

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.10.006

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.10.006>

Numb 分子在结肠癌组织中的表达及其与临床分期的相关性

杨永涛¹, 刘艺², 李连勇¹, 陈琰¹, 黄鑫¹, 屈昌民¹, 梁淑文¹

(1. 中国人民解放军第306医院消化内科, 北京 100101; 2. 中国人民解放军第252医院病理科, 河北 保定 071000)

[摘要] 目的: 检测Numb分子在结肠癌组织中的表达, 探讨其与临床病理分期的关系。方法: 收集并筛选2012年9月至2016年8月解放军第306医院病理科存档的手术切除且得到病理确诊的结肠癌病例75例, 记录其肿瘤分期, 采用免疫组织化学方法检测结肠癌标本及癌旁组织中Numb蛋白表达水平, 分析其与临床病理因素的相关性。结果: 在癌旁组织中Numb表达主要定位在细胞膜上, 而在癌组织中胞膜及胞浆均有表达。结肠癌组织中Numb表达水平较癌旁组织降低(4.87 ± 2.10 vs 7.88 ± 1.87), 差异有统计学意义($P < 0.01$); Numb表达水平在 N_0 与 N_{1-2} 期间及TNM分期I~II与III~IV间差异具有统计学意义($P < 0.01$); 而Numb表达水平与患者性别、年龄、肿瘤大小比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。结论: Numb在结肠癌组织中表达降低, 提示Numb分子在结肠癌的发生发展中发挥作用。

[关键词] Numb; 结肠癌; 临床分期

Numb expression in colon cancer and its correlation with clinicopathological staging

YANG Yongtao¹, LIU Yi², LI Lianyong¹, CHEN Yan¹, HUANG Xin¹, QU Changmin¹, LIANG Shuwen¹

(1. Department of Gastroenterology, the 306th Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100101; 2. Department of Pathology, the 252th Hospital of People's Liberation Army, Baoding Hebei 071000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression pattern of Numb molecule in colon cancer tissue and adjacent tissues, and to analyze the relationship of Numb expression with clinicopathological stage. **Methods:** Routine immunohistochemistry staining was used to detect the expression of Numb in 75 cases of surgical resected colon cancer tissues and adjacent colon tissues that were collected from September 2012 to August 2016 in the 306th Hospital of People's Liberation Army. The pathological stages were recorded. The correlation of Numb expression levels with clinicopathologic data were analyzed. **Results:** Numb was expressed both in the colon cancer tissues and the adjacent colon tissues. Numb was mainly located on the cellular membrane in the adjacent colon tissues while it located both on the cellular membrane and in the cytoplasm in the cancer tissues. Compared with the

收稿日期 (Date of reception): 2017-06-29

通信作者 (Corresponding author): 梁淑文, Email: cherytmu@sina.com

基金项目 (Foundation item): 北京市自然科学基金 (7162207)。This work was supported by Natural Science Foundation of Beijing, China (7162207).

adjacent colon tissues, the overall expression level decreased significantly in the colon cancer tissues (4.87 ± 2.10 vs 7.88 ± 1.87), the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The ratios of high level of Numb expression in the groups of N_0 and TNM I-II stages were significantly higher than that in the N_{1-2} and TNM III-IV stages, respectively ($P < 0.01$). However, there were no significant differences between the level of Numb expression with gender, age and tumors size, respectively (all $P > 0.05$). **Conclusion:** Numb expression changes in colon cancer tissue, which plays an important role in the carcinogenesis and progression of colon cancer.

Keywords Numb; colon cancer; clinical staging

最初, Numb作为一个调节神经细胞发育的“命运决定分子”而被人们发现, 因其能够抑制Notch受体信号通路而引起人们的广泛关注。随后的研究^[1]表明它参与调节多种生化途径与信号, 除可以通过内吞及泛素化作用调节Notch, Hedgehog和TP53等信号途径外, 其还可以调节细胞间黏合和紧密连接, 维持细胞的极性。考虑Numb在细胞动态平衡中多方面的作用, 人们推测其可通过多种途径调控肿瘤的发生发展。研究^[2]显示Numb分子可以通过调控黏附分子E-cadherin胞内的定位调节肿瘤发生过程中的上皮-间质转变, 提示其可能与肿瘤的侵袭及转移有关。结直肠癌是我国第二高发的肿瘤, 且在我国发病率逐年升高, 目前对于其发生及转移的机制认识仍不清楚。检测Numb在结肠癌组织及癌旁组织中的表达变化, 并且分析其与临床病理因素之间的相关性, 可以为结肠癌的发生和发展提供新的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

收集解放军第306医院2012年9月至2016年8月病理科存档且术前均未行放、化疗的手术切除结肠癌标本75例, 每例均同时采集肿瘤组织和肿瘤组织边缘5 cm以外的癌旁组织。男40例, 女35例; 年龄 >70 岁者33例, 年龄 ≤ 70 岁者42例; TNM I-II期36例, III-IV期39例; 肿瘤浸润程度T1~T2者13例, T3~T4者62例; 肿瘤直径 <3 cm者24例, ≥ 3 cm者51例; 淋巴结转移者39例, 无转移者36例; 有远处器官转移者9例, 无转移者66例。TNM分期参照美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)指南(第7版, 2010)进行。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色

使用免疫组织化学染色二步法检测Numb分子在结肠癌及癌旁组织中的表达情况。实验步骤严格遵照试剂说明书指导进行。使用PBS代替一抗作为阴性表达对照。兔抗人Numb多克隆抗体(Ab14140)及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(Ab136817)均购于美国Abcam公司, 氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。4 μm 厚石蜡包埋组织切片置入烤箱中烤片, 分别置入二甲苯及浓度梯度酒精中脱蜡至水, 置入EDTA修复液中进行高压热修复, 修复完毕冷却后置入3% H_2O_2 去离子水中消除内源性过氧化物酶, 洗涤完毕后加盖用PBS配制的3% BSA封闭1 h后立即加入稀释好的一抗(1:1 800), 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。PBS洗涤后加入稀释的二抗(1:200), 37 $^\circ\text{C}$ 孵育1 h。然后加入DAB工作液染色。染色终止后逐步苏木素染核、酒精盐酸分色、脱水及中性树脂封片。

1.2.2 免疫组织化学结果判定

组织切片的免疫组织化学结果在20倍放大光学显微镜下每一标本随机观察3~4个显微镜视野中染色阳性细胞。按照一般的评价标准, 阳性细胞百分比量化成5组: 0~5%阳性细胞评分为0; 6%~25%阳性细胞评分为1; 26%~75%阳性细胞评分为3; $>75\%$ 阳性细胞评分为4。染色强度评分: 无染色评分为0, 弱染色评分为1, 中度评分为2, 强染色评分为3。采用阳性染色强度评分和百分比量化评分乘积来表示Numb表达水平: 阴性(0分), 低表达(1~6分)和高表达(>6 分)。

1.3 统计学处理

利用SPSS 13.0软件进行统计学分析。计量资料采用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 总体均数间的比较采用Student-*t*检验。计数资料以采用 χ^2 检验及

Fisher精确检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Numb在癌旁组织和结肠癌组织中的表达情况

Numb在癌旁组织和结肠癌组织均有表达, 在癌旁组织表达主要定位在细胞膜上, 而在癌组织中胞膜及胞浆均有表达, 呈弥漫性或散在分布的棕黄色颗粒(图1), 在不同个体中其表达强弱存在较大差异。总体上, 结肠癌组织的表达水平较癌旁组织表达明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$; 表1)。结肠癌组织有22例高表达, 53例低表达, 而癌旁组织有29例高表达, 46例低表

达, 不同表达水平在结肠癌组织及癌旁组织间差异有统计学意义($\chi^2 = 15.49$, $P < 0.01$)。

2.2 Numb表达与结肠癌患者临床病理分期的相关性

Numb分子的表达在TNM分期III-IV期与I-II期结肠癌组织中的分布差异有统计学意义($P < 0.01$), Numb表达与TNM分期呈负相关。Numb表达水平在不同分期淋巴结转移患者中差异有统计学意义($P < 0.001$), Numb低表达患者更容易发生淋巴结转移。而Numb表达与结肠患者肿瘤大小无明显相关($P = 0.108$)。Numb表达水平与患者的性别和年龄也无显著相关性($P = 0.520, 0.870$; 表2)。

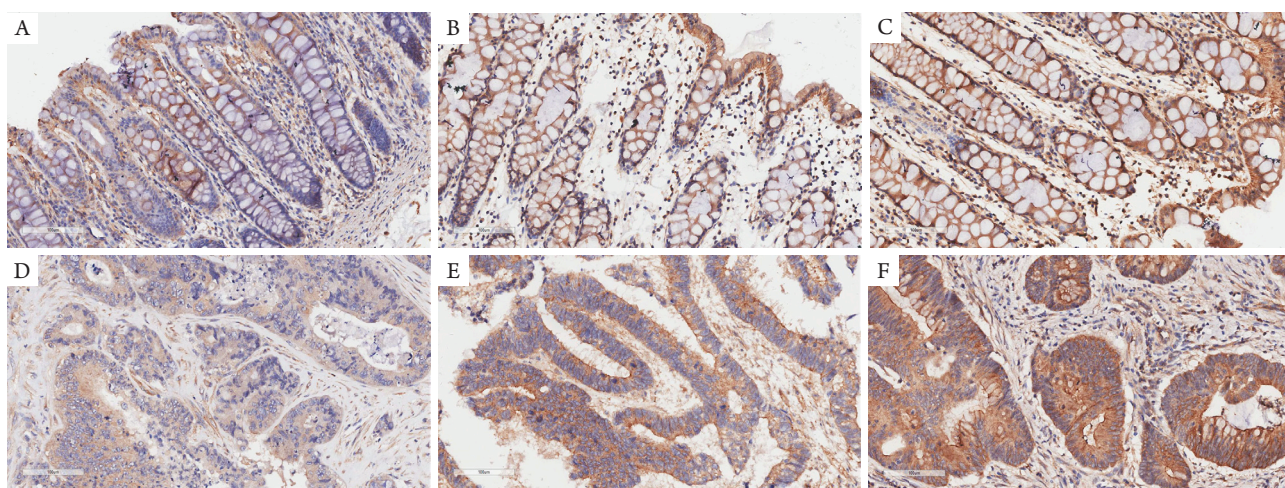


图1 免疫组织化学检测Numb分子在结肠癌及癌旁组织中的不同强度表达($\times 200$)

Figure 1 Differential expression of Numb in colon cancer and adjacent colon tissues detected by immunohistochemistry method ($\times 200$)

A, B, C为癌旁组织; D, E, F为结肠癌组织。

A, B, C for adjacent colon tissues; D, E, F for colon cancer tissues.

表1 免疫组织化学检测Numb分子在结肠癌及癌旁组织中的表达($n=75$)

Table 1 Expression of Numb between the colon cancer tissues and adjacent colon tissues detected by immunohistochemistry ($n=75$)

染色强度	低表达	高表达	合计
结肠癌组织			
百分比	70.6	29.4	100
总分	164	201	365
平均分	3.10 ± 1.42	9.13 ± 1.76	4.87 ± 2.10
癌旁组织			
百分比	38.7	61.3	100
总分	121	470	591
平均分	4.17 ± 1.64	10.22 ± 1.53	7.88 ± 1.87

表 2 Numb 分子表达与结肠癌患者临床病理特征的相关性 ($n=75$)Table 2 Correlation between Numb expression levels and the clinicopathological parameters of colon cancer specimens ($n=75$)

临床病理特征	<i>n</i>	Numb 表达水平 高表达数	低表达数	χ^2	<i>P</i>
性别					
男	40	13	27	0.415	0.52
女	35	9	26		
年龄 / 年				0.027	0.87
≤ 70	42	12	30		
>70	33	10	23		
肿瘤大小 /cm				2.59	0.108
≤ 3	24	10	14		
>3	51	12	39		
淋巴结转移				7.626	0.006
N ₀	36	16	20		
N ₁₋₂	39	6	33		
TNM 分期				22.684	<0.001
I-II	36	18	12		
III-IV	39	4	41		

3 讨论

Numb分子是一个膜相关的蛋白分子, 在干细胞分裂期, 其不对称地分布到两个子代细胞中, 通过抑制Notch通路的活性使两个子代细胞显示不同的分化特性。同时, Numb又是一个进化保守的分子, 在哺乳动物中, 它的同源分子由mNumb和mNumb-like两个基因编码^[3]。Numb蛋白氨基端包含一个磷酸化酪氨酸结合域(phosphotyrosine binding, PTB), 羧基端的包含富含脯氨酸区(proline-rich region, PRR)和Eps15同源区(eps15 homology, EH; DPF和NPF区), 选择性剪切主要发生在PTB和PRR区^[1]。目前已知, 根据位于PTB区内的一个11个氨基酸片段、位于PRR区内的48个氨基酸片段及PRR区的存在与否, Numb基因至少存在6种转录剪切体——编码分子质量为54~72 kD之间的6种蛋白, 并且各种剪切体的表达存在一定的细胞特异性^[4]。既往研究^[5]表明Numb分子在肠上皮细胞系和肠黏膜上皮细胞内都有表达, Notch通路相关分子在肠黏膜上皮细胞存在共定位关系, 在体外培养的细胞系上能够通过抑制Notch信号通路使细胞显示出杯状细

胞表型。且这些普遍表达的Numb分子能够通过调节细胞及连接复合体的组装维持上皮细胞的顶底极性^[6]。基于上述结果推测Numb分子可能通过调节上皮细胞的增殖、分化及上皮间质细胞间的EMT等过程参与结肠癌的发生发展。

研究^[7-8]表明Numb与多种肿瘤的发生有关, 并且其表达水平在不同类型的肿瘤中也存在差别。例如在乳腺癌及非小细胞肺癌中Numb表达降低, 说明其可能发挥抑癌基因的作用。Zheng等^[9]研究发现胰腺导管癌组织中Numb蛋白的表达水平显著下降, 并且通过反转录PCR研究发现PRR结构域完整型和PRR中间48氨基酸缺失型的两种剪切体均有表达。食管鳞癌中, PTB和PRR结构域均完整的Numb1亚型低表达与肿瘤术后高复发率及不良预后显著相关^[10]。但也有研究^[11-12]显示: Numb基因在如星形胶质细胞瘤、宫颈鳞状细胞癌等肿瘤中过度表达, 可能发挥原癌基因的作用。同样, Lu等^[13]报道PTB结构域部分缺失的Numb3型在肝细胞癌中呈过表达, 与肝癌早期复发及不良预后显著相关。Xie等^[14]发现在肝细胞癌中Numb的过表达与肝细胞癌组织分型、门静脉侵袭以及癌灶数量呈正相关。这说明Numb在肿瘤发生发展中发挥肿

瘤特异性的作用。

曾蕴林等^[15]研究发现Numb在正常结肠组织和中、高分化的结肠癌组织中均有较高的阳性表达率,在低分化的结肠癌组织中阳性率下降,说明Numb的表达强度与肿瘤分化程度相关。且该研究^[15]表明来源于Dukes'C级结肠癌的SW62细胞系中Numb分子表达较来源于Dukes'B级结肠癌的SW48细胞系明显降低,但是在不同Dukes分期肿瘤组织中未发现Numb的表达强弱有明显差异。本研究发现在不同分期的结肠癌组织中均有Numb高表达及低表达的发生,但是Numb表达与淋巴结转移及TNM分期呈明显负相关,这说明Numb分子可能如之前推测通过Numb-Notch拮抗、维持P53稳定性及调节E-Cadherin的定位等抑制肿瘤的发生发展。然而有研究^[4]显示两种PRR结构域大部分缺失的两种新型Numb分子亚型NUMB5和NUMB6具有促进肿瘤发生的作用。Karaczyn等^[16]研究发现NUMB6分子能够通过诱导上皮基质转换促进乳腺癌的侵袭和转移。说明Numb分子在肿瘤发生发展中具有亚型特异性。本研究发现在不同分期的肿瘤组织中均可观察到高、低水平的Numb分子表达,同样说明Numb分子在不同个体结肠癌发生发展中可能起到不同的作用。要研究Numb分子在结肠癌中的作用机制,可能需要深入到不同的Numb分子亚型水平。

参考文献

- Gulino A, Di Marcotullio L, Screpanti I. The multiple functions of Numb[J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(6): 900-906.
- Wang Z, Sandiford S, Wu C, et al. Numb regulates cell-cell adhesion and polarity in response to tyrosine kinase signalling[J]. *EMBO J*, 2009, 28(16): 2360-2373.
- Zhong W, Jiang MM, Weinmaster G, et al. Differential expression of mammalian Numb, Numlike and Notch1 suggests distinct roles during mouse cortical neurogenesis[J]. *Development*, 1997, 124(10): 1887-1897.
- Karaczyn A, Bani-Yaghoob M, Tremblay R, et al. Two novel human NUMB isoforms provide a potential link between development and cancer[J]. *Neural Dev*, 2010, 5: 31.
- Yang Y, Zhu R, Bai J, et al. Numb modulates intestinal epithelial cells toward goblet cell phenotype by inhibiting the Notch signaling pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(11): 1640-1648.
- Yang Y, Chen L, Tian Y, et al. Numb modulates the paracellular permeability of intestinal epithelial cells through regulating apical junctional complex assembly and myosin light chain phosphorylation[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(20): 3214-2325.
- Pece S, Serresi M, Santolini E, et al. Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis [J]. *J Cell Biol*, 2004, 167(2): 215-221.
- Westhoff B, Colaluca IN, D'Ario G, et al. Alterations of the Notch pathway in lung cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(52): 22293-22298.
- Zheng KL, He TL, Ji WP, et al. Alternative splicing of NUMB, APP and VEGFA as the features of pancreatic ductal carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(6): 6181-6191.
- Hong J, Liu Z, Zhu H, et al. The tumor suppressive role of NUMB isoform 1 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(14): 5602-5614.
- Chen H, Chen X, Ye F, et al. Symmetric division and expression of its regulatory gene Numb in human cervical squamous carcinoma cells[J]. *Pathobiology*, 2009, 76(3): 149-154.
- Yan B, Omar FM, Das K, et al. Characterization of Numb expression in astrocytomas[J]. *Neuropathology*, 2008, 28(5): 479-484.
- Lu Y, Xu W, Ji J, et al. Alternative splicing of the cell fate determinant Numb in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2015, 62(4): 1122-1131.
- Xie C, Lu Z, Liu G, et al. Numb downregulation suppresses cell growth and is associated with a poor prognosis of human hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(3): 653-660.
- 曾蕴林, 邵喜明, 李华顺. 膜相关蛋白Numb在结肠癌中的表达和意义[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2012, 43(1): 6-8.
- ZENG Yunlin, SHAO Ximing, LI Huashun. Numb expression in colon cancer and its significance[J]. *Journal of Sichuan University. Medical Science Edition*, 2012, 43(1): 6-8.
- Karaczyn AA, Adams TL, Cheng RY, et al. Human NUMB6 induces epithelial-mesenchymal transition and enhances breast cancer cells migration and invasion[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(2): 237-251.

本文引用: 杨永涛, 刘艺, 李连勇, 陈琰, 黄鑫, 屈昌民, 梁淑文. Numb分子在结肠癌组织中的表达及其与临床分期的相关性[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(10): 2057-2061. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.10.006

Cite this article as: YANG Yongtao, LIU Yi, LI Lianyong, CHEN Yan, HUANG Xin, QU Changmin, LIANG Shuwen. Numb expression in colon cancer and its correlation with clinicopathological staging[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(10): 2057-2061. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.10.006