

FAM3C 蛋白与结肠癌临床病理相关性

万晓晨,马小红,程璐,吴国友
(浙江医院,浙江 杭州 310013)

摘要: [目的] 研究 FAM3C 在结肠癌中的表达及其与结肠癌临床病理的相关性。[方法] 用免疫组织化学法检测结肠癌组织芯片 FAM3C 的蛋白表达,分析其与临床病理相关性,Kaplan-Meier 生存分析及 Cox 回归模型分析其预后。[结果] FAM3C 蛋白在结肠癌中表达水平与肿瘤 TNM 分期及淋巴结转移具有显著性相关;Kaplan-Meier 生存分析显示 FAM3C 蛋白表达阳性组生存率显著低于阴性组,Cox 回归模型行多因素分析显示 FAM3C 蛋白不是结肠癌独立预后的因子。[结论] FAM3C 高表达可能参与了结肠癌转移过程,甚至促使结肠癌的恶性进展;其高表达可能与结肠癌患者的生存及预后不良具有相关性。

主题词: FAM3C 蛋白;结肠癌;转移;预后

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)05-0413-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.05.B011

Correlation Between FAM3C Expression and Clinicopathological Features of Colon Cancer

WAN Xiao-chen, MA Xiao-hong, CHENG Lu, et al.

(Zhejiang Hospital, Hangzhou 310013, China)

Abstract: [Objective] To investigate the correlation between FAM3C expression and clinicopathological features of colon cancer. [Methods] The protein level of FAM3C was detected by immunohistochemical staining and the relationship between the expression of FAM3C and clinicopathological features was analyzed. Kaplan-Meier survival analysis and Cox regression model were used to analyze the relationship between FAM3C and prognosis. [Results] FAM3C protein level was significantly correlated with TNM stage and lymph node metastasis in colon cancer. Kaplan-Meier survival analysis showed that the survival of patients with positive expression of FAM3C was significantly lower than those with negative expression, Cox regression model analysis showed that the FAM3C protein level was not an independent prognostic factor for colon cancer. [Conclusion] High expression of FAM3C may be involved in the metastasis of colon cancer, and even promote the malignant progression of colon cancer. Thus, high expression of FAM3C may be related to the survival and prognosis of patients with colon cancer.

Subject words: FAM3C; colon cancer; metastasis; prognosis

随着生活条件和饮食习惯的转变,结肠癌发病率逐渐增高,且呈现发病低龄化的趋势,严重危害人们的健康^[1]。研究表明,结肠癌具有异质性,其分子特征决定其治疗敏感性甚至影响预后^[2]。因此,积极探索结肠癌发生发展过程中的分子机制、寻找预测其生物学行为的分子标志物对结肠癌的治疗具有重要意义。人 FAM3C 基因定位于 7 号染色体(7q31)^[3],

基金项目: 浙江省医药卫生一般研究计划(2014KYA003, 2012KYA005, 2012KYA008)

通讯作者: 吴国友,副主任技师,学士;浙江医院检验科,浙江省杭州市灵隐路 12 号(310013);E-mail: wuguoyou822@163.com

收稿日期: 2017-02-03; **修回日期:** 2017-03-16

是 FAM3 新型细胞因子家族的第三个成员,被认为与肿瘤的发生发展过程有关。在人的乳腺、结肠、前列腺、肺部、肝脏、头部及颈部的肿瘤中发现 FAM3C 表达上调^[4]。Mauri 等^[5]在胰腺癌细胞的无血清培养上清中采用多向蛋白质鉴定技术检测到 10 种未报道过的与胰腺癌相关联的分泌蛋白,其中包括 FAM3C。利用同位素标记的蛋白质组学分析方法,Grönberg^[6]等也发现在胰腺癌细胞分泌的 FAM3C 比非肿瘤的胰腺导管细胞显著性增加,提示 FAM3C 可能是胰腺癌诊断的新分子标志物及治疗靶点。本

课题通过研究 FAM3C 与结肠癌临床病理的相关性分析其在结肠癌发生发展中的作用, 从而为结肠癌防治提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 材料与试剂

结肠癌组织芯片购自上海芯超生物有限公司, 246 例结肠癌中男性 135 例, 女性 110 例, 不详 1 例。组织学类型均为腺癌, 其中高分化 49 例, 中分化 147 例, 低分化 50 例; 淋巴结转移 97 例, 无淋巴结转移 149 例; TNM 分期: I~II 期 142 例, III~IV 期 104 例。病例手术时间 2006 年 1 月至 2009 年 10 月, 随访截至日期 2015 年 7 月, 失访 6 例。

FAM3C 抗体购自 Abcam 公司, 免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

免疫组化依照常规免疫组织化学方法, 将组织石蜡切片置于 65℃ 烤箱中烤 2h, 常规脱蜡, 依次在二甲苯中室温孵育 10min×2 次, 无水乙醇中室温孵育 5min×2 次, 95% 的乙醇中室温孵育 5min×2 次, 蒸馏水洗 2 次, 室温孵育。磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 冲洗 3min。高压抗原修复, PBS 冲洗, 5min×3 次。滴加一抗, 用 PBS 液按 1:100 稀释, 4℃ 孵育过夜; PBS 冲洗, 5min×3 次; 滴加 HRP 标记二抗工作液 50μl, 室温孵育 60min; PBS 冲洗, 5min×3 次, DAB 显色试剂盒显色, 显微镜下观察, 用蒸馏水洗涤终止显色反应, 苏木素复染, 1% 乙醇盐酸分化, 自来水返蓝, 蒸馏水洗涤, 脱水、透明、封片。用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判定

将各组染色切片在双盲情况下由两名病理科医师观察评价结果并进行病理图片采集。FAM3C 阳性表达呈棕黄色颗粒均主要定位于细胞浆, 结果判定, 按照半定量积分方法^[7]: ①每例每个指标随机观察 5 个高倍视野 (×

400), 计数阳性细胞数占细胞总数的百分比评分: 阳性细胞数为 0% 为 0 分, <10% 为 1 分, 10%~50% 为 2 分, >50% 为 3 分; ②按染色强度评分: 无色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分; 根据 ①②两项积分之积判定结果, 具体标准为: 0~2 分为阴性, 3~9 分为阳性。

1.4 统计学处理

数据采用 SPSS13.0 行统计分析。FAM3C 与结肠癌临床病理相关性采用卡方及精确概率法; 单因素的生存分析采用 Kaplan-Meier 方法, Log-rank 检验; 单因素生存分析有意义的因素进入 Cox 回归模型, 行多因素分析。检验均为双尾, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FAM3C 蛋白与临床病理间的关系

免疫组化显示, FAM3C 蛋白定位于胞质 (Figure 1)。FAM3C 蛋白在结肠癌中表达水平与肿瘤 TNM 分期及淋巴结转移具有显著性相关 ($P < 0.05$), 而与性别、年龄、肿瘤大小、分化程度、远处转移及肝转移等因素无显著性相关 ($P > 0.05$) (Table 1)。

2.2 FAM3C 蛋白与生存的关系

FAM3C 蛋白表达阳性组 3 年及 5 年生存率分别为 63.1% 及 48.2%, 中位生存时间 56.00 个月, FAM3C 蛋白表达阴性组 3 年及 5 年生存率分别为 72.9% 及 63.3%, 中位生存时间 >60 个月, FAM3C 蛋白表达阳性组生存率显著性低于阴性组 ($\chi^2 = 6.360$, $P = 0.012$, Figure 2)。

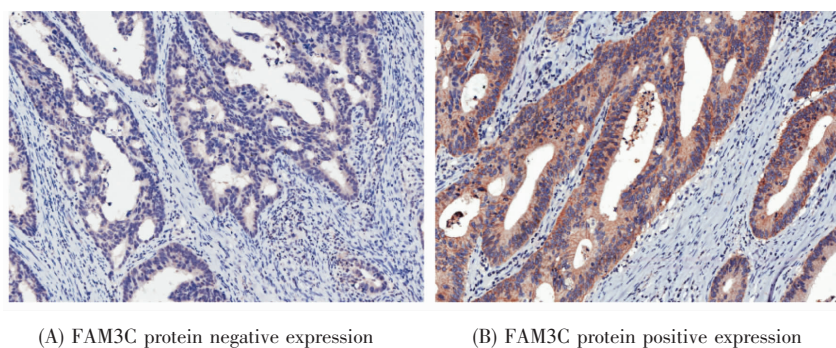


Figure 1 Expression of FAM3C protein in colon cancer (×400)

Table 1 The correlation between FAM3C expression and clinicopathological features of colon cancer

Parameter	FAM3C expression		χ^2	P value
	Negative (%)	Positive (%)		
Gender			0.0003	0.987
Male	75 (55.6)	60 (44.4)		
Female	61 (55.5)	49 (44.5)		
Age(years)			0.006	0.940
<60	33 (55.9)	26 (44.1)		
≥ 60	103 (55.4)	83 (44.6)		
Tumor diameter			1.926	0.165
<20cm	71 (59.7)	48 (40.3)		
≥ 20 cm	63 (50.8)	61 (49.2)		
Differentiation			0.359	0.836
Well	28 (57.1)	21 (42.9)		
Moderate	79 (53.7)	68 (46.3)		
Poor	29 (58.0)	21 (42.0)		
TNM stage			7.423	0.006
I ~ II	89 (62.7)	53 (37.3)		
III ~ IV	47 (45.2)	57 (54.8)		
Lymph-node metastasis			5.123	0.024
Negative	91 (61.1)	58 (38.9)		
Positive	45 (46.4)	52 (53.6)		
Distant metastasis			1.821	0.177
Negative	133 (56.1)	104 (43.9)		
Positive	3 (33.3)	6 (66.7)		
Liver metastasis			1.199	0.274
Negative	134 (55.8)	106 (44.2)		
Positive	2 (33.3)	4 (66.7)		

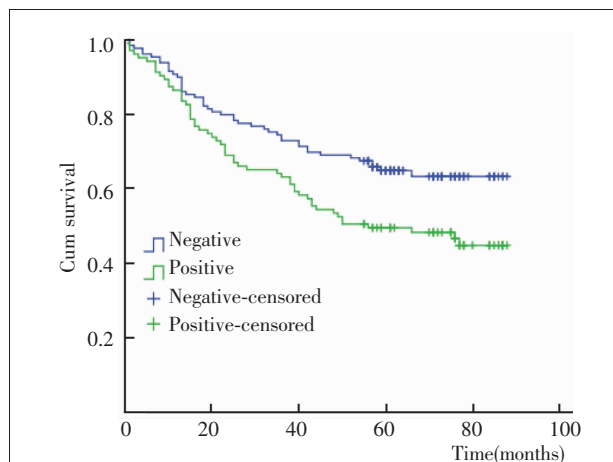


Figure 2 Relationship between FAM3C protein expression and prognosis

2.3 Cox 多因素分析FAM3C 蛋白与预后关系

单因素生存分析显示,分化程度、TNM 分期、淋巴结转移、远处转移、肝转移及 FAM3C 蛋白表达与预后显著性相关(Table 2)。将上述因素纳入 Cox 回

归模型行多因素分析显示,TNM 分期($P=0.028$)、分化程度($P=0.030$)及肝转移($P=0.048$)是结肠癌独立预后的因素,而 FAM3C 蛋白表达与独立预后无显著性相关($P=0.113$)(Table 3)。

3 讨 论

肿瘤的发生是多种因素相互作用的结果,研究发现结肠癌与遗传、饮食习惯及炎症等多因素有关,但其发生、发展的具体分子机制仍未明确^[8,9]。探讨结肠癌组织中功能相关的基因及蛋白的表达,分析其作用机制及临床病理学意义,不仅为进一步研究相关基因在结肠癌发生、发展中的作用提供实验依据,同时也有助于阐明结肠癌发生、发展的分子机制。

上皮细胞间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是肿瘤发生及转移过程中出现的关键环节。FAM3C 为白细胞介素样上皮间质转化诱导因子(interleukinlike epithelial-mesenchymal transition inducer, ILEI), 研究发现其参与上皮间质转化并促进肿瘤的发生^[10],在乳腺正常上皮

细胞(EpH4) EMT 的过程中,FAM3C 表达及分泌显著性增加,进一步研究发现 EpH4 细胞中过表达 FAM3C 可诱导其发生 EMT^[4]。对肝癌细胞的研究发现 FAM3C 通过激活 PDGF-R/b-Catenin 及 PDGF-R/Stat3 通路引起 EMT,且这个过程需要 Ras 参与^[11]。总之,现有研究表明 FAM3C 的正常表达对于胚胎正常发育至关重要,而 FAM3C 表达分泌的异常增加可能参与了多种肿瘤的形成及转移过程,但其机制还需要更深入的研究。

本研究发现 FAM3C 蛋白在结肠癌中表达水平与肿瘤 TNM 分期及淋巴结转移具有显著性相关,提示 FAM3C 高表达可能参与了结肠癌浸润转移过程,甚至促使结肠癌向更加恶性的阶段进展。生存分析显示 FAM3C 蛋白表达阳性组生存率显著性低于阴性组,预示着 FAM3C 高表达可能与结肠癌患者的生存期短、预后不良相关,进一步 Cox 回归模型多因素分析显示 FAM3C 蛋白不是结肠癌独立预后的

Table 2 Univariate analysis of clinicopathological characteristics and prognosis in colon cancer

Clinicopathological characteristics	Survival(%)		Mean survival time(months)	Log-Rank test	P value
	3-years	5-years			
Gender				0.660	0.416
Male	66.7	54.2	58.80		
Female	71.4	59.9	61.88		
Age(years)				1.403	0.236
<60	71.4	64.2	65.0		
≥60	66.9	54.6	59.05		
Tumor diameter				3.231	0.072
<20cm	75.0	59.0	66.88		
≥20cm	61.5	51.3	55.23		
Differentiation				8.077	0.018
Well	79.5	68.7	68.73		
Moderate	71.8	57.2	60.74		
Poor	52.2	43.1	60.29		
TNM stage				14.963	<0.001
I ~ II	78.9	66.1	67.94		
III ~IV	54.5	44.0	50.03		
Lymph-node metastasis				10.430	0.001
Negative	76.3	64.0	66.35		
Positive	57.0	45.7	51.27		
Distant metastasis				15.924	<0.001
Negative	70.5	58.2	61.62		
Positive	12.5	12.5	22.63		
Liver metastasis				27.722	<0.001
Negative	70.0	57.9	61.38		
Positive	0.0	0.0	11.0		
FAM3C expression				6.360	0.012
Negative	72.9	63.3	65.10		
Positive	63.1	48.2	54.43		

Table 3 Cox regression model analysis of prognostic factors of colon cancer

Clinical parameters	Coefficient	Hazard ratio(HR)	95%CI for HR	P value
Distant metastasis	-0.196	0.822	0.184~3.673	0.798
Lymph-node metastasis	-0.640	0.527	0.192~1.447	0.214
TNM stage	1.152	3.166	1.132~8.849	0.028
Differentiation	0.360	1.433	1.035~0.985	0.030
Liver metastasis	1.692	5.432	1.014~29.084	0.048
FAM3C expression	0.329	1.389	0.925~2.086	0.113

因子。

鉴于样本量的限制性,本研究结果尚有待于通过大样本及体内外实验进一步加以验证。显然,对这个新基因家族成员的生物学功能展开进一步研究,将有助于我们了解结肠癌的发生机制,并为防治结肠癌提供新的诊断分子标志物及潜在的治疗靶点。

参考文献:

[1] Torre LA,Bray F,Siegel RL,et al. Global cancer statistics,2012 [J]. CA Cancer J Clin,2015,65(2):87-108.

[2] Sridharan M,Hubbard JM,Grothey A. Colorectal cancer;how emerging molecular understanding affects treatment decisions [J]. Oncology (Williston Park),2014,28(2): 110-118.

[3] Yang J,Guan Y. Family with sequence similarity 3 gene family and nonalcoholic fatty liver disease[J]. J Gastroenterol Hepatol,2013,28(Suppl 1):105-111.

[4] Waerner T,Alacakaptan M,Tamir I,et al. ILEI;a cytokine essential for EMT,tumor formation,and late events in metastasis in epithelial cells [J]. Cancer Cell,2006,10 (3):227-239.

[5] Mauri P,Scarpa A,Nascimbeni AC,et al. Identification of proteins released by pancreatic cancer cells by multidimensional protein identification technology;a strategy for identification of novel cancer markers [J]. FASEB J,2005,19(9):1125-1127.

[6] Gronborg M,Kristiansen TZ,Iwahori A,et al. Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach [J]. Mol Cell Proteomics, 2006,5(1):157-171.

[7] Shou ZX,Jin X,Zhao ZS. Upregulated expression of ADAM17 is a prognostic marker for patients with gastric cancer [J]. Ann Surg,2012,256(6):1014-1022.

[8] Goel G. Evolving role of gene expression signatures as biomarkers in early-stage colon cancer [J]. J Gastrointest Cancer, 2014,45(4):399-404.

[9] Ren Z,Wang W,Li J. Identifying molecular subtypes in human colon cancer using gene expression and DNA methylation microarray data [J]. Int J Oncol,2016,48(2): 690-702.

[10] Johansson P,Bemstrom J,Gorman T,et al. FAM3B PANDERand FAM3C ILEI represent a distinct class of signaling molecules with a non-cytokine-like fold [J].Structure,2013,21(2):306-313.

[11] Lahsnig C,Mikula M,Petz M,et al. ILEI requires oncogenic Ras for the epithelial to mesenchymal transition of hepatocytes and liver carcinoma progression[J].Oncogene, 2009,28(5):638-650.