

ER β 和VEGF在大肠癌中的表达及临床意义

李建文, 陶凯雄, 蔡开琳

■背景资料

雌激素可能影响大肠癌的发生,但机制尚不明确。近年来,大肠黏膜细胞中也发现了ER β 的表达,为人们所关注。大量文献报道ER β 在乳腺、子宫、卵巢、前列腺等雌激素靶器官肿瘤发生、发展中的作用,而对大肠癌中ER β 表达的研究并不多。本文检测ER β 、VEGF在大肠癌中的表达,探讨其在大肠癌发生、发展中的作用。

李建文, 陶凯雄, 蔡开琳, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科 湖北省武汉市 430022

国家自然科学基金资助项目, No. 30500488

通讯作者: 蔡开琳, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科。

caikailin@yahoo.com.cn

电话: 027-85351619

收稿日期: 2007-03-22 修回日期: 2007-08-12

Expression and clinical significance of estrogen receptor β and vascular endothelial growth factor in colorectal carcinoma

Jian-Wen Li, Kai-Xiong Tao, Kai-Lin Cai

Jian-Wen Li, Kai-Xiong Tao, Kai-Lin Cai, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30500488

Correspondence to: Kai-Lin Cai, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Avenue, Jiangnan District, Wuhan 430022, Hubei Province, China. caikailin@yahoo.com.cn

Received: 2007-03-22 Revised: 2007-08-12

Abstract

AIM: To investigate the expression of estrogen receptor β (ER β) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in colorectal cancer tissue, and to determine their relationship with histological type.

METHODS: Expression of ER β and VEGF was detected using an immunohistochemistry SP method in 45 cases of colorectal cancer. Normal colorectal mucosa from 10 patients was used as a control. The relationship between colorectal cancer and the expression of ER β and VEGF was investigated.

RESULTS: ER β and VEGF expression was detected in 23 (51.11%) and 33 (73.33%) of the 45 cases, respectively. ER β and VEGF expression was significantly correlated with the histological type ($P = 0.024$, and $P = 0.005$), but there was

no correlation with disease stage ($P = 0.289$, $P = 0.173$). There was a significant difference on the VEGF expression between the group positive and negative for ER β (56.52% vs 90.90%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The positive expression of ER β is closely correlated with the development of carcinogenesis and prognosis of colorectal carcinoma. Detection of both ER β and VEGF appears to be a valuable tumor marker and prognostic factor for colorectal carcinoma.

Key Words: Colorectal cancer; Estrogen receptor β ; Vascular endothelial growth factor; Immunohistochemistry

Li JW, Tao KX, Cai KL. Expression and clinical significance of estrogen receptor β and vascular endothelial growth factor in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(24): 2652-2656

摘要

目的: 探讨雌激素受体 β (ER β)、血管内皮生长因子(VEGF)在大肠癌组织中的表达以及与大肠癌分化程度之间的关系。

方法: 应用免疫组织化学SP法,检测45例大肠癌中ER β 、VEGF的表达,并以10例正常大肠黏膜组织作对照,分析大肠癌组织中ER β 与VEGF的表达与大肠癌的关系。

结果: 45例大肠癌组织中,ER β 阳性23例(51.11%),VEGF阳性33例(73.33%)。ER β 和VEGF的表达与肿瘤的分化程度有关($P = 0.024$, $P = 0.005$),而与肿瘤的临床分期无关($P = 0.289$, $P = 0.173$)。ER β 阳性组中,VEGF的表达明显低于ER β 阴性组(56.52% vs 90.90%, $P < 0.05$)。

结论: ER β 的阳性表达与大肠癌的发生、发展和预后密切相关,可联合VEGF作为有价值的肿瘤标记和预后指标。

关键词: 大肠癌; 雌激素受体 β ; 血管内皮生长因子; 免疫组化

李建文, 陶凯雄, 蔡开琳. ER β 和VEGF在大肠癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2007;15(24):2652-2656
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2652.asp>

0 引言

1996年Mosselman *et al*^[1]从人睾丸组织中克隆出一种新型雌激素受体, 并命名为雌激素受体 β (ER β), 这是发现的第一种由不同基因编码的甾体类激素受体亚型, 立即引起学者们的广泛关注. Enmark *et al*^[2]采用原位杂交方法发现ER β mRNA在胃、十二指肠、结肠和直肠黏膜呈高表达, 另外, 在淋巴结、脾脏和小肠也大量表达. Campbell-Thompson *et al*^[3]用免疫组化方法发现正常结肠表皮细胞、血管平滑肌细胞和血管内皮细胞、肠神经细胞等表达ER β 蛋白. Takeyama *et al*^[4]用半定量RT-PCR方法检测13, 20和38 wk胎儿消化道器官的ER α , ER β 的分布, 发现肝脏、胃、结肠、小肠均有ER β mRNA 的表达. 血管内皮生长因子是1989年初Ferrara^[5]和Gospodarowiz *et al*分别在牛垂体滤泡星状细胞体外培养液中首先纯化出来的, 而后由Leung *et al*首先从牛垂体滤泡cDNA文库中用多克隆杂交系列分析克隆, 他是由某些肿瘤细胞分泌, 并与血管内皮上的受体结合, 可诱导肿瘤血管生成, 维持肿瘤的持续生长, 是重要的血管生成因子, 已经发现与肿瘤的预后有关. 大量文献报道ER β 在乳腺、子宫、卵巢、前列腺肿瘤发生、发展中的作用^[6-10], VEGF在胃癌中的表达研究较多^[11-12], 而对大肠癌中ER β , VEGF表达的研究并不多. 近年来由于经济发展, 人民生活水平的提高以及饮食结构的改变, 大肠癌的发病率一直呈上升趋势, 为人们所关注. 本实验采用免疫组化SP法检测ER β , VEGF在大肠癌中的表达, 探讨其在大肠癌发生、发展中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 2005-10/2006-06华中科技大学同济医学院附属协和医院胃肠外科住院手术45例大肠癌患者, 男28例, 女17例. 年龄23-79(平均51)岁. 直肠癌20例, 结肠癌25例. 组织学类型: 高分化腺癌6例, 中分化腺癌29例, 低分化腺癌10例; Dukes分期: A期7例, B期21例, C+D期17例. 所有病例术前均未接受放化疗, 且术后经病理证实. 另取10例正常大肠黏膜组织作为对照. 抗-VEGF抗体购自武汉博士德生物技术有限公司, 抗-ER β 抗体购自美国SantaCruz公司.

1.2 方法 所有标本经石蜡包埋, 4 μ m厚切片. 经常规脱蜡、水化后, 30 mL/L过氧化氢甲醇溶液室温下封闭30 min, 山羊血清室温下孵育30 min, 抗原热修复, 分别加入一抗液、生物素标记的二抗及链霉素抗生物素蛋白-过氧化物溶液各15 min(37℃水浴下), 显色、复染、透明、封片. 每次免疫组化染色均设立阴性对照片, 严格控制反应条件. ER β 阳性结果判定方法: 阳性细胞呈棕黄色, 并按切片中阳性细胞数占肿瘤细胞的比例分3个等级, +为20%-40%, ++为40%-60%, +++为60%以上. VEGF阳性结果判定方法: VEGF均以胞质或胞膜出现棕黄色颗粒为阳性细胞. 每例随机观察5个视野, 每个视野100个细胞, 计数500个细胞中染色阳性细胞数, <5%为阴性、6%-20%为弱阳性、21%-50%为中阳性、50%以上为强阳性.

统计学处理 数据处理采用SPSS10.0软件, 各构成比的比较应用 χ^2 检验或Fisher精确概率法进行分析. $P<0.05$ 为结果有统计学意义.

2 结果

2.1 ER β 在大肠癌组织中的表达 大肠癌组织中ER β 的阳性率为51.11%(23/45), 镜下可见阳性反应物质主要表达于胞质或胞膜, 偶见胞核着色, 阳性颗粒粗细不等(图1). ER β 表达与年龄、性别、肿块大小和临床分期无关($P>0.05$), 与肿瘤分化程度关系明显($P<0.05$)(表1).

2.2 VEGF在大肠癌组织中的表达 VEGF的阳性率为73.33%(33/45)(表1), 镜下可见阳性反应物质主要表达于黏膜细胞的胞质, 间质细胞也有表达(图2).

2.3 ER β 与VEGF的关系 ER β 阳性组VEGF的表达56.52%, 明显低于阴性组的表达90.90%($P<0.05$)(表2).

3 讨论

大肠癌是消化道常见的恶性肿瘤之一, 每年全世界约有50万人发病, 在西方国家大肠癌死亡率仅次于肺癌和乳腺癌, 居恶性肿瘤死亡率第3位^[13]. 据1990-1992年中国1/10人口死因抽样调查结果显示, 中国大肠癌的年死亡率为5.30/10万. 居恶性肿瘤死因第5位^[14]. 在我国, 南方发病率高于北方. ER β 基因位于14q22-24区, 为40 kb, ER β 蛋白含530个氨基酸, 分子量为59.2 kDa, 为核受体超家族成员, 是一类配体调节的转录因子, 通过与不同

■研究前沿

目前对ER β 在乳腺、生殖器官中的作用有较多研究. 在大肠癌发生中的作用研究较少. 但由于流行病学调查发现, 雌激素可明显影响大肠癌的发生, 其机制研究也成为近年来的热点.

■创新盘点
本文应用不同病理类型的大肠黏膜标本,同时检测了ERβ和VEGF表达,发现大肠癌中ERβ表达与肿瘤分化程度负相关,与VEGF的表达可能也存在负相关关系。

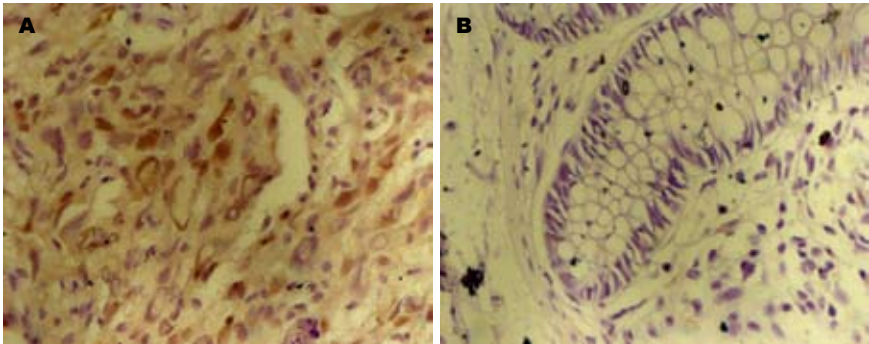


图 1 ERβ在大肠黏膜中的表达. A: ERβ阳性; B: ERβ阴性.

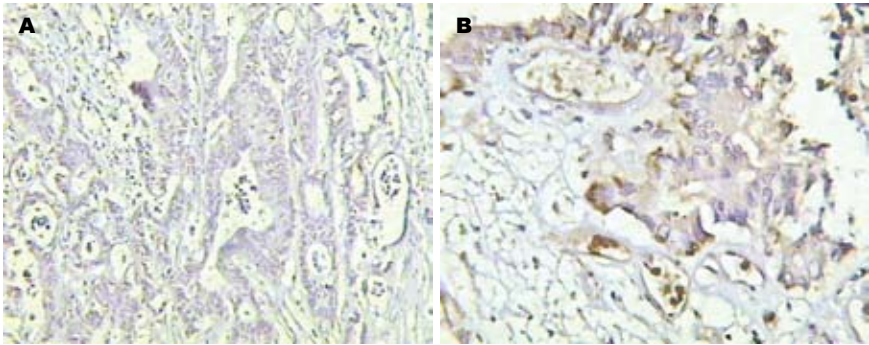


图 2 VEGF在大肠癌中的表达(SP × 200). A: 高分化大肠癌; B: 低分化大肠癌.

表 1 大肠癌ERβ和VEGF的表达与临床病理特征的关系

| 分组 | n | ERβ表达 | | 阳性率 | P值 | VEGF表达 | | 阳性率 | P值 |
|--------|----|-------|-----|-------|-------|--------|-----|-------|-------|
| | | 阳性数 | 阴性数 | | | 阳性数 | 阴性数 | | |
| 性别 | | | | | | | | | |
| 男 | 28 | 15 | 13 | 53.57 | 0.454 | 20 | 8 | 71.43 | 0.745 |
| 女 | 17 | 8 | 9 | 47.06 | | 13 | 4 | 76.47 | |
| 年龄 | | | | | | | | | |
| ≤52 | 12 | 5 | 7 | 41.67 | 0.514 | 10 | 2 | 83.33 | 0.466 |
| ≥52 | 33 | 15 | 18 | 54.55 | | 23 | 10 | 69.70 | |
| 肿块大小 | | | | | | | | | |
| <3 cm | 9 | 5 | 4 | 55.56 | 0.637 | 7 | 2 | 77.78 | 0.829 |
| 3-5 cm | 17 | 7 | 10 | 41.18 | | 13 | 4 | 76.47 | |
| >5 cm | 19 | 11 | 8 | 57.89 | | 13 | 6 | 68.42 | |
| 分化程度 | | | | | | | | | |
| 高分化 | 6 | 4 | 2 | 66.67 | 0.024 | 1 | 5 | 16.67 | 0.005 |
| 中分化 | 29 | 18 | 11 | 62.07 | | 23 | 6 | 79.31 | |
| 低分化 | 10 | 1 | 9 | 10.00 | | 9 | 1 | 90.00 | |
| 临床分期 | | | | | | | | | |
| A | 7 | 2 | 5 | 28.57 | 0.289 | 5 | 2 | 71.43 | 0.173 |
| B | 21 | 10 | 11 | 47.62 | | 18 | 3 | 85.71 | |
| C+D | 17 | 11 | 6 | 64.71 | | 10 | 7 | 58.82 | |

配体和反应元件结合,调节一系列靶基因转录,进而发挥生物学作用. ERβ基因能产生多种转录本,现已发现其几种异构体,如ERβ1, ERβ2, ERβ3, ERβ4, ERβ5等,但生理意义目前尚不清楚. Fiorelli *et al*^[15]采用RT-PCR方法检测了HCT116, HCT8, DLD-1和Lovo等结肠腺癌细胞

株,发现均存在ERβ mRNA表达,其中高度保守的ERβ1在这4个细胞株中呈高表达,而ERβ2-ERβ5仅在HCT116和HCT8两个细胞株中表达,Western blot证实存在ERβ蛋白表达, Arai *et al*^[16]对HT29, Colo320, Lovo, SW480和HCT116 5个结肠腺癌细胞株的研究发现,这些细胞株都存

表 2 大肠癌ERβ表达与VEGF的关系

| VEGF的表达 | ERβ的表达 | |
|---------|--------|----|
| | 阳性 | 阴性 |
| 阳性 | 13 | 20 |
| 阴性 | 10 | 2 |

$\chi^2 = 6.799, P = 0.009; r = 0.624, P = 0.008.$

在ERβ mRNA的表达. 本实验ERβ的阳性表达率为51.11%, 他的表达与肿瘤的分化程度有关($P < 0.05$), 而与肿瘤的临床分期无关($P > 0.05$). ERβ蛋白缺失可能与结肠肿瘤的发生有密切关系, 雌激素替代治疗对结肠的保护作用可能也通过ERβ介导.

肿瘤的生长、侵袭及转移过程受到多种因素的影响, 肿瘤血管生长对实体瘤的生长起重要作用, 是影响肿瘤生物行为和转移潜在的重要因素. VEGF是一种促血管形成的内皮细胞特异的生长因子, 已有大量证据表明他在肿瘤的发展、转移中起着重要的作用. VEGF是一种分子量为34-50 ku的糖蛋白, 他的一个重要作用是刺激血管内皮细胞增殖、迁移并形成新生的血管. 这些新血管是肿瘤组织生长的必备条件, 同时也是肿瘤转移的基础. 我们的实验中肿瘤高分化的6例, 其中VEGF阳性表达1例(16.67%), 中分化的29例, VEGF阳性表达23例(79.31%), 低分化的10例, VEGF阳性表达9例(90.00%), 三者之间差异显著($P < 0.05$). VEGF蛋白表达与大肠癌分化程度有相关性, 即随着大肠癌分化程度降低, VEGF表达增强, 存在统计学意义($P < 0.05$), 与Zheng *et al*^[17]研究结果一致.

我们研究发现, ERβ阳性组VEGF的表达56.52%, 明显低于阴性组的表达90.90%($P < 0.05$). 目前已有研究发现, 雌激素可能通过ERα或ERβ影响VEGF的表达^[18-19], 随着对ERβ作用机制的研究, 也许可以开发出特异地以ERβ为作用靶点的更有效更安全的抗癌药物, 这将打开新的治疗结肠肿瘤的策略之门.

4 参考文献

- 1 Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996; 392: 49-53
- 2 Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjold M, Gustafsson JA. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and

- expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4258-4265
- 3 Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B. Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 632-640
- 4 Takeyama J, Suzuki T, Inoue S, Kaneko C, Nagura H, Harada N, Sasano H. Expression and cellular localization of estrogen receptors alpha and beta in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2258-2262
- 5 Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25: 581-611
- 6 Saji S, Omoto Y, Shimizu C, Warner M, Hayashi Y, Horiguchi S, Watanabe T, Hayashi S, Gustafsson JA, Toi M. Expression of estrogen receptor (ER) (beta)cx protein in ER(alpha)-positive breast cancer: specific correlation with progesterone receptor. *Cancer Res* 2002; 62: 4849-4853
- 7 Ahr A, Karn T, Solbach C, Seiter T, Strebhardt K, Holtrich U, Kaufmann M. Identification of high risk breast-cancer patients by gene expression profiling. *Lancet* 2002; 359: 131-132
- 8 Bardin A, Hoffmann P, Boulle N, Katsaros D, Vignon F, Pujol P, Lazennec G. Involvement of estrogen receptor beta in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res* 2004; 64: 5861-5869
- 9 Skrzypczak M, Bieche I, Szymczak S, Tozlu S, Lewandowski S, Girault I, Radwanska K, Szczylik C, Jakowicki JA, Lidereau R, Kaczmarek L. Evaluation of mRNA expression of estrogen receptor beta and its isoforms in human normal and neoplastic endometrium. *Int J Cancer* 2004; 110: 783-787
- 10 Lai JS, Brown LG, True LD, Hawley SJ, Etzioni RB, Higano CS, Ho SM, Vessella RL, Corey E. Metastases of prostate cancer express estrogen receptor-beta. *Urology* 2004; 64: 814-820
- 11 徐文华, 葛银林, 徐宏伟, 王秀丽, 耿芳宋. VEGF基因表达抑制对胃腺癌细胞SGC-7901增殖的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 655-659
- 12 Ma J, Zhang L, Ru GQ, Zhao ZS, Xu WJ. Upregulation of hypoxia inducible factor 1alpha mRNA is associated with elevated vascular endothelial growth factor expression and excessive angiogenesis and predicts a poor prognosis in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1680-1686
- 13 Houlston RS. What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *Mol Pathol* 2001; 54: 206-214
- 14 李连弟, 鲁凤珠, 张思维, 牧人, 孙秀娣, 皇甫小梅, 孙杰, 周有尚, 欧阳宁慧, 饶克勤, 陈育德, 孙爱明, 薛志福, 夏毅. 中国恶性肿瘤死亡率20年变化趋势和近期预测分析. *中华肿瘤杂志* 1997; 19: 3-9
- 15 Fiorelli G, Picariello L, Martinetti V, Tonelli F, Brandi ML. Functional estrogen receptor beta in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 521-527
- 16 Arai N, Strom A, Rafter JJ, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta mRNA in colon cancer cells: growth effects of estrogen and genistein. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270: 425-431
- 17 Zheng S, Han MY, Xiao ZX, Peng JP, Dong Q. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in

■应用要点

本文发现大肠癌中, ERβ表达与VEGF的表达可能存在负相关关系, 为进一步研究ERβ对大肠癌发生过程的影响提供了基础.

■同行评价

本文采用免疫组化的方法检测了大肠癌中ER β , VEGF的表达, 结果发现ER β 的阳性表达与大肠癌的发生、发展有关。文章研究内容丰富, 图片清晰, 设计较合理, 为临床寻找新的治疗大肠癌的药物靶点提供了理论依据, 有一定的临床意义。

colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1227-1230

- 18 Menendez D, Inga A, Snipe J, Krysiak O, Schonfelder G, Resnick MA. A single-nucleotide polymorphism in a half-binding site creates p53 and estrogen receptor control of vascular endothelial

growth factor receptor 1. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 2590-2600

- 19 Hartman J, Lindberg K, Morani A, Inzunza J, Strom A, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts. *Cancer Res* 2006; 66: 11207-11213

编辑 程剑侠 电编 张敏

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

消化内镜诊疗技术研讨班通知(第一轮)

本刊讯 2007年国家继续医学教育项目“消化内镜诊疗技术研讨班”(项目编号2007-03-03-046)将于2007-11在青岛市举办, 由青岛大学医学院附属医院主办、世界华人消化杂志协办, 特邀国内外著名专家进行专题讲座和现场演示, 欢迎消化内镜工作者投稿参会, 优秀稿件可优先发表。回执或投稿请于2007-09月底前寄青岛大学医学院附属医院内镜诊治中心, 刘希双收, 邮编: 266003, E-mail: liuxishuangl@sina.com, 电话: 0532-82911525, 13864215672。

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志的同行评价

本刊讯 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评价, 采用匿名方式。通常每篇文章邀请2-3位专家审阅, 至少2人通过方可录用, 否则退稿。每期最后一页致谢本期所有审稿人(含退稿)。文章等级评定: ○A级 ○B级 ○C级 ○D级 ○E级 ○不清楚。其中A和B属于很好, C和D不算太好, E是很差, 还有一部分是不清楚。