

· 临床研究 ·

## β-连环蛋白和生存素在老年结直肠腺癌患者中的表达及其意义

常建兰<sup>1\*</sup>, 于俊岩<sup>1</sup>, 王宇<sup>2</sup>, 郭红亮<sup>1</sup>, 田向阳<sup>1</sup>, 刘平<sup>1</sup>, 李璐璐<sup>1</sup>, 周文雅<sup>1</sup>

(长治医学院:<sup>1</sup> 附属和平医院肿瘤科,<sup>2</sup> 附属和济医院病理科, 长治 046000)

**【摘要】** 目的 检测β-连环蛋白(β-catenin)和生存素(survivin)蛋白在老年结直肠腺癌组织中的表达,分析其与老年结直肠腺癌患者性别、淋巴结转移以及肿瘤-淋巴结-转移(TNM)分期之间的关系,探讨β-catenin和survivin蛋白表达的相关性。**方法** 收集2015年1月至2017年12月在长治医学院附属和平医院及和济医院进行手术切除治疗的结直肠腺癌患者50例,将外科手术切除后的标本分为2组:癌组织组和正常组织组(距离癌组织边缘>2 cm,病理检测结果正常),每组50例。采用免疫组织化学法检测β-catenin和survivin蛋白表达。采用SPSS 22.0软件进行数据处理。组间比较采用Mann-Whitney *U*秩和检验。Spearman相关分析β-catenin蛋白表达与survivin蛋白表达的相关性。**结果** β-catenin蛋白在结直肠腺癌细胞膜、细胞浆及细胞核呈阳性表达,在老年癌组织组的阳性表达率显著高于正常组织组(64.0% vs 0.0%,  $P < 0.001$ ),其表达与性别无关( $P > 0.05$ ),与淋巴结转移及TNM分期相关( $P < 0.05$ )。survivin蛋白在结直肠腺癌细胞核呈阳性表达,在老年癌组织组的阳性表达率显著高于正常组织组(54.0% vs 0.0%,  $P < 0.001$ ),其表达与性别、TNM分期无关( $P > 0.05$ ),与淋巴结转移相关( $P < 0.05$ )。Spearman相关分析统计结果显示,老年结直肠腺癌患者的β-catenin蛋白表达与survivin蛋白表达呈显著正相关( $r = 0.645, P < 0.001$ )。**结论** β-catenin和survivin蛋白均参与老年结直肠腺癌的发生发展,可能共同促进老年结直肠腺癌的进展。

**【关键词】** 老年人;结直肠肿瘤;β-连环蛋白;生存素

**【中图分类号】** R735.3;R592

**【文献标志码】** A

**【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2019.05.067

## Expression of β-catenin and survivin in elderly colorectal cancer patients and its significance

CHANG Jian-Lan<sup>1\*</sup>, YU Jun-Yan<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>2</sup>, GUO Hong-Liang<sup>1</sup>, TIAN Xiang-Yang<sup>1</sup>, LIU Ping<sup>1</sup>, LI Lu-Lu<sup>1</sup>, ZHOU Wen-Ya<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Oncology, Affiliated Heping Hospital, <sup>2</sup>Department of Pathology, Affiliated Heji Hospital, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China)

**【Abstract】 Objective** To detect the expression of β-catenin and survivin proteins in colorectal adenocarcinoma tissues of elderly patients, and investigate the correlation of their expression with gender, lymph node metastasis and tumor-lymph node-metastasis (TNM) stage. **Methods** A total of 50 colorectal adenocarcinoma patients who underwent surgical resection in our hospital from January 2015 to December 2017 were recruited in this study. The obtained specimens were divided into cancer tissue group ( $n = 50$ ) and normal tissue group ( $n = 50$ , 2 cm away from the edge of the colorectal cancer mass, with microscopically normal tissue structure). The expression of β-catenin and survivin were detected by immunohistochemistry. SPSS statistics 22.0 was used for data analysis. Mann-Whitney *U* rank test was employed for comparison between 2 groups. Spearman test was applied to analyze the correlation of protein expression between β-catenin and survivin. **Results** β-catenin was mainly expressed in the membrane, cytoplasm and nucleus of colorectal adenocarcinoma cells, and its expression level was significantly higher in cancer tissues than normal tissues (64.0% vs 0.0%,  $P < 0.05$ ). Its expression was not related to gender ( $P > 0.05$ ), but was to lymph node metastasis and TNM stage ( $P < 0.001$ ). Survivin was located in the nuclei of colorectal cancer cells, and its expression was markedly higher in the colorectal cancer tissues than normal tissues (54.0% vs 0.0%,  $P < 0.001$ ). Its level had correlation with lymphatic invasion ( $P < 0.05$ ) but not with gender and TNM stage ( $P > 0.05$ ). Spearman correlation analysis showed that the protein expression of β-catenin was positively correlated to that of survivin in the elderly patients with colorectal adenocarcinoma ( $r = 0.645, P < 0.001$ ). **Conclusion** Both of β-catenin and survivin

收稿日期: 2019-01-01; 接受日期: 2019-02-03

基金项目: 国家自然科学基金(81800456); 长治医学院博士科研启动基金(BS15008)

通信作者: 常建兰, E-mail: changjianlan@163.com

are involved in the occurrence and development of colorectal cancer in elderly patients, and they may jointly promote its progression.

**【Key words】** aged; colorectal neoplasms;  $\beta$ -catenin; survivin

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81800456) and the Starting Fund for Doctorial Scientific Research of Changzhi Medical College (BS15008).

Corresponding author: CHANG Jian-Lan, E-mail: changjianlan@163.com

结直肠癌是全世界最常见的恶性肿瘤之一,发病率居世界第4位,死亡率居世界第2位,中国结直肠癌患者的发病率和死亡率逐年增加,每年发病人数仅次于肺癌<sup>[1]</sup>。美国国立癌症研究所流行病学监测数据库显示,结直肠癌患者中 $\geq 65$ 岁人群的患病率最高。目前结直肠癌的诊断和治疗手段有限,主要治疗方法包括手术、化疗、放疗、靶向治疗、生物治疗等,发现较早、身体状态良好的老年患者可从手术、化疗、放疗等治疗中获益更多,而身体状况较差的老年患者治疗方案的选择则受到一定的限制。靶向治疗的毒性相对较低,适用于更广泛的老年患者群体,因此,寻找有意义的靶点,可及早发现并有效治疗肿瘤,为老年结直肠癌患者提供更多的生存机会。

$\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)是Wnt(一类分泌型糖蛋白)信号通路中的一个重要组成分子,参与多种器官的形成,其表达失调是结直肠肿瘤形成的关键因素之一<sup>[2]</sup>。大多数结直肠肿瘤细胞中 $\beta$ -catenin过表达,但在结直肠癌侵袭前的细胞核内 $\beta$ -catenin也表达增加,同时伴有一定程度的胞内弥漫表达<sup>[3]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路是诱导生存素(survivin)表达的关键因子<sup>[4]</sup>。survivin是凋亡家族中的抑制因子,在细胞凋亡调控过程中发挥重要作用,是很好的肿瘤诊断和治疗候选基因,参与肿瘤相关的多种功能调节,包括肿瘤细胞生长、凋亡和放疗抵抗等<sup>[5-7]</sup>,因此针对survivin的靶向治疗是肿瘤基因治疗的一个方向。目前 $\beta$ -catenin和survivin蛋白在老年结直肠腺癌中的价值有待进一步研究。本研究通过免疫组织化学检测老年结直肠腺癌组织中 $\beta$ -catenin和survivin蛋白的表达情况,分析二者与性别、淋巴结转移、肿瘤-淋巴结-转移(tumor-lymph node-metastasis, TNM)分期之间的关系。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

收集2015年1月至2017年12月在长治医学院附属和平医院及和济医院进行手术切除治疗的结直肠腺癌患者50例,其中男性25例,女性25例,年龄65~78(68.4 $\pm$ 2.7)岁,根据第8版美国癌症联合

委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)结直肠癌分期进行TNM分期<sup>[8]</sup>: I期5例、II期10例、III期29例、IV期6例。纳入标准:(1)经组织病理学确诊为结直肠腺癌;(2)术前均未接受过放疗、化疗、靶向治疗等。排除标准:(1)结直肠腺癌家族史;(2)肿瘤史。将外科手术切除后的标本分为2组:癌组织组和正常组织组(距离癌组织边缘 $> 2$  cm,病理检测结果正常),每组50例。

### 1.2 主要试剂与仪器

$\beta$ -catenin抗体购自SANTA CRUZ公司,survivin抗体购自Abcam公司,相应的二抗、通用型二步法免疫组织化学检测试剂盒、DAB显色试剂盒等均购自北京中杉金桥公司。莱卡石蜡切片机(德国Leica RM2235)。

### 1.3 免疫组织化学染色

采用10%福尔马林固定组织,常规石蜡包埋,4  $\mu$ m连续切片,逐级脱蜡脱水后,磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)冲洗,抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,PBS冲洗后滴加正常的非免疫动物血清,室温孵育10 min。每张玻片加50  $\mu$ l的稀释一抗,将其置于密封湿盒中4 $^{\circ}$ C过夜,PBS冲洗后,加二抗室温孵育20 min,PBS冲洗后二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)染色,苏木素复染,中性树胶封片。切片判读由2名病理科医师采用双盲法独立完成,随机选取5个高倍镜视野,染色强度评分:不显色或显色不清为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。阳性细胞所占百分比评分:未见阳性细胞为0分, $\leq 25\%$ 为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分, $> 75\%$ 为4分。上述两项评分相加为总评分,0分为阴性(-),1~3分为弱阳性(+),4~5分为中度阳性(++), $\geq 6$ 分为强阳性(+++)。总分值 $< 3$ 分的视为阴性表达,总分值 $\geq 3$ 分视为阳性表达<sup>[9]</sup>。

### 1.4 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行数据处理。计数资料以例数(百分率)表示,组间比较采用Mann-Whitney  $U$ 秩和检验。Spearman相关分析 $\beta$ -catenin蛋白表达与survivin蛋白表达的相关性。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 β-catenin 和 survivin 蛋白在癌组织组和正常组织组的表达

在正常组织组中,β-catenin 和 survivin 蛋白均呈阴性表达,阳性表达率均为 0.0%(0/50);在癌组织组中,β-catenin 和 survivin 蛋白阳性表达率分别为 64.0%(32/50)和 54.0%(27/50),均显著高于正常组织组( $P<0.001$ )。β-catenin 在老年结直肠腺癌细胞膜、细胞浆及细胞核均可呈阳性表达,在正常组织细胞膜弱阳性表达;survivin 在老年结直肠腺癌细胞核呈阳性表达,在正常组织细胞核阴性表达(图 1)。

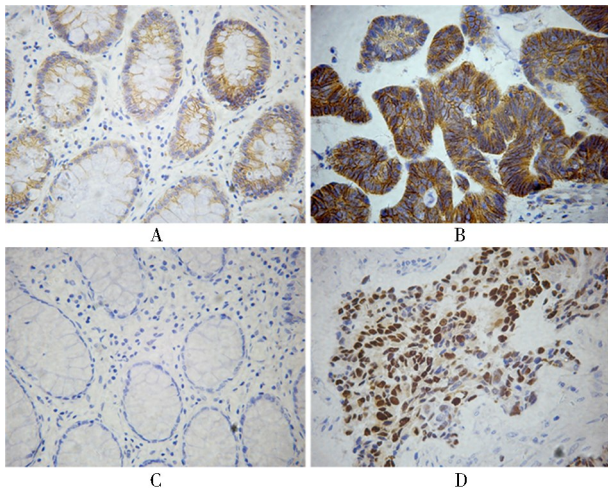


图 1 免疫组织化学法检测 2 组 β-catenin 和 survivin 表达  
Figure 1 Detection of β-catenin and survivin in two groups by immunohistochemistry (DAB ×40)

A: expression of β-catenin in normal tissue group; B: expression of β-catenin in cancer tissue group; C: expression of survivin in normal tissue group; D: expression of survivin in cancer tissue group.

### 2.2 β-catenin 和 survivin 蛋白表达与老年结直肠腺癌临床病理特征的关系

β-catenin 表达与老年结直肠腺癌患者的性别无关,与淋巴结转移情况及 TNM 分期相关( $P<0.05$ ),淋巴结转移的结直肠腺癌患者 β-catenin 表达增高,TNM 分期越晚的患者 β-catenin 表达越高。survivin 蛋白表达与老年结直肠腺癌患者的性别和 TNM 分期无关,与淋巴结转移情况相关( $P<0.05$ ),淋巴结转移的结直肠腺癌患者 survivin 蛋白表达高(表 1)。

### 2.3 β-catenin 蛋白表达与 survivin 蛋白表达的相关性

Spearman 相关分析统计结果显示,老年结直肠腺癌患者的 β-catenin 蛋白表达与 survivin 蛋白表达呈显著正相关( $r=0.645, P<0.001$ )。

表 1 β-catenin 和 survivin 蛋白表达与老年结直肠腺癌临床病理特征的关系

Table 1 Relationship between the expression of β-catenin and survivin and the clinicopathologic features in elderly colorectal cancer patients

Item	n	β-catenin		Survivin	
		Positive [n(%)]	P value	Positive [n(%)]	P value
Gender			1.000		0.779
Male	25	16(64.0)		14(56.0)	
Female	25	16(64.0)		13(52.0)	
Lymphatic invasion			0.017		0.013
Yes	33	25(75.8)		22(66.7)	
No	17	7(41.2)		5(29.4)	
TNM stage			0.026		0.129
I	5	1(20.0)		3(60.0)	
II	10	4(40.0)		4(40.0)	
III	29	22(75.9)		19(65.5)	
IV	6	5(83.3)		1(16.7)	

## 3 讨论

结直肠癌是常见的恶性肿瘤,年龄是与结直肠癌密切相关的高危因素。美国国立卫生研究院将全球结直肠癌患者分为<50岁、50~64岁和>65岁3组进行调查统计,结果显示,在亚洲人群中,>65岁者结直肠癌患病率最高<sup>[10]</sup>。因此,老年结直肠腺癌患者诊断和治疗方法亟待进一步提高,探索老年结直肠腺癌患者中有意义的差异表达蛋白,可为临床诊断和靶向治疗提供理论依据。

研究表明,90%以上的结直肠癌患者中存在 Wnt 经典信号通路的激活,Wnt 信号通路是参与结直肠癌诊断和治疗的重要通路之一<sup>[11,12]</sup>。β-catenin 是 Wnt 经典信号通路中重要的分子,在结直肠癌侵袭前的细胞核内即可检测到 β-catenin 高表达,可使癌细胞具备上皮间质转变能力,进而导致肿瘤细胞的浸润和转移<sup>[13]</sup>。本研究结果表明,老年癌组织中 β-catenin 蛋白表达增加,而且淋巴结转移者的 β-catenin 蛋白表达显著高于无淋巴结转移者,TNM 分期越晚的患者 β-catenin 表达越高。提示 β-catenin 参与了老年结直肠腺癌的发生和发展,并且可能和淋巴结转移情况密切相关。

survivin 是细胞凋亡基因家族的抑制蛋白,在成人正常组织中低表达,在大多数肿瘤组织中高表达。survivin 高表达与肿瘤的生长、治疗抵抗等密切相关。survivin 可通过抑制半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)和 caspase-9 抑制肿瘤细胞凋亡,加速肿瘤发生发展<sup>[14]</sup>,通过抑制 Fas(细胞凋亡相关的膜表



面分子)介导的细胞凋亡抑制免疫系统<sup>[15]</sup>。survivin具有抗凋亡和破坏免疫系统等作用,是很好的肿瘤基因治疗靶标。有证据表明,在大多数恶性肿瘤中,细胞毒性化疗药物和 survivin 的表达之间存在着某种联系,靶向阻断 survivin 结合化疗和放疗,可以减少化疗耐药和放疗抵抗<sup>[16]</sup>。本研究结果显示,老年癌组织中 survivin 表达增加,淋巴结转移患者的 survivin 表达更高,提示 survivin 和老年患者结直肠癌的发生、转移密切相关,可作为老年结直肠癌诊断和治疗的靶标。

一项关于结直肠癌的研究数据显示,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的抑制剂 Wnt 抑制子 1 (inhibitors of Wnt response-1, IWR-1) 可通过降解 survivin 来抑制  $\beta$ -catenin 参与的结直肠癌上皮间充质转化<sup>[17]</sup>。本研究发现,老年结直肠癌患者  $\beta$ -catenin 蛋白表达与 survivin 蛋白表达呈正相关。提示  $\beta$ -catenin 和 survivin 蛋白可能共同促进老年结直肠癌发生、发展和转移。我们将进一步扩大样本量,深入研究老年结直肠癌患者  $\beta$ -catenin 和 survivin 蛋白之间具体的相互调控关系及可能的作用机制,为老年结直肠癌患者诊断和联合靶向治疗提供参考。

## 【参考文献】

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- [2] Behrens J, Lustig B. The Wnt connection to tumorigenesis[J]. Int J Dev Biol, 2004, 48(5-6): 477-487. DOI: 10.1387/ijdb.041815jb.
- [3] 常建兰, 李祖国, 王晓燕, 等. P53、malat 1、ki-67 和  $\beta$ -catenin 基因 mRNA 检测在大肠癌分子诊断中的意义[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(34): 3849-3854. DOI: 10.11569/wcjd.v16.i34.3849.  
Chang JL, Li ZG, Wang XY, et al. Detection of P53, malat 1, ki-67 and  $\beta$ -catenin mRNA expression and its significance in molecular diagnosis of colorectal carcinoma[J]. World Chin J Dig, 2008, 16(34): 3849-3854. DOI: 10.11569/wcjd.v16.i34.3849.
- [4] Ma H, Nguyen C, Lee KS, et al. Differential roles for the coactivators CBP and p300 on TCF/ $\beta$ -catenin-mediated survivin gene expression[J]. Oncogene, 2005, 24(22): 3619-3631. DOI: 10.1038/sj.onc.1208433.
- [5] Kanwar JR, Kamalapuram SK, Kanwar RK. Targeting survivin in cancer: the cell-signalling perspective[J]. Drug Discov Today, 2011, 16(11-12): 485-494. DOI: 10.1016/j.drudis.2011.04.001.
- [6] Favarsani A, Vaira V, Moro GP, et al. Survivin family proteins as novel molecular determinants of doxorubicin resistance in organotypic human breast tumors[J]. Breast Cancer Res, 2014, 16(3): R55. DOI: 10.1186/bcr3666.
- [7] Wang D, Jiao C, Zhu Y, et al. Activation of CXCL12/CXCR4 renders colorectal cancer cells less sensitive to radiotherapy via up-regulating the expression of survivin[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2017, 242(4): 429-435. DOI: 10.1177/1535370216675068.
- [8] 姚宏伟, 吴鸿伟, 刘荫华. 美国癌症联合委员会第八版结直肠癌分期更新及其“预后和预测”评价体系[J]. 中华胃肠外科杂志, 2017, 20(1): 24-27.  
Yao HW, Wu HW, Liu YH. A predicted and prognostic evaluation analysis using the 8th edition of American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system for colorectal cancer[J]. Chin J Gastrointest Surg, 2017, 20(1): 24-27.
- [9] 姜素, 田文艳, 闫晔, 等. 迁移侵袭抑制蛋白和 p21 活化激酶 1 在子宫内膜癌中的表达及其临床意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2018, 40(5): 359-364. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2018.05.008.  
Jiang S, Tian WY, Yan Y, et al. Expression and clinical significance of MIP and PAK1 in endometrial carcinoma[J]. Chin J Oncol, 2018, 40(5): 359-364. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2018.05.008.
- [10] 陈亚君, 张维璐, 何玉红. 结直肠癌高危因素研究进展[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2018, 17(9): 704-707. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2018.09.162.  
Chen YJ, Zhang WL, He YH. Research progress in risk factors for colorectal cancer[J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly, 2018, 17(9): 704-707. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2018.09.162.
- [11] Nazemalhosseini Mojarad E, Kashfi SM, Mirtalebi H, et al. Prognostic significance of nuclear beta-catenin expression in patients with colorectal cancer from Iran[J]. Iran Red Crescent Med J, 2015, 17(7): e22324. DOI: 10.5812/iremj.22324v2.
- [12] Serafino A, Moroni N, Zonfrillo M, et al. Wnt-pathway components as predictive markers useful for diagnosis, prevention and therapy in inflammatory bowel disease and sporadic colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2014, 5(4): 978-992. DOI: 10.18632/oncotarget.1571.
- [13] Hao L, Zhao Y, Wang Z, et al. Expression and clinical significance of SALL 4 and beta-catenin in colorectal cancer[J]. J Mol Histol, 2016, 47(2): 117-128. DOI: 10.1007/s10735-016-9656-5.
- [14] Fulda S, Vucic D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer[J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(2): 109-124. DOI: 10.1038/nrd3627.
- [15] Asanuma K, Tsuji N, Endoh T, et al. Survivin enhances Fas ligand expression via up-regulation of specificity protein 1-mediated gene transcription in colon cancer cells[J]. J Immunol, 2004, 172(6): 3922-3929. DOI: 10.4049/jimmunol.172.6.3922.
- [16] Shamsabadi FT, Eidgahi MR, Mehrbod P, et al. Survivin, a promising gene for targeted cancer treatment[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(8): 3711-3719.
- [17] Lee SC, Kim OH, Lee SK, et al. IWR-1 inhibits epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells through suppressing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling as well as survivin expression[J]. Oncotarget, 2015, 6(29): 27146-27159. DOI: 10.18632/oncotarget.4354.