

直肠癌组织 CDX2 蛋白表达及其临床意义

应 健,应荣培,应崇贵,杨凤龙,颜晓潭
(玉环县中医院,浙江 玉环 317600)

摘 要:[目的] 探讨直肠癌患者中尾型同源盒基因-2 (CDX2) 蛋白检测的临床意义。[方法] 采用 Western blot 检测 50 例直肠癌组织及癌旁组织 CDX2 蛋白的表达,以 20 例正常直肠组织作为对照组。[结果] CDX2 蛋白在癌组织中表达低于癌旁组织,且癌旁组织中表达低于对照组,差异均有统计学意义 ($P<0.01$);CDX2 蛋白在直肠癌组织中的表达与 Dukes 分期、组织分化、淋巴结转移和 3 年生存率有关,而与患者性别、年龄、肿瘤的部位及病理组织学类型无关。[结论] CDX2 蛋白的表达情况可作为评估直肠癌肿瘤恶性程度、临床分期、侵袭转移及预后的参考指标。

主题词:CDX2 蛋白;直肠肿瘤;Western blot

中图分类号:R735.3⁷ **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2013)04-0281-04

Expression of CDX2 Protein in Rectal Cancer and Its Clinical Significance

YING Jian, YING Rong-pei, YING Chong-gui, et al.

(Hospital of Traditional Chinese Medicine in Yuhuan County, Yuhuan 317600, China)

Abstract:[Purpose] To investigate protein expression of the caudal-related homeobox gene 2 (CDX2) and its clinical significance in rectal cancer. [Methods] Western blot analysis was used to detect the protein expression of CDX2 in 50 tissue samples with rectal cancer and cancer adjacent tissues, as well as 20 samples with normal tissues from rectum as control group. [Results] The expression of CDX2 in rectal cancer tissues was lower than that of adjacent tissues, and the expression of CDX2 in cancer adjacent tissues was lower than that of the control group, both with significant differences ($P<0.01$). Expression of CDX2 in rectal cancer correlated with Dukes' stage, histologic differentiation, lymphatic node metastasis and 3-year survival, but had no obvious correlation with gender, age, site of lesion and pathologic type of the cancer patients. [Conclusion] Expression of CDX2 protein might be used to evaluate the malignancy, clinical stage, invasion, metastasis and prognosis of rectal cancer.

Subject words:CDX2 protein; rectal neoplasms; Western blot

直肠癌是消化道常见的恶性肿瘤。直肠癌的发生、发展涉及多基因及其表达产物的改变,癌基因过度表达、抑癌基因表达和功能减退或消失可致肿瘤发生。文献报道尾型同源盒基因-2(CDX2)与肠源性肿瘤的发生密切相关,CDX2 属于同源盒基因家族中一员,它作为肠特异性转录因子决定和维持肠绒毛上皮细胞正常表现型,与肠上皮细胞的增殖和分化相关^[1]。为探讨 CDX2 与直肠癌临床及病理特性的关系,我们通过 Western blot 检测 50 例直肠癌患者的癌组织和癌旁组织的 CDX2 蛋白表达,探讨

其与肿瘤分期、淋巴结转移、预后等临床指标的关联性。

1 资料与方法

1.1 材 料

1.1.1 对 象

收集玉环县中医院住院 50 例直肠癌患者(包括腺癌 37 例、黏液腺癌 8 例、未分化癌 3 例、鳞状细胞癌 2 例)癌组织、癌旁组织(距癌组织 5cm)标本、正常组织(距癌组织大于 5cm)标本。男性 32 例,

收稿日期:2012-11-21;修回日期:2013-03-04

女 18 例,年龄 26~71 岁(51.31±6.36 岁),以正常直肠组织 20 例为对照,男性 14 例,女性 6 例,年龄 26~62 岁(43.35±7.15 岁),诊断均经病理切片确认,置液氮罐中保存,取材为病理切片完成后所留组织,经本院伦理委员会批准并征得患者同意。

1.1.2 仪器和试剂

组织蛋白裂解液购自碧云天,BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自 Thermo 公司,CDX2 和 GAPDH 兔抗人一抗购自 Santa Cruz 公司,PVDF 膜购自北京索莱宝科技有限公司,红外荧光染料标记的驴抗兔二抗购自美国 LI-COR 公司,成像系统为美国 LI-COR 公司的 Odyssey 双色红外荧光成像系统,图像分析软件为 LI-COR 公司开发的 odyssey。

1.2 方法

1.2.1 Western blot 检测 CDX2 表达

取出标本冰上解冻后 PBS 洗涤 1 次,充分剪碎,加入含有 PMSF 的 RAPI 裂解液,冰上裂解 40min,4℃下 10 000r/min 离心 15min 后取上清,用 BAC 法测定蛋白浓度,根据蛋白浓度确定 30μg 为上样量,与上样缓冲液混匀,煮沸 5min 变性后进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白(5%浓缩胶,12%分离胶),浓缩胶跑 45V 的恒压,分离胶跑 100V 的恒压,根据蛋白质 Marker 位置切下 CDX2 和 GAPDH 胶段,恒流 110mA,45min 转移至 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶常温下封闭 2h,PBS-T 洗涤 2 次,每次 5min,分别加入 1:1 000 稀释的兔抗人 CDX2 多克隆抗体和 1:1 500 稀释的兔抗人 GAPDH 多克隆抗体,4℃过夜孵育,PBS-T 洗涤 2 次,每次 10min,再分别加入 1:5 000 稀释的红外荧光染料标记的驴抗兔二抗,室温避光孵育 3h,PBS-T 洗涤 4 次,每次 5min,PBS 洗涤 1 次,10min。美国 LI-COR 公司的 Odyssey 双色红外荧光成像系统扫描,采用 odyssey 分析软件进行条带灰度值的分析,算出样本条带与对应 GAPDH 条带灰度值的比值即为 CDX2 的相对表达量。

1.2.2 生存随访

对所有的直肠癌病人治疗后通过电话对患者本人或家属进行随访,随访至 2011 年 11 月 20 日,失访 2 例,在访的 48 例患者中有 12 例死于直肠癌复发或者远处转移引起的疾病,无 1 例非癌死亡。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件,样本 CDX2 与

GAPDH 相对表达量以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)描述,资料呈偏态分布及方差不齐,样本间的 CDX2 蛋白相对表达量比较采用完全随机设计多个样本比较的秩和检验,两组样本间的 CDX2 蛋白相对表达量比较采用 Wilcoxon 秩和检验。以 $P<0.05$ 认为有统计学差异。

2 结果

2.1 直肠癌患者癌组织、癌旁组织和对照组中 CDX2 蛋白表达结果

CDX2 蛋白在癌组织、癌旁组织和对照组中的相对表达量分别为 0.192±0.136、0.347±0.215、0.576±0.354,表达量依次增高,其中对照组高于癌旁组织,癌旁组织高于癌组织,差异均有统计学意义($P<0.01$)(Table 1,Figure 1)。其中配对过程中发现癌组织表达低于自身配对癌旁或正常组织的有 105 例,略高于自身配对癌旁或正常组织的有 15 例。

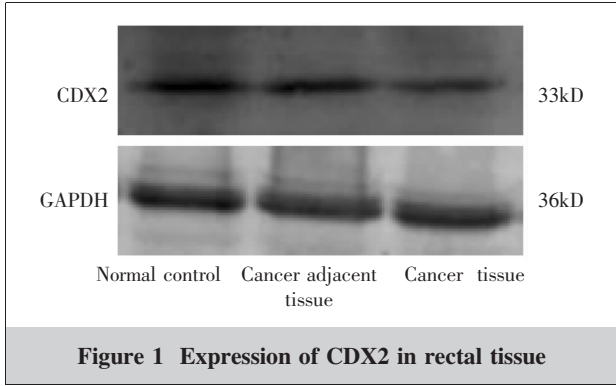


Table 1 The levels of CDX2 in various rectal tissues by Western blot

Groups	n	Level of CDX2	P
Normal tissue	20	0.576±0.354	0.003*
Cancer adjacent tissue	50	0.347±0.215	0.008**
Rectal cancer tissue	50	0.192±0.136	0.000***

Note: *:comparison of normal tissue and cancer adjacent tissue; **:comparison of cancer adjacent tissue and cancer tissue; ***:comparison of normal tissue and cancer tissue.

2.2 直肠癌患者癌组织和癌旁组织不同临床病理因素中 CDX2 蛋白表达

Dukes A、B 期患者癌组织和癌旁组织的 CDX2 蛋白表达量高于 C、D 分期,差异有统计学意义($P<0.05$),有淋巴结转移者癌组织和癌旁组织的 CDX2 蛋白表达量低于无淋巴结转移者,差异有统计学意

义($P<0.05$), 高分化癌组织 CDX2 蛋白的表达量高于低分化者, 差异有统计学意义($P<0.01$), 癌组织中 CDX2 蛋白在 3 年生存组的表达量高于死亡组, 差异有统计学意义($P<0.01$), 表达量在患者性别、年龄、肿瘤的部位及病理组织学分类中差异均无统计学意义($P>0.05$)(Table 2)。

3 讨 论

早期研究发现哺乳动物尾型同源异型盒基因分为两种类型 *CDX1* 和 *CDX2*^[2,3]。Mlodzik 最先在果蝇中成功分离出 *CDX2* 基因及其相关表达蛋白, *CDX2* 基因位于染色体 13q12~q13 区, 全长 22~23kb, 含有 2 个内含子和 3 个外显子, *CDX2* 蛋白由 311 个氨基酸组成, 是肿瘤抑癌基因的一种, 其以螺旋—环—螺旋

(helix-loop-helix, HLH) 的结构与 DNA 的相应区域结合, 调节 DNA 的表达^[4], 是一种转录因子。CDX2 在肠道上皮肿瘤中特异表达, 其免疫组织化学染色可以判断转移瘤的组织来源于肠道, 其表达程度的高低可以评估肿瘤的分化程度^[5,6]。本文通过以 GAPDH 蛋白为内对照, 用 Western blot 检测 CDX2 蛋白在直肠组织中的相对表达含量, 结果显示在癌组织、癌旁组织和对照组中的相对表达量依次增高, 证实 CDX2 蛋白与直肠癌发生发展关系密切, 其表达降低或者缺失可能会引起一系列的基因调控异常, 它的表达改变可促进散发性直肠癌的发展, 是直肠癌的一种抑癌基因, 许多研究也表明 CDX2 的表达在消化道恶性肿瘤中显著降低^[7]。有学者曾采用免疫组化方法检测直肠癌组织和相应癌旁组织中的 CDX2 蛋白表达^[8], 其的研究结果与本文是一致的^[8]。Li 等^[1]的

研究进一步支持这一观点, 他们发现 CDX2 在腺癌中的表达明显低于腺瘤, 周围正常黏膜和轻度异型增生区域明显高于重度异型增生区域表达。我们在研究中发现 Dukes A、B 期患者癌组织和癌旁组织的 CDX2 蛋白表达量高于 C、D 分期, 有淋巴结转移者低于无淋巴结转移者, 表明 CDX2 蛋白的高表达可能抑制肿瘤细胞的增殖及浸润、转移, 癌细胞的浸润扩散与其表达降低相关。CDX2 的致癌以及蛋白的表达调控机制十分复杂, 在体内多个基因的参与下共同完成。Bai 等^[9]在 HT-29 结肠癌细胞系中发现 CDX2 和 p21 启动子之间可以相互作用, 且 CDX2 的高表达能够使 p21 表达 mRNA 增加, 从而抑制肿瘤细胞的 DNA 合成, 从根本上阻断肿瘤细胞的增殖。 β -catenin/TCF-4 介导的 Wnt 信号传导途径激活后, 使细胞

Table 2 CDX2 expression among various clinicopathological factors in rectal cancer and cancer adjacent tissues

Clinicopathological factors	n	Cancer tissue	<i>P</i>	Cancer adjacent tissue	<i>P</i>
gender	50				
Male	32	0.194±0.231	0.765	0.357±0.371	0.684
Female	18	0.191±0.145		0.334±0.286	
Age	50				
<50	22	0.194±0.235	0.653	0.341±0.341	0.876
≥50	28	0.189±0.236		0.351±0.318	
Dukes' stages	50				
A+B	34	0.256±0.156	0.013	0.465±0.536	0.009
C+D	16	0.131±0.097		0.210±0.213	
Degree of differentiation	50				
Well differentiated	12	0.283±0.256	0.008	0.472±0.315	0.009
Moderately differentiated	17	0.198±0.234		0.369±0.324	
Poorly differentiated	21	0.136±0.113		0.251±0.341	
Lymph node metastasis	50				
-	34	0.256±0.156	0.013	0.465±0.536	0.009
+	16	0.131±0.097		0.210±0.213	
Lesion location	50				
Upper	23	0.192±0.126	0.704	0.361±0.372	0.642
Middle	16	0.190±0.218		0.347±0.436	
Lower	11	0.191±0.112		0.339±0.213	
Pathologic types	50				
Adenocarcinoma	7	0.191±0.329	0.823	0.345±0.231	0.561
Mucinous adenocarcinoma	8	0.192±0.214		0.344±0.316	
Undifferentiated carcinoma	3	0.189±0.136		0.378±0.388	
Squamous cell carcinoma	2	0.190±0.217		0.382±0.315	
Surviving after 3 years	48				
Yes	36	0.296±0.527	0.000	0.436±0.157	0.000
No	12	0.104±0.086		0.261±0.538	

内 β -catenin 聚集、激活 TCF/LEF(T 细胞因子/淋巴样增强因子)转录因子并激活其下游的目标基因,增强转录表达,促进细胞的增殖与分化。Guo 等^[10]发现 β -catenin/TCF-4 转录活性受到结肠癌细胞系中 CDX2 的剂量—依赖型方式表达的抑制,从使结肠癌细胞的增殖减弱。因此,CDX2 蛋白表达的高低有望作为评估直肠癌临床分期及侵袭转移的参考指标。

本次研究还发现高分化癌组织 CDX2 蛋白的表达量高于低分化者,癌组织中 CDX2 蛋白在 3 年生存组的表达量高于死亡组,我们的研究结果与 Mizoshita 等^[11]用定量 RT-PCR 技术检测胃癌的 CDX2 的 mRNA 研究结果也有相似之处:CDX2 mRNA 高表达组的生存期明显高于低表达组的生存期,预后较好。学者 Benahmed 等^[12]发现 CDX2 的表达高低随着肿瘤细胞周围微环境的变化而改变,这可能与癌细胞的浸润扩散亦有关。Hinoi 等^[13]研究发现在大细胞高分化的结直肠癌中 CDX2 的表达明显高于低分化结直肠癌。此外,刘艳等^[14]也报道了 CDX2 与结直肠肿瘤分化程度呈正相关,与肿瘤恶性度呈负相关。在体外试验研究中证实 CDX2 基因导入未分化结肠癌细胞系中,细胞可发生明显的分化现象^[15]。这些研究表明,CDX2 具有诱导细胞向肠上皮分化的作用。故高分化直肠癌组织表达明显高于低分化者,我们的结果也进一步证实。因此推测:CDX2 的下调可能是通过促进肿瘤细胞的增殖能力而促进直肠癌的发生发展并影响直肠癌病人的预后。

本文初步证实 CDX2 蛋白在直肠癌组织中的表达高低与 Dukes 分期、组织分化、淋巴结转移和 3 年生存率有关。CDX2 蛋白可作为评估直肠癌肿瘤恶性程度、临床分期及侵袭转移的参考指标,有助于判断直肠癌预后。由于存在患者个体差异,样本例数较小,CDX2 蛋白是否可以单独作为临床预后的决定性因素,还需要进一步研究。下一步实验拟行 CDX2 慢病毒表达载体的构建,并采用体外转染直肠癌细胞 XB1847,以进一步探索 CDX2 与直肠癌有关的分子机制。

参考文献:

- [1] Li MK, Folpe AL. CDX-2, a new marker for adenocarcinoma of gastrointestinal origin[J]. Adv Anat Pathol, 2004, 11(2): 101-105.
- [2] Nakamura T, Yasumura T, Hayashi K, et al. Immunocytochemical detection of circulating esophageal carcinoma cells by immunomagnetic separation[J]. Anticancer Res, 2000, 20(6C): 4739-4744.
- [3] Fang YH, Lai MD. CDX2, a new marker for colorectal cancer[J]. International Journal of Genetics, 2006, 29(4): 311-316. [方义湖, 来茂德. 结直肠癌的新标记——CDX2[J]. 国际遗传学杂志 2006, 29(4): 311-316.]
- [4] Davies M, Arumugam PJ, Shah VI, et al. The clinical significance of lymph node micrometastasis in stage I and stage II colorectal cancer[J]. Clin Transl Oncol, 2008, 10(3): 175-179.
- [5] Wang ZC, Wang C, Zeng QG. Detection of cytokeratin 20 mRNA in peripheral blood from colonic cancer patients by fluorescence quantitative polymerase chain reaction[J]. Chinese Journal of Oncology, 2007, 29(8): 600-603. [王忠诚, 王灿, 曾庆贵. 荧光定量聚合酶链反应检测大肠癌患者外周血癌细胞角蛋白 20 mRNA [J]. 中华肿瘤杂志, 2007, 29(8): 600-603.]
- [6] Masaki T, Ohkura Y, Matsuoka H, et al. Rationale of pelvic autonomic nerve preservation in rectal cancer surgery based on immunohistochemical study [J]. Int J Clin Oncol, 2010, 15(5): 462-467.
- [7] Bai YQ, Yamamoto H, Akiyama, et al. Ectopic expression of homeodomain protein CDX2 in intestinal metaplasia and carcinomas of the stomach [J]. Cancer Lett, 2002, 176(1): 47-55.
- [8] Zhang ZK, Miao L, Tian JC, et al. Clinical significances of CDX2, p21H-ras and p21WAF1 expressions in colorectal cancer [J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2010, 15(2): 102-105. [张正坤, 苗龙, 田君才, 等. 结直肠癌中 CDX2, p21H-ras p21WAF1 表达的临床意义[J]. 胃肠病学, 2010, 15(2): 102-105.]
- [9] Bai YQ, Miyake S, Iwai T, et al. CDX2, homeobox transcription factor Upregulates transcription of the P21/Waf1/CIP Gene [J]. Oncogene, 2003, 22(39): 7942-7949.
- [10] Guo RJ, Edward Huang E, Ezaki T, et al. CDX1 inhabits human colon cancer cell proliferation by reducing 3-catenin/tcf transcriptional activity [J]. J Biol Chem, 2002, 277(4): 1395-1397.
- [11] Mizoshita T, Tsukamoto T, Nakanishi H, et al. Expression of Cdx2 and the phenotype of advanced gastric cancers: relationship with prognosis[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2003, 129(12): 727-734.
- [12] Benahmed F, Gross I, Guenot D, et al. The microenvironment controls CDX2 homeobox gene expression in colorectal cancer cells [J]. Am J Pathol, 2007, 170(2): 733-744.
- [13] Hinoi T, Tani M, Lucas PC, et al. Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon [J]. Am J Pathol, 2001, 159(6): 2239-2248.
- [14] Liu Y, Wang YB, Wang XH. Expression and clinical significance of CDX2 in colonic cancer [J]. Heilongjiang Medicine and Pharmacy, 2007, 30(1): 86-87. [刘艳, 王一波, 王晓红. CDX2 在结肠癌中的表达及临床意义 [J]. 黑龙江医药科学 2007, 30(1): 86-87.]
- [15] Lynch JP, Silberg DJ. To differentiate or proliferate? The interaction between P13K/PTEN and CDX2 [J]. Gastroenterology, 2002, 123(4): 1395-1397.