

· 论 著 ·

# Wnt 信号通路中 NKD1 与 LGR5 在结直肠畸变 隐窝灶中的表达及意义

刘芳<sup>1</sup>, 王凤云<sup>2</sup>, 周云<sup>3</sup>, 彭占仙<sup>4</sup>, 王楷翔<sup>5</sup>, 王丽云<sup>3</sup>, 孙立娜<sup>6</sup>

1. 保定市第一医院病理科, 河北 保定 071000;
2. 保定市第一医院血液科, 河北 保定 071000;
3. 保定市第一医院老年病科, 河北 保定 071000;
4. 保定市第一医院呼吸科, 河北 保定 071000;
5. 保定市传染病医院检验科, 河北 保定 071000;
6. 保定市第一医院检验科, 河北 保定 071000

**摘要:** **目的** 探讨 Wnt 信号通路中裸角质膜同源蛋白 1 (NKD1)、富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体 5 (LGR5) 蛋白在结直肠异型增生性畸变隐窝灶 (ACF)、管状腺瘤及腺瘤癌变中的表达及其相关性。**方法** 收集 2015 年 1 月至 2016 年 6 月结直肠镜检查中应用放大内镜窄带成像 (NBI) 技术发现的、经病理 HE 染色证实为异型增生性 ACF 的 40 例标本, 并以管状腺瘤伴异型增生 40 例、腺瘤癌变 35 例及结直肠正常黏膜 38 例作为对照。采用免疫组化 EnVision 法测定四种病理类型结直肠样本的 NKD1、LGR5 蛋白表达情况, 并分析 NKD1、LGR5 蛋白在结直肠腺瘤癌变过程中的关系。**结果** NKD1 蛋白随结直肠组织恶性程度的递升 [正常黏膜组 (97.4%) → 异型增生性 ACF 组 (80.0%) → 管状腺瘤伴异型增生组 (55.0%) → 腺瘤癌变组 (14.3%)] 表达率递降 ( $P < 0.01$ )。LGR5 蛋白随结直肠组织恶性程度的递升 [正常黏膜组 (5.3%) → 异型增生性 ACF 组 (60.0%) → 管状腺瘤伴异型增生组 (70.0%) → 腺瘤癌变组 (94.3%)] 表达率递升 ( $P < 0.01$ )。在异型增生性 ACF、管状腺瘤、腺瘤癌变的发展过程中 NKD1 和 LGR5 间呈负相关 ( $r_s = -0.678, P < 0.05$ )。**结论** Wnt 信号通路中 NKD1 表达降低与 LGR5 表达升高在结直肠癌前病变的发生发展中可能起重要作用, 或可为结肠癌的早期发现、有效筛查和治疗提供重要的作用靶点。**关键词:** 畸变隐窝灶; 结直肠管状腺瘤; Wnt 信号通路; 裸角质膜同源蛋白 1; 富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体 5; 窄带成像技术

中图分类号: R 735.34 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2017)04-0475-04

## Expressions of NKD1 and LGR5 of Wnt signaling pathway and their clinical significance in colorectal aberrant crypt foci

LIU Fang\*, WANG Feng-yun, ZHOU Yun, PENG Zhan-xian, WANG Kai-xiang, WANG Li-yun, SUN Li-na

\*Department of Pathology, Baoding First Hospital, Baoding, Hebei 071000, China

**Abstract: Objective** To investigate the expressions of naked cuticle drosophila 1 (NKD1) and leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (LGR5) protein of Wnt signaling pathway in aberrant crypt foci (ACF) of colorectal atypical hyperplasia, tubular adenomas and adenomas cancerization and their correlations. **Methods** Forty samples of ACF of atypical hyperplasia found by magnifying endoscope narrow-band imaging (NBI) technique and confirmed by pathology with HE staining in colonoscopy examination from January 2015 to June 2016 were collected, and 40 samples of tubular adenomas combined with atypical hyperplasia, 35 samples of adenomas cancerization and 38 samples of colorectal normal mucosa were selected as contrast. Immunohistochemical EnVision method was used to detect the expressions of NKD1 and LGR5 protein in colorectal samples of four pathological types, and their associations in the process of colorectal adenoma cancerization were analyzed. **Results** The positive expression rates of NKD1 decreased progressively with the increase of malignant degree of colorectal tissues [normal mucosa (97.4%) → atypical hyperplasia ACF (80.0%) → tubular adenomas combined with atypical hyperplasia (55.0%) → adenomas cancerization (14.3%),  $P < 0.01$ ]. The positive expression rates of LGR5 protein increased progressively with the increase of malignant degree of colorectal tissues [normal mucosa (5.3%) → atypical hyperplasia ACF (60.0%) → tubular adenomas combined with atypical hyperplasia (70.0%) → adenomas cancerization (94.3%),  $P < 0.01$ ]. In the development process of ACF of atypical hyperplasia → tubular adenomas → adenomas cancerization, NKD1 was negatively correlated with LGR5 ( $r_s = -0.678, P < 0.05$ ). **Conclusion** The de-

crease of NKD1 expression and the increase of LGR5 expression in Wnt signaling pathway might play an important role in occurrence and development of colorectal precancerous lesions, perhaps this could provide important targets for early discovery, effective screening and treatment of colon cancer.

**Key words:** Aberrant crypt focus; Colorectal tubular adenoma; Wnt signaling pathway; Naked cuticle drosophila 1; Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5; Narrow-band imaging technique

结直肠癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,近年呈上升趋势,且结直肠癌与结直肠腺瘤关系密切。研究结果广泛证实了正常黏膜-畸变隐窝灶(aberrant crypt foci, ACF)-腺瘤-腺癌的发生发展过程。应用内镜观察结直肠新生性病变过程中,普通肠镜易漏诊平坦或微小的病变。ACF 是目前结直肠癌发生过程中可在光镜下观察到的最小和最早期的病变,其不同于正常肠腺之处在于:腺管加深,面积扩大;管腔口呈锯齿状、裂隙状等多种形状;上皮层增厚;腺管极性消失,细胞核大多表现为不典型增生现象。抑制这些早期病变的形成可降低腺瘤、腺癌的发生。Wnt 信号通路是一条最基本的信号通路,这条信号通路中重要成分的变化与结直肠腺癌的发生发展有着密切的联系。

放大内镜窄带成像(narrow-band imaging, NBI)技术对结直肠新生性病变的观察明显优于普通肠镜,其优越性在于可以显示灶性病变绕腺管开口的微血管或网状血管结构<sup>[1]</sup>,且操作简便<sup>[2]</sup>。本研究采用放大内镜 NBI 技术,选择腺管开口扩大或腺管之间排列紧凑、有挤压感的腺体,观察结直肠正常黏膜、异型增生性 ACF、管状腺瘤及腺瘤癌变组织的病理学特点,并检测 Wnt 信号通路中的重要因子裸角质膜同源蛋白 1(naked cuticle drosophila 1, NKD1)、富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体 5(leucine-rich repeat-containing g-protein coupled receptor 5, LGR5)蛋白表达水平的差异,以探讨此通路在异型增生性 ACF 与结直肠癌发生发展中的作用。

## 1 材料与方法

1.1 材料 收集 2015 年 1 月至 2016 年 6 月本院结肠镜检查中应用放大内镜 NBI 技术发现的 ACF (图 1)、10% 福尔马林固定、石蜡包埋标本,并经病理 HE 染色证实为异型增生性 ACF 40 例(图 2);同时以管状腺瘤伴异型增生 40 例、腺瘤癌变 35 例及结直肠正常黏膜 38 例作为对照。所有病理切片均由 2 位经验丰富的病理医师明确诊断。

1.2 免疫组化 各组标本采用石蜡切片、脱蜡、水化等处理。采用 EnVision 免疫组化法,免疫组化染色步骤按试剂盒说明书进行。滴加一抗、二抗, DAB 显色。并以 PBS 代替一抗作为阴性对照。LGR5 与 NKD1 一抗试剂盒购自 SANTA CRUZ 公司,二抗试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。

1.3 结果判定 LGR5 与 NKD1 蛋白阳性染色均定位于细胞质,且为棕黄色颗粒。选择 10 个高倍镜视野( $\times 400$ ),以阳性细胞占全部计数细胞的百分率表示,取平均值。以平均每个高倍视野计数的呈阳性反应的细胞数 $\geq 25\%$ 为蛋白表达阳性,无明显阳性反应或阳性反应细胞数 $< 25\%$ 为阴性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理。计数资料采用频数和百分率表示,组间比较采用行 $\times$ 列表资料的 $\chi^2$ 检验;NKD1、LGR5 蛋白表达的相关性采用 Spearman 相关性检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 不同组别 NKD1 蛋白表达情况 不同组别 NKD1 蛋白表达情况见图 3。NKD1 蛋白随结直肠组织恶性程度的递升[正常黏膜组(97.4%) $\rightarrow$ 异型增生性 ACF 组(80.0%) $\rightarrow$ 管状腺瘤伴异型增生组(55.0%) $\rightarrow$ 腺瘤癌变组(14.3%)]表达率递降( $P < 0.01$ )。见表 1。

2.2 不同组别 LGR5 蛋白表达情况 不同组别 LGR5 蛋白表达情况见图 4。LGR5 蛋白随结直肠组织恶性程度的递升[正常黏膜组(5.3%) $\rightarrow$ 异型增生性 ACF 组(60.0%) $\rightarrow$ 管状腺瘤伴异型增生组(70.0%) $\rightarrow$ 腺瘤癌变组(94.3%)]表达率递升( $P < 0.01$ )。见表 1。

2.3 结直肠黏膜癌变过程中 NKD1、LGR5 表达的相关性 Spearman 相关性分析显示,结直肠正常黏膜 $\rightarrow$ 异型增生性 ACF $\rightarrow$ 管状腺瘤伴异型增生 $\rightarrow$ 腺瘤癌变发展过程中, NKD1 和 LGR5 的表达存在显著负相关关系( $r_s = -0.678, P < 0.05$ )。

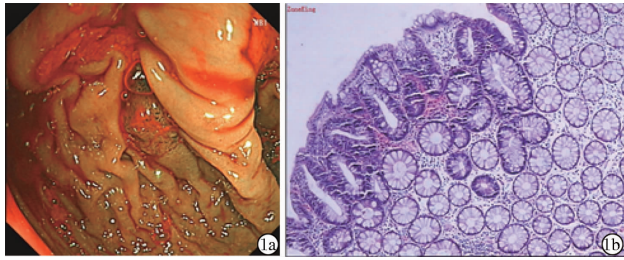
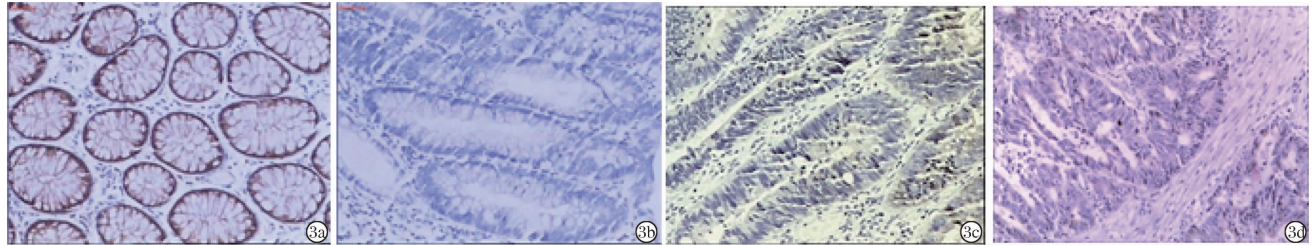


图 1 放大内镜 NBI 模式下的 ACF

图 2 异型增生性 ACF (HE, ×400)

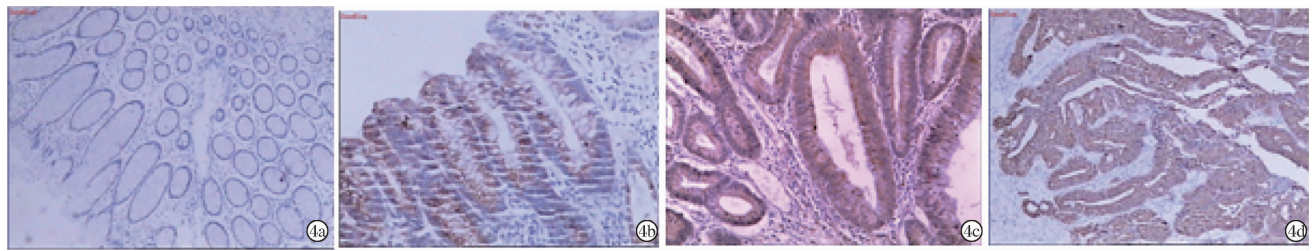
表 1 不同组别 NKD1 蛋白、LGR5 蛋白阳性表达情况 例(%)

| 组别          | 例数 | NKD1     | LGR5     |
|-------------|----|----------|----------|
| 正常黏膜组       | 38 | 37(97.4) | 2( 5.3)  |
| 异型增生性 ACF 组 | 40 | 32(80.0) | 24(60.0) |
| 管状腺瘤伴异型增生组  | 40 | 22(55.0) | 28(70.0) |
| 腺瘤癌变组       | 35 | 5(14.3)  | 33(94.3) |
| P 值         |    | <0.01    | <0.01    |



注:3a:正常结直肠黏膜;3b:异型增生性 ACF;3c:管状腺瘤伴异型增生;3d:腺瘤癌变。

图 3 各组 NKD1 蛋白的表达 (EnVision, ×400)



注:4a:正常结直肠黏膜;4b:异型增生性 ACF;4c:管状腺瘤伴异型增生;4d:腺瘤癌变。

图 4 各组 LGR5 蛋白的表达 (EnVision, ×400)

### 3 讨论

目前认为 ACF 是光镜下可以观察到的结直肠黏膜癌变发生过程中的最早期病变。80% 以上结直肠癌的发生以先前存在的腺瘤为基础,管状腺瘤是临床内镜最常见的结直肠癌的癌前病变。具有增生性息肉特征的 ACF 常发展为增生性息肉,异型增生性 ACF 则进展为腺瘤。WHO 分类根据是否有异型增生将 ACF 分为增生性 ACF 和异型增生性 ACF(微腺瘤)。腺瘤癌变是一个复杂的过程,多数研究认为大肠散发性管状腺瘤癌变途径与 Wnt-β-环连蛋白(β-catenin)信号通路异常激活关系密切<sup>[3]</sup>。研究 ACF 的相关蛋白及基因,有助于阐明结直肠黏膜癌变的早期发生与发展。病例对照研究表明肠镜筛查能显著降低结直肠癌死亡率。放大内镜 NBI 技术的优势在于能够增加黏膜上皮和黏膜下血管模式的对比度和清晰度,从而提高诊断的精确性<sup>[4]</sup>。增生性病变使用 NBI 技术难以观察到表面毛细血管,腺瘤性病变表面毛细血管较细,且较规则,两病变可以相区别。本研究选择经 NBI 技术辅助观察到的腺管开口扩大或腺管之间排列紧凑、有挤压感的腺体、毛细血管密

度增高的结直肠黏膜进行活检,并对经病理证实为异型增生性 ACF 的组织与其他不同类型结直肠黏膜 Wnt 信号通路中的重要因子 NKD1、LGR5 的蛋白表达情况进行研究。

结直肠腺瘤癌变是一个受多条信号转导通路、多种条件影响的复杂过程。Wnt 信号通路是一条较为复杂且保守的信号转导通路,在调控胚胎发育、参与细胞增殖、分化及在肿瘤的发生发展都起着重要的作用。NKD1 是一种包含 470 个氨基酸的蛋白,主要分布于胞膜和胞质中,尤其在胎儿肾脏高表达,在人类许多正常组织中高表达,如心肺、结肠、卵巢、肠等器官,是 Wnt 信号通路中的重要抑制剂<sup>[5-7]</sup>。Guo 等<sup>[8]</sup>研究发现 NKD1 表达下降能促进结直肠癌细胞中 β-catenin 的稳定和细胞的增殖,还可激活 c-Jun 氨基末端激酶参与调节的非经典 Wnt/PCP 信号通路,从而影响上皮细胞的极性并调节粘附蛋白活性,维持细胞极性与细胞骨架的正常结构,最终抑制肿瘤的增殖。本研究结果发现,NKD1 蛋白在结直肠正常黏膜→异型增生性 ACF→管状腺瘤→腺瘤癌变发展过程中阳性表达率递降,与上述研究结果一致,提示 NKD1 基因可能是一种抑癌基因,在结直肠腺癌发生

发展早期即起到重要作用,与肿瘤的恶性程度呈负相关。

LGR5 属于 G 蛋白耦联受体 (GPCRS) 家族的成员<sup>[9]</sup>。下调 LGR5 的 mRNA 水平能够成功诱导结肠肿瘤细胞的凋亡。最新研究证明, LGR5 是 Wnt 信号通路下游的靶向基因,可作为肠等部位的干细胞标志物,同时具有促进肿瘤细胞生成的作用<sup>[10-11]</sup>,且其表达产物在胚胎和器官的发育及多种肿瘤的发生、发展中均发挥着重要作用。Vermeulen 等<sup>[12]</sup>报道 LGR5 在结肠癌干细胞内表达上调,进一步证明大肠癌干细胞以 Wnt 信号的高水平表达为特征。本研究结果发现, LGR5 蛋白随结肠组织恶性程度的递升[正常对照组(5.3%)→异型增生性 ACF 组(60.0%)→管状腺瘤伴异型增生组(70.0%)→腺瘤癌变组(94.3%)]表达率递升,提示 LGR5 的高表达可能促进腺瘤异型增生的形成,并可能在结肠腺瘤形成的早期即能起到作用。NKD1 异常低表达使 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路发生障碍,使胞浆内未被磷酸化降解的  $\beta$ -catenin 进入细胞核内<sup>[13-14]</sup>,从而使  $\beta$ -catenin 蛋白在胞质或胞核蓄积,出现异常阳性表达;而  $\beta$ -catenin 蛋白在核内的异常高表达,在有关辅助因子的协同作用下启动靶基因转录过程,从而促进肿瘤出现侵袭和转移。Barker 等<sup>[15]</sup>通过消除 LGR5-cre 阳性表达小鼠肠干细胞的大肠息肉基因,3~5 周后发生转变的肠干细胞仍存留在隐窝底部,并形成由微腺瘤到肉眼可见的 LGR5 阳性的腺瘤,且证明其有细胞核内  $\beta$ -catenin 高表达,表明 LGR5 高表达可促进  $\beta$ -catenin 表达启动 Wnt 通路。 $\beta$ -catenin 是 Wnt 信号通路中的关键因子。吴文新等<sup>[16]</sup>通过免疫组化方法检测大肠腺瘤及癌变组织中  $\beta$ -catenin 表达阳性率明显升高。本研究结果发现 NKD1 与 LGR5 的表达呈负相关,提示两者可能通过 Wnt- $\beta$ -catenin 通路在大肠腺瘤形成及癌变过程中起到相互调节作用。

综上所述, NKD1 在异型增生性 ACF→管状腺瘤→腺瘤癌变的发生发展过程中表达逐渐降低,并与 LGR5 呈负相关。提示 NKD1、LGR5 可能通过 Wnt- $\beta$ -catenin 通路参与了结肠癌前病变的发生发展,表明联合结肠镜 NBI 技术,检测结肠早期病变中 NKD1、LGR5 的表达,可能为结肠癌的早期发现、有效筛查和治疗提供重要的作用靶点,其实际机制及作用方式有待进一步研究。

## 参考文献

[1] Kobayashi Y, Hayashino Y, Jackson JL, et al. Diagnostic performance

of chromoendoscopy and narrow band imaging for colonic neoplasms: a meta-analysis[J]. *Colorectal Dis*, 2011, 14(1): 18-28.

- [2] 苏燕波,唐建光,刘晓敏,等.窄带成像技术在结直肠肿瘤性与非肿瘤性病变诊断中的临床应用价值[J].*国际消化病杂志*, 2011, 31(5): 295-297.
- [3] Murakami T, Mitomi H, Saito T, et al. Distinct WNT/ $\beta$ -catenin signaling activation in the serrated neoplasia pathway and the adenoma-carcinoma sequence of the colorectum[J]. *Mod Pathol*, 2015, 28(1): 146-158.
- [4] 徐亚,任伯良,陈志荣,等.内镜窄带成像技术在大肠新生性病变诊断中的应用[J].*苏州大学学报(医学版)*, 2008, 28(6): 1042-1043, 1086.
- [5] Zhang S, Wang Y, Dai SD, et al. Down-regulation of NKD1 increases the invasive potential of non-small-cell lung cancer and correlates with a poor prognosis[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 186.
- [6] Twaroski K, Mallanna SK, Jing R, et al. FGF2 mediates hepatic progenitor cell formation during human pluripotent stem cell differentiation by inducing the WNT antagonist NKD1[J]. *Genes Dev*, 2015, 29(23): 2463-2474.
- [7] Zhang S, Li J, Yin ZY, et al. Expression pattern and clinicopathologic significance of NKD1 in human primary hepatocellular carcinoma[J]. *APMIS*, 2015, 123(4): 315-320.
- [8] Guo J, Cagatay T, Zhou G, et al. Mutations in the human naked cuticle homolog NKD1 found in colorectal cancer alter Wnt/Dvl/ $\beta$ -catenin signaling[J]. *PLoS One*, 2009, 4(11): e7982.
- [9] de Lau W, Barker N, Low TY, et al. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling[J]. *Nature*, 2011, 476(7360): 293-297.
- [10] Kemper K, Prasetyanti PR, De Lau W, et al. Monoclonal antibodies against Lgr5 identify human colorectal cancer stem cells[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(11): 2378-2386.
- [11] Ruffner H, Sprunger J, Charlat O, et al. R-Spondin potentiates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling through orphan receptors LGR4 and LGR5[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40976.
- [12] Vermeulen L, De Sousa E Melo F, van der Heijden M, et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(5): 468-476.
- [13] Angonin D, Van Raay TJ. Nkd1 functions as a passive antagonist of Wnt signaling[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e74666.
- [14] Van Raay TJ, Fortino NJ, Miller BW, et al. Naked1 antagonizes Wnt signaling by preventing nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18650.
- [15] Barker N, Ridgway RA, van Es JH, et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer[J]. *Nature*, 2009, 457(7229): 608-611.
- [16] 吴文新,张祥宏,严霞,等.大肠腺瘤癌变过程中  $\beta$ -catenin, p53 和增殖细胞核抗原表达的研究[J].*中华肿瘤杂志*, 2002, 24(3): 264-267.

收稿日期:2016-11-25 修回日期:2017-01-16 编辑:王国品