

# ADAM23基因在结直肠癌中的表达及其意义

王夫景, 张强, 于洪亮, 李胜龙

## ■背景资料

ADAM23基因位于人染色体2q33上, 参与细胞黏附过程, 与细胞-细胞及细胞-基质间的黏连融合有关。随着对研究的深入, 很多证据表明ADAM23基因与人类胃癌、脑肿瘤、乳腺癌、胰腺癌等疾病有关。

王夫景, 张强, 李胜龙, 哈尔滨医科大学附属二院普通外科  
黑龙江省哈尔滨市 150086

于洪亮, 大庆油田总医院集团 黑龙江省大庆市 163712

黑龙江省科技攻关资金资助项目, No. GC06C416-01

王夫景, 主任医师, 教授。从事结直肠癌的基因治疗, 尤其是直肠癌低位保肛技术的研究。

作者贡献分布: 此课题由王夫景设计及撰写; 研究过程由张强完成; 研究所用新试剂及分析工具由于洪亮提供; 数据分析由李胜龙完成。

通讯作者: 王夫景, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属二院普通外科。wangfujing-hyd@163.com

收稿日期: 2008-07-17 修回日期: 2008-09-15

接受日期: 2008-09-17 在线出版日期: 2008-10-28

## Expression of ADAM23 gene and its significance in human colorectal cancer

Fu-Jing Wang, Qiang Zhang, Hong-Liang Yu,  
Sheng-Long Li

Fu-Jing Wang, Qiang Zhang, Sheng-Long Li, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Hong-Liang Yu, Department of General Surgery, Daqing Oilfield General Hospital, Daqing 163712, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Key Science and Technology Foundation of Heilongjiang Province, No. GC06C416-01

Correspondence to: Fu-Jing Wang, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. wangfujing-hyd@163.com

Received: 2008-07-17 Revised: 2008-09-15

Accepted: 2008-09-17 Published online: 2008-10-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of ADAM23 mRNA and protein in human colorectal cancer and its clinical significance.

**METHODS:** Forty-five cases with colorectal cancer undergoing surgical treatment in our hospital from 2007 to 2008 were collected. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry were performed to detect the expression of ADAM23 mRNA and protein respectively in tumor and paratumorous tissues.

**RESULTS:** The expression levels of ADAM23 mRNA and protein were significantly lower in

tumor tissues than those in paratumorous tissues (37.8% vs 95.6%, 28.9% vs 86.7%; both  $P < 0.01$ ). ADAM23 expression had no correlation with patients' age, sex and tumor size, but markedly related to tumor differentiation degree, infiltration depth, lymph node metastasis and clinical stages ( $\chi^2 = 5.688, 14.79, 11.8172, 11.8172$ ;  $P < 0.01$  or  $0.05$ ).

**CONCLUSION:** ADAM23, which is associated with partial biological behaviors, may be involved in the development of colorectal cancer, and it may serve as an important molecular biological indicator in diagnosing and predicting the biological behaviors of colorectal cancer.

**Key Words:** Colorectal cancer; ADAM23; Reverse transcription polymerase chain reaction; Immunohistochemistry

Wang FJ, Zhang Q, Yu HL, Li SL. Expression of ADAM23 gene and its significance in human colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(30): 3406-3409

## 摘要

**目的:** 探讨ADAM23基因mRNA及蛋白在结直肠癌中的表达规律及其临床意义。

**方法:** 我院2007-03/2008-03手术治疗的结直肠癌患者45例, 分别取结直肠癌组织标本以及配对癌旁组织标本, 应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫组织化学方法分析患者ADAM23基因mRNA及蛋白的表达进行。

**结果:** 结直肠癌组织中ADAM23基因mRNA及蛋白的表达明显降低(37.8% vs 95.6%, 28.9% vs 86.7% 均 $P < 0.01$ ), 且其表达与患者的年龄、性别以及肿瘤的大小无关, 而与结直肠癌的分化程度、浸润深度、淋巴结转移和临床分期关系密切( $\chi^2 = 5.688, 14.79, 11.8172, 11.8172, P < 0.01$ 或 $0.05$ )。

**结论:** ADAM23参与了结直肠癌的发展过程, 并与结直肠癌的部分生物学行为有关, 可能成为结直肠癌诊断和判断其生物学特性的重要的分子生物学检测指标。

## ■同行评议者

曹杰, 主任医师, 广州医学院附属广州市第一人民医院胃肠外科

**关键词:** 结直肠癌; ADAM23; 基因表达; 逆转录-聚合酶链反应; 免疫组织化学

王夫景, 张强, 于洪亮, 李胜龙. ADAM23基因在结直肠癌中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(30): 3406-3409  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3406.asp>

## 0 引言

结直肠癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 其发生发展是一个多基因、多阶段的变化过程, 其中癌基因的激活及抑癌基因的失活起重要作用<sup>[1]</sup>. ADAM23基因位于人类染色体(2q33.3), 是ADAM家族的一员, 属于锌蛋白酶总属的一种跨膜蛋白. 国内我们首次选择ADAM23基因作为靶基因, 采用RT-PCR和免疫组织化学的方法, 对ADAM23基因在结直肠癌中的表达及其与肿瘤临床病理学特征的关系进行检测和分析.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院2007-03/2008-03手术治疗的结直肠癌患者45例, 取其癌组织标本以及配对癌旁组织标本, 其中, 高、中分化腺癌27例, 低分化、未分化腺癌18例, 男25例, 女20例, 平均年龄50岁. 每例取新鲜肿瘤组织和距肿瘤边缘10 cm正常黏膜组织各1份. 1组标本以液氮罐冷冻保存备用, 另1组经40 g/L的中性甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋4℃保存, 制成4 μm厚连续切片. 所有标本均经病理组织学检查确诊. 一步法RT-PCR试剂盒购自Promega公司, 兔抗人多克隆抗体为Abcam公司产品, 免疫组织化学(链菌素亲生物素2过氧化物酶S2P)试剂盒购自北京索莱宝公司, 紫外可见分光光度仪, Biofuge22R高冷冻离心机, GeneAmpPCRsystem9700 PCR仪.

### 1.2 方法

**1.2.1 组织总RNA的抽提:** 取80 mg冷冻保存的组织标本, 剪碎后放入DEPC处理过的匀浆器中, 加入1 mL TRIzol进行研磨, 将匀浆后液体移入经DEPC处理过的1.5 mL灭菌微量离心管(EP)中, 室温下静置3 min, 加入0.2 mL氯仿, 12 500 r/min 4℃离心12 min, 将上清移入另一经DEPC处理过的灭菌EP管中, 加入0.5 mL异丙醇, 于12 500 r/min 4℃离心16 min, 倒去上清, 沉淀半干燥, 用50 μL水融解, 用紫外可见分光光度仪检测RNA的纯度及含量.

**1.2.2 RT-PCR:** 引物序列参照文献[2](由上海生工公司合成), 上、下游引物序列分别为5'-TAT GAGCAGCTGTCCACTCG-3'和5'-CCCCAGCC

TGTGCCCCCAAG-3'. 扩增片段长度为249 bp, 采用β-actin为内参对照, 上、下游引物序列分别5'-CCCAGCACAATGAAGATCAAGA TCAT-3'和5'-ATCTGCTGGAAGGTGGACAGCGA-3'. 扩增片段长度为101 bp. 在酶系统中以标准方法合成cDNA第一链, RT体系包括5×Buffer、1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、100 μmol/4 dNTP、500 mg/L Oligod(T)引物、50 U/μL R Nasin等, 总体积25 μL. 在37℃下孵育1 h, 然后95℃灭活5 min终止RT反应. 取2.5 μL上述cDNA产物作为PCR模板进行PCR扩增, 同时以内参照基因β-肌动蛋白(β-actin)作为内参照, PCR反应体系在95℃下变性5 min, 循环条件为95℃ 60 s, 53℃ 60 s, 72℃ 60 s, 共30个循环, 最后延伸10 min. 扩增完毕后取5.0 μL 15 g/L的琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外灯下观察电泳带并进行分析.

**1.2.3 免疫组织化学染色:** 按SP试剂盒说明书进行. 结果判断: 在光镜下有棕黄色颗粒反应出现在细胞膜、细胞质中均为阳性反应细胞, 于5个不同高倍视野相同范围下计数500个细胞及免疫组化染色阳性细胞数, 阳性细胞率<5%计为(-), 等于5%-50%为(+), 大于50%-75%为(++), >75%为(+++).

**统计学处理** 用SPSS11.0分析软件对结果进行统计学处理, 组间差异用 $\chi^2$ 检验.

## 2 结果

**2.1 ADAM23基因mRNA的表达** 45例结直肠正常黏膜中ADAM23 mRNA为高表达, 其阳性率为(95.6%)43/45, 而45例结直肠癌组织中, 仅有17例表达阳性(37.8%)17/45, 其余均为低表达或缺失, 两者间差异有非常显著性( $\chi^2 = 33.8$ ,  $P < 0.0001$ , 图1, 表1).

**2.2 ADAM23蛋白的表达** 阳性表达为细胞膜或细胞质中呈现棕黄色颗粒且阳性细胞百分比 $\geq 5\%$ . 45例正常结直肠黏膜ADAM23蛋白免疫组织化学染色阳性表达率为(86.7%)39/45, 而45例结直肠癌组织ADAM23蛋白免疫组织化学染色阳性表达率仅为(28.9%)13/45, 两者间存在显著性差异( $\chi^2 = 30.7895$ ,  $P < 0.0001$ , 图2, 表1).

**2.3 结直肠癌中ADAM23基因表达与大肠癌临床病理特征间的关系** ADAM23基因表达与患者的年龄、性别以及肿瘤的大小无关( $P > 0.05$ ), 但与肿瘤的分化程度、浸润深度、淋巴结转移及临床分期有关. 高、中分化的结直肠癌组织中, ADAM23 mRNA及蛋白的表达阳性率明显高于

### ■ 相关报道

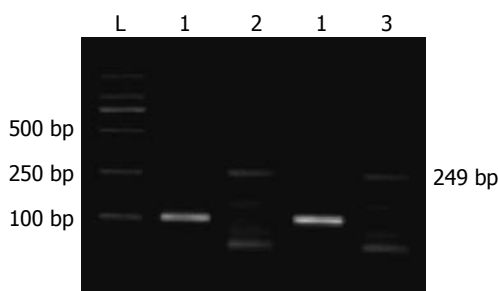
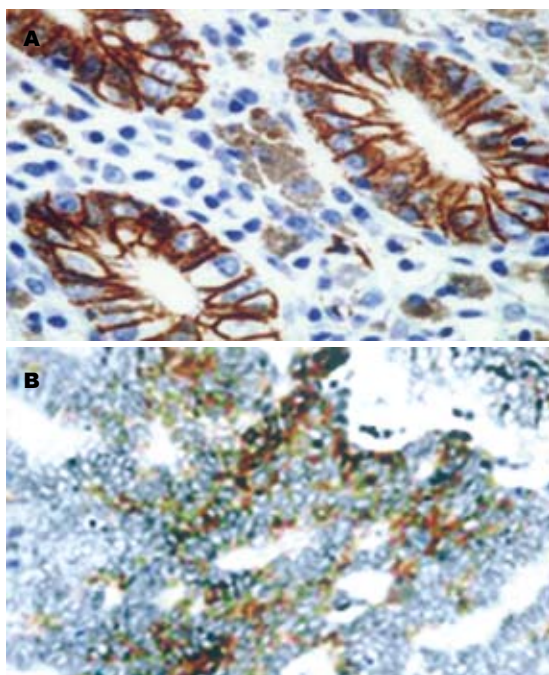
目前, 对于ADAM23基因的研究多数集中在神经系统. Sun *et al*应用RT-PCR方法对不同发育阶段的大鼠脑组织研究表明, ADAM23分子的一个亚型ADAM23 $\gamma$ 在大鼠胚胎和婴儿脑组织中表达, 在出生后10 d表达消失.

## ■创新盘点

本文应用RT-PCR和免疫组织化学方法,检测ADAM23 mRNA和蛋白在结直肠癌中的表达情况,探讨ADAM23基因表达与结直肠癌临床病理特征间的关系。

表 1 大肠癌及正常黏膜组织中ADAM23 mRNA和蛋白的表达 ( $n = 45$ )

组织	ADAM23 mRNA表达		$P$	ADAM23蛋白表达		$P$
	阳性	阴性		阳性	阴性	
大肠癌组织	17	28	<0.01	13	32	<0.01
正常大肠组织	43	2		39	6	

图 1 ADAM23基因mRNA表达水平。L: DL2000; 1:  $\beta$ -actin; 2: 正常结直肠黏膜; 3: 结直肠癌组织。图 2 ADAM23蛋白在结直肠组织中的表达。A: 正常结直肠黏膜(免疫组化染色 $\times 200$ ); 结直肠癌组织(免疫组化染色 $\times 100$ )。

低分化和未分化癌( $\chi^2 = 5.688, P = 0.0171 < 0.05$ ); 随着浸润深度的增加, 表达的阳性率逐渐下降, 未达浆膜的结直肠癌与已达浆膜的结直肠癌中, ADAM23基因的表达差异有非常显著性( $\chi^2 = 14.79, P = 0.0001 < 0.01$ ); 有淋巴结转移者, ADAM23基因的表达低于无淋巴结转移者( $\chi^2 = 11.8172, P = 0.0006 < 0.01$ ); TNM分期中, III、IV期结直肠癌的ADAM23阳性表达率明显低于I、II期, 差异具有显著性( $\chi^2 = 11.8172, P$

表 2 不同类型的结直肠癌组织的ADAM23mRNA的表达

分组	$n$	阳性	阴性	$P$
性别				>0.05
男	25	9	16	
女	20	8	12	
年龄				>0.05
<50	19	8	11	
$\geq 50$	26	9	17	
肿瘤大小				>0.05
$\leq 5$ cm	27	10	17	
>5 cm	18	7	11	
淋巴结转移				<0.01
无	25	15	10	
有	20	2	18	
浸润深度				<0.01
未达浆膜层	26	16	10	
已达浆膜层	19	1	18	
分化程度				<0.05
高中分化	27	14	13	
低未分化	18	3	15	
临床分期				<0.01
I、II	25	15	10	
III、IV	20	2	18	
部位				>0.05
结肠	16	5	11	
直肠	29	12	17	

$=0.0006 < 0.01$ ).

## 3 讨论

ADAM23(GenBank Accession No. AB009672)属于ADAM家族的一员<sup>[3]</sup>. 自1998年开始Black *et al*相继对ADAM家族展开研究, ADAM家族是属于锌蛋白酶总属的一种跨膜蛋白. 其主要功能涉及到细胞膜的融合、细胞因子和生长因子的脱落、细胞迁移及决定细胞命运等很多方面. 还参与调节肌肉生长和受精等一些过程. ADAM家族成员ADAM23作为一种抑癌基因, 在国外有关报道称: ADAM23作为一种抑癌基因与乳腺癌<sup>[4]</sup>、前列腺癌<sup>[5]</sup>、小细胞肺癌<sup>[6]</sup>、恶性胶质瘤<sup>[7]</sup>、胃癌<sup>[8]</sup>、胰腺癌<sup>[9]</sup>、喉癌<sup>[10]</sup>等恶性肿瘤的发生和发展有密切关系, 但在结直肠癌中未见

## ■应用要点

本实验研究主要从分子生物学入手, 对ADAM23在肿瘤转移中发挥的重要作用展开研究, ADAM23基因可能成为反映结、直肠癌发生、发展和预后的重要指标. 所以深入研究细胞表面黏附因子在结、直肠癌转移中的作用机制和临床意义, 可望为开展新型有效的肿瘤治疗方法开辟新的途径。

任何报道。

Fabricio *et al* 研究表明<sup>[2]</sup>, 原发性乳腺癌患者存在高频率的ADAM23基因甲基化现象, 导致ADAM23基因的mRNA表达向下调节, 并且ADAM23基因的失活可促进乳腺肿瘤的发生和发展. Takada *et al* 研究发现<sup>[11]</sup>, ADAM23基因启动子区域甲基化导致ADAM23基因失活可能是胃癌的一种致癌因素, 并认为ADAM23基因作为胃癌的一种抑癌基因, 具有研究价值。

本实验采用RT-PCR和免疫组化方法分别从分子生物学和细胞形态学两个方面检测ADAM23 mRNA和蛋白的表达情况, 本实验发现, 在结直肠癌组织中ADAM23 mRNA及蛋白表达均明显下调, 提示结直肠癌细胞的生长抑制和凋亡减少, 从一定意义上说明ADAM23基因在结直肠组织中呈现低表达或失活, 其正常表达可能是一种抑癌发生因素. 当然, 也不能完全排除由于实验的偏差造成不相关的可能, 这一切均需进一步的工作予以证明. 本结果还显示了RT-PCR方法在检测ADAM23基因表达时其敏感性高于免疫组化方法, 其原因可能是转录水平的mRNA表达先于翻译水平的蛋白质表达, 进行检测的时刻, 细胞中的mRNA还未翻译出足以显示免疫反应的最低蛋白量, 可能会出现有mRNA表达而无蛋白表达的现象. 本结果还显示了ADAM23的表达与结直肠癌的淋巴结转移、肿瘤分化程度、浆膜侵犯程度和TNM分期有关, 表明ADAM23基因可能参与了结直肠癌细胞的分化. 浸润和淋巴结转移的调节, 随临床分期的进展, 其表达率下降, 说明ADAM23基因的失活参与了结直肠癌的发生发展过程, 但目前, ADAM23对结直肠癌发生、发展和转移的影响机制尚不清楚, 其对结直肠癌肿瘤细胞生长和转移的影响还需进一步研究. 由于本资料缺少大量的病例随诊, 其临床意义尚待进一步确定。

#### 4 参考文献

1 杨维良, 张东伟. 我国大肠癌外科实验研究的现状与

- 展望. 中华实验外科杂志 2003; 20: 869-870
- 2 Costa FF, Verbisck NV, Salim AC, Ierardi DF, Pires LC, Sasahara RM, Sogayar MC, Zanata SM, Mackay A, O'Hare M, Soares F, Simpson AJ, Camargo AA. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. *Oncogene* 2004; 23: 1481-1488
- 3 Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 2003; 17: 7-30
- 4 O'Shea C, McKie N, Buggy Y, Duggan C, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ. Expression of ADAM-9 mRNA and protein in human breast cancer. *Int J Cancer* 2003; 105: 754-761
- 5 McCulloch DR, Akl P, Samaratunga H, Herington AC, Odorico DM. Expression of the disintegrin metalloprotease, ADAM-10, in prostate cancer and its regulation by dihydrotestosterone, insulin-like growth factor I, and epidermal growth factor in the prostate cancer cell model LNCaP. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 314-323
- 6 Shintani Y, Higashiyama S, Ohta M, Hirabayashi H, Yamamoto S, Yoshimasu T, Matsuda H, Matsuura N. Overexpression of ADAM9 in non-small cell lung cancer correlates with brain metastasis. *Cancer Res* 2004; 64: 4190-4196
- 7 Kodama T, Ikeda E, Okada A, Ohtsuka T, Shimoda M, Shiomi T, Yoshida K, Nakada M, Ohuchi E, Okada Y. ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor. *Am J Pathol* 2004; 165: 1743-1753
- 8 Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Roessner A, Rocken C. The disintegrin-metalloproteinases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer. *Int J Oncol* 2005; 26: 17-24
- 9 Hagihara A, Miyamoto K, Furuta J, Hiraoka N, Wakazono K, Seki S, Fukushima S, Tsao MS, Sugimura T, Ushijima T. Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers. *Oncogene* 2004; 23: 8705-8710
- 10 Calmon MF, Colombo J, Carvalho F, Souza FP, Filho JF, Fukuyama EE, Camargo AA, Caballero OL, Tajara EH, Cordeiro JA, Rahal P. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 173: 31-37
- 11 Takada H, Imoto I, Tsuda H, Nakanishi Y, Ichikura T, Mochizuki H, Mitsufuji S, Hosoda F, Hirohashi S, Ohki M, Inazawa J. ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation. *Oncogene* 2005; 24: 8051-8060

#### ■同行评价

本研究设计较科学, 数据可靠, 方法合理, 样本量充足, 具有较好的学术价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕