



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.014
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.014
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(4):547-551.

· 基础研究 ·

Notch 信号通路相关蛋白在胃肠道间质瘤中的表达及临床意义

田青水¹, 张宝明¹, 刘毅²

(江苏省连云港市第一人民医院 1. 胃肠外科 2. 病理科, 江苏 连云港 222002)

摘要

目的: 探讨 Notch1、Notch3 及 Hes1 在胃肠道间质瘤 (GIST) 中的表达及临床意义。

方法: 收集 48 例手术切除的原发性 GIST 组织标本以及 48 例 GIST 瘤旁胃肠组织标本, 用免疫组化法检测 Notch1、Notch3 及下游靶基因 Hes1 蛋白的表达, 并分析各蛋白表达与 GIST 患者临床病理因素的关系。

结果: 与瘤旁胃肠组织比较, GIST 组织中 Notch1 (58.33% vs. 29.17%)、Notch3 (97.97% vs. 35.47%)、Hes1 (35.47% vs. 10.42%) 蛋白的阳性表达率均明显升高 (均 $P < 0.05$)。将 GIST 患者按性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤大小及 NIH 危险分级分组比较各蛋白的表达阳性率, 结果显示, Notch1 蛋白表达与 GIST 的 NIH 危险分级有关 ($\chi^2 = 16.53$, $P = 0.001$); Notch3 蛋白的表达与以上各因素均无关 (均 $P > 0.05$); Hes1 蛋白表达与 GIST 的大小有关 ($\chi^2 = 7.78$, $P = 0.02$)。

结论: Notch 信号通路相关蛋白在 GIST 组织中表达升高, 且可能在 GIST 的发生、发展中起重要作用。

关键词

胃肠道间质肿瘤; 受体, Notch; 预后

中图分类号: R739.9

Expressions of Notch signaling pathway related proteins in gastrointestinal stromal tumors and their clinical significance

TIAN Qingshui¹, ZHANG Baoming¹, LIU Yi²

(1. Department of Gastrointestinal Surgery 2. Department of Pathology, the First People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang, Jiangsu 222002, China)

Abstract

Objective: To investigate expressions of Notch1, Notch3 and Hes1 in gastrointestinal stromal tumors (GIST) and their clinical significance.

Methods: The tissue specimens of 48 cases of resected GIST and tissue specimens of gastrointestinal tissue adjacent to 48 cases of GIST were collected. The protein expressions of Notch1 and Notch3 along with the downstream target gene Hes1 were determined by immunohistochemical staining, and the relations of each protein expression with the clinicopathologic factors of GIST patients were also analyzed.

Results: In GIST tissue compared with its adjacent gastrointestinal tissue, the positive expression rate of either Notch1 (58.33% vs. 29.17%), Notch3 (97.97% vs. 35.47%) or Hes1 (35.47% vs. 10.42%) protein was significantly increased (all $P < 0.05$). After comparison of the positive expression rate of each protein between or among groups of GIST patients stratified by gender, age, tumor site, tumor size and NIH risk classification, the results showed

收稿日期: 2015-07-28; 修订日期: 2015-11-16。

作者简介: 田青水, 江苏省连云港市第一人民医院副主任医师, 主要从事消化道肿瘤基础与临床方面的研究。

通信作者: 张宝明, Email: zhbm202@163.com

that Notch1 expression was significantly associated with NIHrisk classification ($\chi^2=16.53, P=0.001$), Notch3 expression was irrelevant to any of the above factors (all $P>0.05$) and Hes1 expression was significantly related to tumor size ($\chi^2=7.78, P=0.02$).

Conclusion: The expressions of Notch signaling pathway related proteins are increased in GIST tissue, which may play an important role in the occurrence and development of GIST.

Key words

Gastrointestinal Stromal Tumors; Receptors, Notch; Prognosis

CLC number: R739.9

胃肠道间质瘤 (gastrointestinal stromal tumors, GIST) 是胃肠道最常见的间叶源性肿瘤, 起源于消化道的Cajal细胞。全世界范围内, GIST每年发生率10/10万^[1], 早期肿瘤可手术切除, 但40%多的肿瘤为复发或不可切除^[2]。尽管盐酸伊马替尼改变了GIST的治疗历史, 但由于Kit二次突变所致的伊马替尼获得性耐药仍然是一临床难题。即使二代酪氨酸激酶抑制剂的应用, 仍未给伊马替尼获得性耐药的患者带来生存获益。因此, 探索新的治疗靶点以克服伊马替尼获得性耐药成为迫切的任务^[3]。Notch信号通路中的多个信号分子在多种肿瘤中的表达已被阐明, 但是关于Notch信号通路中各个信号分子, 包括配体、受体及下游靶基因在GIST组织中的表达研究很少。本研究就Notch信号通路中Notch-1、Notch-3及下游靶基因Hes-1在GIST中的表达及临床意义, 为GIST治疗探索新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 标本来源

2007年1月—2010年12月48例连云港市第一人民医院普通外科手术切除的标本, 复阅HE及免疫组化切片, 经2位以上病理医师根据诊断标准证实为GIST。病例纳入标准: (1) 接受R₀切除的原发性GIST患者; (2) 无其他合并肿瘤; (3) 术前、术后未接受放化疗及分子靶向治疗 (甲磺酸伊马替尼)。反之, 则排除。同期收集手术切除的GIST患者瘤旁正常的胃肠组织标本48例 (切缘距离肿瘤2 cm) 作为对照组。本研究经连云港市第一人民医院医学伦理委员会批准, 并获得患者的知情同意。48例患者中, 男19例, 女29例; 年龄为27~83岁, 平均年龄 (58.92 ± 10.91) 岁; 肿瘤直径2.0~19.0 cm, 平均直径 (7.05 ± 3.91) cm; 胃

27例, 十二指肠6例, 小肠9例, 结直肠3例, 其它部位3例; 按NIH公布的GIST术后危险度分级系统 (2008版)^[4]分为极低危2例, 低危14例, 中危12例和高危20例。另取22例胃癌患者的组织标本作为阳性对照。所有标本均经10%甲醛固定, 常规石蜡包埋。

1.2 主要试剂

多克隆兔抗人抗体Notch1及Notch3购自PoteintechTM公司、单克隆兔抗人抗体Hes1 (克隆号D6P21) 购自Cell Signaling Technology公司、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG抗体购自碧云天公司、通用型SP-9000免疫组化检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司。

1.3 方法

1.3.1 GIST 诊断标准 (1) 对于组织学形态上符合典型GIST, D117和DOG1弥漫阳性者, 可以做出GIST的诊断; (2) 组织学形态考虑为GIST, 但是CD117 (+)、DOG1 (-) 或CD117 (-)、DOG1 (+) 者, 在排除其他类型肿瘤后可做出GIST的诊断, 必要时应进一步行分子病理学检测, 以确定是否存在c-kit或PDGFRA基因突变。如经分子病理学检测也无c-kit或PDGFRA基因突变, 建议请病理学专家讨论后做出最终诊断, 且严密随访观察; (3) 对于组织学形态符合典型GIST, 但是CD117和DOG1均为阴性者, 需要进行c-kit基因和或PDGFRA基因的检测, 如有c-kit基因或PDGFRA基因突变, 可诊断为GIST, 如无c-kit基因或PDGFRA基因突变, 需结合肿瘤原发部位和组织形态学特征, 在排除其他类型肿瘤 (如平滑肌肿瘤、神经鞘瘤和纤维瘤病等) 后, 方可慎重做出野生型GIST的诊断^[5]。

1.3.2 免疫组化检测 将病理科保存的GIST及相应瘤旁组织的蜡块, 置于68℃烤箱中固定20 min, 二甲苯脱蜡40 min, 再用梯度酒精

(70% → 80% → 95% → 100%) 脱水, 加入 3% 双氧水去除内源性过氧化物酶; 加入 EDTA 缓冲液 (pH8.0) 在 95℃ 下行抗原修复 15 min, 室温冷却冲洗, 用 PBS 冲洗 3 次, 3 min/ 次; 用 5% 胎牛血清室温封闭 10 min 后, 滴加 1:100 稀释的多克隆兔抗人抗体 Notch1、1:200 多克隆兔抗人抗体 Notch3 和单克隆兔抗人抗体 Hes1, 4℃ 冰箱孵育过夜, PBS 冲洗 3 次, 3 min/ 次, 滴加辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体, 37℃ 孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次, 3 min/ 次, 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液, 37℃ 孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次, 3 min/ 次; DAB 显色 10 min, 苏木素复染, 常规脱水, 透明, 干燥, 封片。

1.3.3 结果判读 Notch1 和 Notch3 表达于细胞膜上, Hes1 表达于细胞核及细胞质中, 呈现明显棕黄色颗粒或黄色颗粒的细胞为阳性细胞。采用组织积分法 (H-score) 进行结果判读。阳性细胞所占百分率 (percentage of positive cells, PP) 得分: 在光学显微镜下随机选取 10 个高倍镜视野 ($\times 400$), 每个视野计数 100 个肿瘤细胞, 计算 PP, <10% 为 0 分, 10%~25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, >75% 为 4 分; 染色

强度 (staining intensity, SI) 得分: 阴性染色为 0 分, 弱染色为 1 分, 中等染色为 2 分, 强染色为 3 分。H-score=PP \times SI, 0~4 分为阴性, 5~12 分为阳性表达^[6]。所有标本的结果判定由两位病理科医师证实, 并进行评估。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件分析, Notch1、Notch3 及 Hes1 蛋白的阳性表达率与各临床病理参数间的关系比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Notch1、Notch3 和 Hes1 蛋白在 GIST 组织与瘤旁组织中的表达

Notch1 蛋白在 GIST 组织和相应瘤旁组织中的表达阳性率分别为 58.33% 和 29.17% ($\chi^2=7.73$, $P=0.005$); Notch3 蛋白在 GIST 组织和相应瘤旁组织中的表达阳性率分别为 97.97% 和 35.47% ($\chi^2=42.19$, $P=0.000$); Hes1 蛋白在 GIST 组织和相应瘤旁组织中的表达阳性率分别为 35.47% 和 10.42% ($\chi^2=8.49$, $P=0.004$) (图 1)。

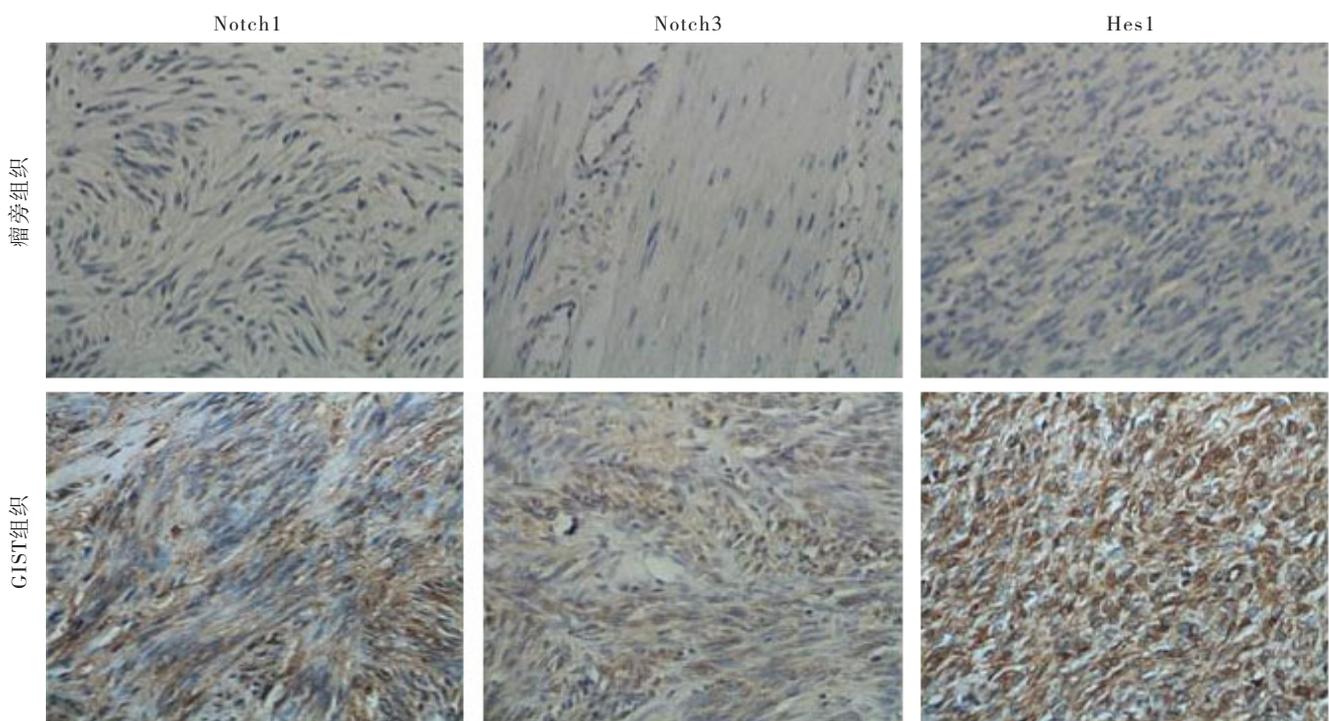


图 1 免疫组化检测 Notch1、Notch3、Hes1 蛋白的表达 ($\times 400$)

Figure 1 Immunohistochemical staining for Notch1, Notch3 and Hes1 expressions ($\times 400$)

2.2 Notch1、Notch3 和 Hes1 蛋白表达与 GIST 患者临床病理特征的关系

Notch1蛋白在GIST组织中的表达与患者的性别、年龄、肿瘤部位及肿瘤大小无关(均 $P>0.05$),而与NIH危险分级有关($\chi^2=16.53$, $P=0.001$); Notch3蛋白在GIST组织中的表达与患

者的性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤大小及NIH危险分级均无关(均 $P>0.05$); Hes1蛋白在GIST组织中的表达与患者的性别、年龄、肿瘤部位及NIH危险分级无关(均 $P>0.05$),而与肿瘤大小相关($\chi^2=7.78$, $P=0.02$)(表1)。

表1 各蛋白表达与 GIST 患者临床病理参数之间的关系 [n (%)]

因素	n	Notch1 阳性	χ^2	P	Notch3 阳性	χ^2	P	Hes1 阳性	χ^2	P
性别										
男	19	11 (57.9)	0.002	0.96	19 (100.0)	0.67	0.41	6 (31.6)	0.20	0.65
女	29	17 (58.6)			28 (96.6)			11 (37.9)		
年龄 (岁)										
≤ 60	29	17 (58.6)	0.002	0.96	28 (96.6)	0.67	0.41	11 (37.9)	0.20	0.65
> 60	19	11 (57.9)			19 (100.0)			6 (31.6)		
部位										
胃	27	13 (48.2)	4.952	0.29	27 (100.0)	4.43	0.35	10 (37.0)	4.20	0.38
十二指肠	6	5 (83.3)			6 (100.0)			3 (50.0)		
小肠	9	7 (77.8)			8 (88.9)			2 (22.2)		
结直肠	3	1 (33.3)			3 (100.0)			0 (0.0)		
其他	3	2 (66.7)			3 (100.0)			2 (66.7)		
肿瘤大小 (cm)										
≤ 5	21	11 (52.4)	1.76	0.41	21 (100.0)	4.43	0.35	5 (23.8)	7.78	0.02
5~10	18	10 (55.6)			18 (100.0)			9 (50.0)		
> 10	9	7 (77.8)			8 (88.9)			0 (0.0)		
NIH 分级										
极低危	2	0 (0.0)	16.53	0.001	2 (100.0)	1.43	0.70	0 (0.0)	3.30	0.35
低危	14	9 (64.3)			14 (100.0)			3 (21.4)		
中危	12	6 (50.0)			12 (100.0)			5 (41.7)		
高危	20	13 (65.0)			19 (95.0)			9 (45.0)		

3 讨论

Notch信号通路参与调控细胞多种进程,包括细胞的增殖、分化、凋亡、黏附、上皮-间质转换、迁移及血管的形成^[7-8]。Notch信号通路在肿瘤生成过程依据细胞内环境不同,既表现促癌作用,又具抗增殖作用^[9-10]。研究表明,在急性T淋巴细胞白血病、胆管癌、卵巢癌、乳腺癌及非小细胞肺癌中,Notch信号通路起促癌作用^[11-15]。而在前列腺癌、皮肤癌、小细胞肺癌、神经内分泌肿瘤、慢性粒细胞白血病及B细胞恶性肿瘤中,Notch信号通路起肿瘤抑制作用^[16-18]。Notch信号通路在肿瘤发生中的双重作用因其在生理条件下生物学特点造成,即在某些组织中维持其干细胞表型,而在另一些组织中引起其干细胞的分化^[19]。目前,关于Notch信号通路在GIST中的表达及意义的研究很少,其作用尚不明确,需进一步探讨。

本研究首次探讨Notch信号通路中细胞膜受体Notch1及Notch3蛋白在GIST组织中的表达。与对

照组相比,在48例GIST组织中,Notch1和Notch3阳性表达率分别为58.33%和97.97% ($P<0.05$),可见,Notch3在GIST组织中普遍高表达。同时本研究进一步探讨了Notch1及Notch3在48例GIST中的表达情况与临床因素之间的关系。研究表明,Notch1蛋白在GIST组织中的表达与患者的性别、年龄、肿瘤部位及肿瘤大小无关 ($P>0.05$),而与NIH危险分级有关; Notch3蛋白在GIST组织中的表达与患者的性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤大小及NIH危险分级均无关。由此可见,Notch1及Notch3在GIST组织中异常表达,且Notch1与GIST的NIH危险分级有关。

Notch配体(Delta-like-1、3、4和Jagged1、2)与Notch受体(Notch-1、Notch-2、Notch-3和Notch-4)特异性结合,Notch信号通路随之激活。Notch受体经过按序3次剪切释放其活性形式NICD, NICD进入细胞核后,其RAM区与CBF-1及MAML蛋白结合形成转录复合物,并募集转录共激活因子(co-activator, CoA),激活下游靶基

因的转录。Hes家族是Notch信号通路阐述最为明确的靶基因^[20-22]。本研究探讨Hes1蛋白在GIST组织和相应瘤旁组织中的表达阳性率分别为35.47%和10.42%，差异有统计学意义（ $\chi^2=8.49$ ， $P=0.004$ ），表明Hes1在GIST组织中异常表达。从而进一步分析Hes1蛋白在GIST组织中的表达与患者的性别、年龄、肿瘤部位及NIH危险分级无关，而与肿瘤大小相关。

综上所述，Notch通路的激活可能在GIST发生、发展过程中起重要作用，但其机制仍需进一步阐明。随着“精准医学”的发展，对GIST分子机制进一步阐明，有望揭示Notch信号分子对GIST细胞抗凋亡和促血管生成、肿瘤侵袭及转移方面的具体机制，同时为GIST分子靶向治疗寻找新的有效靶点以及制定GIST综合治疗的新策略提供帮助。

参考文献

- [1] Demetri GD, von Mehren M, Antonescu CR, et al. NCCN Task Force report: update on the management of patients with gastrointestinal stromal tumors[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2010, 8(Suppl 2):S1-41.
- [2] Joensuu H. Adjuvant treatment of GIST: patient selection and treatment strategies[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2012, 9(6):351-358.
- [3] Dumont AG, Yang Y, Reynoso D, et al. Anti-tumor effects of the Notch pathway in gastrointestinal stromal tumors[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(9):1674-1683.
- [4] Joensuu H. Risk stratification of patients diagnosed with gastrointestinal stromal tumor[J]. Hum Pathol, 2008, 39(10):1411-1419.
- [5] 中国CSCO胃肠间质瘤专家委员会. 中国胃肠间质瘤诊断治疗共识(2013年版)[J]. 中华胃肠外科杂志, 2014, 17(4):393-398. Gastrointestinal Stromal Tumor Committee belonging to the Chinese Society of Clinical Oncology. Consensus of Diagnosis and Treatment of Gastrointestinal Stromal Tumor in China (2013)[J]. Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery, 2014, 17(4):393-398.
- [6] 王昊, 陈平, 柳欣欣, 等. 胃肠间质瘤p-AKT (Thr308) 和p-AKT (Ser473) 表达及其临床意义和预后分析[J]. 肿瘤, 2014, 34(6):541-546. Wang H, Chen P, Liu XX, et al. Expressions of p-AKT (Thr308) and p-AKT (Ser473) proteins in gastrointestinal stromal tumors and their clinicopathological significance and the impact on prognosis[J]. Tumor, 2014, 34(6):541-546.
- [7] Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(5): 338-351.
- [8] Yuan X, Wu H, Xu H, et al. Notch signaling: An emerging therapeutic target for cancer treatment[J]. Cancer Lett, 2015, 369(1):20-27.
- [9] Miele L, Golde T, Osborne B. Notch signaling in cancer[J]. Curr Mol Med, 2006, 6(8):905-918.
- [10] Miele L, Miao H, Nickoloff BJ. NOTCH signaling as a novel cancer therapeutic target[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2006, 6(4):313-323.
- [11] Ma S, Shi Y, Pang Y, et al. Notch1-induced T cell leukemia can be potentiated by microenvironmental cues in the spleen[J]. J Hematol Oncol, 2014, 7(1):71.
- [12] Mizutani T, Taniguchi Y, Aoki T, et al. Conservation of the biochemical mechanisms of signal transduction among mammalian Notch family members[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(16):9026-9031.
- [13] De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(2):97-110.
- [14] Yu P, Petrus MN, Ju W, et al. Augmented efficacy with the combination of blockade of the Notch-1 pathway, bortezomib and romidepsin in a murine MT-1 adult T-cell leukemia model[J]. Leukemia, 2015, 29(3):556-566.
- [15] 苏进, 邓小峰, 刘波, 等. Notch信号通路在胆管癌中的研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(8):1175-1180. Su J, Deng XF, Liu B, et al. Notch signaling pathway in cholangiocarcinoma: recent progress[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(8):1175-1180.
- [16] Kunnimalaiyaan M, Chen H. Tumor suppressor role of Notch-1 signaling in neuroendocrine tumors[J]. Oncologist, 2007, 12(5):535-542.
- [17] Zweidler-McKay PA, He Y, Xu L, et al. Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies[J]. Blood, 2005, 106(12):3898-3906.
- [18] Dotto GP. Notch tumor suppressor function[J]. Oncogene, 2008, 27(38):5115-5123.
- [19] Klinakis A, Lobry C, Abdel-Wahab O, et al. A novel tumoursuppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia[J]. Nature, 2011, 473(7346):230-233.
- [20] Radtke F, Rai K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(10):756-767.
- [21] Capaccione KM, Pine SR. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(7):1420-1430.
- [22] Andersson ER, Lendahl U. Therapeutic modulation of Notch signalling-are we there yet?[J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13(5):357-378.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 田青水, 张宝明, 刘毅. Notch信号通路相关蛋白在胃肠道间质瘤中的表达及临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(4):547-551. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.014

Cite this article as: Tian QS, Zhang BM, Liu Y. Expressions of Notch signaling pathway related proteins in gastrointestinal stromal tumors and their clinical significance[J]. Chin J Gen Surg, 2016, 25(4):547-551. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.014