

DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20170723.003

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20170723.2122.006.html>

结肠癌组织中 RNF181、TPX2 的表达量及其与癌细胞活力、血管新生的相关性分析

熊 超

(湖北省武汉市商职医院外一科,湖北 武汉 430021)

[摘要] **目的:**研究结肠癌组织中 RNF181、TPX2 的表达量及其与癌细胞活力、血管新生的相关性。**方法:**收集在我院接受手术切除的结肠癌组织及癌旁组织,制作石蜡切片并对 RNF181、TPX2 进行免疫组化染色,判断蛋白阳性率;抽提 RNA 并进行荧光定量 PCR 反应,测定 RNF181、TPX2、VEGF、VEGFR1、VEGFR2、HIF-1 α 的 mRNA 表达量;采集结肠癌患者的术前血清标本并测定 CEA、CA199、CA242 的含量。**结果:**结肠癌组织中 RNF181 的 mRNA 表达量及蛋白阳性率均显著低于癌旁组织,TPX2 的 mRNA 表达量及蛋白阳性率均显著高于癌旁组织;结肠癌组织中 RNF181 阳性患者的血清 CEA、CA199、CA242 的含量以及结肠癌组织 VEGF、VEGFR1、VEGFR2、HIF-1 α 的 mRNA 表达量均显著低于 RNF181 阴性患者;结肠癌组织中 TPX2 阳性患者的血清 CEA、CA199、CA242 的含量以及结肠癌组织 VEGF、VEGFR1、VEGFR2、HIF-1 α 的 mRNA 表达量均显著高于 TPX2 阴性患者。**结论:**结肠癌组织中低表达的 RNF181、高表达的 TPX2 与癌细胞增殖过程以及血管新生过程密切相关。

[关键词] 结肠癌;沉默环指蛋白 181;Xklp2 靶蛋白;肿瘤标志物;血管新生

[中图分类号] R735.3+5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-1237(2017)14-1969-03

RNF181 and TPX2 expression in colon cancer tissue and their correlation with cancer cell viability and angiogenesis

XIONG Chao

(Surgery Department No. 1, Wuhan Commercial Staff Hospital in Hubei Province, Wuhan City, Hubei Province, 430021)

[Foundation Project]: It is supported by Public Health Project of Wuhan Health and Family Planning Commission (WG13D12).

[Author]: XIONG Chao (1980-), Male, M.M., Attending Physician, Tel: 13986053773, E-mail: xiongchao2017@sina.com.

Received: 2017-07-10 Revised: 2017-07-15

JHMC, 2017;23(14):1969-1971

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective:** To study the RNF181 and TPX2 expression in colon cancer tissue and their correlation with cancer cell viability and angiogenesis. **Methods:** Colon cancer tissue and tissue adjacent to carcinoma that were surgically removed in our hospital between July 2013 and May 2016 were collected and made into paraffin sections, immunohistochemical staining for RNF181 and TPX2 was conducted, and the positive protein rate was determined; RNA was extracted for fluorescence quantitative PCR reaction, and the mRNA expression of RNF181, TPX2, VEGF, VEGFR1, VEGFR2 and HIF-1 α were determined; the preoperative serum samples of colon cancer patients were collected to determine the contents of CEA, CA199 and CA242 levels. **Results:** mRNA expression and positive protein rate of RNF181 in colon cancer tissue were significantly lower than those in adjacent tissue while mRNA expression and positive protein rate of TPX2 were significantly higher than those in adjacent tissue; CEA, CA199 and CA242 levels in serum as well as VEGF, VEGFR1, VEGFR2 and HIF-1 α mRNA expression in colon cancer tissue of patients with positive RNF181 in colon cancer tissue were significantly lower than those of patients with negative RNF181; CEA, CA199 and CA242 levels in serum as well as VEGF, VEGFR1, VEGFR2 and HIF-1 α mRNA expression

[基金项目] 武汉市卫计委公共卫生科研项目(WG13D12)

[作者简介] 熊超(1980-),男,湖北武汉人,硕士,主治医师,电话:13986053773, E-mail: xiongchao2017@sina.com.

[收稿日期] 2017-07-10 [修回日期] 2017-07-15 网络出版时间:2017-07-23 21:22:39

in colon cancer tissue of patients with positive TPX2 in colon cancer tissue were significantly higher than those of patients with negative TPX2. **Conclusions:** The low expression of RNF181 and high expression of TPX2 in colon cancer tissue are closely related to the cancer cell proliferation and angiogenesis process.

[KEY WORDS] Colon cancer; Ring finger protein 181; Xklp2 target protein; Tumor marker; Angiogenesis

结肠癌是我国常见的消化系统恶性肿瘤之一且发病率、死亡率均呈逐年升高的趋势^[1,2]。癌细胞具有极强的增殖能力,病灶内大量增殖的癌细胞不仅能够促进肿瘤组织生长、同时还能够促进肿瘤的远处转移。目前,关于结肠癌细胞增殖的调控机制尚未阐明^[3,4]。沉默环指蛋白 181(ring finger protein 181,RNF181)和 Xklp2 靶蛋白(targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2,TPX2)是近年来新发现的两种结肠癌相关分子。已有细胞实验的研究结果表明,靶向沉默 RNF181 的表达能够促进结肠癌细胞的增殖、而靶向沉默 TPX2 的表达则能够抑制结肠癌细胞的增殖^[5,6]。但是关于结肠癌组织中 RNF181、TPX2 表达量的变化趋势及其与细胞增殖的相关性尚未见报道。在下列研究中,我们分析了结肠癌组织中 RNF181、TPX2 的表达量及其与癌细胞活力、血管新生的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2013 年 7 月~2016 年 5 月期间在我院接受手术切除的结肠癌组织及癌旁组织,共 42 例,所有患者均经结肠镜及病理检查明确结肠癌的诊断、术前未接受过化疗及靶向治疗,入院后接受根治性手术且术后经病理切片确诊为结肠癌。42 例结肠癌标本来源的患者平均年龄(53.2 ± 7.3)岁,男性 29 例,女性 13 例,中高分化 26 例、低未分化 16 例。

1.2 RNA 抽提及检测方法

取液氮冷冻的结肠癌组织及癌旁组织,采用加入 RNA 总提取液 Trizol 后充分研磨组织,而后依次加入三氯甲烷和异丙醇进行萃取、离心,得到 RNA 后进行反转录,取反转录得到的 cDNA 样本进行荧光定量 PCR 扩增,扩增的基因包括 RNF181、TPX2。根据扩增的曲线计算上述基因的 mRNA 含量。

1.3 免疫组化染色及判读方法

选择石蜡包埋的结肠癌组织及癌旁组织,制作石蜡切片后进行免疫组化染色,分别孵育 RNF181、TPX2 的第一抗体及其对应的种属特异性第二抗体,DAB 显色、苏木精复染后脱水、中性树脂封片。在显微镜下观察切片,阳性染色的 RNF181、TPX2 位于胞浆中且呈棕黄色,将 5 个高倍视野内 RNF181、TPX2 阳性细胞比例 $> 20\%$ 的组织切片判断为 RNF181、TPX2 阳性。

1.4 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件录入数据并进行分析,两组间计量资料的分析采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠癌组织中 RNF181、TPX2 的表达量

结肠癌组织中 RNF181 的 mRNA 表达量及蛋白阳性率均显著低于癌旁组织,TPX2 的 mRNA 表达量及蛋白阳性率均显著高于癌旁组织。结肠癌组织和癌旁组织中 RNF181、TPX2 mRNA 表达量及蛋白阳性率的差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 结肠癌组织中 RNF181、TPX2 的表达量

| 组织来源 | 样本量 | mRNA 表达量($\bar{x} \pm s$) | | 蛋白阳性率[n(%)] | |
|------------|-----|-----------------------------|-----------------|-------------|------------|
| | | RNF181 | TPX2 | RNF181 | TPX2 |
| 结肠癌组织 | 42 | 0.38 \pm 0.08 | 2.46 \pm 0.33 | 14(33.33%) | 31(73.81%) |
| 癌旁组织 | 42 | 1.04 \pm 0.14 | 1.12 \pm 0.16 | 23(54.76%) | 18(42.86%) |
| T/χ^2 | | 16.822 | 11.489 | 6.028 | 9.438 |
| P | | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |

2.2 结肠癌组织中 RNF181、TPX2 表达量与血清肿瘤标志物的相关性

结肠癌组织中 RNF181 阳性患者的血清 CEA、CA199、CA242 含量均显著低于 RNF181 阴性患者,结肠癌组织中 TPX2 阳性患者的血清 CEA、CA199、CA242 含量均显著高于 TPX2 阴性患者。见表 2、3。

表 2 结肠癌组织中 RNF181 阳性表达和阴性表达患者的肿瘤标志物含量($\bar{x} \pm s$)

| RNF181 表达 | 例数 | CEA (ng/mL) | CA199 (U/mL) | CA242 (U/mL) |
|-----------|----|------------------|-------------------|------------------|
| 阳性 | 14 | 15.32 \pm 2.28 | 61.76 \pm 8.34 | 37.81 \pm 5.23 |
| 阴性 | 28 | 31.47 \pm 5.13 | 97.25 \pm 11.78 | 61.58 \pm 7.61 |
| t | | 10.948 | 7.282 | 8.768 |
| P | | <0.05 | <0.05 | <0.05 |

表 3 结肠癌组织中 TPX2 阳性表达和阴性表达患者的肿瘤标志物含量($\bar{x} \pm s$)

| TPX2 表达 | 例数 | CEA | CA199 | CA242 |
|---------|----|------------------|--------------------|------------------|
| 阳性 | 31 | 33.74 \pm 5.78 | 102.71 \pm 12.17 | 72.12 \pm 9.34 |
| 阴性 | 11 | 13.18 \pm 2.02 | 55.36 \pm 7.09 | 31.24 \pm 4.39 |
| t | | 18.292 | 9.181 | 12.038 |
| P | | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

2.3 结肠癌组织中 RNF181、TPX2 表达量与血管新生分子的相关性

结肠癌组织中 RNF181 阳性患者结肠癌组织 VEGF、VEGFR1、VEGFR2、HIF-1 α 的 mRNA 表达量均显著低于 RNF181 阴性患者;结肠癌组织中 TPX2 阳性患者结肠癌组

织 VEGF、VEGFR1、VEGFR2、HIF-1 α 的 mRNA 表达量均显著高于 TPX2 阴性患者。见表 4、5。

表 4 结肠癌组织中 RNF181 阳性表达和阴性表达患者的血管新生分子含量($\bar{x} \pm s$)

| RNF181 表达 | 例数 | VEGF | VEGFR1 | VEGFR2 | HIF-1 α |
|-----------|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 阳性 | 14 | 0.59 \pm 0.07 | 0.37 \pm 0.04 | 0.42 \pm 0.05 | 0.51 \pm 0.06 |
| 阴性 | 28 | 1.04 \pm 0.13 | 1.07 \pm 0.12 | 1.11 \pm 0.14 | 0.98 \pm 0.10 |
| <i>t</i> | | 8.038 | 15.581 | 13.246 | 9.183 |
| <i>P</i> | | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

表 5 结肠癌组织中 TPX2 阳性表达和阴性表达患者的血管新生分子含量($\bar{x} \pm s$)

| TPX2 表达 | 例数 | VEGF | VEGFR1 | VEGFR2 | HIF-1 α |
|----------|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 阳性 | 31 | 1.09 \pm 0.14 | 1.02 \pm 0.13 | 1.05 \pm 0.13 | 1.01 \pm 0.11 |
| 阴性 | 11 | 0.52 \pm 0.06 | 0.41 \pm 0.03 | 0.49 \pm 0.06 | 0.45 \pm 0.05 |
| <i>t</i> | | 8.727 | 14.128 | 12.318 | 11.937 |
| <i>P</i> | | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

3 讨论

细胞无限增殖是恶性肿瘤最突出的生物学特征,也是造成肿瘤发生、发展以及复发、转移的生物学基础。结肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一,癌细胞具有极强的增殖能力,手术切除后的复发率和转移率均较高。但是,目前关于结肠癌细胞增殖的调控机制尚未完全阐明。沉默环指蛋白 181 (RNF181)和 Xklp2 靶蛋白(TPX2)是近年来新发现的细胞增殖和凋亡调控基因,在多种恶性肿瘤中均检测到 RNF181 和 TPX2 的异常表达^[7,8]。RNF181 是一类 E3 泛素连接酶,参与泛素-蛋白酶体途径对细胞周期、细胞分化、DNA 损伤修复相关基因的降解,进而影响细胞的增殖和凋亡^[9]。TPX2 是一类微管相关蛋白,在细胞周期的 G1 期-S 期高表达的 TPX2 能够与 Aurora A 激酶相互作用并促进 Aurora A 在纺锤体微管中定位,进而启动着丝点微管形成及纺锤体聚集^[10-12]。

近年来,有国内学者的研究观察到 RNF181 和 TPX2 对结肠癌细胞的增殖具有调控作用。牛文博^[5]对结肠癌 SW-480 细胞的研究发现,靶向沉默 RNF181 能够通过 MAPK/ERK 信号转导通路的激活来促进细胞增殖;简捷^[6]对结肠癌 SW-480 细胞的研究发现,靶向沉默 TPX2 能够通过下调 MMP-9 和 VEGF 的表达来抑制细胞增殖。根据以上学者的细胞学研究结果可知靶向沉默 RNF181 和 TPX2 的效应分别为促增殖和促凋亡,由此我们推测:RNF181 和 TPX2 分别具有促凋亡和促增殖的效应。但是,关于结肠癌组织中 RNF181 和 TPX2 的表达及其对细胞增殖、凋亡的影响仍未见明确报道。在上述研究中,我们首先对结肠癌组织中 RNF181 和 TPX2 的表达量进行了分析,结果显示:结肠癌组

织中 RNF181 的 mRNA 表达量及蛋白阳性率均显著低于癌旁组织,TPX2 的 mRNA 表达量及蛋白阳性率均显著高于癌旁组织。这就说明结肠癌组织中 RNF181 呈低表达局势、而 TPX2 呈高表达趋势。

RNF181 和 TPX2 分别具有促凋亡和促增殖的效应,结肠癌组织中低表达的 RNF181 和高表达的 TPX2 能够共同发挥促进细胞增殖、抑制细胞凋亡的作用,进而促进肿瘤病灶的生长。为了进一步明确 RNF181 和 TPX2 对结肠癌细胞增殖的影响,我们对血清中肿瘤标志物进行了分析。CEA、CA199、CA242 是结肠癌常用的肿瘤标志物,能够反应肿瘤的负荷程度以及癌细胞的活力^[13,14],由分析结果可知:结肠癌组织中 RNF181 阳性以及 TPX2 阴性患者的血清 CEA、CA199、CA242 含量均显著低于 RNF181 阴性以及 TPX2 阳性患者。这就说明肿瘤组织中 RNF181 的高表达和 TPX2 的低表达能够促进癌细胞的增殖、增加肿瘤标志物的含量。肿瘤组织中血管新生是细胞增殖的生物学基础,能够为增殖过程提供所需的营养物质。VEGF 是介导血管新生过程最重要的分子,在 HIF-1 α 作用下高表达的 VEGF 能够与受体 VEGFR1、VEGFR2 相互作用并诱导新生血管的形成^[15-17]。我们通过分析结肠癌组织中上述血管新生分子的表达量可知:结肠癌组织中 RNF181 阳性以及 TPX2 阴性患者结肠癌组织 VEGF、VEGFR1、VEGFR2、HIF-1 α 的 mRNA 表达量均显著低于 RNF181 阴性以及 TPX2 阳性患者。这就说明肿瘤组织中 RNF181 的高表达和 TPX2 的低表达能够促进结肠癌中 VEGF 所介导的血管新生。

综上所述,结肠癌组织中低表达的 RNF181、高表达的 TPX2 与癌细胞增殖过程以及血管新生过程密切相关。

参考文献

- Quintana JM, Gonzalez N, Anton-Ladislao A, et al. Colorectal cancer health services research study protocol: the CCR-CA-RESS observational prospective cohort project [J]. BMC Cancer, 2016, 8(16): 435.
- Abacjew-Chmyłk AO, Chmyłko Ł, Wydra DG, et al. Multiple multiparity is a negative prognostic factor for endometrial cancer in Poland [J]. Ginekol Pol, 2016, 87(3): 178-182.
- Stornes T, Wibe A, Nesbakken A, et al. National Early Rectal Cancer Treatment Revisited [J]. Dis Colon Rectum, 2016, 59(7): 623-629.
- Warrier SK, Heriot AG, Lynch AC. Surgery for Locally Recurrent Rectal Cancer: Tips, Tricks, and Pitfalls [J]. Clin Colon Rectal Surg, 2016, 29(2): 114-122.
- 牛文博,王德海,李鹏,等.沉默 RNF 181 基因表达可促进结肠癌 SW480 细胞的生长[J].肿瘤,2016,36(6):621-627.

- 中国药房, 2016, 27(15): 2059-2061.
- 6 刘建群, 高俊博, 刘小红. 冬凌草的化学成分研究[J]. 中国药房, 2015, 26(33): 4724-4726.
 - 7 熊辉. 冬凌草现代药理化学成份及临床用药研究[J]. 内蒙古中医药, 2014, 1(22): 96-97.
 - 8 Bishop AJ, Ensor J, Moulder SL, et al. Prognosis for patients with metastatic breast cancer who achieve a no-evidence-of-disease status after systemic or local therapy [J]. *Cancer*, 2015, 121(24): 4324-4332.
 - 9 Goodin S, Barbour S, Song J, et al. Safety and tolerability of eribulin mesylate in patients with pretreated metastatic breast cancer [J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2015, 72(24): 2150-5156.
 - 10 Welch HG, Gorski DH, Albertsen PC. Trends in metastatic breast and prostate cancer [J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(6): 596.
 - 11 Janni W, Sarosiek T, Karaszewska B, et al. Final overall survival analysis of a phase II trial evaluating vinorelbine and lapatinib in women with ErbB2 overexpressing metastatic breast cancer [J]. *Breast*, 2015, 24(6): 769-773.
 - 12 李戎. 新辅助化疗联合保乳术治疗乳腺癌的临床观察[J]. 当代医学, 2013, 19(6): 22-23.
 - 13 Andreopoulou E, Sparano JA. Chemotherapy in patients with anthracycline- and taxane-pretreated metastatic breast cancer: an overview [J]. *Curr Breast Cancer Rep*, 2013, 5(1): 42-50.
 - 14 胡赛男, 张莉莉, 俞乔, 等. 剂量密集新辅助化疗方案治疗乳腺癌的临床效果[J]. 实用临床医药杂志, 2015, 19(19): 39-43.
 - 15 郭艳静, 刘丽芳. 中医中药治疗乳腺癌临床研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(8): 1774-1777.
 - 16 张莉, 田欢, 李清琴, 等. 132 例乳腺癌患者中医体质特征与中医证候的相关性研究[J]. 云南中医中药杂志, 2012, 33(8): 13-15.
 - 17 高欣, 刘淑真, 刘巧玲, 等. 冬凌草临床抗癌疗效观察[J]. 癌症, 1984, 3(3): 201-202.
 - 18 樊青霞, 王瑞, 王瑞林. 冬凌草单药及与化疗合用治疗食管癌 205 例[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(23): 2534-2537.
 - 19 Shu J, Li CG, Liu Y, et al. Comparison of serum tumor associated material (TAM) with conventional biomarkers in cancer patients [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(5): 2399-2403.
 - 20 Stiekema A, Boldingh QJ, Korse CM, et al. Serum human epididymal protein 4 (HE4) as biomarker for the differentiation between epithelial ovarian cancer and ovarian metastases of gastrointestinal origin [J]. *Gynecol Oncol*, 2015, 136(3): 562-566.
 - 21 廖洪宇. 血清 TK1、CA15-3 和 CEA 水平对乳腺癌化疗疗效的评估[J]. 山西医科大学学报, 2014, 45(2): 123-125.
 - 22 薛健, 宋洁, 沈彩霞. 冬凌草的抗肿瘤作用研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(9): 2277-2278.
 - 23 张俊峰, 陈规划, 陆敏强. 冬凌草甲素对人肝癌 BEL-7402 细胞的增殖抑制作用及其作用机制[J]. 中成药, 2006, 28(9): 1325.
 - 24 李娜, 金平, 张春洁. 冬凌草甲素诱导人卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡及其机制[J]. 肿瘤防治研究, 2013, 40(1): 36-41.

(上接第 1971 页)

- 6 简捷, 黄缘, 刘利珍, 等. 靶向沉默 TPX2 基因可抑制人结肠癌 SW480 细胞的增殖和侵袭[J]. 肿瘤, 2016, 36(6): 628-634.
- 7 Pedersen SM, Chan W, Jattani RP, et al. Correction for Pedersen et al., Regulation of CARD11 Signaling and Lymphoma Cell Survival by the E3 Ubiquitin Ligase RNF181 [J]. *Mol Cell Biol*, 2016, 36(8): 1322.
- 8 Wu L, Zhou F, Yin X, et al. Overexpressed targeting protein for Xklp2 (TPX2) serves as a promising prognostic marker and therapeutic target for gastric cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17(8): 824-832.
- 9 Pedersen SM, Chan W, Jattani RP, et al. Negative Regulation of CARD11 Signaling and Lymphoma Cell Survival by the E3 Ubiquitin Ligase RNF181 [J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 36(5): 794-808.
- 10 Gupta A, Jain R, Wahi D, et al. Abrogation of AuroraA-TPX2 by novel natural inhibitors: molecular dynamics-based mechanistic analysis [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 626-633.
- 11 Liang B, Jia C, Huang Y, et al. TPX2 Level Correlates with Hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation, Apoptosis, and EMT [J]. *Dig Dis Sci*, 2015, 60(8): 2360-2372.
- 12 Takahashi Y, Sheridan P, Niida A, et al. The AURKA/TPX2 axis drives colon tumorigenesis cooperatively with MYC [J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(5): 935-942.
- 13 Peng Y, Zhai Z, Li Z, et al. Role of blood tumor markers in predicting metastasis and local recurrence after curative resection of colon cancer [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(1): 982-990.
- 14 王勇, 赵政, 倪平. 血清 CA72-4、CA199、CEA 在结直肠癌患者中的检测及临床意义 [J]. 海南医学院学报, 2015, 21(5): 815-817.
- 15 Liu M, Du K, Fu Z, et al. Hypoxia-inducible factor 1- α up-regulates the expression of phospholipase D2 in colon cancer cells under hypoxic conditions [J]. *Med Oncol*, 2015, 32(1): 394.
- 16 程佩宇, 李富. 结直肠癌患者整合素 $\alpha\beta_6$ 的表达及与 VEGF 的相关关系 [J]. 海南医学院学报, 2016, 22(11): 1137-1139.
- 17 Bakirtzi K, West G, Fiocchi C, et al. The neurotensin-HIF-1 α -VEGF α axis orchestrates hypoxia, colonic inflammation, and intestinal angiogenesis [J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(12): 3405-3414.