



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.014
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.014
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(10):1417-1421.

· 基础研究 ·

转化生长因子 β 激活酶 1 在结肠癌中的表达及临床意义

鞠红艳¹, 白洋², 王策³

(1. 广东省深圳市宝安区中心医院 消化内科, 广东 深圳 518102; 2. 吉林大学第一医院 超声科, 吉林 长春 130021; 3. 吉林省职业病防治医院 检验科, 吉林 长春 130061)

摘要

目的: 探讨转化生长因子 β 激活酶 1 (TAK1) 在结肠癌组中的表达与临床意义。

方法: 收集 141 例结肠癌患者手术标本, 用免疫组织化学方法检测 TAK1 蛋白在结肠癌及癌旁正常组织中的表达, 并分析其表达与患者临床病理因素及预后的关系, 同时检测结肠癌组织中 K-ras 基因突变情况, 分析 TAK1 表达与 K-ras 基因突变的关系。

结果: TAK1 在结肠癌组织中的阳性表达率明显高于癌旁正常组织 (68.8% vs. 16.3%, $P < 0.05$); TAK1 的阳性表达与 Dukes 分期、肿瘤分化程度和淋巴结转移有关 ($P < 0.05$); TAK1 阳性表达患者的 5 年生存率明显低于低表达的患者 ($P < 0.05$); TAK1 阳性表达的结肠癌组织 K-ras 基因的突变率明显高于 TAK1 阴性表达的结肠癌组织 (52.6% vs. 13.6%, $P < 0.05$)。

结论: TAK1 可能参与了结肠癌的恶性进展, 且 TAK1 的表达可能与 K-ras 基因突变密切相关。

关键词

结肠肿瘤; 转化生长因子 β 激活酶 1; 原癌基因蛋白质 p21 (ras)

中图分类号: R735.3

Expression and clinical significance of transforming growth factor β -activated kinase 1 in colon cancer

JU Hongyan¹, BAI Yang², WANG Ce³

(1. Department of Digestive Medicine, Central Hospital of Shenzhen Baoan District, Shenzhen, Guangdong 518102, China; 2. Department of Ultrasonography, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China; 3. Department of Laboratory Medicine, Occupational Disease Prevention and Treatment Hospital of Jilin Province, Changchun 130061, China)

Abstract

Objective: To investigate the expression of transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK1) in colon cancer and the clinical significance.

Methods: Surgical specimens from 141 patients with colon cancer were collected. The TAK1 expression in colon cancer tissues and their adjacent normal tissues were determined by immunohistochemical staining, and the relations of TAK1 expression with clinicopathologic factors as well as prognosis of the patients were analyzed. Meanwhile, the K-ras gene mutation in the colon cancer tissues was detected, and the relationship between TAK1 expression and K-ras gene mutation was examined.

Results: The positive expression rate of TAK1 in colon cancer tissues was significantly higher than that in adjacent normal tissues (68.8% vs. 16.3%, $P < 0.05$). The positive TAK1 expression was significantly associated with Dukes stage, degree of tumor differentiation and lymph node metastasis ($P < 0.05$), and the 5-year survival rate in patients

收稿日期: 2015-07-22; 修订日期: 2015-09-15。

作者简介: 鞠红艳, 广东省深圳市宝安区中心医院主治医师, 主要从事胃肠道早期癌基础方面的研究。

通信作者: 鞠红艳, Email: thinkorgo@163.com

with TAK1 positive tumor was significantly lower than in those with its low expression ($P < 0.05$). The incidence of K-ras gene mutation in TAK1 positive colon cancer tissues was significantly higher than that in those with TAK1 negative expression (52.6% vs. 13.6%, $P < 0.05$).

Conclusion: TAK1 may be involved in malignant progression of colon cancer, and its expression is probably related to K-ras gene mutation.

Key words Colonic Neoplasms; Transforming Growth Factor β -Activated Kinase 1; Proto-Oncogene Proteins p21(ras)
CLC number: R735.3

结肠癌在世界范围内具有较高的发病率，随着我国人口老龄化的加剧，结肠癌在我国的发病率有逐年增加的趋势^[1-2]，严重影响人民的生命健康。由于结肠癌发生、发展和侵袭的病理分子学机制尚未完全阐明，目前对于结肠癌的治疗尚缺乏特异性的药物治疗^[3-4]，因此深入研究结肠癌发生、发展的具体病理学机制对于其治疗具有重要的意义^[5]。以往研究发现，转化生长因子 β 激活酶1 (TAK1) 在多种肿瘤的发生、发展中发挥重要的作用^[6-7]，但是对于其在临床结肠癌患者肿瘤组织中的表达目前相关研究却不多，本文通过检测TAK1在结肠癌患者肿瘤组织中的表达，并探讨其与结肠癌患者临床病理特征和患者预后的相关性，以期对结肠癌的治疗提供新的思路和方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2002年7月—2010年2月间在本院接受首次手术治疗并经过术后病理结果证实的原发性结肠癌患者141例，经过我院伦理委员会批准，患者术前均签署知情同意书。排除术前接受过放、化疗及生物免疫治疗的患者。所有患者每隔3个月进行5年的电话或者门诊随访。

1.2 免疫组织化学和 HE 染色

免疫组化步骤参照标准流程及以往参考文献^[8]：取术中切除的新鲜结肠癌组织和肿瘤边缘的正常肠组织，4℃中性福尔马林中浸泡2 d后，石蜡包埋，使用切片机将石蜡切成4 μm 后的切片，经二甲苯脱蜡，梯度乙醇水化后，采用抗原修复液进行抗原修复，兔免疫血清封闭后，滴加TAK1抗体（美国Santa cruz公司，1:50）稀释液，37℃

温箱中2 h，PBS充分冲洗后，山羊抗兔二抗稀释液（美国Santa Cruz公司，1:200）孵育1 h，PBS洗后加入辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素作用15 min，PBS冲洗后DAB显色，苏木精复染，镜下观察。采用PBS代替一抗作阴性对照。

免疫结果判断标准：TAK1以细胞浆出现棕黄色沉淀为阳性，由5位有经验的病理科医师采用双盲法计数：对每张切片在高倍镜下（ $\times 400$ ）计数15个视野，平均100个细胞中TAK1阳性细胞的个数作为阳性细胞率。免疫组化阳性结果主要根据以下两方面：(1) 阳性细胞的百分比 $< 1\%$ 为0分；1%~10%之间为1分； $> 10\%$ ~30%为2分； $> 30\%$ ~60%为3分； $> 60\%$ 为4分；(2) 细胞的染色阴性为0分；淡黄色为1分；黄色为2分；棕黄色为3分。最终结果判定：0~2分为阴性，3~7分为阳性。

1.3 K-ras 基因突变率的检测

采用显微切割技术及博大泰恒生物公司生产的DNA提纯试剂盒从石蜡组织中提取DNA，具体步骤参照试剂盒说明书进行，第二步进行基因突变的检测，采用德国Qiagen公司生产的K-ras突变检测试剂盒，操作步骤根据说明书及以往文献进行^[9]。

1.4 统计学处理

用SPSS 13.0 软件进行统计学处理，计数资料采取 χ^2 检验，用Kaplan-Meier法进行生存分析， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠癌和癌旁组织中 TAK1 的表达

HE染色结果显示，癌旁正常组织具有完整的肠壁结构，结肠癌组织正常的肠壁结构消失，细胞排列紊乱，胞核异型性多见（图1）。TAK1在正常结肠组织中的表达主要位于细胞胞浆中，呈

现弱阳性表达 (图 2)。统计结果表明 TAK1 在结肠癌肿瘤组织中的阳性率为 68.8%, 癌旁正常肠组

织为 16.3%, 两者之间有统计学差异 ($P < 0.05$) (表 1)。

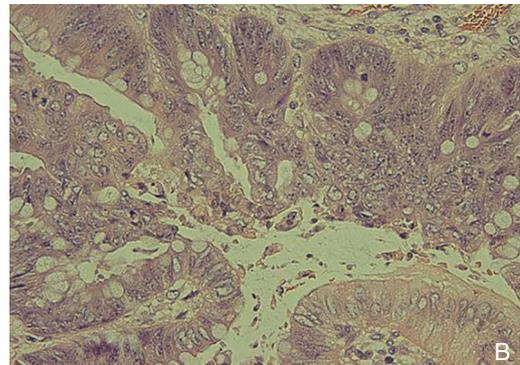
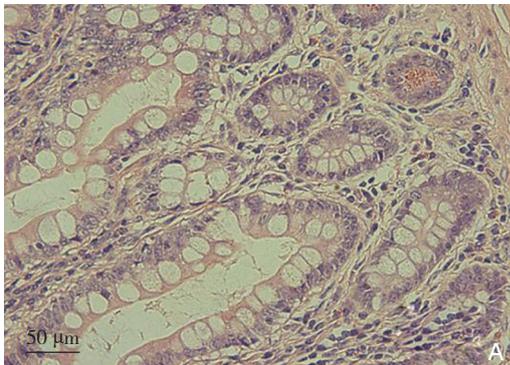


图 1 HE 染色结果 ($\times 400$)
Figure 1 HE staining sections ($\times 400$)

A: 癌旁组织; B: 结肠癌组织
A: Adjacent tissue; B: Colon cancer tissue

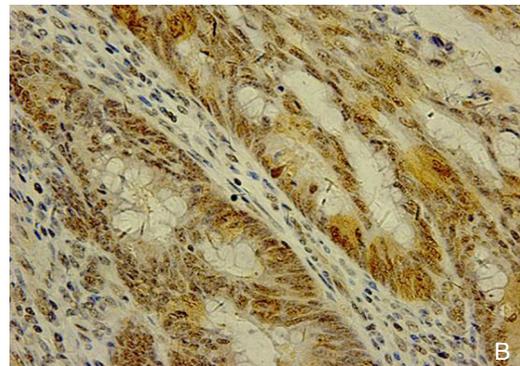
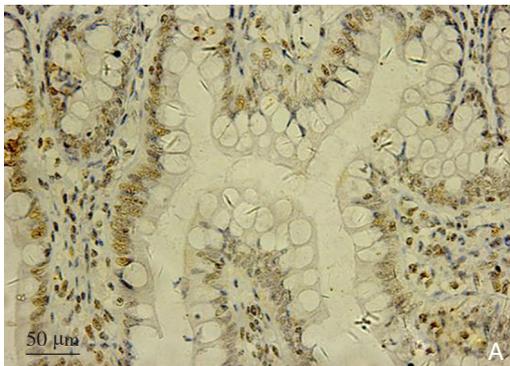


图 2 TAK1 的免疫组织化学染色 ($\times 400$)
Figure 2 Immunohistochemical staining for TAK1 ($\times 400$)

A: 癌旁组织; B: 结肠癌组织
A: Adjacent tissue; B: Colon cancer tissue

表 1 结肠癌和癌旁正常组织中 TAK1 的表达 [n (%)]
Table 1 TAK1 expressions in colon cancer and adjacent tissues [n (%)]

组织	TAK1 表达		P
	阳性	阴性	
癌组织	97 (68.8)	44 (31.2)	<0.001
癌旁正常组织	23 (16.3)	118 (83.7)	

2.3 TAK1 的表达与结肠癌临床病理特征分级间的关系

TAK1 的阳性表达情况与结肠癌患者的性别和年龄无关 (均 $P > 0.05$) ; TAK1 的表达量与结肠癌患者的 Dukes 分期、分化程度和淋巴结转移有关 (均 $P < 0.05$) , 临床分期越高、分化程度越低和存在淋巴结转移的患者, TAK1 的阳性表达率越高 (表 2)。

表 2 TAK1 表达与临床病理特征的关系 [n (%)]
Table 2 Relations of TAK1 expression with clinicopathologic features [n (%)]

参数	n	TAK1 阳性	TAK1 阴性	P
性别				0.79
男	76	53 (69.7)	23 (30.3)	
女	65	44 (67.7)	21 (32.3)	
年龄 (岁)				0.82
< 60	50	35 (70.0)	15 (30.0)	
≥ 60	91	62 (68.1)	29 (31.9)	
分化程度				<0.001
低	56	49 (87.5)	7 (12.5)	
中	72	46 (63.9)	26 (26.1)	
高	13	2 (15.4)	11 (84.6)	
Dukes 分期				<0.001
A+B	55	25 (45.5)	30 (54.5)	
C+D	86	72 (83.7)	14 (16.3)	
淋巴结转移				<0.001
有	92	81 (88.0)	11 (12.0)	
无	49	16 (32.7)	33 (67.3)	

2.4 TAK1 的表达与患者 5 年生存期的关系

Kaplan-Meier法进行生存分析结果表明，TAK1阳性表达的结肠癌患者5年中位生存时间为31个月，阴性表达的患者5年中位生存时间为46个月；TAK1阳性表达的结肠癌患者5年生存率明显低于阴性表达的结肠癌患者（ $P<0.05$ ）（图3）。

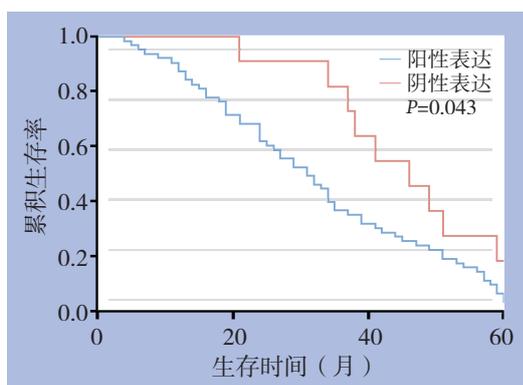


图3 TAK1 阳性与阴性结肠癌患者生存曲线

Figure 3 Survival curves of patients with positive or negative TAK1 expression

2.5 TAK1 表达与 K-ras 基因突变的关系

K-ras基因突变总体率为40.4%（57/141），97例TAK1阳性表达患者中K-ras的突变例数为51例，K-ras野生型为46例；44例TAK1阴性表达患者K-ras的突变例数为6例，K-ras野生型例数为38例，TAK1阳性表达的结肠癌患者肿瘤组织中K-ras的突变率明显高于TAK1阴性表达的患者（ $P<0.05$ ）（表3）。

表3 TAK1 表达与 K-ras 基因突变的关系 [n (%)]

Table 3 Relationship between TAK1 expression and K-ras gene mutation [n (%)]

K-ras 基因	TAK1 表达		P
	阳性	阴性	
K-ras 突变型	51 (52.6)	6 (13.6)	<0.05
K-ras 野生型	46 (47.4)	38 (86.4)	

3 讨论

TAK1是MAPK激酶的激酶蛋白家族的一员，TAK1激活后可以同时调控MAPK和NF- κ B信号通路的激活。近来大量研究表明TAK1介导的信号转导通路在应激反应和炎症免疫等过程中发挥关键性的作用^[10]，在肿瘤中研究发现，TAK1在卵巢癌、乳腺癌、肝癌、白血病等多种恶性肿瘤中存

在异常高表达^[6, 11-13]，敲除TAK1基因的表达或者使用特异性的TAK1抑制剂可以显著抑制上述肿瘤细胞的增殖并促进其凋亡^[10]，提示TAK1有可能成为肿瘤治疗的新靶点。在结肠癌细胞中，最近的研究表明TAK1在K-ras基因突变的结肠癌细胞中处于过度激活的状态，K-ras基因在肿瘤细胞的生长以及血管生成等过程中起着重要的调控作用，正常的K-ras基因可抑制肿瘤细胞的生长，而突变的K-ras基因则会持续刺激细胞增殖，导致肿瘤的发生；统计研究发现超过半数的结肠癌患者肿瘤组织中存在K-ras基因的突变^[14]，尽管特效的靶向结肠癌疗法对于K-ras基因未突变的结肠癌患者具有很好的疗效，然而对于存在K-ras基因变异的肿瘤患者疗效却不佳，这极大的影响了结肠癌患者的整体预后^[15]。在体外细胞培养和动物体内实验中深入研究发现，敲除TAK1基因的表达或者使用TAK1的特异性抑制剂5Z-7-oxozeaenol可以显著促进K-ras基因突变的结肠癌细胞发生凋亡，但对正常非突变的细胞影响却很小^[15-16]，这些研究成果提示靶向TAK1蛋白的药物有可能成为治疗K-ras基因突变的结肠癌患者的新手段。

尽管体外细胞培养实验和动物体内实验中研究发现TAK1有可能成为结肠癌治疗的新靶点^[16-17]，但是迄今为止，对于TAK1在临床结肠癌患者肿瘤组织中表达及意义的研究却不多，本文通过采用免疫组织化学检测法检测TAK1在结肠癌组织中的表达，结果表明，与癌旁正常组织相比，结肠癌组织中TAK1蛋白的表达水平存在异常升高，这与在体外细胞培养实验中观察到的结果具有一致性，进一步提示了TAK1有潜质成为结肠癌治疗的新靶点。在证实TAK1在结肠癌组织中存在异常表达后，本研究进一步探讨了TAK1的表达量与结肠癌患者临床病理特征的相关性，结果表明TAK1的表达量与结肠癌患者的性别和年龄无关，而与患者的有无淋巴结转移和Dukes分期存在密切相关性：C、D期的结肠癌患者肿瘤组织中TAK1的表达量显著高于A、B期，有淋巴结转移的结肠癌患者阳性表达率显著高于无淋巴结转移的患者，提示TAK1可能与结肠癌患者的病情发展存在显著相关性；生存分析结果显示TAK1阳性表达的结肠癌患者的5年生存率显著低于阴性表达的患者，提示临床上检测结肠癌患者肿瘤组织中TAK1的表达量对于判断患者的预后可能具有重要意义。最后，本研究还发现，TAK1阳性表达的结肠癌患者肿瘤

组织中K-ras的突变率显著高于TAK1阴性表达的患者,提示临床肿瘤标本中TAK1的阳性表达与K-ras基因的突变可能存在一定的相关性,靶向TAK1的治疗有可能改善K-ras基因突变结肠癌患者的预后。

综上所述, TAK1在结肠癌患者的肿瘤组织中存在着异常高表达,并与结肠癌患者临床分期、有无淋巴结转移和预后存在显著相关性,靶向TAK1的治疗手段有可能为结肠癌治疗提供新的思路和方法。

参考文献

- [1] Liu S, Zheng R, Zhang M, et al. Incidence and mortality of colorectal cancer in China, 2011[J]. Chin J Cancer Res, 2015, 27(1):22-28.
- [2] 张利飞, 裴海平. 结直肠癌预后预测研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(4):581-588.
- [3] Aarons CB, Mahmoud NN. 现代结直肠癌外科治疗的思考[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(4):459-466.
- [4] Millan M, Merino S, Caro A, et al. Treatment of colorectal cancer in the elderly[J]. World J Gastrointest Oncol, 2015, 7(10):204-220.
- [5] Kocarnik JM, Shioivitz S, Phipps AI. Molecular phenotypes of colorectal cancer and potential clinical applications[J]. Gastroenterol Rep (Oxf), 2015, [Epub ahead of print]
- [6] Ying L, Chunxia Y, Wei L. Inhibition of ovarian cancer cell growth by a novel TAK1 inhibitor LYTAK1[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2015, 76(3):641-650.
- [7] Kilty I, Jones LH. TAK1 selective inhibition: state of the art and future opportunities[J]. Future Med Chem, 2015, 7(1):23-33.
- [8] 刘贤伟, 曹俊达, 熊功友, 等. TGF- β 1、Smad7与树突状细胞在结肠癌肝转移中作用的初步研究[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(1):63-69.
- [9] 高洁, 张静, 鲁涛, 等. 结直肠癌K-ras基因突变与临床病理特征的关系[J]. 中华病理学杂志, 2012, 41(9):595-598.
- [10] Sakurai H. Targeting of TAK1 in inflammatory disorders and cancer[J]. Trends Pharmacol Sci, 2012, 33(10):522-530.
- [11] Huang HL, Chiang CH, Hung WC, et al. Targeting of TGF-beta-activated protein kinase 1 inhibits chemokine (C-C motif) receptor 7 expression, tumor growth and metastasis in breast cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(2):995-1007.
- [12] Wang Y, Tu Q, Yan W, et al. CXCL19 suppresses proliferation and inflammatory response in LPS-induced human hepatocellular carcinoma cells via regulating TLR4-MyD88-TAK1-mediated NF-kappaB and MAPK pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 456(1):373-379.
- [13] Bosman MC, Schepers H, Jaques J, et al. The TAK1-NF-kappaB axis as therapeutic target for AML[J]. Blood, 2014, 124(20):3130-3140.
- [14] Imamura Y, Lochhead P, Yamauchi M, et al. Analyses of clinicopathological, molecular, and prognostic associations of K-ras codon 61 and codon 146 mutations in colorectal cancer: cohort study and literature review[J]. Mol Cancer, 2014, 13:135. doi: 10.1186/1476-4598-13-135.
- [15] Hrabe JE, O'Leary BR, Fath MA, et al. Disruption of thioredoxin metabolism enhances the toxicity of transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1) inhibition in K-ras-mutated colon cancer cells[J]. Redox Biol, 2015, 5:319-327. doi: 10.1016/j.redox.2015.06.004.
- [16] Singh A, Sweeney MF, Yu M, et al. TAK1 inhibition promotes apoptosis in K-ras-dependent colon cancers[J]. Cell, 2012, 148(4):639-650.
- [17] Takahashi H, Jin C, Rajabi H, et al. MUC1-C activates the TAK1 inflammatory pathway in colon cancer[J]. Oncogene, 2015, 34(40):5187-5197.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 鞠红艳, 白洋, 王策. 转化生长因子 β 激活酶1在结肠癌中的表达及临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(10):1417-1421. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.014

Cite this article as: JU HY, BAI Y, WANG C. Expression and clinical significance of transforming growth factor β -activated kinase 1 in colon cancer[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(10):1417-1421. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.014