

网络出版时间: 2018-8-10 15:56 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180808.1718.029.html

结直肠癌中 GLUT-1、HIF-1 α 表达的临床意义

武雪亮¹, 王立坤², 周海丰¹, 郭飞¹, 杨永江¹, 刘博³, 杨东东¹, 屈明¹, 薛军¹

摘要 目的 观察结直肠癌组织中葡萄糖转运蛋白-1 (GLUT-1) 和低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 的表达变化, 并探讨其临床意义。方法 选取结直肠癌组织 50 例(结直肠癌组)、50 例结直肠正常组织(正常组), 采用免疫组化法检测两组结直肠组织的 GLUT-1、HIF-1 α 的表达, 分析 GLUT-1、HIF-1 α 阳性表达与结直肠癌临床病理参数的关系。结果 癌组和正常组中 GLUT-1 阳性表达率分别为 68.00% (34/50)、16.00% (8/50), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 癌组和正常组中 HIF-1 α 阳性表达率分别为 72.00% (36/50)、20.00% (10/50), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); GLUT-1 和 HIF-1 α 在结直肠癌中的表达明显相关 ($r = 0.508, P < 0.001$); GLUT-1、HIF-1 α 的表达阳性率均与结直肠癌浆膜浸润、分化程度、TNM 分期、淋巴转移、肝转移及脉管浸润有关 ($P < 0.05$)。结论 在结直肠癌组织中, GLUT-1 和 HIF-1 α 表达均增高, 均可作为评估结直肠癌发生、发展、转移及预后重要指标。

关键词 葡萄糖转运蛋白 1; 低氧诱导因子 1 α ; 结直肠癌; 免疫组化; 临床意义

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)10-1623-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.10.029

据 GLOBOCAN 2012 统计中国人群结直肠癌目前排位死因顺位从第 7 位上升到第 5 位, 男女死亡率分别为 9.0/10 万和 6.1/10 万, 严重威胁国民健康^[1]。尽管近年来结直肠癌的普查力度不断加强、手术方式不断改进、靶向药物大力推广, 并取得了一系列的突破, 但其 5 年生存率不足 60%, 仍是公共

卫生的关键问题^[2]。因此, 对结肠直肠癌的深入研究, 尤其对其分子生物学研究具有很高的临床价值。GLUT-1 (glucose transporter, GLUT-1) 是葡萄糖转运蛋白家族中最重要的成员, 广泛存在于真核生物和原核生物中, 在肿瘤早期生长、癌症转移和侵袭等方面均具有重要作用。相关报道证实, 在乳腺癌、食管癌、肝癌等肿瘤细胞内均发现 GLUT-1 的高表达, GLUT-1 的活性和表达水平与肿瘤的恶性生物学行为密切相关^[3-5]。目前, GLUT-1 在结直肠癌方面的研究鲜有报道, 该研究通过对结直肠癌和正常结直肠组织行免疫组织化学染色分析检测, 旨在探讨 GLUT-1 在结直肠癌中的表达情况及与相关临床病理因素间的关系, 为结直肠癌靶向诊疗提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集河北北方学院附属第一医院普通外科 2016 年 9 月~2017 年 1 月手术切除的结直肠癌组织 50 例和正常结直肠的组织 50 例, 结直肠的癌组织自癌灶中心处取得, 另外取经病理证实为正常肠组织的标本切缘。所有病例为原发性肿瘤, 术前没有行针对性治疗, 如新辅助放化疗等, 术后标本均在 1 h 内获得, 并贮存于液氮中。

1.2 主要试剂和实验方法

1.2.1 主要试剂 兔抗 GLUT-1 多克隆抗体、鼠抗人 HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司; 免疫组化试剂盒、DAB 显色剂购自上海 Gene Tech 公司。

1.2.2 免疫组织化学染色 10% 的甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 切片厚度 4 μm , 应用苏木精-伊红染色, 行病理诊断。用 80 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱对切片进行烘烤 30 min, 再用乙醇进行脱水, 并使内源性过氧化物酶灭活, 应用枸橼酸缓冲液行高温高压水化修复过程; 之后 PBS 洗 3 次, 加入一抗 (1:100) 50 μl , 温度控制于 4 $^{\circ}\text{C}$ 一夜; 再用 PBS 洗 3 次, 加入二抗 50 μl 。室温下 DAB 显色, PBS 洗 3 次, 苏木精轻度复染, 盐酸乙醇分化后流动清水冲洗 10 min, 梯度乙醇脱水, 松节

2018-05-10 接收

基金项目: 河北省财政厅临床医学优秀人才培养研究项目(编号: 3101-03-02); 河北省张家口市科技局指令性计划(编号: 1621083D)

作者单位: 河北北方学院附属第一医院¹ 普通外科、² 超声医学科、³ 病理科 张家口 075000

作者简介: 武雪亮, 男, 硕士, 主治医师;

杨东东, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者 E-mail: yw-cydd@126.com;

薛军, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者 E-mail: yfyuejun@163.com

油透明和树胶行封片处理 ,PBS 代替一抗作为阴性对照 ,光镜下观察。

1.2.3 阳性结果判定标准^[6] GLUT-1 阳性染色主要集中于细胞质中 ,少量表达于细胞核 ,HIF-1 α 阳性染色主要集中于细胞核 ,少量表达于细胞质 ,均为棕黄色或褐色颗粒 ,计算阳性细胞百分比并评分 , $\leq 5\%$ 为 0 分 , $6\% \sim 25\%$ 为 1 分 , $26\% \sim 50\%$ 时为 2 分 , $51\% \sim 75\%$ 时为 3 分 , $>75\%$ 时为 4 分 ;同理 ,无着色为 0 分 ,浅黄色为 1 分 ,黄色为 2 分 ,深黄色为 3 分。然后两组相乘 ,0 分: - ,1 ~ 4 分: + ,5 ~ 8 分: ++ ,9 ~ 12 分: +++ 阳性包含 + ~ +++。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行分析 ,计数资料以百分率表示 ,GLUT-1 和 HIF-1 α 的表达与临床病理参数的关系应用 χ^2 检验进行分析 ,采用 Pearson 法进行相关性分析 ,检验水准设 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 结直肠癌、正常组织中 GLUT-1 和 HIF-1 α 表达情况 癌组和正常组织中 GLUT-1 阳性表达率分别为 68.00% (34/50) 、16.00% (8/50) ,组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ;癌组和正常组织中 HIF-1 α 阳性表达率分别为 72.00% (36/50) 、20.00% (10/50) ,组间差异有统计学意义 ($P < 0.001$) ,见图 1、表 1。

2.2 GLUT-1 和 HIF-1 α 表达与结直肠癌临床病理特征的关系 GLUT-1 和 HIF-1 α 的表达都和肿瘤的浸润深度、分化程度、TNM 分期、淋巴转移、肝转移和脉管浸润有关 ($P < 0.05$) 。TNM 分期高、分化程度越低、伴淋巴结转移、肝转移和脉管浸润的患者

GLUT-1 和 HIF-1 α 的表达均增强 ,而 GLUT-1 和 HIF-1 α 的阳性表达与患者肿瘤大小无相关性 ($P > 0.05$) ,见表 2。

2.3 GLUT-1 和 HIF-1 α 在结直肠癌中表达的相互关系 GLUT-1 和 HIF-1 α 在结直肠癌中的表达明显相关 ($r = 0.508$, $P < 0.001$) 。GLUT-1 在 HIF-1 α 阳性组中的表达 (阳性率 80.56%) 明显高于在 HIF-1 α 阴性组中的表达 (阳性率 35.71%) ,差异有统计学意义 ($P < 0.001$) ,见表 3。

3 讨论

结直肠癌的发生、发展是多个基因调控的多步骤、多因素、多阶段的复杂过程 ,其中失控性生长和不断侵袭增殖是恶性肿瘤细胞的最主要特征 ,这种特征的维系主要靠葡萄糖的无氧酵解为其提供能量 ,该过程即使在氧充足的环境下仍可继续进行^[7]。由于肿瘤的高消耗、高代谢 ,需要较普通细胞成倍的能量。而正常情况下 ,葡萄糖无法独立通过细胞膜的双分子层结构 ,必须依赖跨膜分布的葡萄糖转运蛋白作为载体 ,因而这类载体的活性及表达量对肿瘤细胞的恶性增殖具有极其重要的意义^[8]。

GLUT-1 是葡萄糖转运蛋白最重要的成员 ,GLUT-1 内含 492 个氨基酸 ,由 12 个疏水性的跨膜 α 螺旋结构域、两个电荷的膜内区及膜外区构成^[9]。Deng et al^[10] 解析的人源 GLUT-1 的晶体结构显示其经典的协助转运超家族的折叠方式: 12 个跨膜螺旋组成 NH₂-端和-OOH 端 2 个结构域 ,其中的腔孔呈向胞内区展开 ,这即是其转运的基础框架。

肿瘤细胞膜上的 GLUT-1 的表达受多种途径调

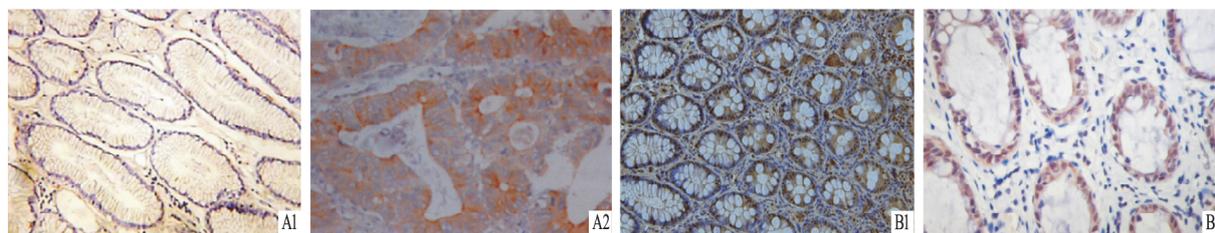


图 1 结直肠正常组织和癌组织中 GLUT-1、HIF-1 α 蛋白的表达 SP $\times 200$
A: GLUT-1; B: HIF-1 α ; 1: 正常组织; 2: 结直肠癌组织

表 1 GLUT-1 和 HIF-1 α 在结直肠癌组织及癌旁正常组织中的表达

组别	n	GLUT-1/HIF-1 α (n)				阳性率 (%)	χ^2 值	P 值
		-	+	++	+++			
结直肠癌	50	16/14	9/8	11/12	14/16	68.00/72.00	16.386/14.438	<0.001 / <0.001
正常	50	42/40	4/6	2/3	2/1	16.00/20.00		

表2 GLUT-1 和 HIF-1 α 在结直肠癌组织中的表达及与临床病理因素的关系 [n(%)]

项目	n	GLUT-1 阳性	χ^2 值	P 值	HIF-1 α 阳性	χ^2 值	P 值
肿瘤大小(cm)			0.095	0.773		0.965	0.393
≥ 5	32	22(68.75)			23(71.88)		
< 5	18	12(66.67)			13(72.22)		
分化程度			7.071	0.013		7.083	0.011
高	12	5(41.67)			5(41.67)		
中	21	14(66.67)			15(71.43)		
低	17	15(88.24)			16(94.12)		
浆膜浸润			8.954	0.002		9.007	0.001
有	39	30(76.92)			32(82.05)		
无	11	4(36.36)			4(36.36)		
TNM 分期			8.097	0.004		5.995	0.021
I + II	8	3(37.50)			4(50.00)		
III + IV	42	11(73.81)			32(76.19)		
淋巴结转移			8.981	0.001		9.174	0.000
有	33	28(84.85)			29(87.87)		
无	17	6(35.29)			7(41.18)		
肝转移			6.333	0.016		6.197	0.018
有	7	7(100.00)			7(100.00)		
无	43	27(62.79)			29(67.44)		
脉管浸润			6.097	0.019		5.711	0.025
有	16	14(87.50)			15(93.75)		
无	34	20(58.82)			21(61.76)		

表3 GLUT-1 和 HIF-1 α 在结直肠癌组织中表达的相关性 (n)

GLUT-1	HIF-1 α		总计	r 值	P 值
	+	-			
+	29	5	34	0.508	<0.001
-	7	9	16		
总计	36	14	50		

节,目前研究较多的有磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K) / 蛋白激酶 B(AKT) / 雷帕霉素靶蛋白(mTOR) 途径和 HIF-1 α 和 p53 途径,PI3K/AKT/mTOR 与癌细胞的增殖、微血管形成和转移蛋白的合成关系密切,且需要大量能量供应,在肝癌、胃癌、子宫癌等肿瘤细胞中均证实能上调 GLUT-1 的表达^[11]。

本研究显示 GLUT-1 和 HIF-1 α 在正常肠黏膜和腺癌中的表达水平逐步上升,差异有统计学意义,表明在肠黏膜癌变的过程中,细胞膜上的 GLUT-1 和 HIF-1 α 水平不断上调,从而确保肿瘤对能量的摄取。进一步研究显示, GLUT-1 和 HIF-1 α 表达水平与结直肠癌的病理分期、浸润深度、分化程度、淋巴结转移、肝转移和脉管浸润均明显相关,且二者存在明显相关性。HIF-1 α 是调控癌细胞对低氧耐受的关键蛋白,研究^[12]表明,在肝癌细胞内, HIF-1 α 能直接激活 GLUT-1 等糖酵解相关因子活性,从而满

足肝癌细胞的能量摄取,增强其对低氧的耐受力。在胃肿瘤体外培养的细胞内,低氧条件下应用 HIF-1 α 抑制剂处理后,癌细胞内活性氧比例更高,凋亡更显著^[13]。杨通印等^[14]对 142 结直肠癌组织标本行免疫组化检测发现 GLUT-1 和 HIF-1 α 表达明显高于正常肠黏膜,且二者存在协同作用,在低氧环境下, HIF-1 α 表达上调能诱导 GLUT-1 高表达,加速癌细胞糖酵解,促进癌细胞浸润和转移。

综上所述, GLUT-1 异常表达对结直肠癌的发生和进展有重要作用,深入探究 GLUT-1 和 HIF-1 α 的作用机制有望为结直肠癌精确治疗提供重要的理论依据。

参考文献

- [1] 张 玥,石菊芳,黄慧瑶,等. 中国人群结直肠癌疾病负担分析 [J]. 中华流行病学杂志 2015, 36(7): 709-14.
- [2] Sharkas G F, Arqoub K H, Khader Y S, et al. Colorectal cancer in Jordan: survival rate and its related factors [J]. J Oncol, 2017, 2017: 3180762.
- [3] Wei S B, Fan Q, Yang L, et al. Promotion of glycolysis by HOTAIR through GLUT1 upregulation via mTOR signaling [J]. Oncol Rep, 2017, 38(3): 1902-8.
- [4] Choi B H, Song H S, An Y S, et al. Relation between fluorodeox-

- ylucose uptake and glucose transporter-1 expression in gastric signet ring cell carcinoma[J]. *Nucl Med Mol Imaging*, 2011, 45(1): 30-5.
- [5] Kim H M, Jung W H, Koo J S, et al. Site-specific metabolic phenotypes in metastatic breast cancer [J]. *J Transl Med*, 2014, 12(11): 354-9.
- [6] Cooper R, Sariogh S, Sokmen S, et al. Glucose transporter-1 (Glut1): a potential marker of prognosis in rectal carcinoma[J]. *Br J Cancer* 2003, 89(5): 870-6.
- [7] 詹启敏, 陈杰. 细胞周期与肿瘤转化医学[J]. *中国肿瘤临床* 2014, 41(1): 1-7.
- [8] Dong H, Yang X, Xie J, et al. UP12, a novel ursolic acid derivative with potential for targeting multiple signaling pathways in hepatocellular carcinoma[J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 93(2): 151-62.
- [9] Jurcovicova J. Glucose transport in brain-effect of inflammation [J]. *Endocr Regul* 2014, 48(1): 35-48.
- [10] Deng D, Xu C, Sun P, et al. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1 [J]. *Nature* 2014, 510(7503): 121-5.
- [11] Fan R, Hou W, J, Zhao Y, J, et al. Overexpression of HPV16 E6/E7 mediated HIF-1 α upregulation of GLUT1 expression in lung cancer cells [J]. *Tumour Biol* 2016, 37(4): 4655-63.
- [12] 梁辉, 姬宏斌, 宫伟, 等. 肝细胞癌中 HIF-1 α 与 Glut1 表达的关系及意义[J]. *实用癌症杂志* 2014, 29(1): 28-32.
- [13] Tanaka T, Kitajima Y, Miyake S, et al. The apoptotic effect of HIF-1 α inhibition combined with glucose plus insulin treatment on gastric cancer under hypoxic conditions [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137257.
- [14] 杨通印, 郝朗松, 郭德正. 缺氧诱导因子 1 α 、葡萄糖转运蛋白 1 和乳酸脱氢酶 5 在结肠直肠癌的表达及其意义[J]. *中华病理学杂志* 2017, 46(2): 93-7.

Expressions of GLUT-1 and HIF-1 α in colorectal cancer tissues and its clinical significance

Wu Xueliang¹, Wang Likun², Zhou Haifeng¹, et al

(¹Dept of General Surgery, ²Dept of Ultrasound, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

Abstract Objective To explore the expressions of GLUT-1 and HIF-1 α in human colorectal adenocarcinoma tissues and discuss the clinical significances. **Methods** The expressions of GLUT-1 and HIF-1 α in 50 specimens of colorectal adenocarcinoma tissues (colorecta cancer group) and 50 specimens of normal colorectal tissues (normal group) were selected and immunohistochemistry technique was used to detect the expression of GLUT-1 and HIF-1 α in two groups. The correlation between their positive expression and the clinicopathologic features were analyzed. **Results** The positive rates of GLUT-1 in colorecta cancer group and normal group were 68.00% (34/50) and 16.00% (8/50) respectively, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The positive rates of HIF-1 α in the colorecta cancer group and normal group were 72.00% (36/50) and 20.00% (10/50) respectively, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Expression of GLUT-1 was related with expression of HIF-1 α in colorectal cancer tissues ($r = 0.508$, $P < 0.001$). The positive expression of GLUT-1 and HIF-1 α were correlated with the depth of tumor invasion, differentiation degrees, TNM stage, lymph node metastasis, liver metastasis and vessel invasion ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression levels of GLUT-1 and HIF-1 α are higher in colorectal cancer tissues, which can be used as important indicators to evaluate the occurrence, development, metastasis and prognosis of colorectal cancer.

Key words GLUT-1; HIF-1 α ; colorectal neoplasms; immunohistochemistry; clinical significance