

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.008

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.008

Gankyrin 在结直肠癌和腺瘤中的表达及其临床意义

刘颖

(河南科技大学附属三门峡市中心医院病理科, 河南 三门峡 472000)

[摘要] 目的: 探讨癌性锚蛋白重复序列(Gann ankyrin repeats, Gankyrin)在结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)和腺瘤组织中的表达及其临床意义。方法: 采用免疫组织化学检测Gankyrin在94例CRC和87例腺瘤组织中的表达, 同时分析Gankyrin表达与CRC临床病理学特征的相关性。结果: Gankyrin在正常肠黏膜、腺瘤和CRC中的表达率分别为11.7%(11/94), 47.1%(41/87), 70.2%(66/94, $P<0.001$)。Gankyrin在CRC中的表达与组织学分级、临床分期和转移相关($P<0.05$), 和患者性别、年龄以及肿瘤大小没有相关性($P>0.05$)。结论: Gankyrin不仅参与CRC的早期发生, 也与CRC的恶性进展有关, 有望成为CRC诊断和防治的靶标。

[关键词] 癌性锚蛋白重复序列; 结肠; 直肠; 癌; 腺瘤

Expression of Gankyrin in colorectal carcinomas and adenomas and its clinical significance

LIU Ying

(Department of Pathology, Central Hospital of Sanmenxia, Affiliated to Henan University of Science and Technology, Sanmenxia Henan 472000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression of Gann ankyrin repeats (Gankyrin) in colorectal carcinoma (CRC) and adenoma and its clinical significance. **Methods:** Immunohistochemical assay was performed to detect the expression of Gankyrin in 94 cases of CRCs and 87 cases of adenomas. In addition, the relationship between the expression of Gankyrin and the clinicopathological features of patients with CRCs was analyzed. **Results:** The rates of Gankyrin expression in normal intestinal mucosa, adenomas and CRCs were 11.7% (11/94), 47.1% (41/87), 70.2% (66/94), respectively ($P<0.001$). The expression of Gankyrin in CRCs was remarkably related with histologic grade of CRCs, metastasis, and the clinical stage ($P<0.05$). There was no correlation between the expression of Gankyrin and age, gender of patients with CRCs, size of tumors ($P>0.05$). **Conclusion:** Gankyrin does not only participate in the early carcinogenesis of CRCs, but also is related to their malignant progression. Gankyrin is a potential target for the diagnosis, prevention and treatment of CRCs.

Keywords Gann ankyrin repeats; colon; rectum; carcinoma; adenoma

收稿日期 (Date of reception): 2018-03-02

通信作者 (Corresponding author): 刘颖, Email: liuyingsanmenxia@163.com

结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)是一种严重威胁人类健康的消化道恶性肿瘤,在全球男、女性恶性肿瘤的发病率中,CRC分别居第4和第3位。全球每年新发CRC病例约120万,死亡人数约60万^[1]。在我国,随着人们生活水平的提高和膳食结构的改变,CRC的发病呈逐年上升趋势。据国家癌症中心^[2]最新统计,我国2015年约有37.6万CRC新发病例,发病率居第4位,有19.1万人死于CRC。因此,探讨CRC的发生、发展机制,寻找CRC的诊治靶标,对CRC的早期筛查、诊断、靶向治疗以及改善CRC的预后,具有重要意义。癌的发生、发展是多因素、多步骤协同作用的结果,其中癌基因的激活和抑癌基因的失活,是导致癌症发生的重要机制。研究^[3]发现:肠癌的发生遵循“正常上皮-高度增生上皮-腺瘤-癌-转移”的过程,因此腺瘤被认为是肠癌的重要癌前病变。癌性锚蛋白重复序列(Gann ankyrin repeats, Gankyrin)是近年克隆的一种癌基因,在细胞增殖调控过程中起重要作用^[4]。Gankyrin最初被发现于肝细胞癌中高表达,后来经研究证实,其在食管癌^[5]、胆管癌^[6]、乳腺癌^[7]、肺癌^[8]中也有异常表达;且上调Gankyrin表达能促进肿瘤的发展,下调Gankyrin表达则能抑制肿瘤的发展。表明Gankyrin与肿瘤的发生、发展关系密切^[4-8]。目前关于Gankyrin在CRC中的研究甚少^[9-12],且鲜见在结直肠腺瘤中的表达的研究报道。本研究采用免疫组织化学技术,检测Gankyrin在CRC及腺瘤中的表达,并结合临床病理参数,旨在探讨其在CRC发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源

选取河南省三门峡市中心医院院病理科存档的2010年1月1日至2016年12月30日结、直肠黏膜腺瘤活检标本87例和CRC手术根治切除标本94例。所有病例经病理学证实,诊断无异议。结直肠腺瘤和癌的组织学诊断和分级参照2013年版WHO消化系统肿瘤分类^[13]。根据细胞的异型性和腺体结构的异型性,将腺瘤分为腺瘤伴低级别上皮内瘤变(low grade intraepithelial neoplasia, LGIN)和腺瘤伴高级别上皮内瘤变(high grade intraepithelial neoplasia, HGIN)两组。CRC的临床分期参照2010年版美国癌症联合委员会/国际抗癌联盟(American Joint Committee on Cancer/Union

for International Cancer Control, AJCC/UICC)结直肠癌TNM分期系统^[14],将CRC分为I, II, III, IV期。CRC的组织学类型均为腺癌,患者均有详细的临床病理学资料,术前未接受任何肿瘤相关治疗,均为首次手术。在94例CRC患者(表1)中,男62例,女32例,年龄19~85岁;高、中分化76例,低分化18例;临床I+II期38例,III+IV期56例;淋巴结或远处转移阴性51例,阳性病43例。对CRC病例,同时选取癌旁正常肠黏膜作为正常对照(距离癌组织至少5 cm)。标本均经中性缓冲甲醛固定液固定12~24 h,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,4 μm 切片,HE染色,显微镜观察并诊断。本研究经三门峡市中心医院科研伦理委员会审核批准。

1.1.2 试剂

浓缩型抗Gankyrin多克隆抗体购自美国Dako公司。免疫组织化学试剂盒、DAB显色试剂盒、抗原修复用枸橼酸缓冲液均购自北京中山金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色及结果判定

采用免疫组织化学EnVision二步法检测Gankyrin在结、直肠病变中的表达,操作按试剂盒说明书进行。步骤如下:4 μm 切片脱蜡、水化、自来水冲洗;枸橼酸抗原修复液微波修复20 min,自然冷却,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗;滴加3%过氧化氢,室温10 min, PBS冲洗;滴加非免疫动物血清,室温10 min;除去血清,滴加一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBS冲洗;滴加生物素标记二抗,室温10 min, PBS冲洗;DAB显色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜观察。抗Gankyrin抗体按1:800稀释后使用,以PBS代替一抗作为阴性对照。由于Gankyrin最初从肝细胞癌中克隆出来,且在肝细胞癌中100%(34/34)中高表达^[4],因此,本文以肝细胞癌切片作为阳性对照。

1.2.2 结果判定

Gankyrin表达定位于细胞质/细胞核,由于表达强度的不同,在细胞质/细胞核呈淡黄色、棕黄色或棕褐色。根据阳性细胞数和染色强度来判定结果,方法如下:随机选取10个高倍视野($\times 400$),每个视野计数100个细胞。根据每个病例中阳性细胞数和阳性的强弱程度,分别评分。根据阳性细胞数评分标准为:阳性细胞数 $< 5\%$,为0分;5% \leq 阳性细胞数 $< 25\%$,为1分;25% \leq 阳性细胞数 $< 50\%$,为2分;50% \leq 阳性细胞数 $< 75\%$,为3分;阳性细胞数 $\geq 75\%$,为4分。细胞染色强度

评分: 细胞质/细胞核无着色, 为0分; 细胞质或细胞核呈淡黄色, 为1分; 细胞质或细胞核呈棕黄色, 为2分; 细胞质或细胞核呈棕褐色, 为3分。每个病例的2个评分的乘积, 即为该病例免疫组织化学染色的最终评分。0分, 判为阴性(-); 1~4分, 判为+; 5~8分, 判为++; 9~12分, 判为+++。+至

+++均判为免疫组织化学染色阳性。

1.3 统计学处理

使用SPSS 17.0统计软件进行数据分析, 组间差异性比较采用卡方(χ^2)检验。设检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 Gankyrin在CRC中的表达及其与临床病理参数的关系

Table 1 Expression of Gankyrin in CRCs and its relationship with clinicopathological parameters

临床病理参数	n	阳性/[例(%)]			阴性(-)	χ^2	P
		+	++	+++			
年龄/岁						0.054	0.817
≤60	42	10 (23.8)	12 (28.6)	8 (19.1)	12		
>60	52	14 (26.9)	11 (21.2)	11 (21.2)	16		
性别						0.488	0.485
男	62	15 (24.2)	16 (25.8)	14 (22.6)	17		
女	32	9 (28.1)	7 (21.9)	5 (15.6)	11		
分化程度						4.607	0.032
高、中分化	64	16 (25.0)	13 (20.3)	11 (17.2)	24		
低分化	30	8 (26.7)	10 (33.3)	8 (26.7)	4		
肿瘤大小/cm						0.906	0.341
≤3	44	10 (22.7)	12 (27.3)	11 (25.0)	11		
>3	50	14 (28.0)	11 (22.0)	8 (16.0)	17		
TNM分期						6.816	0.009
I+II	38	8 (21.1)	6 (15.8)	7 (18.4)	17		
III+IV	56	16 (28.6)	17 (30.4)	12 (21.4)	11		
淋巴结或远处转移						4.739	0.029
无	51	10 (19.6)	9 (17.6)	12 (23.5)	20		
有	43	14 (32.6)	14 (32.6)	7 (16.3)	8		

2 结果

2.1 Gankyrin 在 CRC, 腺瘤和癌旁正常组织中的表达

免疫组织化学染色结果示: Gankyrin在CRC、腺瘤、癌旁组织中均有不同程度的表达, 定位于细胞质和/或细胞核(图1~3, 表1~3)。Gankyrin在CRC, 腺瘤, 癌旁组织中的表达率分别为66/94(70.2%), 41/87(47.1%), 1/94(11.7%), 差异有统计学意义($\chi^2=66.607$, $P<0.001$; 表2)。且Gankyrin在腺

瘤伴HGIN(19/26)中的表达率显著高于腺瘤伴LGIN中的阳性率(23/61), 差异有统计学意义($\chi^2=10.022$, $P=0.002$; 表3)。

2.2 Gankyrin 在 CRC 中的表达及其与临床病理参数的关系

Gankyrin的表达与CRC患者的性别、年龄、肿瘤的大小无相关性($P>0.05$); 而与肿瘤的分化程度($\chi^2=4.607$, $P=0.032$)、TNM临床分期($\chi^2=6.816$, $P=0.009$)、淋巴结或远处转移相关($\chi^2=4.739$, $P=0.029$; 表1)。

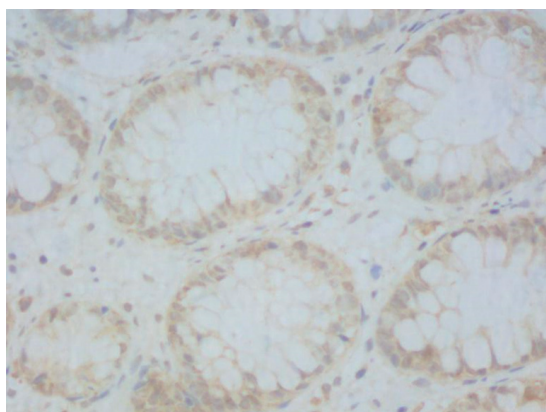


图1 Gankyrin在正常肠黏膜中的表达(EnVision, × 200)

Figure 1 Expression of Gankyrin in normal intestinal mucosa (EnVision, × 200)

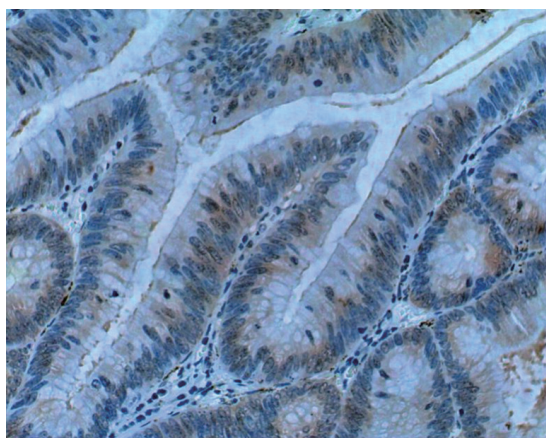


图2 Gankyrin在结、直肠腺瘤中的表达(EnVision, × 200)

Figure 2 Expression of Gankyrin in colorectal adenoma (EnVision, × 200)

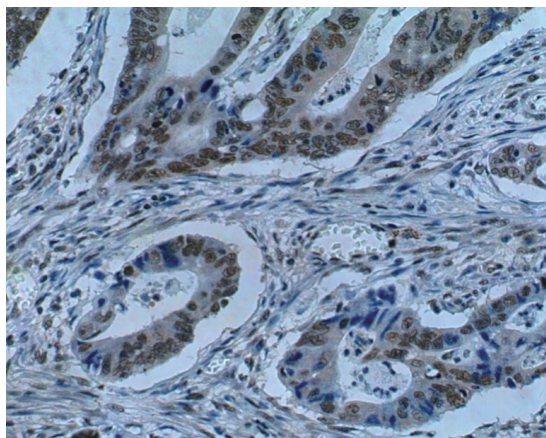


图3 Gankyrin在CRC中的表达(EnVision, × 200)

Figure 3 Expression of Gankyrin in CRC (EnVision, × 200)

表2 Gankyrin在CRC, 腺瘤和正常肠黏膜中的表达

Table 2 Expression of Gankyrin in CRCs, adenomas and normal intestinal mucosa

组别	n	Gankyrin阳性[例(%)]		
		+	++	+++
正常肠黏膜	94	9 (9.6)	2 (2.1)	0 (0.0)
腺瘤	87	19 (21.8)	10 (11.5)	12 (13.8)
CRC	94	24 (25.5)	23 (24.5)	19 (20.2)

组别	阴性(-)	χ^2	P
正常肠黏膜	83	66.607	<0.001
腺瘤	46	—	—
CRC	28	—	—

表3 Gankyrin在结直肠腺瘤中的表达

Table 3 Expression of Gankyrin in colorectal adenomas

组别	n	阳性[例(%)]		
		+	++	+++
腺瘤伴LGIN	61	14 (23.0)	6 (9.8)	2 (3.3)
腺瘤伴HGIN	26	5 (19.2)	4 (15.4)	10 (38.5)

组别	阴性(-)	χ^2	P
腺瘤伴LGIN	39	10.022	0.002
腺瘤伴HGIN	7	—	—

3 讨论

CRC的发生是多步骤、多因素参与的过程,近年对CRC的研究虽已取得一些进展,但其发生、发展机制尚未完全阐明。肠腺瘤被认为是肠癌的癌前病变,肠癌的发生遵循“正常肠上皮-肠上皮增生-腺瘤-癌-转移”的步骤^[3]。作为一种重要的癌基因, Gankyrin在多种癌的发生、发展中起重要作用^[4-8]。Tang等^[9]通过检测Gankyrin mRNA和蛋白在CRC细胞株和组织中的表达,发现Gankyrin在CRC细胞株和肿瘤组织中高表达,并和肿瘤的临床分期和转移相关;靶向沉默Gankyrin基因后,导致CRC细胞增殖活性和致癌性降低。Bai等^[10]研究发现:在肝转移阳性的CRC中, Gankyrin的表达显著高于在肝转移阴性中的表达;使用RNAi介导的基因沉默技术降低Gankyrin的表达后,可削弱CRC细胞的迁移和转移能力,说明Gankyrin和CRC肝转移相关;全基因组转录组分析显示: Gankyrin通过启动IL-8途径,可促进CRC细胞的肝转移。He等^[11]发现: Gankyrin在CRC中表达显著升高,和较差的临床预后相关; Gankyrin通过磷脂酰肌醇-3激

酶/糖原合成酶激酶/ β -链蛋白(phosphatidylinositol 3-kinase/glycogen synthase kinase 3 beta/ β -catenin, PI3K/GSK-3 β / β -catenin)信号转导途径, 可增强肿瘤细胞的增殖、血管生成和耐药性。Sakurai等^[12]的研究显示: Gankyrin在炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)中的表达显著高于IBD已缓解的病例; 并在结肠炎相关性肠癌(colitis-associated cancer, CAC)中的肿瘤细胞和炎细胞中均有高表达; 降低炎细胞而不是肿瘤细胞中Gankyrin的表达, 可降低机体致瘤性。上述研究表明Gankyrin在CRC的发生、发展中起重要作用, 与较差的临床预后相关, Gankyrin有望成为CRC治疗和预防的靶标。但结直肠癌腺瘤作为重要的癌前病变, Gankyrin在腺瘤中是否有异常表达? 本研究显示: 和正常肠黏膜相比, Gankyrin在CRC和结直肠癌腺瘤中均有异常高表达; 且Gankyrin在正常肠黏膜、结直肠癌腺瘤和CRC中的表达率逐步升高(阳性率分别为11/94, 41/87, 66/94), 差异有统计学意义($P < 0.001$)。通过检测Gankyrin在结直肠癌腺瘤中的表达发现, Gankyrin在腺瘤伴HGIN(19/26)中的表达率显著高于腺瘤伴LGIN中的表达率(23/61), 表明Gankyrin参与正常肠黏膜、腺瘤伴LGIN、腺瘤伴HGIN到肠癌的恶性转化过程。Gankyrin的异常表达可能是CRC发生的早期事件, 这为结直肠癌腺瘤至CRC这一癌变模式的早期干预提供了理论依据和分子靶标。

通过分析Gankyrin表达和CRC临床病理参数的关系, 发现Gankyrin在CRC中的表达与肿瘤的分化程度、临床分期、淋巴结或远处转移相关, 表明Gankyrin的异常表达在CRC的恶性进展中起重要作用, 提示Gankyrin可能是评估CRC预后的重要指标。

综上所述, Gankyrin不仅参与CRC的早期发生, 也参与CRC的恶性进展, Gankyrin有望成为CRC新的标志物。未来仍需进一步研究Gankyrin的作用机制, 理解CRC的恶性进展和转移机制, 以寻找CRC预防和治疗的新靶点, 改善CRC患者的预后。

参考文献

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
2. Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
3. Rosai J. Rosai & Ackerman外科病理学[M]. 10版. 郑杰译. 北京: 北京大学医学出版社, 2014.

- Rosai J. Rosai and Ackerman's surgical pathology[M]. 10th ed. Translated by ZHENG Jie. Beijing: The Medical Publishing House of Beijing University, 2014.
4. Higashitsuji H, Itoh K, Nagao T, et al. Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas[J]. *Nat Med*, 2000, 6(1): 96-99.
5. Ortiz CM, Ito T, Tanaka E, et al. Gankyrin oncoprotein overexpression as a critical factor for tumor growth in human esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance[J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(2): 325-332.
6. Zheng T, Hong X, Wang J, et al. Gankyrin promotes tumor growth and metastasis through activation of IL-6/STAT3 signaling in human cholangiocarcinoma[J]. *Hepatology*, 2014, 59(3): 935-946.
7. Gao L, Xie H, Dong L, et al. Gankyrin is essential for hypoxia enhanced metastatic potential in breast cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(3): 1032-1036.
8. Wang WP, Yan XL, Li WM, et al. Clinicopathologic features and prognostic implications of Gankyrin protein expression in non-small cell lung cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2015, 211(12): 939-947.
9. Tang S, Yang G, Meng Y, et al. Overexpression of a novel gene gankyrin correlates with the malignant phenotype of colorectal cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(2): 88-95.
10. Bai Z, Tai Y, Li W, et al. Gankyrin activates IL-8 to promote hepatic metastasis of colorectal cancer[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(14): 4548-4558.
11. He F, Chen H, Yang P, et al. Gankyrin sustains PI3K/GSK-3 β / β -catenin signal activation and promotes colorectal cancer aggressiveness and progression[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(49): 81156-81171.
12. Sakurai T, Higashitsuji H, Kashida H, et al. The oncoprotein gankyrin promotes the development of colitis-associated cancer through activation of STAT3[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(15): 24762-24776.
13. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, et al. WHO classification of tumors of the digestive system[M]. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2010.
14. 张平, 韩若凌, 叶卫华. 影像学检查在直肠癌诊断中的应用[J]. *临床荟萃*, 2013, 28(8): 938-941.
ZHANG Ping, HAN Ruoling, YE Weihua. Application of imaging examination in the diagnosis of rectal cancer[J]. *Clinical Focus*, 2013, 28(8): 938-941.

本文引用: 刘颖. Gankyrin在结直肠癌和腺瘤中的表达及其临床意义[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(7): 1424-1428. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.008

Cite this article as: LIU Ying. Expression of Gankyrin in colorectal carcinomas and adenomas and its clinical significance[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(7): 1424-1428. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.008