

C-erbB-2/neu 基因表达水平 与结直肠癌预后的关系^①

万德森^② Haiyen E Zhai² Bernard Levin³ Leland W.K. Chung²

(1 中山医科大学附属肿瘤医院腹科, 广州, 510060 2 M D Anderson 癌症中心泌尿科实验室
3 M D Anderson 癌症中心胃肠肿瘤和消化疾病科, 美国, 休斯顿)

提 要 报告31例结直肠癌用 c-erbB-2/neu 单克隆抗体作免疫组织化学染色, 阳性率高达 93.5%, 其中强阳性61.3%(19/31)。呈强阳性的19例中, 5年内死亡47.4%(9/19), 中位数(M)生存期仅24个月, 而呈阴性的2例分别于术后5年半和6年半仍健在。结合长期随访分析, c-erbB-2/neu 基因表达的水平与病者术后生存期有明显的负相关, 可以作为推测结直肠癌病者预后的指标。

关键词 c-erbB-2/neu 基因; 结肠肿瘤; 直肠肿瘤免疫组织化学

中图分类号 R 735.34

结直肠癌是最常见的消化道癌瘤之一。尽管近二三十年来诊治水平有了很大提高, 但是仍有半数病人最终死于本病。影响其预后的因素很多。本文旨在通过对31例结直肠癌的免疫组织化学研究, 试图探索 c-erbB-2/neu 基因在结直肠癌的表达程度及其对疾病预后的影响。

1 材料和方法

从中国中山医科大学肿瘤医院病理科随意挑选在1980~1985年间结肠癌(16例)和直肠癌(15例)病理组织蜡块, 重新切片, 并复习病历和记录随访结果; 而免疫组织化学染色等一系列研究工作, 则在美国休斯顿的 M D Anderson 癌症中心泌尿科实验室进行。

1.1 性别和年龄

本组31例中, 男20例, 女11例, 男女之比为1.8:1。年龄中位数为52岁(范围25~70岁), 30岁以下2例(6.5%), 60岁以上4例(12.9%)。

1.2 癌瘤部位

结肠癌16例, 其中位于盲肠1例, 升结肠5例, 横结肠1例, 脾曲结肠1例, 降结肠5例, 乙状结肠3例; 直肠癌15例。

1.3 临床病理分期

根据 Dukes 分类法, 属于 B 期22例, C 期9例。

1.4 组织学分类

腺癌25例, 粘液腺癌5例, 乳头状腺癌1例。

1.5 手术方式

全部病例均施行了根治性切除术, 其中 Miles 手术12例, Dixon 手术5例, 左半结肠切除术7例, 右半结肠切除术7例。

1.6 随访结果

全部病例均随访5年以上或至死亡。术后6~50个月内死于本病11例, 其余术后5~9年均健在。

1.7 免疫组化染色

将石蜡切片脱蜡, 并依次序用0.1%胰蛋白酶(用 pH7.6 的 PBS 稀释)、10%马血清(用 pH 7.6 的 PBS 稀释)和3% H_2O_2 处理, 分别在室温下培育10 min、30 min 和15 min, 然

① 本研究获世界卫生组织资助, 在美国休斯顿 M D Anderson 癌症中心泌尿科实验室完成;

② 第一作者 53岁, 男, 教授

后用第一抗体 c-erbB-2/neu (Ab-3) (美国 Oncogen science 产品), 浓度 1:5 (用 1% 马血清稀释), 加在玻片上, 在 37℃ 下温育 2 h, 以后按 Biotin/Avidin 系统方法 (ABC 药盒由美国 Vector Laboratories 公司提供) 进行, 用 dibenzanthracene (DAB) 显色。各步骤之间均用 PBS (pH 7.6) 洗涤 4 次, 每次约 2 min。封片后在显微镜下观察其染色情况, 区分为 0 至 III, 在统计时将 0 列为阴性 (亦即癌细胞不着色), + 和 ++ 列为弱阳性 (亦即癌细胞的胞浆、胞膜有着色), III 和 III+ 列为强阳性 (癌细胞着色很深, 见附图)。为减少主观片面性, 分别

由两人各自阅片, 然后核对所得结果, 获得共识。直到总结分析时才查阅随访结果。阴性对照采用小鼠血清 (1:1 000) 代替 c-erbB-2/neu 抗体, 步骤同前述。染色阴性者 100% 细胞不着色; 染色阳性者 50% 以上癌细胞着色。

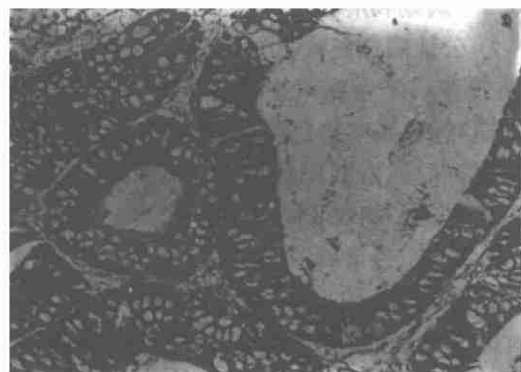
2 结 果

试验组有着色 29 例, 阳性率为 93.5% (29/31), 其中强阳性 19 例, 弱阳性 10 例; 无着色 2 例, 阴性率为 6.5% (2/31), 此两例均为男

性结肠癌。阳性者在镜下可见癌细胞的胞浆和细胞膜有棕黑色颗粒, 根据此等着色颗粒密集程度区分强弱。阴性者镜下未见明显着色颗粒。

强阳性 19 例中, 5 年内死亡 9 例 (47.4%); 阴性和弱阳性 12 例中, 5 年内死亡 2 例 (17.8%)。

全组 5 年内死于肿瘤共 11 例, 其中强阳性 9 例 (81.8%); 而弱阳性仅 2 例 (18.2%)。生存 5 年以上共 20 例, 其中阴性 2 例, 弱阳性 8 例, 强阳性 10 例 (50%)。强阳性在上述生存和死亡组内所占的比例, 经统计学处理, 差异有显著意义 ($P < 0.05$) (附表)。



附图 结肠腺癌切片

C-erbB-2/neu (Ab-3) 免疫组化染色, 癌细胞胞浆呈强阳性反应, 颗粒棕黑色、密集。ABC 法, $\times 400$

附表 C-erbB-2/neu 免疫组化染色情况与随访结果

随访结果	n	阴性和弱阳性		强阳性		P
		例数	%	例数	%	
5年内死亡	11	2	18.2	9	81.8	<0.05
5年以上存活	20	10	50.0	10	50.0	

3 讨 论

C-erbB-2/neu 又称 c-neu, NGL 或 HER-2, 是目前已知的 60 余种肿瘤基因之一, 而且在临床上越来越受重视。它是在 1974 年从小

鼠的神经母细胞瘤和胶质母细胞瘤分离出来^[1], 其产物是一种带有酪氨酸激活酶活性的细胞表面糖蛋白, 分子量为 185 千道尔顿 (111.4×10^3 u), 所以又称为 P185^{neu}。它与上皮生长因子受体 (EGFR) 同源, 但又显著不同, 功能方面可能有调节细胞生长并与上皮

细胞转变有关。c-erbB-2/neu 基因位于人染色体17q²¹,它如何参与细胞恶变的机制尚未明了,但业已发现在多种人类肿瘤中有此基因表达,包括乳腺癌^[2~4]、结直肠肿瘤^[2]、膀胱癌^[2,5]、非小细胞性肺癌^[2]、胃和食管下段腺癌^[6]、胰腺癌^[7]、卵巢癌^[8]、前列腺癌^[9]等。

近来不少研究者指出 c-erbB-2/neu 基因的扩增,肿瘤蛋白超表达与早期复发和较短的生存期有关。Slamon 在一项86例腋淋巴结阳性的乳腺癌研究中指出,c-erbB-2/neu 基因扩增者早期复发且生存期较短^[3]Wright 通过对185例能切除的乳腺癌进行研究,并作了较长时间随访,得出同样结论,并认为 c-erbB-2/neu 肿瘤蛋白的表达是人类乳腺癌重要的独立的预后因素^[4]。Berchuck 用 C-erbB-2/neu 抗体进行免疫组化染色,73例卵巢癌中有23例(32%)呈强阳性,此23例的生存期中位数(M)仅15.7个月,而余50例系 C-erbB-2/neu 正常表达,生存期中位数(M)为32.8个月,因而作者认为 c-erbB-2/neu 基因表达可以作为卵巢癌预后的指标^[8]。Cohen 等亦报告消化道上皮有 c-erbB-2/neu 基因,而且用免疫组化染色时常见绒毛腺上皮着色,而腺管极少或不着色。腺瘤的 c-erbB-2/neu 基因表达比附近正常的上皮或恶性转变的细胞增多,提示 c-erbB-2/neu 肿瘤蛋白可能是一种生存因子受体,对上皮细胞正常生长和功能起调节作用,也与细胞恶变有关。

众所周知,影响结直肠癌术后生存的因素很多。本院曾对363例结直肠癌根治术后长期随访结果分析,发现影响疗效的主要因素有年龄、肿瘤部位、病期和淋巴结转移^[10]。现试从这几方面和生存期结合本组31例免疫组化染色结果分析 c-erbB-2/neu 表达对预后的影响。

3.1 年龄

本组30岁以下的2例染色均为强阳性,均于术后1年半内死亡,而70岁的乙状结肠癌患者,染色为弱阳性,术后5年2个月仍健在。30~69岁的28例中,染色强阳性17例(60.7%),

弱阳性和阴性11例(39.3%)。一般认为青少年结直肠癌预后差。本研究结果提示此可能与 c-erbB-2/neu 肿瘤基因表达水平有关,但无统计学意义($P>0.05$)。

3.2 肿瘤部位

一般认为结肠癌预后比直肠癌好,本组染色结果表明直肠癌 c-erbB-2/neu 肿瘤蛋白表达甚于结肠癌。结肠癌16例中,阴性2例(12.5%),弱阳性5例(23.1%),强阳性9例(56.3%);而直肠癌15例全部阳性,其中弱阳性5例(33.3%),强阳性10例(66.7%)。但两部位强阳性率比较,差异无显著意义($P>0.05$)。

3.3 病期和淋巴结转移

公认病期越晚,预后越差;一旦发生淋巴结转移,5年生存率则明显下降。本组 Dukes B 期22例,其中染色阴性2例(9.1%),弱阳性8例(36.4%),强阳性12例(54.5%);而 C 期9例中,弱阳性2例(22.2%),强阳性7例(77.8%);再者,C 期9例中7例于术后6~50个月内死于肿瘤。C 期预后差,是否与 c-erbB-2/neu 肿瘤蛋白超表达较甚有关呢?值得进一步探讨。

3.4 生存期

本组强阳性的19例中,5年内死亡9例(47.4%);而阴性和弱阳性的12例中,5年内死亡仅2例(17.8%)。虽然两者差异无显著意义($P>0.05$),但似乎可以看到强阳性预后较差,5年生存率较低。事实上,根据5年内死亡11例与5年以上存活的20例比较(附表),表明 c-erbB-2/neu 肿瘤蛋白的表达水平在两者间起重要作用。强阳性者死亡的9例,生存期中位数(M)仅24个月(范围6~50个月),而阴性的2例术后已分别存活5年半和6年半仍健在。可见,如用免疫组化方法未能测出 C-erbB-2/neu 肿瘤蛋白表达,则预后极为良好。

综上所述,用免疫组化方法测定 C-erbB-2/neu 肿瘤蛋白的结果,与影响结直肠癌预后的主要因素是相一致的,5年生存率基

本上与 c-erbB-2/neu 肿瘤蛋白超表达呈负相关。所以,我们认为 c-erbB-2/neu 肿瘤基因是否扩增或肿瘤蛋白是否超表达可以作为一项预测结直肠癌患者术后预后的指标。

本研究病例数不多,且仅用了免疫组化染色方法,是属于探索性的,更进一步应运用 Western blot 对 c-erbB-2/neu 蛋白进行分析和运用 Northern blot 和 Southern blot 等手段对 mRNA 表达和基因扩增进行细致研究。对结直肠癌的肿瘤基因(如 c-erbB-2/neu)和抑制基因(如 P⁵³)的深入研究,不仅可以更好理解肿瘤的形成过程和寻找早期诊断的标记物,还可以促使结直肠癌的预防和治疗产生革命性的变化。

(本研究承蒙中山医科大学肿瘤医院腹科张亚奇医生和病理科赵美卿技师大力协助,谨致谢意)

参 考 文 献

- 1 Shih C, Padhy LC, Murray M, et al. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature*, 1981, 290: 261
- 2 McCann A, Dervan PA, Johnston PA, et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in primary human tumors. *Cancer*, 1990, 65: 88
- 3 Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer; Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science (Wash DC)*, 1987, 235: 177
- 4 Wright C, Angus B, Nicholson S, et al. Expression of c-erbB-2/neu oncoprotein: A prognostic indication in human breast cancer. *Cancer Res*, 1989, 49: 2087
- 5 Zhau GYE, Zhang X, Von Eschenbach AC, et al. Amplification and expression of the C-erbB-2/neu proto-oncogene in human bladder cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 1990, 3: 254
- 6 Houldsworth J, Cordon-Cardo C, Ladanyi M, et al. Gene amplification in gastric and esophageal adenocarcinomas. *Cancer Res*, 1990, 50: 6417
- 7 Yamanaka Y, Onda M, Uchida E, et al. Immunohistochemical study on expression of c-erbB-2 protein in human pancreatic carcinoma. *Pancreas*, 1990, 5(6): 737
- 8 Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, et al. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, 1990, 50: 4087
- 9 Zhau HE, Wan DS, Zhou JX, et al. Expression of c-erbB-2/neu proto-oncogene on human prostatic cancer tissues and cell lines. *Molecular Carcinogenesis*, 1992, 5: 320
- 10 万德森, 李国材, 马国胜, 等. 结直肠癌根治术后长期随访结果分析. *中国肿瘤临床*, 1992, 19(2): 111

(1993-05-19收稿 1993-11-28修回)

RELATIONSHIP BETWEEN C-erbB-2/neu EXPRESSION AND PROGNOSIS OF COLORECTAL CANCER

Wan Desen¹ Haiyen E. Zhau² Bernard Levin³ Leland W. K. Chung²

(1 Department of Abdominal Surgery, Tumor Hospital,
Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510060;

2 Department of Urology,

3 Department of Gastrointestinal Oncology and Digestive
Diseases, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas U. S. A.)

C-erbB-2/neu protooncogen coded for a transmembrane glycoprotein was expressed in broad categories of human neoplasms. The amplification/expression of c-erbB₂/neu has been employed as a prognostic markers for human breast, ovarian, lung and gastric cancers. In this study, we examined the expression of c-erbB₂/neu oncoprotein in 31 cases of primary human colorectal cancers by an immunohistochemical method. Results of our study showed that: (1) c-erbB₂/neu was expressed in 93.5% (29/31) of the specimens examined; 61.3% (19/31) of the specimens were found to stain strongly whereas 32.2% (10/31) stained weakly and 6.5% (2/31) was found to be devoid of any staining. (2) Specimens obtained from patients with strong staining splited fairly evenly in their survival for <5 years (47% or 9/19) and >5 years (53% or 10/19). In contrast, a substantial higher percentage of patients with weak staining (83% or 10/12) survived >5 years than those survived <5 years (17% or 2/12). (3) Of the patients who died within 5 years, 82% (9/11) exhibited strong c-erbB₂/neu staining with only 18% displayed weak staining. In contrast, 50% (10/20) of the patients who survived >5 years had strong c-erbB₂/neu staining and the other 50% (10/20) have weak staining. Our data suggest that strong c-erbB₂/neu staining in colorectal cancer is associated with poor prognosis for 5-year survival.

Key words c-erbB-2/neu; colonic neoplasms; rectal neoplasms immunohistochemical method