

PCBP1 在 140 例结直肠癌中的表达及临床意义

张翔¹, 周云海¹, 姚路斌¹, 夏加增¹, 刘益飞², 张青², 黄华²

(1. 无锡市第二人民医院, 江苏 无锡 214000; 2. 南通大学附属医院, 江苏 南通 226001)

摘要: [目的] 研究多聚胞嘧啶结合蛋白-1 (poly (C)-binding protein 1, PCBP1) 在结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 组织中的表达及其临床意义。[方法] 采用免疫组织化学技术 (En-Vision 法) 检测 140 例 CRC 组织及相对应 140 例癌旁肠黏膜组织中 PCBP1 的表达情况, 使用卡方检验分析 PCBP1 的表达与 CRC 患者的临床病理参数之间的关系, Kaplan-Meier 生存曲线分析及 Cox 多因素分析 PCBP1 的表达对 CRC 患者预后的影响。[结果] PCBP1 在 CRC 组织的阳性率为 37.1% (52/140), 明显低于癌旁结直肠组织的 52.1% (73/140); PCBP1 的表达情况与肿瘤 TNM 分期及淋巴结转移相关; Cox 多因素回归分析结果显示, PCBP1 表达、TNM 分期及术后辅助治疗与 CRC 的预后相关; Kaplan-Meier 生存曲线结果表明 PCBP1 低表达的病例预后较高表达的病例差, 差异具有统计学意义 ($P=0.001$)。[结论] PCBP1 在 CRC 组织中低表达, 其表达失调与 CRC 的发生、发展及预后密切相关。

关键词: 多聚胞嘧啶结合蛋白-1 (PCBP1); 结直肠肿瘤; 免疫组织化学; 预后; 临床病理学

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X (2015) 11-0908-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.11.B010

Expression of PCBP1 in 140 Cases with Colorectal Cancer and Its Clinical Significance

ZHANG Xiang, ZHOU Yun-hai, YAO Lu-bin, et al.

(The Second People's Hospital of Wuxi, Wuxi 214000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of poly (C)-binding protein 1 (PCBP1) in colorectal cancer (CRC) and its clinical significance. [Methods] Immunohistochemistry (IHC) was used to detect the expression of PCBP1 in 140 cases of CRC tissues and their adjacent tissues. Pearson χ^2 test was performed to analyze the association of PCBP1 expression with clinicopathologic features. Kaplan-Meier analysis and Cox regression analysis were used to evaluate the influence of PCBP1 expression on the prognosis of CRC patients. [Results] The positive rate of PCBP1 expression in CRC was 37.1% (52/140), which was significantly lower than that (52.1%, 73/140) in adjacent tissues. The expression of PCBP1 was associated with TNM staging and lymph node metastasis. Multivariate analysis using the Cox proportional hazards model demonstrated that the expression of PCBP1 as well as TNM staging and adjuvant treatment after surgery were independent prognostic factors of overall survival. The result of Kaplan-Meier analysis showed that patients with low expression of PCBP1 had poor overall survival rate ($P=0.001$). [Conclusion] PCBP1 expression is down-regulated in CRC tissue, and its expression dysregulation is associated with carcinogenesis and prognosis of CRC.

Subject words: poly (C)-binding protein 1 (PCBP1); colorectal neoplasms; immunohistochemistry; prognosis

结直肠癌 (CRC) 是胃肠道肿瘤中最常见的恶性肿瘤, 近年来, 由于生活水平的提高, 饮食结构的改变等, CRC 的发病率呈上升的趋势, 且发病年龄年

轻化, 在我国的大中城市发病率高居不下, 严重威胁人类的健康和生命^[1]。目前临床多采用手术、放化疗及分子靶向药物等综合治疗已经取得一定效果, 5 年存活率有所上升, 但是仍有必要探索特定的预后指标来对患者进行评估^[2]。多聚胞嘧啶结合蛋白 (poly (C)-binding protein, PCBP) 蛋白具有多种功能,

通讯作者: 黄华, 副主任医师, 硕士; 南通大学附属医院病理科, 江苏省南通市西寺路 20 号 (226001); E-mail: hhua666@126.com
收稿日期: 2015-09-28; 修回日期: 2015-10-07

既可以作用于细胞质参与翻译的过程,也可以作用于细胞核,在转录和剪切过程中扮演着桥梁的角色。PCBP1 属于 PCBP 蛋白家族^[3]。本研究通过采用免疫组织化学技术观察分析 140 例 CRC 组织标本中 PCBP1 的表达情况,分析 PCBP1 在 CRC 发生、发展的作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集南通大学附属医院病理科 2009 年 1 月至 2010 年 8 月 140 例 CRC 组织石蜡切除标本及相应癌旁肠黏膜组织。癌旁的肠黏膜组织取自远离 CRC 组织 7cm 以上处。CRC 组织标本及癌旁肠黏膜组织均经过病理证实。所有病例术前均由肠镜活检诊断为腺癌,均为原发病例,术前未经过放化疗、分子靶向治疗、免疫治疗或中药治疗。其中男性 80 例,女性 60 例;年龄 36~89 岁,平均年龄 65 岁;<65 岁共 66 例,≥65 岁共 74 例;肿瘤最大径<3cm 共 68 例,最大径≥3cm 共 72 例;肿瘤分化程度:高分化 37 例,中分化 83 例,低分化 20 例;TNM 分期(参照 UICC 2009 年发布的第 7 版 TNM 分期方法):I 期+II 期 39 例,III 期 68 例,IV 期 33 例;有淋巴结转移的 101 例,无淋巴结转移的 39 例。140 例患者中采取 Dixon 手术 47 例,Miles 手术 21 例,乙状结肠切除术 33 例,右半结肠切除术 17 例,横结肠切除术 12 例,左半结肠切除术 10 例。其中 124 例患者在术后采取了单纯化疗、放化疗联合治疗、单纯放疗、分子靶向治疗、基因治疗或免疫治疗等方式,16 例患者术后未采取任何辅助治疗。所有 140 例病例均具有相应的病史资料及随访记录,随访日期截止至 2015 年 8 月 31 日,随访率 100%。

1.2 试剂

鼠抗人 PCBP1 抗体购于美国 Santa Cruz 生物公司,稀释浓度为 1:500。即用型 EnVision 试剂盒(PV-9000)及 DAB 酶底物显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法

采用免疫组织化学技术(EnVision 两步法),本研究的所有标本均经过 4% 中心福尔马林固定 24h,常规取材,Leica 自动脱水机脱水,石蜡包埋,4μm

厚度连续切片,70℃恒温箱中烘烤 1h,二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,pH 6.0 柠檬酸盐抗原修复液中高温高压修复 22min,滴加 30%过氧化氢以消除内源性过氧化物酶的活性,滴加鼠抗人 PCBP1 单克隆抗体(1:500),置于 4℃冰箱过夜,滴加二抗,PBS 冲洗,DAB 显色,苏木素复染,0.1% HCl 分化,梯度酒精脱水,中性树胶封片。用 PBS 代替一抗作为阴性对照,已知的阳性切片作为阳性对照,余步骤一致。

1.4 结果判定

PCBP1 抗体主要定位于细胞核,以相应部位出现淡黄色至深棕色颗粒为阳性表达。每张切片在显微镜下随机选取 10 个高倍视野,每个视野计数 100 个细胞,计算阳性细胞数。根据阳性细胞的百分比计分,<5%为 0 分,5%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分。根据着色强度计分,无着色或浅染色为 0 分,中等染色为 1 分,深染色为 2 分。将阳性细胞所占百分比计分与着色强度计分相乘所得的乘积作为判定结果,≤6 分为低表达,7~12 分为高表达。所有切片由病理科两名主治医师及以上医生采用双盲法阅片。

1.5 统计学处理

本研究采用 SPSS 13.0 软件包分析处理数据,PCBP1 在 CRC 组织的表达水平与 CRC 患者的临床病理参数之间的关系采用 χ^2 检验分析,预后分析采用 Kaplan-Meier 方法作出生存曲线,多因素分析采用 Cox 比例风险模型, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCBP1 在 CRC 组织及癌旁肠黏膜组织的表达情况

PCBP1 主要定位于细胞核,阳性呈淡黄色至深棕色颗粒(Figure 1),在 140 例 CRC 患者中 PCBP1 阳性表达率为 37.1%(52/140);140 例癌旁肠黏膜组织中 PCBP1 的阳性表达率为 52.1%(73/140)。PCBP1 在 CRC 组织与癌旁组表达比较差异有统计学意义($P=0.016$)(Table 1)。

2.2 PCBP1 表达与 CRC 患者临床病理特征的关系

在 CRC 患者中,PCBP1 表达在 CRC 患者不同 TNM 分期及有否发生淋巴结转移间差异有统计学

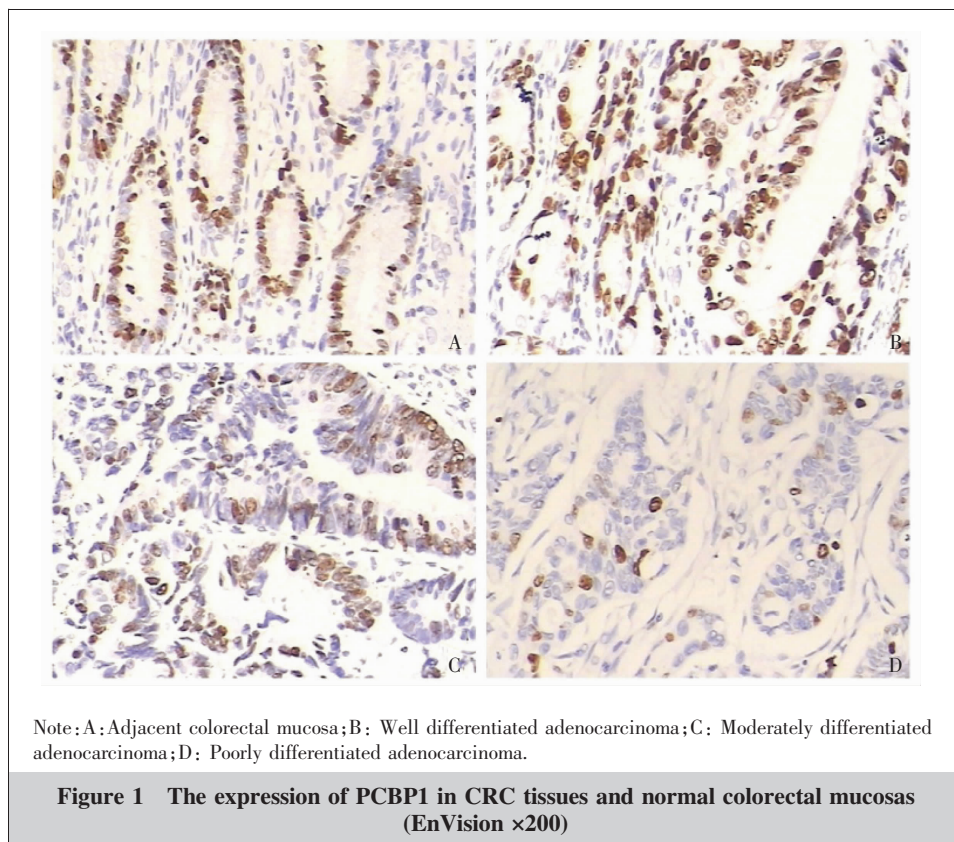


Table 1 Comparison of PCBP1 expression in CRC tissues and adjacent colorectal mucosae

Pathologic types	N	PCBP1 expression		Positive rate(%)
		High	Low	
CRC tissues	140	52	88	37.1
Adjacent colorectal mucosae	140	73	67	52.1
χ^2		15.564		
P		0.016		

意义 ($P < 0.05$),而在不同性别、年龄、肿瘤大小、分化程度患者间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (Table 2)。

2.3 PCBP1 的表达与 CRC 患者预后情况分析

利用 Kaplan-Meier 分析方法对 140 例 CRC 患者进行生存统计分析,PCBP1 高表达组患者 3 年生存率为 94.2%,5 年生存率为 59.6%;PCBP1 低表达组患者 3 年生存率为 83.0%,5 年生存率为 34.1%。说明 PCBP1 高表达组预后较 PCBP1 低表达组预后好 ($P = 0.001$),PCBP1 的表达水平与 CRC 患者预后有关 (Figure 2)。此外,通过 Cox 模型的多因素分析发现,TNM 分期 ($P = 0.023$)、PCBP1 表达 ($P = 0.018$)及术后辅助治疗 ($P = 0.014$)是 CRC 患者预后的独立危险因素 (Table 3)。

3 讨论

PCBP 蛋白家族是近几年研究的热点,已有研究证实 PCBP 位于真核细胞的启动子上,主要通过其聚合连接活性作用参与多种生物学过程。PCBP1 最先由 Aasheim 等^[4]在 1994 年从人淋巴细胞的 cDNA 库中克隆获得,该基因位于人类染色体 2p12-p13,蛋白分子量约 38 kD,由 356 个氨基酸组成。因其与 PCBP 蛋白家族中第一个被发现的成员核内不均一核糖核蛋白 K(hnRNP K)具有相似的结构和功能,故曾被命名为 hnRNP E1。PCBP1 隶属于 PCBP 蛋白家族,与该家族中其他成员的一级结构类似,具有 3 个保守的 KH 结构域。Andrea 等^[5]在神经细胞瘤中研究发现 PCBP1 在细胞核和胞质中均有分布,但主要分布在细胞核,这种现象与 KH3 结构域密切相关。

PCBP1 参与调节基因转录、mRNA 稳定和翻译等过程^[6,7]。Kumar 等^[8]发现 PCBP1 在细胞中以核小斑的形式分布,提示 PCBP1 在转录水平参与了基因的表达调控作用。Makeyev 等^[9]研究发现在小鼠体内含有 PCBP1 基因同源物,说明 PCBP1 的转录功能是在哺乳动物分支之前发生。PCBP1 还能通过调节翻译起始因子活性在翻译水平调节体细胞及生殖细胞分化,在胚胎发育过程中起着重要作用^[6,10,11]。目前已有多项研究证实 PCBP1 在人体各组织细胞中广泛表达,在多种肿瘤组织或细胞中出现低表达。

Zhang 等^[12]通过对胆囊癌 GBC-SD 细胞株研究发现,PCBP1 主要通过调节 TGF- β 信号途径,抑制肿瘤细胞的侵袭和转移作用,作为负性调节因子,PCBP1 表达降低能引起 PRL-3 蛋白水平上调、AKT 活化和促进肿瘤发生^[13,14]。宗明珠等^[15]从细胞学水平研究

Table 2 The expression of PCBP1 and clinicopathologic parameters in 140 case with CRC

Parameters	N	PCBP1		Positive rate(%)	χ^2	P
		High	Low			
Gender						
Male	80	30	50	37.5	0.010	0.920
Female	60	22	38	36.7		
Age(years old)						
< 65	66	26	40	39.4	0.271	0.603
≥65	74	26	48	35.1		
Tumor size(cm)						
< 3	68	23	45	33.8	0.624	0.486
≥3	72	29	43	40.3		
Tumor differentiation						
Well	37	18	19	48.6	3.534	0.171
Moderate	83	29	54	34.9		
Poor	20	5	15	25.0		
TNM						
I + II	39	21	18	53.8	8.050	0.018
III	68	18	50	26.5		
IV	33	13	20	39.4		
Lymph node metastasis						
Yes	101	31	70	30.7	6.460	0.011
No	39	21	18	53.8		

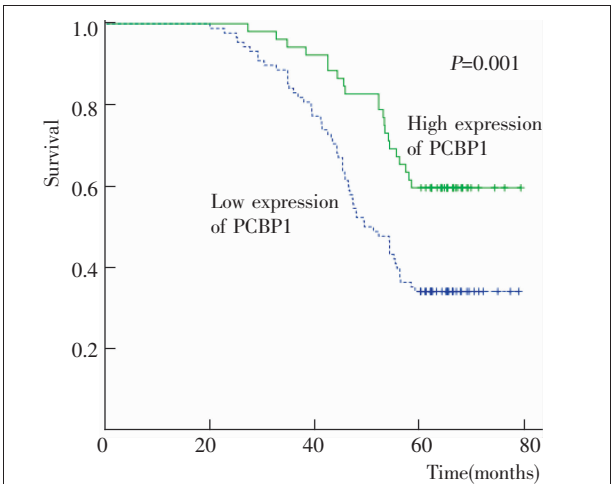


Figure 2 Survival curves of CRC patients with high or low expression of PCBP1

Table 3 Multivariate analysis of overall survival in 140 CRC specimens

Variables	Hazard ratio	95% Confidence interval	P
Gender	0.762	0.479~1.213	0.252
Age	0.987	0.620~1.570	0.956
Tumor size	0.810	0.500~1.311	0.390
Tumor differentiation	1.479	0.997~2.194	0.052
Lymph node metastasis	1.777	0.694~4.550	0.231
TNM	1.817	1.087~3.038	0.023*
PCBP1 expression	0.514	0.297~0.892	0.018*
Adjuvant treatment	0.429	0.218~0.844	0.014*

发现,在结直肠癌 HT-29/L-OHP 耐药细胞株中 PCBP1 表达明显高于未加 L-OHP 的 HT-29 细胞株,这可能由于 PCBP1 能降低 p21 表达、延长细胞周期和促进细胞增殖。Liu 等^[16]通过免疫组织化学技术研究发现在转移性 NSCLC 中 PCBP1 与 E-cad 低表达、Vim 高表达,且 PCBP1 是 NSCLC 患者独立预后因素,提示 PCBP1 表达失调会促进上皮间质转化的发生,促进肿瘤组织发生侵袭和转移。这与本次研究结果相一致。

在本次研究中,我们主要对 140 例 CRC 患者手术标本进行统计分析,发现 PCBP1 在 CRC 组织中低表达,在癌旁肠黏膜组织中高表达。且 PCBP1 表达与 CRC 患者的 TNM 分期及淋巴结转移存在相关性 ($P<0.05$),TNM 分期越高,PCBP1 的表达降低,同样,PCBP1 在具有淋巴结转移的结直肠癌组织中低表达。此外,我们通过 Ka-

plan-Meier 生存分析和 Cox 模型多因素分析发现,PCBP1 的表达与 CRC 患者的预后相关,PCBP1 可以作为 CRC 患者预后的一个独立的危险因素 ($P=0.018$)。

尽管已经发现 PCBP1 涉及多个生物学事件,但是目前仍无明确的研究证实 PCBP1 在 CRC 中的临床意义。本研究主要从组织学水平初步研究了 PCBP1 在 CRC 组织中的表达和作用,检测了 PCBP1 的表达情况,但是 PCBP1 在 CRC 患者的表达异常的调控机制尚不清楚,上下游的分子和信号通路还未明确,还需要进一步从分子学角度进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Siegel RL,Miller KD,Jemal A. Cancer statistics,2014 [J]. CA Cancer J Clin,2014,64(1):9-29.
- [2] Coppedè F,Lopomo A,Spisni R,et al. Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis,prognosis and treatment of colorectal cancer[J]. World J Gastroenterol,2014,20(4):943-956.
- [3] Leidgens S,Bullough KZ,Shi H,et al. Each member of the poly-r(C)-binding protein 1(PCBP) family exhibits iron chaperone activity toward ferritin[J]. J Biol Chem,2013,288(24):17791-17802.
- [4] Aasheim HC,Loukianova T,Deggerdal A,et al. Tissue specific expression and cDNA structure of a human transcript

- encoding a nucleic acid binding [oligo(dC)] protein related to the pre-mRNA binding protein K [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(6): 959-964.
- [5] Berry AM, Flock KE, Loh HH, et al. Molecular basis of cellular localization of poly C binding protein 1 in neuronal cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 349(4): 1378-1386.
- [6] Cho SJ, Jung YS, Chen X. Poly(C)-binding protein 1 regulates p63 expression through mRNA stability [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71724.
- [7] Seli E, Yaba A, Guzeloglu-Kayisli O, et al. Alternative splicing of the mouse embryonic poly (A) binding protein (Epab) mRNA is regulated by an exonic splicing enhancer: a model for post-transcriptional control of gene expression in the oocyte [J]. *Mol Hum Reprod*, 2008, 14(7): 393-398.
- [8] Kumar GR, Glaunsinger BA. Nuclear import of cytoplasmic poly (A) binding protein restricts gene expression via hyperadenylation and nuclear retention of mRNA [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(21): 4996-5008.
- [9] Makeyev AV, Chkheidze AN, Liebhaber SA. A set of highly conserved RNA-binding proteins, alphaCP-1 and alphaCP-2, implicated in mRNA stabilization, are co-expressed from an intronless gene and its intron-containing paralog [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(35): 24849-24857.
- [10] Bag J, Bhattacharjee RB. Multiple levels of post-transcriptional control of expression of the poly (A)-binding protein [J]. *RNA Biol*, 2010, 7(1): 5-12.
- [11] Xia M, He H, Wang Y, et al. PCBP1 is required for maintenance of the transcriptionally silent state in fully grown mouse oocytes [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(15): 2833-2842.
- [12] Zhang HY, Dou KF. PCBP1 is an important mediator of TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition in gall bladder cancer cell line GBC-SD [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(8): 5519-5524.
- [13] Beaulieu YB, Kleinman CL, Landry-Voyer AM, et al. Polyadenylation-dependent control of long noncoding RNA expression by the poly (A)-binding protein nuclear 1 [J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(11): e1003078.
- [14] Wang H, Vardy LA, Tan CP, et al. PCBP1 suppresses the translation of metastasis-associated PRL-3 phosphatase [J]. *Cancer Cell*, 2010, 18(1): 52-62.
- [15] Zong MZ, Fen WT, Du N, et al. Screening and identifying oxaliplatin-resistance-associated proteins in colorectal cancer cell lines [J]. *Tumor*, 2013, 3(3): 223-228. [宗明珠, 冯婉婷, 杜楠, 等. 结直肠癌奥沙利铂耐药相关蛋白的筛选与鉴定 [J]. *肿瘤*, 2013, 3(3): 223-228.]
- [16] Liu Y, Gai L, Liu J, et al. Expression of poly (C)-binding protein 1 (PCBP1) in NSCLC as a negative regulator of EMT and its clinical value [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(6): 7165-7172.

2015 年浙江省肿瘤学学术年会及多学科 综合治疗高峰论坛预告

浙江省肿瘤学会定于 2015 年 12 月 4~5 日在杭州召开“2015 年浙江省肿瘤学学术年会及多学科综合治疗高峰论坛”, 本次会议由浙江省医学会肿瘤学分会主办, 浙江省抗癌协会、浙江省肿瘤医院、浙江省胸部肿瘤(肺、食管)诊治技术研究重点实验室和浙江省中西医结合重点肿瘤实验室协办。围绕胸腹部肿瘤诊治, 会议将邀请国内外专家做大会报告, 并举办食管癌规范化多学科综合治疗全国继续教育学习班、浙江省第三届 IGRT/SBRT 在胸腹部恶性肿瘤中的应用进展国际研讨会和晚期肿瘤的多学科综合治疗讨论(MDT)等。

会议内容: ①专题报告; ②食管癌规范化多学科综合治疗全国继续教育学习班; ③IGRT/SBRT 在胸腹部恶性肿瘤中的应用进展国际研讨会; ④晚期肿瘤多学科综合治疗(包括胃癌、结直肠癌、乳腺癌以及中西医结合治疗和康复治疗等 4 部分)。

会议继教学分: 本次大会已列入国家级继续医学教育项目, 经考试合格者授予国家级 I 类学分。

报名及投稿方式: 本次会议采用网上注册报名, 请登录 <http://zjhxyx2015.medmeeting.org/> 进行网上报名并进行网上投稿。

联系人: 浙江省医学会学术组织部 周 杨 电话: 0571-87567816

浙江省肿瘤医院 牟瀚舟 电话: 0571-88122431