

结肠癌组织 Smad4 蛋白表达的意义

肖德胜, 李景和, 傅春燕, 文继舫

肖德胜, 李景和, 傅春燕, 文继舫, 中南大学湘雅医学院病理学教研室
湖南省长沙市 410078
肖德胜, 男, 1970-12-25 生, 湖南省双峰县人, 汉族. 2001 年中南大学湘雅
医学院硕士毕业, 现为该院博士生, 讲师. 主要从事消化道肿瘤病理研究.
项目负责人: 文继舫, 410078, 湖南省长沙市湘雅路 88 号, 中南大学湘雅医
学院病理学教研室. jifangwen@hotmail.com
电话: 0731-2355098
收稿日期: 2003-12-12 接受日期: 2004-02-01

Expression and significance of Smad4 in colorectal carcinoma tissue

De-Sheng Xiao, Jing-He Li, Chun-Yan Fu, Ji-Fang Wen

De-Sheng Xiao, Jing-He Li, Chun-Yan Fu, Ji-Fang Wen, Department of
Pathology, Xiangya School of Medicine, Central South University,
Changsha 410078, Hunan Province, China
Correspondence to: Ji-Fang Wen, Department of Pathology, Xiangya
School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, Hunan
Province, China. jifangwen@hotmail.com
Received: 2003-12-12 Accepted: 2004-02-01

Abstract

AIM: To investigate the role of Smad4 protein in colorectal
carcinogenesis.

METHODS: Expression of Smad4 was detected in 70 cases
of normal tissues and colorectal tumor by a streptavidin-
peroxidase conjugation method (S-P).

RESULTS: Smad4 expression was significantly lower in
colorectal carcinoma ($n=52$) than that in the normal tissues
($n=7$) and was related to the tumor stages, differentiation
and metastasis (lymph node or blood) ($P<0.05$).

CONCLUSION: Down-regulation of Smad4 expression may
be associated with the carcinogenesis, and Smad4 may play
a role in invasion and metastasis of colorectal carcinoma.

Xiao DS, Li JH, Fu CY, Wen JF. Expression and significance of Smad4
in colorectal carcinoma tissue. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):
1065-1068

摘要

目的: 探讨 Smad4 在结肠癌发生、发展过程中的作用。

方法: 采用免疫组化 S-P 法检测 70 例正常结肠黏膜组织和
结肠肿瘤组织中 Smad4 的表达。

结果: 结肠癌($n=52$)中 Smad4 的表达水平明显低于正常结肠
黏膜($n=7$), 并与肿瘤分期、分化程度及转移有关($P<0.05$)。

结论: Smad4 的低表达可能与结肠癌的发生、发展过程有
关, 并可能在结肠癌浸润和转移中发挥作用。

肖德胜, 李景和, 傅春燕, 文继舫. 结肠癌组织 Smad4 蛋白表达的意义. 世界
华人消化杂志 2004;12(5):1065-1068

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1065.asp>

0 引言

转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)
超家族在机体的免疫调节、细胞生长和分化、细胞外基
质的合成和储存、胚胎发育、创伤修复等方面发挥着十
分重要的作用^[1-5]. TGF- β 是机体上皮细胞生长、增生
和分化强有力的抑制因子, 但是上皮源性的恶性肿瘤
细胞丧失了对 TGF- β 的反应性而逃避 TGF- β 的生长抑
制作用, 结果导致肿瘤发生^[6-8]. Smad4 是 TGF- β 信号
转导途径的中心分子, 几乎所有生物学效应均是 Smad4
与不同的 Smads 蛋白相互作用的结果^[9-12]. Smad4 是
DPC4 的基因产物. 最近有文献报道, 伴远处转移的浸
润癌和远处转移病灶其 DPC4 突变频率明显高于腺瘤和
黏膜内癌, 且有显著性差异($P=0.006-0.001$), 说明
DPC4 的突变与结肠癌的恶性进展, 如远处转移有关.
另有文献报道 Smad4 蛋白表达异常可能有利于结肠癌
的浸润和转移^[13-16]. 我们用免疫组织化学 S-P 法检测
Smad4 蛋白的表达情况, 旨在探讨 Smad4 在结肠癌癌
变机制中可能的作用, 并阐明 Smad4 与结肠癌浸润和
转移的关系如下。

1 材料和方法

1.1 材料 我校 1996/2001 年结肠肿瘤及正常结肠黏膜
存档蜡块共 70 例, 每例皆有完整病历和病理资料, 并
经病理诊断核实. 所有标本经 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包
埋, 5 μ m 连续切片. 正常结肠黏膜 7 例, 腺瘤 11 例,
高分化腺癌 13 例, 低分化腺癌 25 例, 癌转移(经淋
巴道及血道)14 例; Dukes A、B 期 38 例, C、D 期 14
例; 男 45 例, 女 25 例; 小于 60 岁 39 例, 大于或等
于 60 岁 31 例. 鼠抗人 Smad4 单克隆抗体为 neomarkers
公司产品, 使用稀释度 1:50; S-P 试剂盒及 DAB 显色试
剂盒由北京中山公司提供。

1.2 方法 采用 S-P 免疫组化法, 按试剂盒说明书进行
操作. 以 Smad4 阳性的正常胰腺组织作阳性对照, 以
PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照. 以细胞质、胞核出现
棕黄色颗粒为阳性. 根据切片中阳性细胞数及染色反应
强度分为 4 级并评分^[17-18]: 阴性(0 分), 细胞不着色或阳
性细胞数小于 25%; 弱阳性(1 分), 细胞内出现浅棕黄
色颗粒或阳性细胞数为 25-50%; 阳性(2 分), 细胞内出

现棕黄色颗粒或阳性细胞数为 50-75%; 强阳性(3分), 细胞内出现深棕黄色颗粒或阳性细胞数为 大于 75%. 每张切片选取 10 个视野进行评分, 取平均值作为评分结果.

统计学处理 两组样本之间采用 t 检验.

2 结果

2.1 Smad4在结肠肿瘤中的表达 Smad4蛋白阳性信号定位于细胞质及胞核. 在正常结肠黏膜和结肠腺瘤中, Smad4 呈强阳性表达, 阳性细胞分布在黏膜全层中(图 1, 2). 在结肠癌组织中, Smad4 蛋白表达下降, 其分布及着色程度呈异质性, 其中高分化腺癌尚有部分表达(图 3), 低分化腺癌及转移癌表达明显下降, 有的甚至无表达(图 4-6).

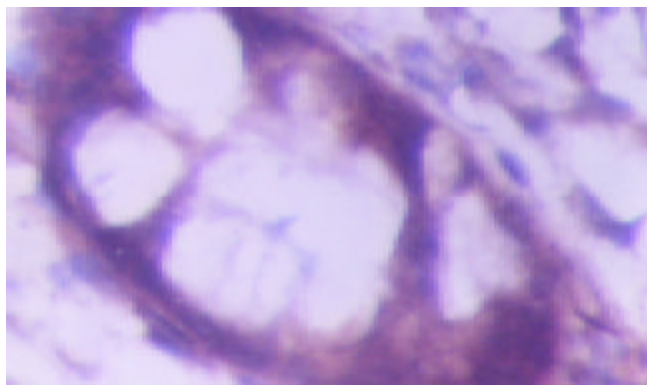


图1 正常结肠黏膜胞质及胞核 Smad4 强阳性 SP×200.

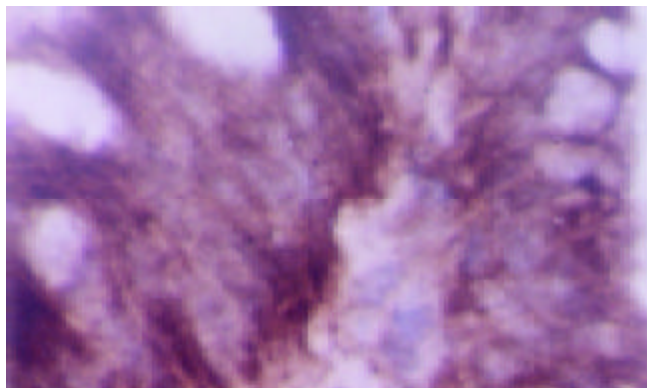


图2 结肠腺瘤胞质及胞核 Smad4 强阳性 SP×200.



图3 结肠高分化腺癌胞质 Smad4 阳性 SP×200.

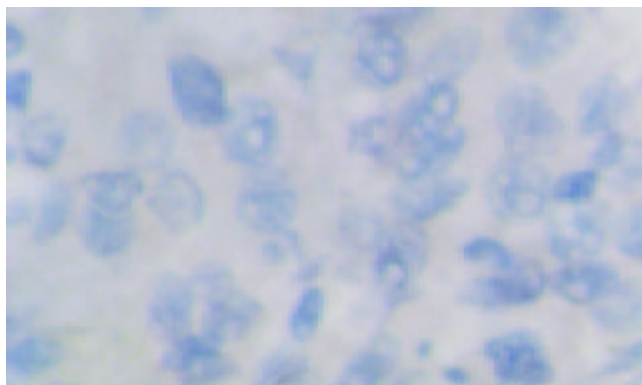


图4 结肠低分化腺癌胞质 Smad4 阴性 SP×200.

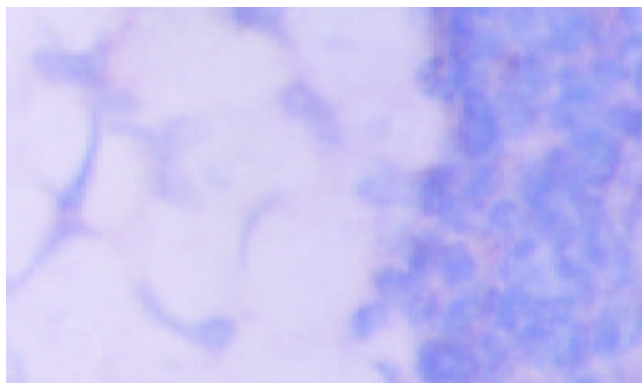


图5 结肠癌淋巴结转移 Smad4 阴性 SP×200.

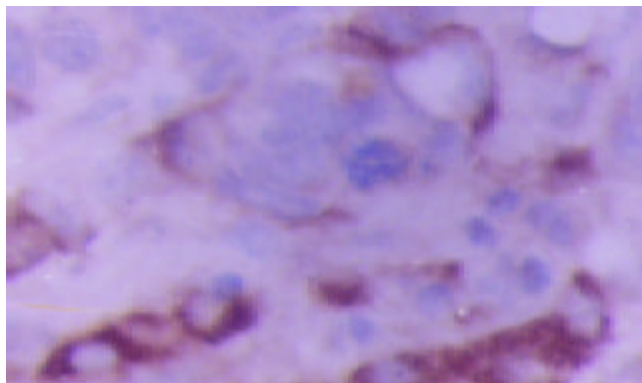


图6 结肠癌转移 Smad4 弱阳性 SP×200. (左上角为结肠癌组织, Smad4 蛋白表达呈弱阳性; 右下角为肝组织, Smad4 蛋白表达呈强阳性).

2.2 Smad4蛋白与结肠癌生物学行为的关系 Smad4蛋白在结肠肿瘤中的表达与肿瘤分期、分化程度及转移有关(表 1). Smad4 蛋白在正常结肠黏膜和腺瘤中全部表达, 且呈强阳性表达, 而在高分化腺癌、低分化腺癌及转移癌中均有较明显下降, 有的甚至不表达. 正常结肠黏膜与腺瘤比较, Smad4 蛋白表达无显著性差异($P > 0.05$); 与正常结肠黏膜比较, 在高分化腺癌、低分化腺癌及转移癌中 Smad4 蛋白表达均有显著性差异($P < 0.05$). 与低分化腺癌比较, 高分化腺癌 Smad4 蛋白表达较强, 有显著性差异($P < 0.05$); 与 A, B 期结肠癌比较, C, D 期结肠癌 Smad4 蛋白表达弱, 有显著性差异($P < 0.05$); Smad4 蛋白表达与结肠癌患者的性别、年龄均无统计学意义($P > 0.05$).

表 1 人结肠癌 Smad4 蛋白表达与临床病理参数的关系

| 病理参数 | n | mean ± SD |
|-------------|----|---------------------------|
| 正常结肠黏膜 | 7 | 2.86 ± 0.24 |
| 结肠腺瘤 | 11 | 2.56 ± 0.45 |
| 高分化结肠腺癌 | 13 | 1.66 ± 0.73 ^{ac} |
| 低分化结肠腺癌 | 25 | 1.11 ± 0.78 ^a |
| 癌转移 | 14 | 1.00 ± 0.78 ^a |
| DukesA, B 期 | 38 | 1.49 ± 0.70 |
| DukesC, D 期 | 14 | 1.00 ± 0.79 |
| 男 | 45 | 1.57 ± 0.97 |
| 女 | 25 | 1.60 ± 0.92 |
| 年龄(岁) <60 | 39 | 1.49 ± 0.99 |
| 年龄(岁) ≥ 60 | 31 | 1.70 ± 0.89 |

^aP <0.05, vs 正常结肠黏膜; ^cP <0.05, vs 低分化腺癌.

3 讨论

TGF- β 信号转导途径的失控可能会丧失对细胞的生长抑制而导致肿瘤的发生^[19]. DPC4 的失活被认为是引起生长抑制丧失的一个重要原因, 可概括为: (1)染色体片段的丢失, 包括杂合型缺失或纯合型缺失; (2)基因突变, 如移码突变、无义突变、错义突变等; (3)基因表达水平异常, 即表达水平低下或缺乏^[20]. DPC4 被认为是一种肿瘤抑制基因^[21-25], 大约 50% 的胰腺癌, 30% 的结肠癌其 DPC4 发生了突变^[26-28]. DPC4 功能的失活能够导致肿瘤的发生, 在 DPC4 功能缺陷的肿瘤细胞株中通过 DPC4 表达的重建, 使之重新获得了抑制肿瘤形成的能力. 目前不少学者认为 DPC4 的失活发生在肿瘤进展的后期, 属于晚期分子事件, 并与肿瘤的浸润和转移密切相关^[29-33]. DPC4 作为候选的肿瘤抑制基因, 对其功能的研究存在二个问题^[34]: (1)DPC4 基因的蛋白产物 Smad4 在结肠癌中的表达情况, 国内外尚未见文献报道; (2) Smad4 蛋白的表达情况与结肠癌临床生物学行为的关系研究在国内外亦未见相关的文献报道.

我们研究结果表明, Smad4 在正常结肠黏膜中均有强的表达, 而在高分化腺癌、低分化腺癌及转移癌(淋巴道或血道)中表达均明显下降, 有的甚至无表达, 其差异均有显著性. 低分化腺癌与高分化腺癌比较, Smad4 蛋白表达有明显下降(P <0.05); C, D 期结肠癌与 A, B 期结肠癌比较, Smad4 蛋白的表达亦有明显下降(P <0.05); 表明 Smad4 蛋白在结肠肿瘤中的表达情况与肿瘤分期、分化程度及转移有关. Smad4 蛋白表达水平下降或缺乏削弱了 TGF- β 信号转导途径, 减弱或丧失了对细胞的生长抑制作用, 从而导致肿瘤的发生. Smad4 蛋白表达水平的下降或缺乏可能是由染色体片段丢失(杂合型缺失或纯合型缺失)或基因突变(移码突变、无义突变、错义突变等)引起的. DPC4 的失活可能发生在肿瘤进展的后期, 属于晚期分子事件, 并

参与肿瘤的浸润和转移. 此外, Smad4 蛋白的表达与结肠癌患者的性别、年龄均无统计学意义(P >0.05); 正常结肠黏膜与腺瘤比较, Smad4 蛋白的表达差异不明显(P >0.05). 表明 Smad4 可能具有抑制结肠癌细胞生长及抑制结肠癌浸润和转移的作用, 提示 Smad4 可能参与了结肠癌的演进过程, 有利于加深我们对结肠癌癌变机制的理解.

一般认为, 结肠癌的发生是一个长期的多因素形成的分阶段的过程. 从结肠黏膜上皮过度增生→不典型增生→结肠癌的演进过程中, 关键的步骤是癌基因的突变和抑癌基因的失活, 本结果表明 DPC4 的失活可能与结肠癌的发生和转移有关, 但 DPC4 失活绝不是导致结肠癌发生的惟一因素, 必定还有许多其他基因或因素的参与, 那么这些基因或因素是什么, 他们之间是如何相互作用的, 这些问题有待进一步的研究.

4 参考文献

- Wei HS, Li DG, Lu HM, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Zhang J, Cheng JL, Xu QF. Effects of AT1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl₄. *World J Gastroenterol* 2000;6:540-545
- Huang GC, Zhang JS, Zhang YE. Effects of retinoic acid on proliferation, phenotype and expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in TGF- β 1-stimulated rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2000;6:819-823
- Huang X, Li DG, Wang ZR, Wei HS, Cheng JL, Zhan YT, Zhou X, Xu QF, Li X, Lu HM. Expression changes of activin A in the development of hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:37-41
- Fang DC, Yang SM, Zhou XD, Wang DX, Luo YH. Telomere erosion is independent of microsatellite instability but related to loss of heterozygosity in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:522-526
- Xiong B, Gong LL, Zhang F, Hu MB, Yuan HY. TGF β 1 expression and angiogenesis in colorectal cancer tissue. *World J Gastroenterol* 2002;8:496-498
- Yang X, Li C, Herrera PL, Deng CX. Generation of Smad4/Dpc4 conditional knockout mice. *Genesis* 2002;32:80-81
- Miyaki M, Kuroki T. Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:799-804
- Cattaneo M, Orlandini S, Beghelli S, Moore PS, Sorio C, Bonora A, Bassi C, Talamini G, Zamboni G, Orlandi R, Menard S, Bernardi LR, Biunno I, Scarpa A. SEL1L expression in pancreatic adenocarcinoma parallels SMAD4 expression and delays tumor growth in vitro and in vivo. *Oncogene* 2003;22:6359-6368
- Grady WM, Markowitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002;3:101-128
- Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W. Smad4 transcriptional pathways and angiogenesis. *Int J Gastrointest Cancer* 2002;31:47-59
- Lin X, Liang M, Liang YY, Brunicardi FC, Melchior F, Feng XH. Activation of transforming growth factor- β signaling by SUMO-1 modification of tumor suppressor Smad4/DPC4. *J Biol Chem* 2003;278:18714-18719
- Lin X, Liang M, Liang YY, Brunicardi FC, Feng XH. SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem* 2003;278:31043-31048
- Yamaguchi A. Genetic changes in liver metastasis of colorectal cancer and their clinical application. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2001;102:370-375
- Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M, Hishima T, Koike M, Shitara N, Iwama T, Utsunomiya J, Kuroki T, Mori T. Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* 1999;18:3098-3103

- 15 Mikami T, Ookawa K, Shimoyama T, Fukuda S, Saito H, Munakata A. KAI1, CAR, and Smad4 expression in the progression of colorectal tumor. *J Gastroenterol* 2001;36:465-469
- 16 Maitra A, Molberg K, Albores-Saavedra J, Lindberg G. Loss of Dpc4 expression in colonic adenocarcinomas correlates with the presence of metastatic disease. *Am J Pathol* 2000;157:1105-1111
- 17 李保森, 游绍莉, 赵志海, 辛绍杰, 赵景民, 王松山. 实验性肝纤维化形成过程中几种基质金属蛋白酶表达的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:483-485
- 18 金中元, 程瑞雪, 郑长黎, 郑晖. 原发性肝细胞癌中 PTTG 和 c-myc 基因表达的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1677-1681
- 19 Hu JY, Wang S, Zhu JG, Zhou GH, Sun QB. Expression of B7 costimulation molecules by colorectal cancer cells reduces tumorigenicity and induces anti-tumor immunity. *World J Gastroenterol* 1999;5:147-151
- 20 McCarthy DM, Hruban RH, Argani P, Howe JR, Conlon KC, Brennan MF, Zahurak M, Wilentz RE, Cameron JL, Yeo CJ, Kern SE, Klimstra DS. Role of the DPC4 tumor suppressor gene in adenocarcinoma of the ampulla of Vater: analysis of 140 cases. *Mod Pathol* 2003;16:272-278
- 21 Pizzi S, Azzoni C, Bassi D, Bottarelli L, Milione M, Bordini C. Genetic alterations in poorly differentiated endocrine carcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer* 2003;98:1273-1282
- 22 Schwarte-Waldhoff I, Klein S, Blass-Kampmann S, Hintelmann A, Eilert C, Dreschers S, Kalthoff H, Hahn SA, Schmiegel W. DPC4/SMAD4 mediated tumor suppression of colon carcinoma cells is associated with reduced urokinase expression. *Oncogene* 1999;18:3152-3158
- 23 Schwarte-Waldhoff I, Volpert OV, Bouck NP, Sipos B, Hahn SA, Klein-Scory S, Luttges J, Kloppel G, Graeven U, Eilert-Micus C, Hintelmann A, Schmiegel W. Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:9624-9629
- 24 Cao WX, Cheng QM, Fei XF, Li SF, Yin HR, Lin YZ. A study of preoperative methionine-depleting parenteral nutrition plus chemotherapy in gastric cancer patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:255-258
- 25 肖德胜, 文继舫, 李景和, 胡忠良, 郑晖, 傅春燕. DPC4 基因转染对结肠癌细胞生物学行为的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:1004-1008
- 26 Xia NS, Yang HJ, Zhang J, Lin CQ, Wang YB, Wang J, Zhan MY, Ng MH. Prokaryotical expression of structural and non-structural proteins of hepatitis G virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:642-646
- 27 Xu HY, Yang YL, Gao YY, Wu QL, Gao GQ. Effect of arsenic trioxide on human hepatoma cell line BEL-7402 cultured in vitro. *World J Gastroenterol* 2000;6:681-687
- 28 Tascilar M, Skinner HG, Rosty C, Sohn T, Wilentz RE, Offerhaus GJ, Adsay V, Abrams RA, Cameron JL, Kern SE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:4115-4121
- 29 Barbera VM, Martin M, Marinoso L, Munne A, Carrato A, Real FX, Fabre M. The 18q21 region in colorectal and pancreatic cancer: independent loss of DCC and DPC4 expression. *Biochim Biophys Acta* 2000;1502:283-296
- 30 Schneider G, Schmid RM. Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer* 2003;2:15
- 31 Cowgill SM, Muscarella P. The genetics of pancreatic cancer. *Am J Surg* 2003;186:279-286
- 32 Moore PS, Beghelli S, Zamboni G, Scarpa A. Genetic abnormalities in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2003;2:7
- 33 Ohtaki N, Yamaguchi A, Goi T, Fukaya T, Takeuchi K, Katayama K, Hirose K, Urano T. Somatic alterations of the DPC4 and Madr2 genes in colorectal cancers and relationship to metastasis. *Int J Oncol* 2001;18:265-270
- 34 Xu X, Brodie SG, Yang X, Im YH, Parks WT, Chen L, Zhou YX, Weinstein M, Kim SJ, Deng CX. Haploid loss of the tumor suppressor Smad4/Dpc4 initiates gastric polyposis and cancer in mice. *Oncogene* 2000;19:1868-1874

World Journal of Gastroenterology 2005 年将改为周刊

《World Journal of Gastroenterology, WJG》是我国消化病学领域中惟一以全英文发表原创性论文的国际性学术期刊. WJG 创刊于 1995 年, 原名《China National Journal of New Gastroenterology》, 1998 年更名为 WJG, 由世界胃肠病学杂志社出版. WJG 国际标准刊号 ISSN 1007-9327, 国内统一刊号 CN 14-1219/R, 月刊, 大 16 开, 256 页, 邮发代号 82-261, 北京报刊发行局发行. 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 以及日益增多的国际科技交流的需要, 从 2005 年开始, WJG 将由半月刊改为周刊, 大 16 开, 160 页, 每月 7、14、21、28 日出版.