

TRPV6、Ki-67在溃疡性结肠炎、结肠癌中的表达及意义

张慧, 刘模荣, 刘微

■背景资料

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 和结肠癌的发生率目前呈现升高趋势, 近年来瞬时受体阳离子通道亚家族V成员6(transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6, TRPV6)与肿瘤发生的研究取得了较大的进步。与人体内多种肿瘤形成过程相关, 本文作者主要从TRPV6和Ki-67在UC和结肠癌中的表达及意义进行研究。

张慧, 刘模荣, 刘微, 遵义医学院附属医院消化内科 贵州省遵义市 563003

张慧, 在读硕士, 主要从事大肠肿瘤的防治研究。

贵州省自然科学基金资助项目, No. 黔科合J字(2009)2205号
作者贡献分布: 此由刘模荣负责课题设计并指导实验及论文写作; 张慧负责实验研究过程、数据分析和论文写作; 刘微协助资料整理及数据统计。

通讯作者: 刘模荣, 主任医师, 563003, 贵州省遵义市汇川区大连路149号, 遵义医学院附属医院消化内科。zylmr@163.com
电话: 0852-8609224

收稿日期: 2014-10-21 修回日期: 2014-11-05

接受日期: 2014-11-12 在线出版日期: 2014-12-28

TRPV6 and Ki-67 expression in ulcerative colitis and colon carcinoma

Hui Zhang, Mo-Rong Liu, Wei Liu

Hui Zhang, Mo-Rong Liu, Wei Liu, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Supported by: the Guizhou Provincial Science and Technology Fund Project, No. J(2009)2205

Correspondence to: Mo-Rong Liu, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, 149 Dalian Road, Huichuan District, Zunyi 563003, Guizhou Province, China. zylmr@163.com

Received: 2014-10-21 Revised: 2014-11-05

Accepted: 2014-11-12 Published online: 2014-12-28

Abstract

AIM: To investigate the TRPV6 and Ki-67 expression in ulcerative colitis and colon cancer.

METHODS: The expression of TRPV6 and Ki-67 was examined by immunohistochemistry in 20 ulcerative colitis tissues, 20 colon cancer tissues and 20 normal colonic mucosal tissues.

RESULTS: TRPV6 expression gradually increased from normal colon tissue to ulcerative colitis tissue and colonic cancer. The positive rates of TRPV6 in ulcerative colitis and colon cancer were significantly higher than that in the normal colon tissue ($P < 0.05$). TRPV6 expression was located in the cytoplasm and/or cell membrane. The positive rates of Ki-67 in ulcerative colitis and colon cancer were significantly higher than that in the normal colon tissue ($P < 0.05$). Ki-67 expression was located in the nucleus. The

expression of TRPV6 had a positive correlation with that of Ki-67 in ulcerative colitis and colonic cancer ($r = 0.48, P < 0.05; r = 0.69, P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression of TRPV6 and Ki-67 differs among ulcerative colitis, colon cancer and normal colon. The expression of TRPV6 in ulcerative colitis and colon cancer is significantly higher than that normal colon tissue, suggesting that TRPV6 may be related to the pathogenesis and development of ulcerative colitis and colon cancer.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Ulcerative colitis; Colorectal cancer; TRPV6; Ki-67

Zhang H, Liu MR, Liu W. TRPV6 and Ki-67 expression in ulcerative colitis and colon carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(36): 5732-5736 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/5732.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i36.5732>

摘要

目的: 旨在探索TRPV6、Ki-67在溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)、结肠癌组织中的表达情况以及与细胞增殖、恶变之间的联系。

方法: 收集遵义医学院附属医院行结肠镜下取病理活检的结肠组织标本, 结合其临床资料, 共获取UC标本20例, 结肠癌组织20例, 肠镜检查未见异常的肠黏膜组织20例。通过免疫组织化学染色, 观察UC、结肠癌及正常结肠组织中TRPV6、Ki-67的表达情况。

结果: (1)在正常结肠黏膜组织、UC以及结肠癌中均有TRPV6的表达, 但TRPV6在UC和结肠癌组中的表达率显著高于正常黏膜组($P < 0.05$), 其阳性表达部位位于胞浆和/或胞膜; Ki-67的阳性率呈递增趋势, 其在UC和结肠癌中的阳性表达率显著高于正常黏膜组($P < 0.05$), 其阳性表达部位位于胞核; (2)TRPV6、Ki-67在UC和结肠癌中的表达呈正相关($r = 0.48, P < 0.05; r = 0.69, P < 0.05$)。

■同行评议者

刘杰民, 副主任医师, 贵州省人民医院消化内科

结论: TRPV6、Ki-67在人UC、结肠癌以及正常结肠等组织中有不同程度的表达, TRPV6在UC和结肠癌组中的表达率均显著高于正常黏膜组。推测TRPV6可能在UC、结肠癌的发生、发展过程中扮演着重要的角色。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 溃疡性结肠炎; 结肠癌; TRPV6; Ki-67

核心提示: 本文应用免疫组织化学检测钙离子通道瞬时受体阳离子通道亚家族V成员6(transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6, TRPV6)、Ki-67在溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)、结肠癌中的表达及意义, 本研究发现, 无论在UC或是结肠癌组织中TRPV6、Ki-67阳性表达均较正常结肠黏膜组织增高, 而且TRPV6、Ki-67阳性表达表现出一定相关性, 提示TRPV6可能参与结肠黏膜组织细胞的增殖, 表明TRPV6可能在UC、结肠癌的发生、发展过程中扮演着重要的角色, 该研究对临床工作具有重要的指导意义。

张慧, 刘模荣, 刘微. TRPV6、Ki-67在溃疡性结肠炎、结肠癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(36): 5732-5736
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/5732.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i36.5732>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因未明的结直肠慢性非特异性炎性疾病, 病变主要局限于大肠黏膜与黏膜下层, 且以溃疡为主, 临床常常表现为反复发作而治愈难度大, 被世界卫生组织列为现代难治疾病之一^[1]。UC的发病机制是多因素、多环节协同作用的结果, 目前获得广泛认同的发病机制为: 环境因素作用于遗传易感者, 在肠道菌丛参与下, 启动肠道免疫及非免疫系统, 导致肠上皮和组织细胞持久的损伤^[2]。UC是公认的结肠癌(colon cancer, CC)癌前病变^[3]。结肠癌是消化系统主要的恶性肿瘤之一, 在我国的发病率呈逐年上升的趋势, 严重威胁着人们的健康。流行病学研究^[4-6]表明, 钙及维生素D能显著降低UC和结肠癌的发生率。但对钙如何影响UC和结肠癌的机制目前尚不清楚。本研究通过观察新型钙离子通道瞬时受体阳离子通道亚家族V成员6(transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6, TRPV6)在UC及结肠癌的表达情况, 探索TRPV6在UC、结肠癌组织中的表达情况以及与细胞增

殖、恶变之间的联系。

1 材料和方法

1.1 材料 所有标本均来自于遵义医学院附属医院行结肠镜下取病理活检的结直肠组织标本, 其临床及病理资料均符合UC国内共识意见标准^[7]。共取UC标本20例, 结肠癌组织20例, 肠镜检查未见异常的结肠黏膜组织20例。TRPV6多克隆抗体购自Abcam公司; Ki-67多克隆抗体购自Bioss公司; GTVision™ III抗鼠/兔通用型免疫组织化学检测试剂盒购自上海基因科技有限公司; 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 标本处理: 将取得的结肠组织标本浸泡于4%多聚甲醛室温固定并立即送于病理科进行包埋, 制作成石蜡块。用切片机将收集的蜡块标本切成约10 μm的切片, 附于多聚赖氨酸处理过的载玻片上, 置于干燥鼓风机中干燥2 h后, 即可进行免疫组织化学实验。

1.2.2 免疫组织化学检测: TRPV6一抗稀释2500倍, Ki-67一抗稀释100倍, PBS代替一抗作空白对照, DAB显色, 苏木精对比染色, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明后封片。用已知阳性片作阳性对照。具体步骤参照说明书进行。

1.2.3 免疫组织化学检测结果判断: 光镜下观察组织切片的显色反应。按照Maruyama等^[8]提出的判断方法, TRPV6以细胞胞浆内或胞膜出现棕黄色颗粒为阳性, Ki-67则以细胞核出现棕黄色为阳性, 并用阳性片作为对照, 每张切片随机选择5个视野, 200倍显微镜下观察计数。采用双人观察, 综合评定方法参照文献方法, 根据染色的浓度及阳性细胞的数量分别记分: 不着色为0分, 浅黄色为1分, 黄色为2分, 棕黄色为3分。阳性细胞数<10%为0分, 10%-30%为1分, 31%-70%为2分, >70%为3分。根据染色深度与阳性细胞数得分之和分为4级: (-)为0分, 弱阳性(+)为1-2分, 阳性(++)为3-4分, 强阳性(+++)为5-6分。

统计学处理 本实验数据统一用SPSS17.0软件进行统计分析, 计数资料样本率之间的比较分析采用 χ^2 检验, 各指标间的相关性分析采用Spearman相关分析法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TRPV6在不同结肠组织中的表达情况 TRPV6在正常结肠黏膜组织、UC以及结肠癌中的表达率呈逐步递增趋势, 其阳性表达率分别

■研发前沿

近年来, 相继发现了多种钙离子的跨膜转运通道, 且主要集中在瞬时性受体电位通道(transient receptor potential, TRP)超家族这一类新型钙离子转运蛋白通道。而TRPV6是该家族中V亚家族中已知的钙离子高选择性通道之一, 目前研究发现TRPV6与人体内多种肿瘤(如骨肿瘤、乳腺癌、前列腺癌及结肠癌等)形成过程相关。

■相关报道

研究表明TRPV6通过调控细胞内钙离子的浓度影响细胞生物学行为, 在人乳腺癌、前列腺癌、结肠癌等多种肿瘤中呈高表达。Ki-67一种细胞核相关抗原, 存在于增殖细胞中, 已成为细胞增殖的标志之一, 在胃癌、乳腺癌、子宫内瘤、宫颈癌、淋巴瘤、皮肤病变、胶质瘤的表达具有密切关系。

■创新盘点

本研究通过观察TRPV6、Ki-67在UC、结肠癌中的表达情况,特别是探索了TRPV6在UC、结肠癌中所扮演的角色。该研究将对UC进一步的临床工作具有重要指导的意义。

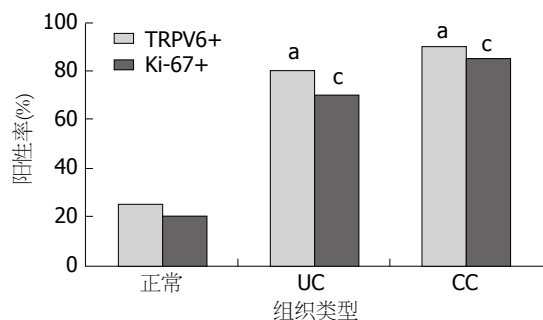


图1 TRPV6和Ki-67在各组织中的阳性表达率。^a $P<0.05$ vs 正常对照组TRPV6; ^c $P<0.05$ vs 正常对照组Ki-67。UC: 溃疡性结肠炎; CC: 结肠癌。

为25%、80%、90%(图1, 2)。

2.2 Ki-67在不同结肠组织中的表达情况 Ki-67在正常结肠黏膜组织、UC以及结肠癌中的表达率呈逐步递增趋势,其阳性表达率分别为20%、70%、85%(图1, 3)。

2.3 TRPV6、Ki-67在UC及结肠癌中表达的相关性 无论在UC或结肠癌中,TRPV6阳性表达率增高时,Ki-67的阳性表达率亦随之增高。相关性检验($r_{uc}=0.48$, $r_{cc}=0.69$, $P<0.05$),表明两者有较好的相关性。

3 讨论

Lamprecht等^[9]研究指出,结肠隐窝表面与细胞内维持正常的钙离子梯度对于结肠细胞的终末分化和凋亡起着重要的调节作用,这种钙离子梯度与维生素D水平有关。在UC及结肠肿瘤发生的过程中,钙离子梯度则被破坏。此外,钙离子也可以通过干预细胞血管形成和调控细胞周期来影响结直肠癌的发展进程^[10,11]。但钙离子对UC及结肠肿瘤影响的具体机制目前仍尚不清楚。

瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)是一种非电压依赖性阳离子通道,TRPV6是TRP基因超家族中的成员,广泛存在于多种哺乳动物组织中,并参与调节多种重要的生理功能,包括肌肉收缩、递质释放、细胞增殖、细胞分化、基因转录、细胞凋亡及细胞死亡等^[12]。TRPV6是唯一已知的钙离子高选择性通道之一^[13]。在促进跨细胞钙离子转运的三步过程中,已有研究^[14]证明TRPV6是其一部分,钙离子通过TRPV6进入细胞后,结合到钙结合蛋白D28K上和/或钙结合蛋白D9K上弥散到基底外侧膜然后钙离子经钠钙交换蛋白(Na/Ca exchanger 1, NCX1)和三磷酸腺苷(ATP)依赖性质膜钙离子-碱性磷酸酶1b排出,TRPV6除了在维持机体钙平衡中起着重要

作用外,在肿瘤的发生和进展中也有非常重要的影响。有研究表明TRPV6在前列腺、乳腺、甲状腺、卵巢和胰腺等恶性肿瘤中呈高表达^[15]。对于TRPV6基因在结肠疾病中的研究,其首先发现于大鼠十二指肠,仅表达于上皮细胞,与钙离子的摄入密切相关。目前有关TRPV6在人类结肠细胞中的表达及功能仍知之甚少,虽有研究表明TRPV6在结肠癌中表达显著增加^[16],但对于其在正常结肠组织、UC及结肠癌中表达的相互关系及其对肿瘤发生的影响仍缺乏进一步的认识。本研究免疫组织化学数据表明,TRPV6在UC及结肠癌中均高表达,其阳性率分别为80%、90%,主要定位于细胞胞浆,少量表达在细胞膜;TRPV6在UC组、结肠癌组的阳性表达率与正常黏膜组相比较差异在统计学上具有显著性($\chi^2_{uc}=12.13$, $\chi^2_{cc}=17.28$; $P<0.01$);但UC、结肠癌之间TRPV6的阳性表达率两相比较差异在统计学上无显著性($\chi^2=0.78$, $P>0.05$)。

Ki-67是一种细胞核相关抗原,存在于增殖细胞中,是参与驱动细胞周期的调节网络,可以用来识别生长中的正常细胞和肿瘤细胞,评估细胞的增殖程度,已成为细胞增殖的标志之一^[17]。国内外有诸多文献报道,Ki-67基因在正常的组织中不表达,仅在增殖的细胞核中有表达,在一定程度上能够反映细胞的增殖活性,在癌变组织中表达强烈,且在恶变的初期就有微弱的表达,表达水平随着病变的发展呈梯度上升,显示其参与了肿瘤的发生及发展。Ki-67基因的高表达往往与胃癌、乳腺癌、子宫内膜、宫颈癌、淋巴瘤、皮肤病变、胶质瘤^[18-20]等具有密切关系,并作为肿瘤治疗效果的监测。本研究免疫组织化学数据表明,Ki-67在UC中表达阳性率为70%;在结肠癌中表达阳性率为85%,主要定位于细胞核;与正常黏膜组比较差异在统计学上具有显著性($\chi^2_{uc}=10.11$, $\chi^2_{cc}=16.94$; $P<0.01$);但Ki-67在UC、结肠癌两组之间的阳性表达率比较统计学上差异无显著性($\chi^2=0.25$, $P>0.05$)。

本研究发现,无论在UC或是结肠癌组织中TRPV6、Ki-67阳性表达均较正常结肠黏膜组织增高,而且TRPV6、Ki-67阳性表达表现出一定相关性,提示TRPV6可能参与结肠黏膜组织细胞的增殖,通过某种途径参与了UC及结肠癌的发病过程,其具体机制尚需进一步研究。而对于UC和结肠癌组织TRPV6、Ki-67阳性表达率两者之间缺乏统计学上差异显著性现象,可能与本组样本量较小,也可能本组标本取材时UC患

■应用要点

本研究提示TRPV6可能参与结肠黏膜组织细胞的增殖,通过某种途径参与了UC及结肠癌的发病过程。认为TRPV6在肠道一些慢性炎症和癌前病变中可能成为肠道肿瘤防治的一个新的研究方向。

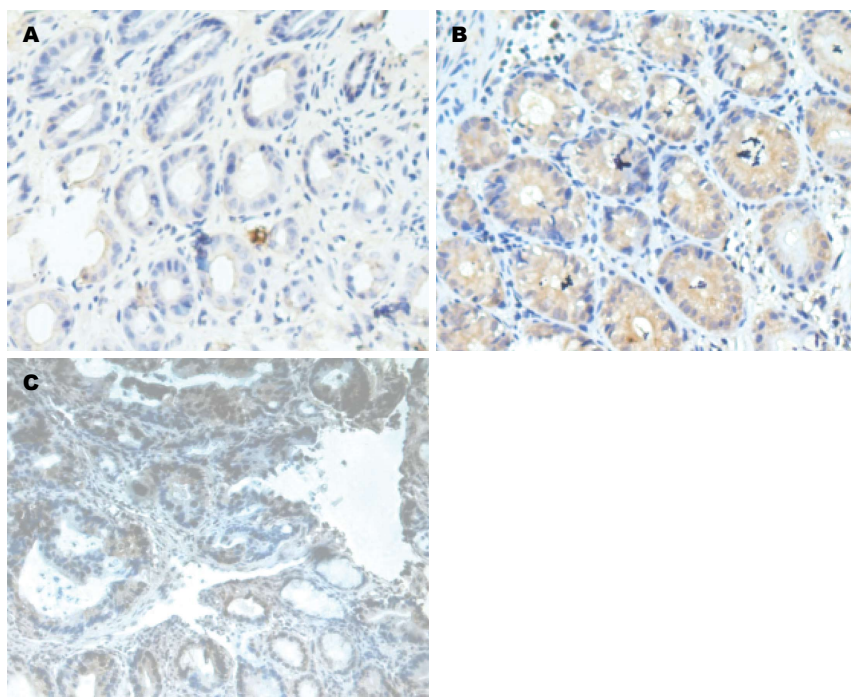


图 2 TRPV6在正常结肠组织、溃疡性结肠炎、结肠癌的表达($\times 200$). A: 正常结肠组织; B: 溃疡性结肠炎; C: 结肠癌. 主要表达部位为细胞膜或胞浆.

■名词解释

TRPV6: TRP超家族中V亚家族中已知的钙离子高选择性通道之一, 其存在于具有钙离子跨细胞转运功能的器官; Ki-67: 一种细胞核相关抗原, 存在于增殖细胞中, 是参与驱动细胞周期的调节网络, 可以用来识别生长中的正常细胞和肿瘤细胞, 评估细胞的增殖程度, 已成为细胞增殖的标志之一.

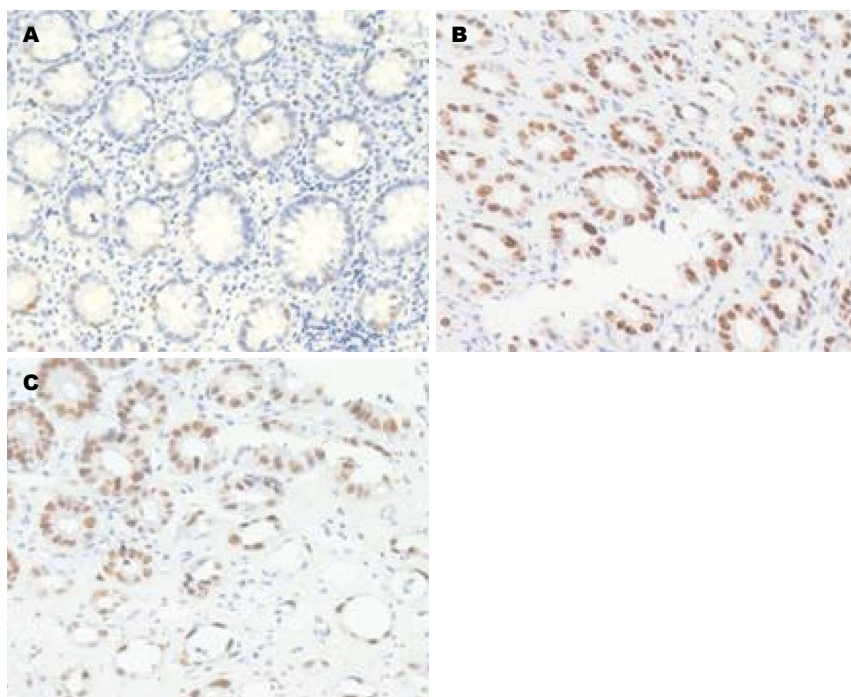


图 3 Ki-67在正常结肠组织、溃疡性结肠炎、结肠癌的表达($\times 200$). A: 正常结肠组织; B: 溃疡性结肠炎; C: 结肠癌. 主要表达部位为细胞核.

者病情处于活动期, 细胞增殖较活跃有关. 这有待今后进一步研究结果验证.

4 参考文献

- 1 Bamias G, Cominelli F. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease: current concepts. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 365-369 [PMID: 17545770 DOI: 10.1097/MOG.0b013e3281c55eb2]
- 2 Weersma RK, van Dullemen HM, van der Steege G, Nolte IM, Kleibeuker JH, Dijkstra G. Review article: Inflammatory bowel disease and genetics. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26 Suppl 2: 57-65 [PMID: 18081650 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2007.03476.x]
- 3 Teng XD. [World Health Organization classification

■同行评价

本文较准确反映了研究工作的科学问题和特定内容,对同行在TRPV6钙离子通道与肠道肿瘤方面的研究有一定的参考价值,该研究为指导临床工作具有重要的意义。

- 4 of tumours, pathology and genetics of tumours of the lung]. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2005; 34: 544-546 [PMID: 16383307]
- 4 Satia-Abouta J, Galanko JA, Martin CF, Potter JD, Ammerman A, Sandler RS. Associations of micronutrients with colon cancer risk in African Americans and whites: results from the North Carolina Colon Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 747-754 [PMID: 12917206]
- 5 Peters U, Chatterjee N, McGlynn KA, Schoen RE, Church TR, Bresalier RS, Gaudet MM, Flood A, Schatzkin A, Hayes RB. Calcium intake and colorectal adenoma in a US colorectal cancer early detection program. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1358-1365 [PMID: 15531687]
- 6 Heine-Bröring RC, Winkels RM, Renkema JM, Kragt L, van Orten-Luiten AC, Tigchelaar EF, Chan DS, Norat T, Kampman E. Dietary supplement use and colorectal cancer risk: A systematic review and meta-analyses of prospective cohort studies. *Int J Cancer* 2014 Oct 21. [Epub ahead of print] [PMID: 25335850 DOI: 10.1002/ijc.29277]
- 7 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012年, 广州). *中华内科杂志* 2012; 57: 818-831
- 8 Maruyama K, Ochiai A, Akimoto S, Nakamura S, Baba S, Moriya Y, Hirohashi S. Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer. *Oncology* 2000; 59: 302-309 [PMID: 11096342]
- 9 Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 601-614 [PMID: 12894248 DOI: 10.1038/nrc1144]
- 10 Umar S, Morris AP, Kourouma F, Sellin JH. Dietary pectin and calcium inhibit colonic proliferation in vivo by differing mechanisms. *Cell Prolif* 2003; 36: 361-375 [PMID: 14710853 DOI: 10.1046/j.1365-2184.2003.00291.x]
- 11 Lin R, White JH. The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioessays* 2004; 26: 21-28 [PMID: 14696037 DOI: 10.1002/bies.10368]
- 12 Spehr J, Gelis L, Osterloh M, Oberland S, Hatt H, Spehr M, Neuhaus EM. G protein-coupled receptor signaling via Src kinase induces endogenous human transient receptor potential vanilloid type 6 (TRPV6) channel activation. *J Biol Chem* 2011; 286: 13184-13192 [PMID: 21349844 DOI: 10.1074/jbc.M110.183525]
- 13 Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 183-191 [PMID: 11931994]
- 14 Nijenhuis T, Hoenderop JG, Bindels RJ. Downregulation of Ca(2+) and Mg(2+) transport proteins in the kidney explains tacrolimus (FK506)-induced hypercalciuria and hypomagnesemia. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 549-557 [PMID: 14978156]
- 15 Wissenbach U, Niemeyer BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalie A, Reus K, Meese E, Bonkhoff H, Flockerzi V. Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem* 2001; 276: 19461-19468 [PMID: 11278579 DOI: 10.1074/jbc.M009895200]
- 16 Peleg S, Sellin JH, Wang Y, Freeman MR, Umar S. Suppression of aberrant transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6 expression in hyperproliferative colonic crypts by dietary calcium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 299: G593-G601 [PMID: 20508153 DOI: 10.1152/ajpgi.00193.2010]
- 17 Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-1715 [PMID: 6206131]
- 18 Lazăr D, Tăban S, Sporea I, Dema A, Cornianu M, Lazăr E, Goldiș A, Vernic C. Ki-67 expression in gastric cancer. Results from a prospective study with long-term follow-up. *Rom J Morphol Embryol* 2010; 51: 655-661 [PMID: 21103622]
- 19 Gelincik I. Ki-67 and Bcl-2 in colorectal polyps with breast cancer. *Indian J Pathol Microbiol* 2011; 54: 307-311 [PMID: 21623079 DOI: 10.4103/0377-4929.81608]
- 20 Jin Q, Zhang W, Qiu XG, Yan W, You G, Liu YW, Jiang T, Wang L. Gene expression profiling reveals Ki-67 associated proliferation signature in human glioblastoma. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124: 2584-2588 [PMID: 22040407]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利

