大肠癌中 MTA1 和 HIF-1α 的表达与淋巴管生成的关系

杨珍玉[1]，周序珑[1]，夏明汗[2]，蒋光喻[2]，钟雪云[1]，杜 彬[1*]
（暨南大学 1. 医学院病理学系，2. 附属第一医院病理科，广东 广州 510632）

摘 要：【目的】探讨大肠癌中转移相关基因 1(MTA1)、缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)蛋白的表达及其与淋巴管生成的关系。【方法】用免疫组织化学 SP 法检测 81 例大肠癌中 MTA1、HIF-1α 蛋白的表达及 D2-40 标记的淋巴管密度。【结果】81 例大肠癌中 MTA1、HIF-1α 阳性表达率分别为 66.7%和 63%，MTA1 和 HIF-1α 的表达均与大肠癌 Duke's 分期和淋巴结转移相关($P < 0.05$)而与组织学分级和浸润深度无关($P > 0.05$)，大肠癌中 MTA1 和 HIF-1α 蛋白表达呈正相关($P < 0.05$)，MTA1 和 HIF-1α 蛋白过表达病例肿瘤旁淋巴管密度分别为 18.4 ± 4.9、18.0 ± 5.3，高于 MTA1 和 HIF-1α 不表达和弱表达病例(15.6 ± 4.5、15.4 ± 4.2)，两者的差异有统计学意义($P < 0.05$)。【结论】MTA1 和 HIF-1α 蛋白的过表达可能促进了大肠癌旁淋巴管的生成，在肿瘤淋巴结的转移中起一定作用。

关键词：结直肠癌；MTA1；HIF-1α；淋巴管密度
中图分类号：R735.34 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-3554(2010)03-0350-04

Correlation of MTA1 and HIF-1α Expression with Lymphangiogenesis in Colorectal Carcinoma

YANG Zhen-yu[1], ZHOU Xu-long[1], XIA Ming-han[2], JIANG Guang-yu[2], ZHONG Xue-yun[1], DU Bin[1*]
(1. Department of Pathology, Medical School, Jinan University, Guangzhou 510632, China;
2. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression of metastasis-associated gene 1 (MTA1), hypoxia inducible-factor l alpha (HIF-1α) in human colorectal cancer and to explore the relationship between their expression and lymphangiogenesis. 【Methods】 The expression of MTA1 and HIF-1α, and D2-40 marked lymphatic vessel density (LVD) were detected by immunohistochemical staining in eighty-one human colorectal cancer cases. 【Results】 The positive rates of MTA1 and HIF-1α expression were 66.7% and 63.0 % respectively in the eighty-one human colorectal cancer cases. The expression of MTA1 and HIF-1α were both correlate with Duke's stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$) but did not correlate with the pathological grade and depth of invasion ($P > 0.05$). In addition, MTA1 and HIF-1α expression has a positive correlation in human colorectal cancer ($P < 0.05$). In MTA1 and HIF-1α over-expression cases, the peritumoral LVD was 18.4 ± 4.9 and 18.0 ± 5.3 respectively and was higher than that of the MTA1 and HIF-1α expression none or weak cases (15.6 ± 4.5, 15.4 ± 4.2), the difference has statistically significance ($P < 0.05$). 【Conclusion】 The overexpression of MTA1 and HIF-1α in colorectal cancer possibly promote the cancer lymphangiogenesis and play a role in lymph node metastasis.

Key words: colorectal cancer; metastasis-associated gene 1; hypoxia inducible-factor l alpha; lymphatic vessel density
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2010,31(3):350-353;396]

淋巴道转移是大肠癌转移的重要途径，而淋巴管的生成则是促进大肠癌淋巴道转移的主要因素。MTA1(metastasis-associated gene 1)是近年来发现的一个与肿瘤转移密切相关的癌基因，MTA1 可促进大肠癌侵袭转移，但其与淋巴管生成的关系尚不明确[1]。HIF-1α 是一种肿瘤细胞缺氧条件下诱导的核转录因子，已有研究表明 HIF-1α 与乳腺癌、胰腺癌的淋巴管生成相关[2-3]。特别值得注

收稿日期：2009-10-21
基金项目：广东省医学科研基金(B2006084)
作者简介：杨珍玉，硕士研究生，E-mail：yzhenyu99@163.com；*通信作者：杜彬，E-mail：tdubin@jnu.edu.cn

意的是,MTA1 可直接影响 HIF-1α 蛋白的稳定性和转录活性来促进乳腺癌的转移[4],那么大肠癌中 MTA1 和 HIF-1α 的表达是否有相关性及其与淋巴管生成的关系值得进一步深入研究。本研究用免疫组织化学的方法检测 81 例大肠癌切除肿瘤组织中 MTA1 和 HIF-1α 的表达及用淋巴管特异性标记物 D2-40[5]标记的肿瘤淋巴管密度,探讨大肠癌中 MTA1 和 HIF-1α 的表达与淋巴管生成的关系。

1　材料与方法

1.1　临床资料

收集暨南大学附属第一医院 2007 年 9 月至 2008 年 12 月 81 例大肠癌手术切除标本。其中男性患者 45 例,女性患者 36 例,年龄从 21 岁到 93 岁,平均年龄 61.2 岁。81 例大肠癌中,高中分化癌 59 例,低分化癌 19 例,另外 3 例粘液腺癌并为低分化癌,有淋巴结转移者 40 例,其中一例有肝转移,无淋巴结转移者 41 例。患者在手术前均未接受过放化疗。所有标本经 100 mL/L 甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μm 厚连续切片，分别做常规 HE 染色和免疫组织化学染色。

1.2　主要实验试剂

鼠抗人 MTA1 单克隆抗体、鼠抗人 D2-40 单克隆抗体和兔抗人 HIF-1α 多克隆抗体分别购自美国 Santa Cruz 公司，福州迈新生物技术开发公司和武汉博士德生物工程公司。羊抗鼠和羊抗兔 SP 试剂盒购自福州迈新技术开发公司,DAB 显色液购自中杉金桥生物技术公司。

1.3　免疫组织化学染色

染色方法按照链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)法试剂盒说明书步骤进行。用已知阳性表达的癌组织做阳性对照,PBS 代替一抗作阴性对照。组织均用 pH 6.0 的柠檬酸修复液微波修复抗原处理。鼠抗人 MTA1 单克隆抗体经 1∶50 稀释后用于实验，其它两种抗体均为即用型工作液。

1.4　结果判定

1.4.1　*MTA1 和 HIF-1α 阳性判定*　MTA1 和 HIF-1α 均为细胞浆或核表达。胞浆或胞核内出现棕黄色颗粒为阳性。判定标准综合染色强度和着色细胞数量进行分级：着色略高于背景和着色细胞数 > 10%为阳性；细胞数 < 25%，着色较弱为弱阳性;细胞数为 25% ~ 50%,着色较强为中度阳性;细胞数 > 50%,着色强为强阳性。其中,中度和强阳性为过表达。

1.4.2　*淋巴管计数方法*　参照 Vermeulen 等[6-7]所用方法,先在 40 倍视野下寻找淋巴管密度最多的区域，再在 200 倍视野下计数 D2-40 阳性的淋巴管个数。取 3 个视野淋巴管的平均值即为所计淋巴管密度。

1.5　统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件,率进行 χ^2 检验,淋巴管密度的比较用 t 检验，相关分析采用 Spearman 检验，$P < 0.05$ 为有统计学意义。

2　结　果

2.1　MTA1 和 HIF-1α 的表达和临床病理指标的关系

MTA1 和 HIF-1α 的阳性表达均以胞浆为主,仅很少量核表达(图 1A,B)。MTA1 表达阳性率为 66.7%,其中中度和强阳性病例有 23 例,弱阳性有 31 例,阴性有 27 例;HIF-1α 阳性率为 63%,中度和强阳性有 28 例,弱阳性有 23 例,阴性有 30 例。MTA1 和 HIF-1α 的阳性表达均与分化程度无关($\chi^2 = 1.529$,$P > 0.05$；$\chi^2 = 0.353$，$P > 0.05$),与浸润深度无关($\chi^2 = 0.368$，$P > 0.05$；$\chi^2 = 0.732$,$P > 0.05$),但与淋巴结转移和 Duke's 分期相关（$\chi^2 = 4.173$,$P < 0.05$;$\chi^2 = 4.910$,$P < 0.05$,表 1)。

2.2　MTA1 和 HIF-1α 表达的相关性

MTA1 阳性的 54 例大肠癌中,HIF-1α 阳性率为 72.2%(39/54);MTA1 阴性的 27 例中,HIF-1α 阳性率为 44.4%(12/27)。MTA1 和 HIF-1α 的表达存在正相关性($r_s = 0.271$,$P < 0.05$,表 2)。

2.3　淋巴管的观察

淋巴管被染成棕黄色,肿瘤旁比较明显,大多都呈扩张状态,管腔不规则,管壁很薄,为扁平的内皮细胞所围成,不见肌层(图 1C)。有淋巴结转移的病例,肿瘤旁淋巴管密度为 18.1 ± 5.3,无淋巴结转移的病例，肿瘤旁淋巴管密度为 15.2 ± 3.9。经统计学分析,有、无淋巴结转移的病例肿瘤旁淋巴管密度的差异有统计学意义($t = 2.508$,$P < 0.05$)。

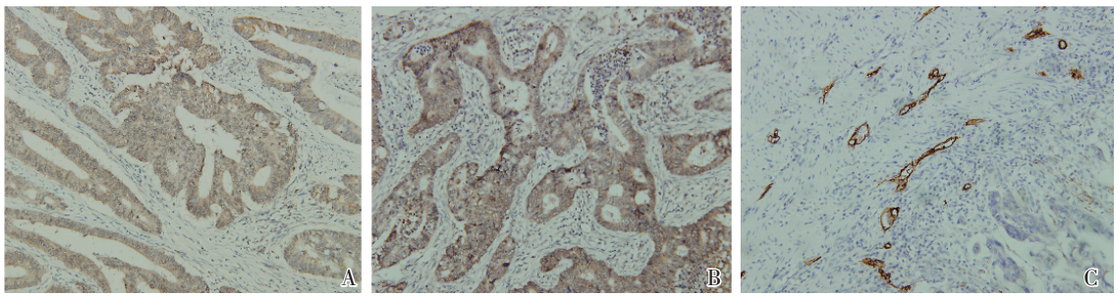


图 1 MTA1、HIF-1α 在大肠癌中的表达和 D2-40 标记的肿瘤旁淋巴管

Fig.1 Expression of MTA1 and HIF-1α in colorectal carcinoma and the lymphatic vessels marked by D2-40 at peritumor carcinoma

A: MTA1; B: HIF-1α; C: Lymphatic vessels marked by D2-40; × 200

表 1 81 例大肠癌组织中 MTA1 和 HIF-1α 表达与临床病理指标的关系

Table 1 Relationship of the expression of MTA1 and HIF-1α with clinic pathological features in 81 colorectal cancer cases

Clinicopathological features	*n*	MTA1(+)	P_1	HIF-1α (+)	P_2
Differentiation			0.216		0.553
Well/Moderately differentiated	59	37		36	
Poorly differentiated	22	17		15	
Depth of invasion			0.544		0.392
Submucosa/muscularis	15	9		8	
Serosa	66	45		43	
Lymph node metastasis			0.041		0.027
Positive	40	31		30	
Negative	41	23		21	
Duke's stage			0.041		0.027
A and B	41	23		21	
C and D	40	31		30	

2.4 MTA1 和 HIF-1α 的表达与肿瘤旁淋巴管密度的关系

MTA1 中度和强阳性的病例肿瘤旁淋巴管密度为 18.4 ± 4.9,MTA1 阴性和弱阳性的病例肿瘤旁淋巴管密度为 15.6 ± 4.5,低于 MTA1 过表达的病例, 两者肿瘤旁淋巴管密度的差异有统计学意义(t = 2.183,P < 0.05);同样 HIF-1α 中度和强阳性的病例肿瘤旁淋巴管密度(18.0 ± 5.3)高于 HIF-1α 弱和不表达病例(15.4 ± 4.2),其差异有统计学意义(t = 2.230,P < 0.05,图 2)。

表 2 81 例大肠癌组织中 MTA1 和 HIF-1α 表达关系

Table 2 Correlation between the expression of MTA1 and HIF-1α in 81 colorectal cancer cases

MTA1	HIF-1α		r_s	P
	+	−		
+	39	15	0.271	0.014
−	12	15		

3 讨 论

3.1 MTA1 及 HIF-1α 与大肠癌淋巴管生成的关系

淋巴道转移是大肠癌等上皮性肿瘤发生转移的主要方式, 淋巴管生成则是肿瘤淋巴道转移的重要机制。引起淋巴管生成的分子机制尚未明了,MTA1 和 HIF-1α 可能都是影响淋巴管生成的因素。目前已明确,MTA1 是促进大肠癌等多种肿瘤转移的关键分子。Toh 等[1]人和本研究组前期研究[8]分别从 mRNA 与蛋白质水平证实,大肠癌组织中 MTA1 过度表达与淋巴结转移阳性率显著相关。本研究的结果显示 MTA1 过表达时大肠癌旁淋巴管密度 LVD 增加,则进一步提示 MTA1 可能

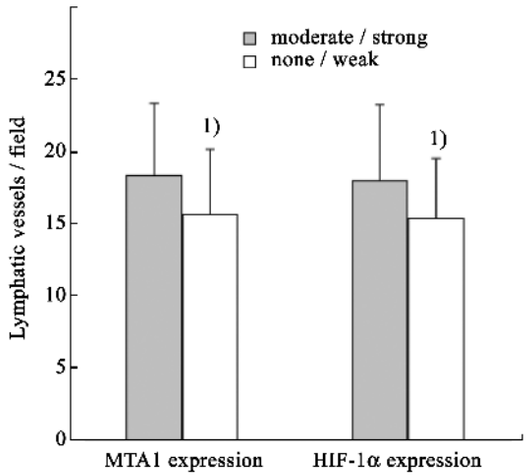


图 2　大肠癌中 MTA1 和 HIF-1α 中–强度表达和弱、不表达与肿瘤旁淋巴管密度的关系

Fig.2　Relationship between moderate/strong expression of MTA1 and HIF-1α and peritumor LVD versus none/weak expression of MTA1 and HIF-1α in colorectal cancer

1) $P<0.05$

通过影响淋巴管生成来促进大肠癌淋巴道转移。

HIF-1α 是缺氧状态引起肿瘤细胞转移的关键分子。正常氧条件下，HIF-1α 易被泛素蛋白酶体系统降解。缺氧时，HIF-1α 降解受阻，蛋白量增多，HIF-1α 与靶基因中的缺氧反应元件结合启动了靶基因的转录[9]。HIF-1α 可通过调控这些靶基因来影响肿瘤淋巴管的生成，从而促进肿瘤细胞的转移 。Katsuta 等[10]在食管癌组织中用免疫组织化学的方法证明：HIF-1α 的表达能促进血管内皮生长因子 VEGF-C 的表达，且 HIF-1α 的表达与肿瘤细胞浸润淋巴管有关，提示 HIF-1α 可能通过调节 VEGF-C 的表达在肿瘤淋巴管的转移中起一定的作用。Schoppmann 等[2]也用同样的方法在乳腺癌组织中研究认为 HIF-1α 与 VEGF-C 的表达和淋巴管的生成有关。另外在胰腺癌、口腔鳞状细胞癌等肿瘤中也有报道 HIF-1α 能促进淋巴管生成[3,11]。我们研究也发现 HIF-1α 过表达增加大肠癌旁淋巴管密度 LVD，可见 HIF-1α 可通过促进肿瘤淋巴管的生成而促进肿瘤细胞淋巴结转移。

3.2　大肠癌中 MTA1 和 HIF-1α 表达的相关性

关于 MTA1 和 HIF-1α 的相关性目前研究尚不多见。MTA1 可参与组成 NuRD 复合物，与 HDAC1、HDAC2 相互作用使组蛋白去乙酰基、核小体重塑从而抑制基因的表达[12]。最近有报道 HDAC1/MTA1 复合物能使 HIF-1α 去乙酰基而稳定，同时也增强了 HIF-1α 转录活性而使血管生成增加，为肿瘤的生长和转移提供了有利条件[13]。朱晓霞等[14]报道在肺癌组织中 MTA1 的表达与 HIF-1α 的表达有显著相关性。我们研究发现大肠癌中 MTA1 和 HIF-1α 的表达呈正相关，且促进了大肠癌淋巴结转移，这再次提示 MTA1 可能通过稳定 HIF-1α 蛋白促进了大肠癌转移。特别是，我们还发现 MTA1 过表达的病例，大肠癌旁淋巴管密度增多，提示 MTA1 可能通过 HIF-1α 的表达诱导淋巴管生成。

综上所述，MTA1 和 HIF-1α 的过表达与大肠癌淋巴道转移密切相关，两者都是判断大肠癌预后的重要指标。而且 MTA1 很可能通过稳定 HIF-1α 蛋白来促进大肠癌旁淋巴管的生成，从而有利于大肠癌转移。

参考文献：

[1] Toh Y, Oki E, Oda S, et al. Overexpression of the MTA1 gene in gastrointestinal carcinomas: correlation with invasion and metastasis [J]. Int J Cancer, 1997, 74(4): 459–463.

[2] Schoppmann SF, Fenzl A, Schindl M, et al. Hypoxia inducible factor-1a correlates with VEGF-C expression and lymphangiogenesis in breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 99(2): 135–141.

[3] Tao J, Li T, Li K, et al. Effect of HIF-1alpha on VEGF-C induced lymphangiogenesis and lymph nodes metastases of pancreatic cancer [J]. Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2006, 26(5): 562–564.

[4] Yoo YG, Kong G, Lee MO. Metastasis-associated protein 1 enhances stability of hypoxia inducible factor-1 alpha protein by recruiting histone deacetylase 1 [J]. EMBO J, 2006, 25(6): 1231–1241.

[5] Kahn H J, Bailey D, Marks A. Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi sarcoma and a subset of angiosarcoma [J]. Mol Pathol, 2002, 15(4): 434–400.

[6] Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al. Quantification of Angiogenesis in Solid Human Turnouts: an International Consensus on the Methodology and Criteria of Evaluation [J]. Eur J Cancer, 1996, 32A(14): 2474–2484.

[7] 郭永顺，戴宇平，夏金堂，等. 膀胱移行细胞癌环氧化酶 2 表达与淋巴管和血管生成的关系 [J]. 中山大学

（下转第 396 页　to page 396）