

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.10.022

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190125.1432.005.html(2019-01-28)

转录因子 CP2 在结直肠癌中的表达及临床意义*

陈丽,付丹,陈霞[△]

(四川省成都市第六人民医院消化内科 610051)

[摘要] **目的** 检测转录因子 CP2(TFCP2)在结直肠癌中的表达,探讨其与结直肠癌临床病理特征之间的关系。**方法** 以免疫组织化学法检测 128 例的结直肠癌组织以及癌旁结直肠黏膜组织中 TFCP2 的表达。采用 Western blot、反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 5 例临床结直肠癌手术标本及癌旁结直肠黏膜组织中 TFCP2 的表达情况。**结果** 免疫组织化学结果表明,TFCP2 在结直肠癌组织的阳性表达率(85.9%)显著高于相应癌旁结直肠黏膜组织(21.1%)。TFCP2 mRNA 在前者的表达水平是后者的 1.40~17.00 倍。Western blot 证实 TFCP2 在结直肠癌组织的表达是对应癌旁结直肠黏膜组织的 1.01~3.56 倍。TFCP2 的表达与肿瘤患者发生的年龄、性别及肿瘤的部位等无关,与肿瘤的分化、浸润深度、侵袭转移、Dukes' 分期等相关。**结论** TFCP2 在结直肠癌中呈现高表达,与结直肠癌患者的肿瘤临床病理特征有显著相关性。

[关键词] 转录因子;结直肠肿瘤;病理学,临床**[中图分类号]** R735.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)10-1713-03

Expression and clinical significance of transcription factor CP2 in colorectal carcinoma*

CHEN Li, FU Dan, CHEN Xia[△]

(Department of Gastroenterology, Sixth People's Hospital of Chengdu, Chengdu, Sichuan 610051, China)

[Abstract] **Objective** To detect transcription factor CP2 (TFCP2) expression in colorectal carcinoma, and explore the relationship with the clinicopathological features. **Methods** The expression of TFCP2 was detected in 128 patients' colorectal carcinoma tissues and adjacent mucosal tissues by immunohistochemistry. The expression of TFCP2 colorectal carcinoma and adjacent mucosal tissues of 5 patients in surgical with colorectal carcinoma were detected by Western-blot and reverse transcription-PCR (RT-PCR). **Results** The immunohistochemistry results showed that the positive expression rate of TFCP2 in colorectal carcinoma tissues (85.9%) was significantly higher than that of the adjacent mucosal tissues (21.1%). The mRNA expression of TFCP2 was 1.40~17.00 times relative to colorectal tissue. Western blot confirmed that the expression of TFCP2 in colorectal carcinoma was 1.01~3.56 times that of adjacent tissues. TFCP2 expression was not related to the patient's age of tumor onset, gender and location of the tumor, however, it is related to tumor differentiation, infiltration depth, invasion and metastasis and Dukes' stage. **Conclusion** TFCP2 highly expressed in colorectal carcinoma and there was a significant correlation with the clinicopathological features.

[Key words] transcription factors; colorectal neoplasms; pathology, clinical

据国家癌症中心全国最新癌症报告显示,我国恶性肿瘤的发病率为 278.07/10 万,病死率为 167.89/10 万。其中,结直肠癌发病率已跃居恶性肿瘤第 3 位。截止 2010 年,我国结直肠癌新发病例数已超过 27 万,死亡病例 13 万以上,且有逐年增加的趋势^[1]。这主要与结直肠癌晚期的侵袭转移密切相关。然而,目前对结直肠癌侵袭转移的研究仍未找到可靠、敏感的判断指标和治疗靶点。

转录因子 CP2(transcription factor CP2, TFCP2)最初被认为其与小鼠 α 球蛋白基因的启动子区域相结合,通过增加 TFCP2 的表达后,激活 α 球蛋白的表

达,可在体外诱导鼠白血病(MEL)细胞的分化^[2]。近年来,TFCP2 与肿瘤之间的关系得到越来越多研究者的报道。该转录因子在不同的肿瘤研究中发现其扮演了不一样的角色功能。有研究表明,TFCP2 通过 β-catenin/TCF 信号通路的激活,发挥癌基因的作用,可增加前列腺癌的侵袭转移等恶性生物学行为^[3]。而在恶性黑色素瘤的研究中发现,TFCP2 扮演的是抑癌基因的功能,TFCP2 的高表达可以抑制黑色素瘤细胞的生长^[4]。此外,TFCP2 还参与了肿瘤细胞上皮间质转换,诱导肿瘤血管生成。与各种癌症发生发展等密切相关,如肝癌、胰腺癌、透明细胞肾细胞癌、乳腺

* 基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研课题(G16PJ039)。通信作者,E-mail:chenxiacdly@163.com。

作者简介:陈丽(1984-),主治医师,硕士,主要从事胃肠道肿瘤及慢性

癌和甲状腺癌等^[2]。然而,TFCP2 在结直肠癌中的表达情况及与结直肠癌的临床病理参数之间是否存在一定的相关性,目前尚不清楚。本研究通过免疫组织化学、反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、Western blot 方法,在结直肠癌及癌旁结直肠黏膜组织中,对该基因做进一步深入研究。以期对临床结直肠癌的风险评估和预后判断提供有力的依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

临床病理材料收集来自本院 2011—2017 年临床结直肠癌手术送检标本,共 128 例。患者年龄 33~82 岁,中位年龄 56 岁,其中淋巴结转移 86 例,无淋巴结转移 42 例。癌旁结直肠黏膜组织均取自距肿瘤原发灶大于 5 cm 的切除肠管。Western blot、RT-PCR 检测所采用的组织标本,均来自本院 2017 年结直肠癌手术切除的新鲜标本。本课题所有研究方法中的配对标本,采用的是同一患者手术切除的结直肠癌和其相对应的癌旁结直肠黏膜组织。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂

一抗 TFPC2 兔抗人 IgG 多克隆抗体购自美国 Thermo Fisher 公司, β -Tubulin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。免疫组织化学染色 SP 检测试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒以及 RT-PCR SYBR Green I 检测试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。蛋白提取试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白定量试剂盒,购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2.2 苏木素-伊红(HE)及免疫组织化学染色

用 10% 甲醛固定 24 h,石蜡包埋切片,常规 HE 染色,证实为结直肠癌的病理诊断。其后,采用免疫组织化学 SP 法染色,比较结直肠癌和癌旁结直肠黏膜组织中 TFPC2 的表达。主要步骤参考试剂盒说明书进行:脱蜡,乙二胺四乙酸(EDTA)抗原修复,过氧化氢作用;正常山羊血清封闭;一抗 TFPC2 兔抗人 IgG 多克隆抗体 1:200,4℃ 过夜;辣根酶标记羊抗兔/小鼠 IgG 多聚体,37℃ 作用 1 h;辣根过氧化物酶作用 30 min;DAB 显色,出现棕黄色着色后自来水冲洗终止反应;苏木素复染细胞核。磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗,作为阴性对照。

1.2.3 RT-PCR

提取结直肠癌和癌旁结直肠组织 RNA(按照 TaKaRa 试剂说明进行)。测定标本浓度,PCR 反应(TaKaRa 逆转录试剂盒)10 μ L 体系按说明书进行,TFPC2 引物序列按照参考文献[4]设计,具体引物序列为:正向 5'-TGG CTT CAA CAG TTC CCA TA-3',反向 5'-TCT GGC TGG TGG TTT GGT-3'。内参 GAPDH 引物序列为:正向 5'-TGT TCG TCA TGG GTG TGA ACC-3',反向 5'-ATG GAC TGT GGT CAT GAG TCC-3'。

1.2.4 Western blot

配制 10% 分离胶,5% 浓缩胶。依次加入 Marker 5 μ L(加拿大 Fermentas 公司),待

测样品 20 μ L。半干法转膜:采用聚偏氟乙烯(PVDF)膜(美国 Milliore 公司)。磷酸盐吐温缓冲液(PBST)漂洗印迹膜 2 次,放入 5% 蛋白封闭液(武汉博士德),室温封闭 4 h。一抗孵育:TFPC2 按 1:1 000 稀释,内参 Tubulin 按 1:1 000 稀释,4℃ 孵育过夜;二抗孵育,室温作用 2 h。ECL 显色:避光,在凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司)中观察、拍照。

1.3 免疫组织化学染色结果判断

显微镜下观察每例标本免疫组织化学染色表达情况:TFPC2 表达位于细胞核内,阳性染色为浅棕色至棕褐色。根据参考文献[5]方法评估染色结果,采用染色百分比评分与染色强度评分相结合方法。染色百分比评分:没有阳性信号为 0 分,1%~10% 细胞着色计为 1 分,11%~50% 的细胞着色计为 2 分,51%~80% 细胞着色计为 3 分,大于 80% 细胞着色计为 4 分。染色强度评分标准:阴性为 0 分,弱阳性为 1 分,中等阳性为 2 分,强阳性为 3 分。最后将染色阳性百分比得分与染色强度得分结果相乘,总分为 0~12 分,总分小于或等于 6 分设为阴性,大于 6 分设为阳性。病理阅片由 2 位有经验的病理医师双盲评分。

1.4 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件系统进行统计学分析,比较结直肠癌与癌旁结直肠黏膜组织间以及肿瘤不同临床病理参数间 TFPC2 表达阳性率差异采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TFPC2 的表达

免疫组织化学染色显示结直肠癌组织及癌旁结直肠黏膜组织中 TFPC2 的表达情况,TFPC2 蛋白主要位于细胞核内,在不同 TNM 分期的结直肠癌中其表达具有异质性,见图 1。TFPC2 的表达在低分化的结直肠癌组织的表达强于高、中分化的结直肠癌组织。统计结果显示,128 例的结直肠癌及癌旁结直肠黏膜组织中 TFPC2 的阳性表达率分别为 86% 和 21%。

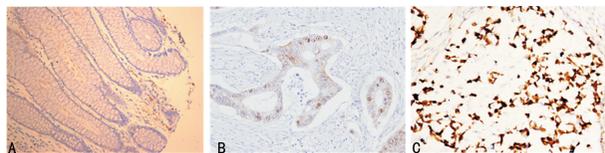


图 1 A:癌旁结直肠黏膜组织;B:高、中分化结直肠癌组织;C:低分化结直肠癌组织

图 1 TFPC2 在癌旁结直肠黏膜及癌组织中的表达(免疫组织化学 $\times 200$)

2.2 RT-PCR 结果

5 例配对标本中,结直肠癌组织 TFPC2 mRNA 的表达水平显著高于癌旁结直肠黏膜组织,前者是后者的 1.40~17.00 倍。见图 2。

2.3 Western blot 结果

TFPC2 在结直肠癌组织的表达量是对应癌旁结直肠黏膜组织中的 1.01~3.56 倍。见图 3。

2.4 TFPC2 的表达与结直肠癌临床病理特征的相关性

128 例的结直肠癌标本按照临床病理特征分组,TFPC2 的表达与患者性别、年龄、肿瘤部位和肿瘤大

小等无显著相关性,与浸润深度、分化程度、Dukes'分期和淋巴结转移等具有显著相关性(表 1)。结直肠癌组织中 TFCP2 的表达为阴性和阳性分别为 18/128 (14.1%)和 110/128(85.9%),而癌旁结直肠黏膜组织中 TFCP2 的阴性表达和阳性表达分别为 101/128 (78.9%)和 27/128 (21.1%),差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

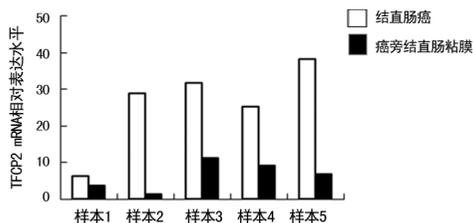


图 2 结直肠癌及癌旁结直肠黏膜组织中 TFCP2 mRNA 的表达水平

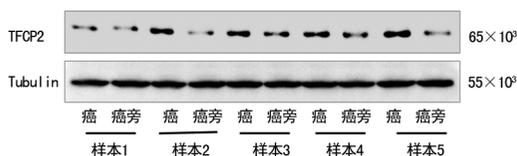


图 3 TFCP2 在结直肠癌肿瘤标本及癌旁结直肠黏膜组织中的蛋白表达水平

表 1 TFCP2 的表达与结直肠癌临床病理特征的关系 (n)

临床病理特征	n	TFCP2		P
		阴性	阳性	
性别				0.469
男	67	8	59	
女	61	10	51	
年龄				0.896
<50 岁	48	7	41	
≥50 岁	80	11	69	
部位				0.943
直肠	65	9	56	
结肠	63	9	54	
肿瘤大小				0.624
<4 cm	42	5	37	
≥4 cm	86	13	73	
浸润深度				0.001
黏膜内/肌层	25	14	11	
浆膜/外层	103	4	99	
分化程度				0.011
高/中分化	79	16	63	
低分化	49	2	47	
Dukes'分期				0.001
A+B	21	12	9	
C+D	107	6	101	
淋巴结转移				0.001
是	86	5	81	
否	42	13	29	

3 讨 论

TFCP2 的 DNA 结合域有一个特点,它类似免疫蛋白的结构,与肿瘤抑制基因 TP53 相类似,因此其被认为很可能是 p53 基因的前体^[6]。TFCP2 也被认为

可能扮演了抑癌基因的功能。然而,随着研究者不断地研究发现,TFCP2 在不同肿瘤发生、发展中可能发挥了不同作用。一方面发挥了促癌的作用,例如,在对肝细胞性肝癌的研究中发现,在超过 90%的肝细胞性肝癌标本,相对于正常肝组织,TFCP2 是呈高表达的,它的表达水平与肝细胞性肝癌的进展密切相关^[7]。在对口腔鳞状细胞癌的研究中发现,TFCP2 在肿瘤细胞的表达是显著增强的,它与肿瘤 TNM 分期相关^[8]。在对宫颈癌、卵巢癌的研究中发现 TFCP2 的表达和肿瘤的进展密切相关^[9-10]。β-catenin/TCF 信号通路在疾病的发生、发展过程中发挥了极其重要的作用^[11]。有研究者在对胰腺癌的研究中发现,TFCP2 可以激活 β-catenin/TCF 信号通路,从而促进了胰腺癌的侵袭转移^[3]。然而 β-catenin/TCF 这条通路同样在结直肠癌的侵袭、转移中发挥了关键的作用^[12]。因此,TFCP2 在结直肠癌的侵袭、转移中是否发挥此作用还有待进一步研究。另一方面,有研究者在对恶性黑色素瘤的研究中发现,TFCP2 在恶性黑色素瘤肿瘤发生、发展过程中发挥了抑癌基因的功能。TFCP2 的过度表达抑制了恶性黑色素瘤细胞的生长。TFCP2 与死亡相关的蛋白激酶(DAPK)基因启动子区结合,正向调节其转录。DAPK 在许多肿瘤中被证实其发挥的是抑制肿瘤细胞功能。因此,有研究表明,在某些情况下 TFCP2 可以起到抑制肿瘤的作用^[4]。

然而,本研究结果表明,TFCP2 的表达与肿瘤患者发生的年龄、性别肿瘤的部位及大小无关,与肿瘤的分化、浸润深度、侵袭转移、Dukes'分期等密切相关。通过 RT-PCR 及 Western blot 进一步证实 TFCP2 在结直肠癌组织的表达是显著高于癌旁结直肠组织,说明其高表达可能参与了肿瘤的发生和进展。但其与患者预后之间的关系,尚有待以后的随访资料来加以明确。结直肠癌发生的具体原因及机制尚未阐明,目前,研究者们更接受 FEARON 等^[13]的大肠癌发生的经典模式,该模式认为肿瘤的发生可能是个复杂的过程,涉及多基因改变从而导致结直肠癌的发生,包括腺瘤性结肠息肉(APC)病基因,微卫星不稳定,p53 基因的突变与缺失等。TFCP2 基因曾被认为是 TP53 的前体基因,TFCP2 基因与 TP53 基因在结直肠癌中的发生过程中是否有着内在的联系,尚有待进一步研究。本研究结果表明,TFCP2 在结直肠癌组织中高表达,并且在淋巴结转移的病理标本中显著高表达,这提示 TFCP2 可能在结直肠癌的发展演进过程中发挥重要的作用,可能扮演了促癌的角色。其具体机制有待于进一步的研究证实。

综上所述,TFCP2 的表达与结直肠癌分化、Dukes'分期以及侵袭转移存在显著相关性,在肿瘤的发生、发展过程中发挥了重要的促癌作用。在临床标本中常规检测 TFCP2 的表达对于疾病的转移风险评估和预后判断有重要的提示作用。同时,通过对 TFCP2 的分子调控机制研究,可能对结直肠癌有重要的科研和临床指导价值。 (下转第 1719 页)

可快速拔除喉罩,更快进行手术周转。另外,患者未使用肌松药,术后可更快进食、恢复,符合胸科手术加速康复外科理念。最后,椎旁神经阻滞在胸科术后止痛的作用确切,术中阿片类药物的使用量少,减少恶心、呕吐及便秘的发生率^[9-15]。综上所述,该方法与传统双腔管插管全身麻醉比具有苏醒快、疼痛轻、恢复快等特点。

参考文献

- [1] CAMPOS J H, KERNSTINE K H. A comparison of a left-sided Broncho-Cath with the torque control blocker univent and the wire-guided blocker[J]. *Anesth Analg*, 2003, 96(1):283-289.
- [2] 金清尘. 单肺麻醉的低氧血症[J]. *中华麻醉学杂志*, 1997(11):699-700.
- [3] 张加强. 超声引导下胸椎旁神经阻滞应用现状[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2017, 31(2):111-112.
- [4] POMPEO E, MINEO D, ROGLIANI P, et al. Feasibility and results of awake thoracoscopic resection of solitary pulmonary nodules[J]. *Ann Thorac Surg*, 2004, 78(5):1761-1768.
- [5] CHEN J S, CHENG Y J, HUNG M H, et al. Nonintubated thoracoscopic lobectomy for lung cancer[J]. *Ann Surg*, 2011, 254(6):1038-1043.
- [6] POMPEO E, TACCONI F, FRASCA L, et al. Awake thoracoscopic bullaplasty[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2011, 39(6):1012.
- [7] 杨汉字, 董庆龙, 梁丽霞, 等. 保留自主呼吸的喉罩全身麻

醉对胸腔镜肺大疱切除术的应用[J]. *广州医科大学学报*, 2015(3):45-48.

- [8] LI S, LIU J, HE J, et al. Video-assisted transthoracic surgery resection of a tracheal mass and reconstruction of trachea under non-intubated anesthesia with spontaneous breathing[J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8(3):575-585.
- [9] 蔡开灿, 王向东, 叶靖, 等. 喉罩全麻与气管插管全麻胸腔镜手术治疗肺大疱的临床对照研究[J]. *南方医科大学学报*, 2013, 33(5):756-760.
- [10] 何建华, 马曙亮, 顾连兵. 超声引导椎旁神经阻滞在开胸手术中的应用[J]. *临床麻醉学杂志*, 2013, 29(1):31-34.
- [11] 王春影, 岳子勇. 椎旁神经阻滞在胸科手术术后镇痛的应用[J]. *临床肺科杂志*, 2017, 22(12):2309-2311, 2314.
- [12] AL-DEHAYAT G, AL-EDWAN A, MAMKING M, et al. Thoracic paravertebral block and morphine versus morphine alone for post thoracoscopy pain[J]. *J Royal Med Soc*, 2012, 19(3):19-22.
- [13] EL-DAWLATLY A, HAJJAR W, ALNASSAR S A, et al. Ultrasound-guided thoracic paravertebral block for postoperative pain treatment after thoracoscopic surgery[J]. *Intern J Ultr Appl Technol*, 2010, 1(1):23-26.
- [14] 杨纲华, 林静丽, 何绮桃, 等. 超声引导下连续胸椎旁神经阻滞对开胸术后肺功能的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(2):118-121.
- [15] 张洪江, 潘维敏, 张林, 等. 喉罩全麻和气管插管全麻在单孔胸腔镜肺叶切除术中的临床对照研究[J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(3):455-458.

(收稿日期:2018-09-28 修回日期:2018-12-23)

(上接第 1715 页)

参考文献

- [1] 李道娟, 李倩, 贺宇彤. 结直肠癌流行病学趋势[J]. *肿瘤防治研究*, 2015, 42(3):305-310.
- [2] KOTARBA G, KRZYWINSKA E, GRABOWSKA A I, et al. TFCP2/TFCP2L1/UBP1 transcription factors in cancer[J]. *Cancer Lett*, 2018, 420(420):72-79.
- [3] DAI Y D, CAI Y, ZHAO J Y, et al. TFCP2 activates beta-catenin/TCF signaling in the progression of pancreatic cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(41):70538-70549.
- [4] GOTO Y, YAJIMA I, KUMASAKA M, et al. Transcription factor LSF (TFCP2) inhibits melanoma growth[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(3):2379-2390.
- [5] AIGELSREITER A, RESS A L, BETTERMANN K, et al. Low expression of the putative tumour suppressor spinophilin is associated with higher proliferative activity and poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(9):1830-1837.
- [6] KOKOSZYNSKA K, OSTROWSKI J, RYCHLEWSKI L, et al. The fold recognition of CP2 transcription factors gives new insights into the function and evolution of tumor suppressor protein p53 [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(18):2907-2915.
- [7] YOO B K, EMDAD L, GREDLER R, et al. Transcription

factor Late SV40 Factor (LSF) functions as an oncogene in hepatocellular carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(18):8357-8362.

- [8] CHEN C H, TSAI H T, CHUANG H C, et al. Metformin disrupts malignant behavior of oral squamous cell carcinoma via a novel signaling involving Late SV40 factor/Aurora-A[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):1358.
- [9] BRONIARCZYK J K, WAROWICKA A, KWASNIEWSKA A, et al. Expression of TSG101 protein and LSF transcription factor in HPV-positive cervical cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(5):1409-1413.
- [10] KAUR M, MACPHERSON C R, SCHMEIER S, et al. In silico discovery of transcription factors as potential diagnostic biomarkers of ovarian cancer[J]. *BMC Syst Biol*, 2011, 5:144.
- [11] CLEVERS H, NUSSE R. Wnt/ β -catenin signaling and disease[J]. *Cell*, 2012, 149(6):1192-1205.
- [12] SCHINZARI V, TIMPERI E, PECORA G, et al. Wnt3a/ β -Catenin signaling conditions differentiation of partially exhausted t-effector cells in human cancers[J]. *Cancer Immunol Res*, 2018, 6(8):941-952.
- [13] FEARON E R, VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumourigenesis[J]. *Cell*, 1990, 61(5):759-767.

(收稿日期:2018-09-22 修回日期:2018-12-24)