依据, 为临床上肿瘤的分子靶向治疗提供一个新靶点. 而针对 Wnt 通路中 wnt 蛋白复合物、下游靶基因和各种激活因子与配体的小分子抑制剂和抗体的研发主要阻碍在于 Wnt 通路在正常成人组织中的作用, 如干细胞的再生、伤口愈合、细胞增殖^[5].

VEGF 是促血管生成因子, 具有增加血管通透性和促进血管形成的作用^[11]. 本研究发现, VEGF 蛋白在结肠癌中的表达明显而癌旁正常结肠组织中不表达; VEGF 蛋白在结肠癌中的表达率与病理分级、肿瘤浸润深度无明显关系, 而与 Dukes 分期及有无淋巴结转移密切相关, 这与 Hideyasu Oh 等的研究结果一致^[12]. 以上结果提示 VEGF 蛋白可能参与了大肠癌的分化、淋巴管转移, 其机制可能是通过自分泌或旁分泌并与其相应的受体结合促进肿瘤血管新生和远处转移, 另 VEGF 可作为临床预测大肠癌病情进展的指标. 此外, 结肠癌中 VEGF 蛋白的表达随 BCL9 蛋白的表达升高而升高, 其机制可能是 BCL9 异常表达致 Wnt 途径失调, 上调下游靶基因 VEGF

的表达, 促进结肠癌细胞增殖、转移和血管生成, BCL9 对 VEGF 可能存在某种调节作用.

BCL9 和 VEGF 在大肠癌发生发展中具有重要作用. 然而, BCL9 在大肠癌中的异常表达及与 VEGF 的作用机制有待进一步研究, 以确定是否存在除了 Wnt 通路失活或异常激活、BCL9 基因突变、甲基化和翻译后修饰外的其他机制. BCL9 在人类多种肿瘤中表达, 它将成为与 Wnt 通路失调相关肿瘤治疗的一个新靶点.

参考文献 (References):

- [1] POLAKIS P. Wnt signaling and cancer[J]. Genes Dev, 2000, 14(15): 1837-1851.
- [2] KRAMPS T, PETER O, BRUNNER E, et al. Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear β -Catenin-TCF complex[J]. Cell, 2002, 109(1): 47-60.
- [3] DE LA ROCHE M, W ORM J, BIENZ M. The function of BCL9 in Wnt/ β -catenin signaling and colorectal cancer cells [J]. BMC Cancer, 2008, 199(8): 1-13.
- [4] SUSTMANN C, FLACH H, EASTMAN Q, et al. Cell-type-specific function of BCL9 involves a transcriptional activation domain that synergizes with β -catenin[J]. Molecular and Cellular Biology, 2008, 28(10): 3526-3537.
- [5] MALA M, DANIEL E C, KOHICHI T, et al. BCL9 promotes tumor progression by conferring enhanced proliferative, metastatic, and angiogenic properties to cancer cells[J]. Cancer Res, 2009, 69(19): 1-10.
- [6] BERNSTEIN C, BERNSTEIN H, PAYNE C M, et al. Field defects in progression to gastrointestinal tract cancers[J]. Cancer Lett, 2008, 260(1-2): 1-10.
- [7] SAKAMOTO I, OHWADA S, TOYA H, et al. Up-regulation of a BCL9-related β -catenin-binding protein, B9L, in different stages of sporadic colorectal adenoma[J]. Cancer Sci, 2007, 98(1): 83-87.
- [8] CORBIN M, AURELIEN D R, DAVID S R, et al. WNT/ β -catenin pathway activation in wilms tumors: a unifying mechanism with multiple entries?[J]. Genes, Chromosomes & Cancer, 2009, 48(9): 816-827.
- [9] TOYA H, OYAMA T, OHWADA S, et al. Immunohistochemical expression of the β -catenin-interacting protein B9L is associated with histological high nuclear grade and immunohistochemical ErbB2 / HER-2 expression in breast cancers[J]. Cancer Sci, 2007, 98(4): 484-490.
- [10] WILLIS T G, ZALCBERG I R, COIGNET L J A, et al. Molecular cloning of translocation t(1; 14)(q21; q32) defines a novel gene(BCL9) at chromosome 1q21[J]. Blood, 1998, 91(6): 1873-1881.
- [11] 李晓娟, 纪淑红. 综述 VEGF 的结构特征及生物学功能[J]. 中华临床医学研究杂志 (LI Xiao-juan, JI Shu-hong. Review the structural features and biological function of VEGF [J]. Chinaourna of Clinical Investigation), 2007, 13(3): 388.
- [12] OH H, TAKAGI H, OTANI A, et al. Selective induction of neuropilin-1 by vascular endothelial growth factor (VEGF): A mechanism contributing to VEGF-induced angiogenesis[J]. PNAS, 2002, 99(1): 383-388.