

CDCA7L 在结肠癌患者组织标本中的表达及临床意义

赵冲¹, 汪强¹, 武奋萍¹, 刘胜兰²

(1. 成都市第七人民医院, 四川 成都 610041;

2. 四川大学华西医院, 四川 成都 610000)

摘要: [目的] 探讨 CDCA7L 在结肠癌组织中表达及临床意义。[方法] 通过 QRT-PCR 及免疫组织化学法检测 CDCA7L mRNA 及蛋白在 65 例结肠癌组织及癌旁组织标本中的表达, 分析其表达与患者临床病理特征及预后的关系。[结果] CDCA7L 在结肠癌组织标本中的表达较癌旁组织明显增高(81.54% vs 6.15%, $P<0.001$)。CDCA7L 的表达与患者性别、年龄及肿瘤部位无关 (P 均 >0.05), 与分期、淋巴结转移、远处转移、肿瘤分化、血清 CEA 水平及生存状态明显相关 (P 均 <0.05)。高表达 CDCA7L 患者的总生存时间及中位生存时间均较低表达者明显缩短 (27.00 ± 3.32 个月 vs 43.72 ± 3.08 个月, 13.00 ± 1.49 个月 vs 27.01 ± 1.87 个月; $P<0.001$)。Cox 多因素回归模型分析提示, CDCA7L 表达、远处转移及临床分期是结肠癌独立的预后因素 ($P<0.05$)。[结论] CDCA7L 参与调节结肠癌的发生发展, 可作为潜在的结肠癌诊断和预后评估的分子标志物。

关键词: CDCA7L; 结肠癌; 预后

中图分类号: R735.3+5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)10-0885-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.10.B010

Expression and Clinical Significance of CDCA7L in Patients with Colon Cancer

ZHAO Chong, WANG Qiang, WU Feng-ping, et al.

(Seventh People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610041, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression and clinical significance of CDCA7L in colon carcinoma. [Methods] The expression of CDCA7L mRNA and protein were detected by QRT-PCR and immunohistochemistry in 65 cases of colon cancer tissues and adjacent tissues, and the relationship of CDCA7L expression with the clinicopathological features and prognosis of the patients were analyzed. [Results] The expression of CDCA7L in colon cancer tissue specimens was higher than that in noncancerous tissue (81.54% vs 6.15%, $P<0.001$). CDCA7L expression was not related to gender, age and tumor location (all $P>0.05$), but was related to stage, lymph node metastasis, distant metastasis, differentiation, serum CEA levels and survival status (all $P<0.05$). Furthermore, overall survival time and median survival time of patients with high expression of CDCA7L was shorter (27.00 ± 3.32 m vs 43.72 ± 3.08 m, 13.00 ± 1.49 m vs 27.01 ± 1.87 m, $P<0.001$). Cox multivariate regression model analysis showed that CDCA7L expression, distant metastasis and clinical stage were the independent prognostic factors ($P<0.05$). [Conclusion] CDCA7L is involved in the regulation of colon cancer, and can be used as a molecular marker for the diagnosis and prognosis of colon cancer.

Subject words: CDCA7L; colon cancer; prognosis

近年来,随着人民生活水平的不断提高,饮食习惯和饮食结构的改变以及人口老龄化,我国结直肠癌的发病率和死亡率均呈上升趋势^[1,2],其中,结肠

癌的发病率上升尤为显著。随着外科技术的不断发展,结肠癌患者手术切除率明显提高,术后 5 年生存率相关资料显示:Dukes A、B 及 C 期分别可达 80%、65%及 30%^[3]。因此影响患者术后长期生存的主要因素是结肠癌的分期,早期结肠癌的检出率低,这是严重导致术后 5 年生存率低的主要原因^[4]。目

通讯作者: 刘胜兰, 主治医师, 本科; 四川大学华西医院超声科, 四川省成都市武侯区林荫街 2 号 (610041); E-mail: lanlan16358221@qq.com

收稿日期: 2017-02-19; **修回日期:** 2017-03-23

前,国内外较广泛应用于检测结肠癌的指标是 CEA,约 60% 的结肠癌患者 CEA 高于正常人,但其特异性并不高^[5,6]。因此寻找结肠癌早期特异性诊断标注物已成为目前临床亟待解决的难题。研究发现细胞分化周期相关 7 样蛋白 (cell division cycle-associated 7-like, CDCA7L) 与肿瘤的分化、增殖和凋亡相关,但其与结肠癌的关系目前国内尚少见报道。本研究通过检测 CDCA7L 在结肠癌组织中的表达,分析其表达与患者临床病理特征及预后的关系。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集 2013 年 1 月至 2015 年 12 月成都市第七人民医院收治的结肠癌患者标本,50 例结肠癌组织标本及癌旁组织标本取自结肠癌患者手术切除的结肠癌病变组织,癌旁组织取自距癌变边缘 2cm 内;15 例Ⅳ期患者癌组织取自肠镜活检标本,15 例非结肠癌患者的正常结肠组织取自先天性巨结肠、各种原因导致的结肠破裂穿孔、肠扭转、嵌顿疝的患者;所有患者资料完整,术前均未行抗肿瘤相关治疗,术前均抽血送检验科用免疫荧光法测定 CEA 值,术后组织标本均立即做相应处理保存。所有组织标本都是在术后半小时内获取用 10% 的甲醛浸泡,所有入选病例入院后即刻用含抗凝剂的紫色采血管采集静脉血,置于 4℃ 冷藏 30min 后,室温下 3000rpm 离心 15min,留取上层血清,置于 -20℃ 冰箱备用。

1.2 患者资料及随访

65 例患者中男性 37 例,女性 28 例;年龄 30~80 岁,中位年龄 50 岁,50 岁以下患者 30 例,50 岁及以上患者 35 例;右半结肠癌 29 例,左半结肠癌 36 例;Ⅰ期 7 例,Ⅱ期 23 例,Ⅲ期 20 例,Ⅳ期 15 例;有淋巴转移 35 例,无淋巴转移 30 例;有远处转移 15 例,无远处转移 50 例。本研究经本院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

全部 65 例患者出院后均随访,随访方式为电话随访和门诊随访,随访内容包括一般情况、临床症状及影像学检查。随访起点为手术或病理活检日期,末次随访时间为 2016 年 4 月 1 日,至随访截止日,存活病例 45 例,死亡病例 20 例,无失访病例。

1.3 免疫组化方法

免疫组化染色:石蜡切片、脱蜡、水化,PBS 冲洗

3×3min;高温高压抗原修复;加 3% 过氧化氢溶液,室温下孵育 10min,以阻断内源性过氧化物酶;PBS 冲洗 3×3min;加第一抗体,室温下孵育 60min;PBS 冲洗 3×5min;加聚合物增强剂(试剂 A),室温孵育 20min;PBS 冲洗 3×3min;加酶标抗鼠聚合物(试剂 B),室温下孵育 30min;PBS 冲洗 3×3min;加新配制的 DAB 显色液,显微镜下观察,阳性显色为棕黄色;自来水冲洗,苏木素复染,0.1% 盐酸分化,自来水冲洗,PBS 冲洗返蓝;梯度酒精脱水干燥,中性树脂封片。免疫组化的检测结果进行半定量判定。切片由两位病理学医师重复观察,结果有分歧时由第三人观片,讨论判定。CDCA7L 均以 <50% 的肿瘤细胞着色为低表达;≥50% 的肿瘤细胞着色为高表达。采用盲法评估(免疫组化阅片者事先不知患者临床资料及分组情况),评估结果均经病理科主任医师核实。

1.4 血清总 RNA 提取

将分离所得血清,置于冰上融化;取 250μl 血清样品,加入 750μl Trizol,振荡器混匀,静置 5min;加入 200μl 氯仿,振荡器混匀,静置 10min;室温下离心 12 000rpm 10min,留取上清液并量取其体积,转移至另一个无 Rnase 的 EP 管中;分别加入与上清液等体积的异丙醇,振荡器振荡混匀,室温下静置 3min;室温下离心 12 000rpm 10min;倒出管内液体,加用 1ml 75% 乙醇;室温 12 000rpm 离心 2min;倒出乙醇,并用 Tip 枪头将剩余液体吸干净,晾干。每管中加入 10μl 无 Rnase 的 ddH₂O,以能够充分溶解 RNA;用分光光度计测定总 RNA 浓度及纯度。

1.5 Real-time PCR 分析 CDCA7L 的表达水平

将提取的血清总 RNA,逆转录反应参照 AMV 逆转录试剂盒说明,在 20μl 体系中加入 2μg 总 RNA 进行 cDNA 的合成。Real-time PCR 采用 2xSYBR Green PCR Master Mix,取适量 cDNA 作为模板,引物浓度 0.4μmol/L,15μl 体系进行扩增,每个待测样本设置 3 个平行样,根据目标基因设计合成相应上下游引物进行 PCR 扩增,以 GAPDH 作为内参照。PCR 反应在定量 PCR 反应仪上进行 3 次独立实验后得到的数据运用公式 $RQ=2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法进行分析。

1.6 统计学处理

所有结果均通过 SPSS13.0 统计软件进行分析。CDCA7L mRNA 的差异表达采用 *t* 检验或 One way ANOVA 分析。CDCA7L 蛋白的差异表达及其与临床

病理参数间的关系使用 Chi-Square 检验;采用Kaplan-Meier 法分析 CDCA7L 的表达与生存时间及预后的关系,应用 Cox 比例风险模型分析影响结肠癌预后的因素; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CDCA7L mRNA 在结肠癌组织标本中的表达

CDCA7L mRNA 在 65 例结肠癌组织中的表达水平为 6.125 ± 0.398 , 与 50 例癌旁组织 (1.058 ± 0.070) 及 15 例正常组织 (0.980 ± 0.080) 比较,差异有统计学意义 ($P<0.001$), Figure 1。

2.2 CDCA7L 蛋白在结肠癌组织标本中的表达

CDCA7L 阳性表达位于细胞膜, CDCA7L 在癌旁组织及正常组织中的高表达率为 6.15% (4/65)。在结肠癌组织标本中的高表达率为 81.54% (53/65), 差异有统计学意义 ($P<0.001$)。见 Figure 2。

2.3 CDCA7L 表达与结肠癌临床病理特征的关系

CDCA7L 表达与患者的性别、年龄及肿瘤部位无关 (P 均 >0.05); 与分期、淋巴结转移、远处转移、肿瘤分化、血清 CEA 水平和生存状态明显相关, 差异均有统计学意义 (P 均 <0.05)。见 Table 1。

2.4 CDCA7L 表达与结肠癌患者生存分析

高表达 CDCA7L 的患者的无进展生存时间为 13.00 ± 1.49 个月, 较低表达者 (27.01 ± 1.87 个月) 缩短,

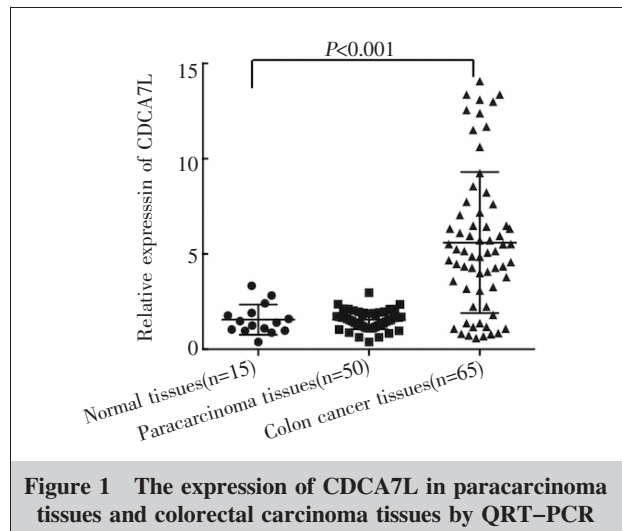


Figure 1 The expression of CDCA7L in paracarcinoma tissues and colorectal carcinoma tissues by QRT-PCR

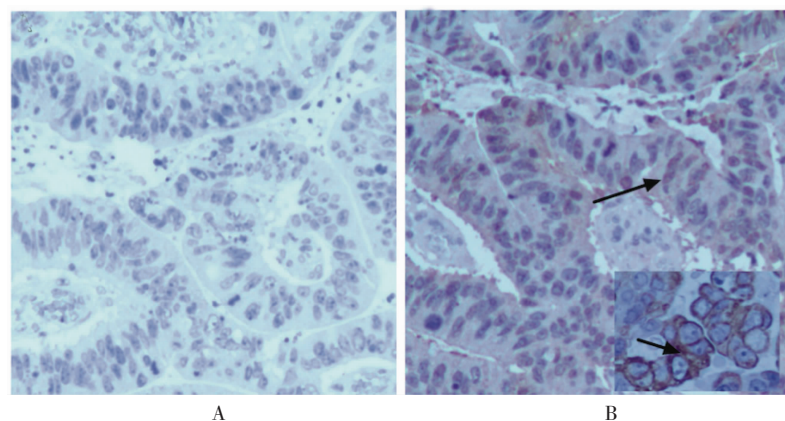


Figure 2 The expression of CDCA7L in paracarcinoma tissues (A) and colorectal carcinoma tissues (B) ($\times 200$)

差异有统计学意义 ($\chi^2=35.85$, $P<0.001$, Figure 3A); 低表达 CDCA7L 的患者的总生存时间为 43.72 ± 3.08 个月, 较高表达者 (27.00 ± 3.32 个月) 明显延长, 差异有统计学意义 ($\chi^2=23.130$, $P<0.001$, Figure 3B)。

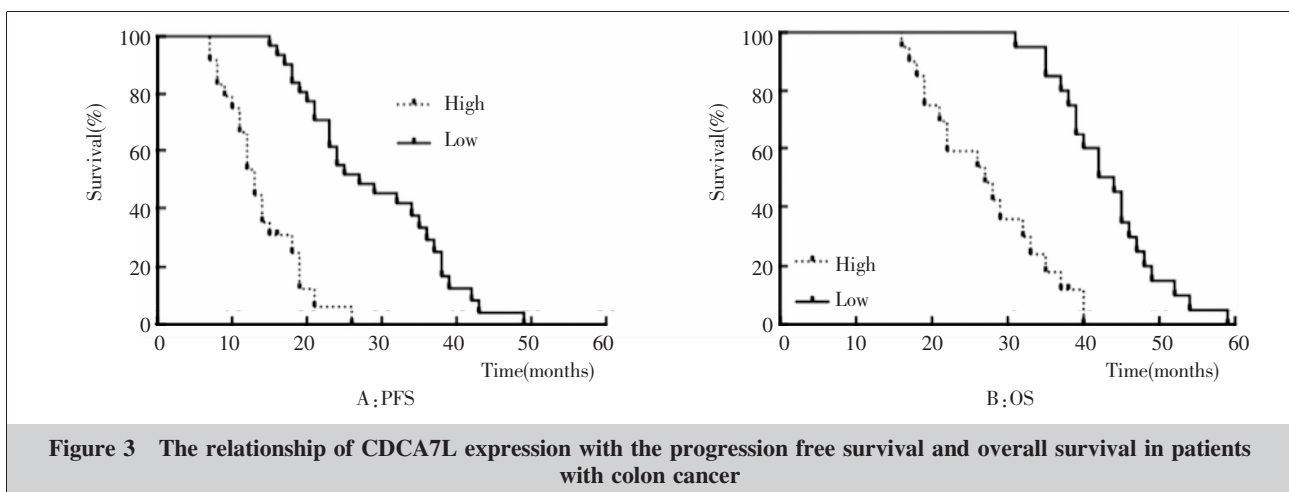


Figure 3 The relationship of CDCA7L expression with the progression free survival and overall survival in patients with colon cancer

2.5 预后影响因素分析

多因素 Cox 回归分析结果显示, CDCA7L 的表达、远处转移及临床分期是结肠癌独立的预后因素。见 Table 2。

Table 1 The relationship of CDCA7L expression with pathological characteristics of colorectal cancer patients

Clinical characteristics	CDCA7L expression		χ^2	P
	Low	High		
Ages(years)			0.004	0.948
<50	6	24		
≥50	6	29		
Gender			0.008	0.928
Male	6	31		
Female	6	22		
Differentiation			4.204	0.040
Well	9	21		
Poor and mucinous adenocarcinoma	3	32		
Location			0.032	0.858
Right colon	6	23		
Left colon	6	30		
Stage			12.996	0.005
I	5	2		
II	3	20		
III	3	17		
IV	1	14		
Lymph node metastasis			4.928	0.026
Yes	3	32		
No	9	21		
Distant metastasis			4.415	0.036
Yes	0	15		
No	12	38		
Serum CEA(ng/ml)			11.164	0.001
<5	8	10		
≥5	4	43		
Survival status			9.989	0.002
Survival	12	33		
Death	0	20		

Table 2 Cox multivariate analysis of independent prognosis factors of colon cancer

Clinical characteristics	β	SE	Wald	RR(95%CI)	P
Gender	0.383	0.322	1.004	1.016(0.673~1.982)	0.162
Age	0.275	0.335	0.510	1.350(0.672~2.013)	0.302
Stage	1.909	0.881	3.650	3.741(2.310~5.794)	0.001
CDCA7L expression	4.673	1.813	6.204	2.932(4.571~13.651)	0.002
Distant metastasis	9.922	3.109	0.197	4.007(1.687~9.806)	0.003
Lymph node metastasis	1.192	0.447	0.577	1.258(0.761~2.954)	0.067

3 讨论

结肠癌(colon cancer)是胃肠道中常见的恶性肿瘤。结肠癌发病率在我国居恶性肿瘤第 3~5 位, 年死亡率 10/10 万左右。国内报道结肠癌根治术后 5 年生存率在 60%左右^[7,8]。结肠癌患者死亡原因主要是复发和转移, 近年来, 发病率有上升趋势^[9]。由于结肠癌的病因及发病机制尚未完全明确, 因而结肠癌的诊断和治疗仍非常困难, 发病率、死亡率仍居高不下^[10]。目前治疗癌症最有效的方法是手术治疗联合化疗, 局部肿瘤 5 年生存率约为 93%, 然而将近 1/2 的患者在发现时已有转移^[11], 超过 1/3 的患者在手术之后复发。虽然手术技巧和其他治疗方式进步, 近些年出现了新的分子靶向药物, 但结肠癌死亡率仍较高, 主要是因为结肠癌复发和转移率较高^[12,13]。因此, 提高结肠癌早期诊断率、寻找新的分子靶向治疗药物及转移、复发预警指标等已成为当今结肠癌研究中亟待解决的问题。

CDCA7L 也称为 R1、JP02、RAM2, 定位于 7p15.3, 有 15 个外显子, 编码一个由 454 个氨基酸残基组成的蛋白质, 是细胞分裂周期相关蛋白家族成员之一^[14]。尽管该蛋白参与细胞凋亡过程, 但 CDCA7L 与肿瘤的关系新近才引起注意^[15]。仅有的实验研究结果显示, CDCA7L 基因可以加速肝细胞癌的细胞周期进程^[16], 也与多发性骨髓瘤的发生相关^[15]。在髓母细胞瘤中, CDCA7L 蛋白与 c-myc 结合, 促进肿瘤细胞的增殖^[17]。这些研究提示 CDCA7L 在肿瘤发生、发展中可能扮演重要角色。本研究通过通过 QRT-PCR 及免疫组织化学法检测 CDCA7L 在结肠癌组织及癌旁组织标本中的 mRNA 及蛋白表达, 分析其表达与患者临床病理特征及预后的关系。结果显示 CDCA7L 在结肠

癌组织标本中的表达较癌旁组织明显增高, CDCA7L 表达与患者性别、年龄及肿瘤部位无关, 与疾病分期、淋巴结转移、远处转移、肿瘤分化和血清 CEA 水平及生存状态明显相关; 此外高表达 CDCA7L 患者的总生存时间及中位生存时间均较低表达者明显缩短; Cox 多因素回归模型

分析提示,CDCA7L 表达、远处转移及临床分期是结肠癌独立的预后因素($P<0.05$)。以上研究结果提示 CDCA7L 基因是结直肠癌预后不良的影响因子,参与调节结肠癌的发生发展,可作为潜在的结肠癌诊断和预后评估的分子标志物。

参考文献:

- [1] Ferrer-Mayorga G, Gomez-Lopez G, Barbachano A, et al. Vitamin D receptor expression and associated gene signature in tumour stromal fibroblasts predict clinical outcome in colorectal cancer[J]. Gut, 2016, 1(4): 182–190.
- [2] Jagadish N, Parashar D, Gupta N, et al. A novel cancer testis antigen target A-kinase anchor protein (AKAP4) for the early diagnosis and immunotherapy of colon cancer[J]. Oncoimmunology, 2016, 5(2): 89–95.
- [3] Li C, Wang H, Lin F, et al. Bioinformatic exploration of MTA1-regulated gene networks in colon cancer [J]. Front Med, 2016, 3(6): 201–210.
- [4] Wang Y, Lu P, Zhang W, et al. GEN-27, a newly synthetic isoflavonoid, inhibits the proliferation of colon cancer cells in inflammation microenvironment by suppressing NF-B pathway[J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016, 28(5): 30–40.
- [5] Aggarwal S. Sustained improvement in a metastatic colon cancer patient with folfox failure after folfox failure[J]. Case Rep Oncol, 2015, 8(3): 487–492.
- [6] Gade M, Kubik M, Fisker RV, et al. Diagnostic value of (18)F-FDG PET/CT as first choice in the detection of recurrent colorectal cancer due to rising CEA [J]. Cancer Imaging, 2015, 10(6): 182–190.
- [7] Becerra AZ, Probst CP, Tejani MA, et al. Evaluating the prognostic role of elevated preoperative carcinoembryonic antigen levels in colon cancer patients: results from the national cancer database[J]. Ann Surg Oncol, 2016, 23(5): 1554–1561.
- [8] Lawrence N, Hinder V, Murray M, et al. Transient elevation in serum carcinoembryonic antigen while on adjuvant chemotherapy for colon cancer: Is this of prognostic importance? [J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2015, 5(6): 1082–1090.
- [9] Manigandan K, Manimaran D, Jayaraj RL, et al. Taxifolin curbs NF-kappaB-mediated Wnt/beta-catenin signaling via up-regulating Nrf2 pathway in experimental colon carcinogenesis[J]. Biochimie, 2015, 11(9): 103–112.
- [10] Naghibalhossaini F, Sayadi K, Jaberie H, et al. Inhibition of CEA release from epithelial cells by lipid A of Gram-negative bacteria[J]. Cell Mol Biol Lett, 2015, 20(3): 374–384.
- [11] Saleem TH, Attiya AM, Ahmed EA, et al. Possible Protective effects of quercetin and sodium gluconate against colon cancer induction by dimethylhydrazine in mice[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(14): 5823–5828.
- [12] Kajita K, Kuwano Y, Satake Y, et al. Ultraconserved region-containing Transformer 2beta4 controls senescence of colon cancer cells[J]. Oncogenesis, 2016, 12(1): 208–215.
- [13] Nataraj SM, Prema CL, Vimalambike MG, et al. Major protein of carcinoembryonic antigen gene family-CD66c, a novel marker in colon carcinoma [J]. J Clin Diagn Res, 2016, 10(2): 1–4.
- [14] Bartholomeeusen K, De Rijck J, Busschots K, et al. Differential interaction of HIV-1 integrase and JPO2 with the C terminus of LEDGF/p75[J]. J Mol Biol, 2007, 372(2): 407–421.
- [15] Chan T, Hawkins C, Krieger JR, et al. JPO2/CDCA7L and LEDGF/p75 are novel mediators of PI3K/AKT signalling and aggressive phenotypes in medulloblastoma [J]. Cancer Res, 2016, 3(4): 82–88.
- [16] Tian Y, Huang C, Zhang H, et al. CDCA7L promotes hepatocellular carcinoma progression by regulating the cell cycle[J]. Int J Oncol, 2013, 43(6): 2082–2090.
- [17] Huang A, Ho CS, Ponzielli R, et al. Identification of a novel c-Myc protein interactor, JPO2, with transforming activity in medulloblastoma cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(13): 5607–5619.