

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.24.009

文章编号: 1005-8982(2017)24-0044-05

## 结直肠癌组织中卷曲螺旋结构域 12 蛋白表达 与肿瘤生长侵袭的关系\*

耿玮, 叶智斌, 范亚男, 梁巍, 张梦阳

(河北省人民医院 普外五科, 河北 石家庄 050051)

**摘要:目的** 观察结直肠癌组织中卷曲螺旋结构域 12(CCDC12)蛋白的表达情况,并探讨 CCDC12 蛋白与肿瘤生长侵袭的关系。**方法** 免疫组织化学 SP 法检测 94 例结直肠癌组织及癌旁正常肠黏膜组织中 CCDC12 蛋白的表达,同时检测与肿瘤生长侵袭有关的蛋白质 Cyclin D1、P21、MMP-9 及 TIMP-1 蛋白表达。记录患者肿瘤生物学特征,分析 CCDC12 蛋白与结直肠癌生物学特征及 Cyclin D1、P21、MMP-9 及 TIMP-1 蛋白的关系。**结果** CCDC12、CyclinD1、MMP-9 及 TIMP-1 蛋白在结直肠癌组织中阳性表达率均高于癌旁正常肠黏膜组织( $\chi^2=38.480、30.312、38.368$  及  $7.667$ , 均  $P<0.01$ ),P21 蛋白在两种组织中差异无统计学意义( $\chi^2=0.862, P=0.353$ )。在结直肠癌组织中 CCDC12 蛋白阳性表达与肿瘤细胞分化、浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期有关( $\chi^2=5.130、5.902、9.760$  及  $4.458, P=0.024、0.015、0.002$  及  $0.035$ )。Spearman 相关性分析发现,CCDC12 与 Cyclin D1、MMP-9 蛋白表达呈正相关( $r=0.302$  和  $0.365, P=0.003$  和  $0.001$ ),CCDC12 与 P21 表达呈负相关( $r=-0.287, P=0.005$ )。**结论** 结直肠癌中存在 CCDC12 蛋白表达增高现象,CCDC12 可能通过与 CyclinD1、P21 及 MMP-9 蛋白的相互作用参与了结直肠癌的生长及侵袭过程。

**关键词:** 结直肠癌;卷曲螺旋结构域 12;肿瘤生长;肿瘤侵袭

**中图分类号:** R735.3

**文献标识码:** A

## Effect of Coiled-coil domain-containing protein 12 on growth and invasion of colorectal cancer tissues\*

Wei Geng, Zhi-bin Ye, Ya-nan Fan, Wei Liang, Meng-yang Zhang

(Department of Fifth General Surgery, Hebei General Hospital,  
Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of Coiled-coil domain-containing protein 12 (CCDC12) on growth and invasion of colorectal cancer. **Methods** Immunohistochemistry (IHC) was used to detect expression of CCDC12 in 94 cases of colorectal cancer and associated adjacent healthy tissues. Growth and invasion related proteins including CyclinD1, P21, matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) were also determined. Biological characteristics of cancer were recorded and correlated with concentrations of CCDC12, CyclinD1, P21, MMP-9, TIMP-1 proteins. **Results** Positive expression rates of CCDC12, CyclinD1, MMP-9 and TIMP-1 in colorectal cancer tissues were significantly increased when compared with those in healthy tissues ( $\chi^2 = 38.480, 30.312, 38.368$  and  $7.667$ , respectively) ( $P < 0.01$ ) while no significant difference was observed in concentration of P21 in the tissues ( $\chi^2 = 0.862, P = 0.353$ ). Intimate correlations of CCDC12 with characters of tumor such as differentiation, depth of invasion, lymphatic metastasis, and TNM stages ( $\chi^2 = 5.130, 5.902, 9.760$  and  $4.458; P = 0.024, 0.015, 0.002$  and  $0.035$ , respectively) were observed. Spearman correlation analysis showed that the expression of CCDC12 was positively correlated with Cyclin D1 and MMP-9 ( $r = 0.302$  and  $0.365, P = 0.003$  and  $0.001$ , respectively)

收稿日期:2017-01-10

\* 基金项目:河北省科技计划项目(No:16277218)

while negative correlation was found between CCDC12 and P21 ( $r = -0.287, P = 0.005$ ). **Conclusions** CCDC12 is highly expressed in colorectal cancer, which affects Cyclin D1-, P21- and MMP-9-mediated growth and metastasis of colorectal cancer.

**Keywords:** colorectal cancer; CCDC12 gene; tumor growth; tumor invasion

我国结直肠癌的发病率占恶性肿瘤第 4 位,死亡率居第 5 位<sup>[1]</sup>,虽然手术及药物治疗结直肠癌已取得了较大的进展<sup>[2-3]</sup>,但由于结直肠癌发病隐匿、无特异性症状,因此很难早期诊断,患者就诊时多已处于进展期。该病的整体治疗效果还远不能令人满意<sup>[4]</sup>。结直肠癌生长迅速、具有较强的侵袭转移能力,这是结直肠癌治疗效果不佳的重要原因。结直肠癌的生长及侵袭是多种基因异常表达的结果,探讨其机制对结直肠癌的综合诊治意义重大。卷曲螺旋结构域(coiled-coil domain-containing,CCDC)基因家族有多个成员,研究发现一些 CCDC 基因与恶性肿瘤关系密切<sup>[5-7]</sup>,也有研究发现 CCDC12 与结直肠癌有关<sup>[8]</sup>。但有关结直肠癌组织中 CCDC12 表达及意义的相关报道极少。本研究通过检测结直肠癌组织中 CCDC12 蛋白表达情况,为探讨 CCDC12 蛋白与结直肠癌的生长及侵袭的关系提供依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

选取 2013 年 1 月 -2015 年 6 月于河北省人民医院外科手术的 94 例结直肠癌患者的肿瘤组织及癌旁正常肠黏膜组织石蜡标本进行检测。入组标准:①年龄 $\geq 18$ 岁;②患者有手术切除标本确诊为结直肠癌;③术前未接受过放疗、化疗及介入治疗等措施;④患者为初诊。排除标准:①合并其他恶性肿瘤或有其他肿瘤病史的患者;②曾行手术治疗的复发患者;③接受新辅助放化疗或靶向治疗的患者。男性 61 例,女性 33 例;年龄 37~81 岁,平均(53.52 $\pm$ 8.95)岁。患者均签署知情同意文件,本研究得到河北省人民医院伦理委员会批准。

### 1.2 主要试剂及仪器

CCDC12(购自美国 Aviva 公司),CyclinD1、P21、MMP-9 及 TIMP-1 抗体(购自美国 Sigma 公司),免疫组织化学试剂盒、二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(均购自北京中杉生物公司),切片机(RM2255 型)、组织细胞染色机(ST5020 型)(购自德国 LEICA 公司)。

### 1.3 免疫组织化学检测及结果判断

将石蜡包埋的组织在切片机上连续 4  $\mu\text{m}$  切

片,然后进行脱蜡、水化、抗原修复及阻断内源性过氧化物酶(peroxidase,POD)活性,分别加入各一抗,浸泡、冲洗后加入二抗,37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min,最后进行显色、复染及封片。阴性对照为磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline,PBS),阳性对照为各一抗提供的阳性对照。CCDC12、CyclinD1、P21、MMP-9 及 TIMP-1 蛋白均以在细胞浆或细胞膜出现黄色或棕色颗粒为染色阳性。在镜下( $\times 400$ )随机选取 5 个视野,应用二次计分法将阳性细胞比例与染色强度的乘积作为读片结果。乘积为 0 记为(-),1~2 记为(+),3~4 记为(++), $>4$  记为(+++)。(-)为阴性表达,其他均记为阳性表达。

### 1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件,各蛋白在肿瘤组织与正常黏膜组织间的表达差异及肿瘤组织中各指标表达与病理特征关系用  $\chi^2$  检验,肿瘤组织各指标之间的相关性用 Spearman 相关分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CCDC12、CyclinD1、P21、MMP-9 及 TIMP-1 在结直肠癌肿瘤组织及癌旁正常肠黏膜组织中的表达情况

在结直肠癌组织中,CCDC12 阳性表达率为 75.53%、CyclinD1 阳性率为 61.70%、P21 阳性率为 37.23%、MMP-9 阳性率为 82.98%、TIMP-1 阳性率为 58.51%,癌旁正常肠黏膜组织中 CCDC12、CyclinD1、P21、MMP-9 及 TIMP-1 阳性率分别为 19.15%、15.96%、31.91%、25.53%及 34.04%。经配对  $\chi^2$  检验,CCDC12、CyclinD1、MMP-9 及 TIMP-1 蛋白在结直肠癌组织中阳性表达率均高于癌旁正常肠黏膜组织( $\chi^2=38.480, 30.312, 38.368$  及  $7.667, P=0.001, 0.001, 0.001$  及  $0.006$ ),P21 蛋白在两种组织中差异无统计学意义( $\chi^2=0.862, P=0.353$ )。见表 1 和图 1。

### 2.2 CCDC12 在结直肠癌组织表达与临床病理参数的关系

结直肠癌组织中 CCDC12 蛋白阳性率与患者性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤直径、神经血管侵犯及远处转移情况差异无统计学意义( $\chi^2=2.163, 1.973,$

表 1 CCDC12、CyclinD1、P21、MMP-9 及 TIMP-1 蛋白在结直肠癌组织及相应癌旁正常肠黏膜组织中的表达 (n=94,例)

组别	CCDC12		CyclinD1		P21		MMP-9		TIMP-1	
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
结直肠癌组织	71	23	58	36	35	59	78	16	55	39
癌旁正常肠黏膜组织	18	76	15	79	30	64	24	70	32	62
$\chi^2$ 值	38.480		30.312		0.862		38.368		7.667	
P 值	0.001		0.001		0.353		0.001		0.006	

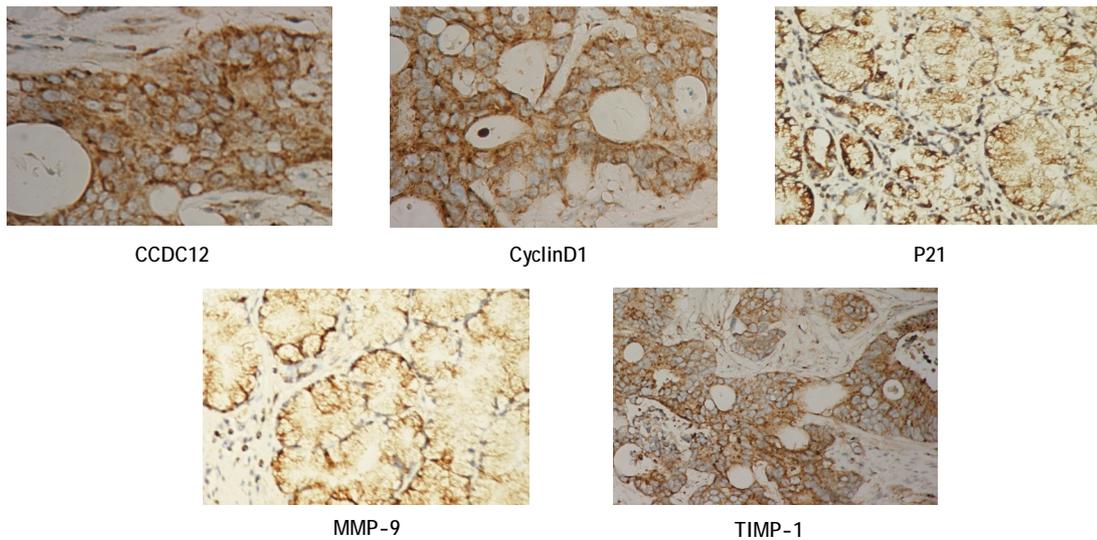


图 1 CCDC12、CyclinD1、P21、MMP-9 及 TIMP-1 蛋白在结直肠癌组织中的表达 (×200)

1.057、4.458、2.729、0.146 及 0.132,  $P=0.141$ 、 $0.160$ 、 $0.788$ 、 $0.099$ 、 $0.703$  及  $0.716$ ), CCDC12 蛋白阳性表达与肿瘤浸润深度、分化程度、淋巴结转移及临床分期差异有统计学意义 ( $\chi^2=5.902$ 、 $5.130$ 、 $9.760$  及  $4.458$ ,  $P=0.015$ 、 $0.024$ 、 $0.002$  及  $0.035$ )。见表 2。

### 2.3 CCDC12 与 CyclinD1、P21、MMP-9 及 TIMP-1 蛋白在结直肠癌组织中表达的相关性

经 Spearman 相关分析显示,在结直肠癌组织中,CCDC12 与 CyclinD1、MMP-9 蛋白表达呈正相关( $r=0.3022$  和  $0.3653$ ,  $P=0.003$  和  $0.001$ ),CCDC12 与 P21

表 2 CCDC12 蛋白表达与结直肠癌临床病理特征的关系 例

因素	男/女/例	年龄		肿瘤部位				肿瘤直径				
		≥60 岁	<60 岁	右半结肠	横结肠	左半结肠	直肠	≥5 cm	<5 cm			
CCDC12 蛋白表达												
阴性(n=23)	12/11	7	16	6	2	8	7	13	10			
阳性(n=71)	49/22	12	59	15	12	22	22	53	18			
$\chi^2$ 值	2.163	1.973		1.057				2.729				
P 值	0.141	0.160		0.788				0.099				
因素	肿瘤浸润深度		临床分期		分化程度		淋巴结转移		神经血管侵犯		远处转移	
	局限浆膜内	浆膜外	I、II 期	III、IV 期	好	差	阳性	阴性	有	无	有	无
CCDC12 蛋白表达												
阴性(n=23)	14	9	12	11	19	4	9	14	9	14	5	18
阳性(n=71)	23	48	20	51	40	31	53	18	31	40	13	58
$\chi^2$ 值	5.902		4.458		5.130		9.760		0.146		0.132	
P 值	0.015		0.035		0.024		0.002		0.703		0.716	

表达呈负相关( $r=-0.2886, P=0.005$ )。

### 3 讨论

随着我国社会发展及饮食结构的改变,近年来结直肠癌的发生率不断升高<sup>[9]</sup>,已成为最常见的消化道恶性肿瘤之一。该病无特异性症状,早期易于误诊漏诊。结直肠癌具有生长迅速、侵袭转移快的特点,因而在就诊时多数患者已处于进展期,治疗效果不理想。目前对结直肠癌的主要治疗措施包括手术、放疗化疗及部分靶向药物的治疗<sup>[4,10]</sup>,但总体治疗效果尚待进一步提高。因此,了解结直肠癌细胞的生长侵袭机制有重要的临床价值。结直肠癌细胞的生长侵袭是多基因共同作用的结果,在该方面已有不少研究成果,但具体机制尚未完全阐明。

CCDC12 基因是 CCDC 家族的成员之一,该家族有众多成员,近年来研究发现该家族的多个成员与恶性肿瘤关系密切<sup>[5-7]</sup>。本研究显示,在结直肠癌组织中 CCDC12 表达比正常肠黏膜增强,且 CCDC12 的阳性表达与肿瘤浸润深度、分化情况、淋巴结转移及 TNM 分期有关,本研究结果提示 CCDC12 可能参与结直肠癌的生长及侵袭过程,具有导致结直肠癌进展的作用。但 CCDC12 在肿瘤不同阶段发挥的具体作用还有待进一步研究。

CyclinD1 是调节细胞周期的一种重要蛋白,该蛋白可以使 Rb 蛋白磷酸化而失活,从而启动细胞周期。在肿瘤组织中 CyclinD1 表达异常,促进肿瘤细胞的增殖,对多种肿瘤的生长具有促进作用<sup>[11-12]</sup>。本研究发现,在结直肠癌中 CyclinD1 表达比正常肠黏膜增强,与 LI 等的研究结果符合<sup>[13]</sup>。P21 蛋白具有抑制肿瘤细胞增殖的功能,其主要作用在于 P21 能抑制周期素依赖激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)复合物的活性,从而抑制细胞周期的进展,抑制细胞分裂<sup>[14]</sup>。但本研究中 P21 蛋白在肿瘤与正常肠黏膜组织中表达无差异。笔者分析这可能是由于 P21 蛋白只在肿瘤的特定期阶段发挥作用,而正常组织中 P21 也保持一定的表达,对细胞周期发挥调控作用,因而也有一定程度表达。MMP-9 是基质金属蛋白酶家族(MMPs)的重要成员之一,具有降解细胞外基质的功能,在肿瘤细胞的侵袭迁移中有重要的促进作用。研究发现 MMP-9 在结直肠癌肿瘤组织中具有高表达现象<sup>[15]</sup>。本研究也发现,MMP-9 在肿瘤组织中表达增强,且与肿瘤的浸润及分期有关,提示 MMP-9 在结直肠癌进展中发挥重要作用。

TIMP-1 具有抑制 MMP-9 的功能,在调节肿瘤细胞的侵袭迁移过程中发挥重要作用,研究表明 TIMP-1 在结直肠癌肿瘤组织的表达高于癌旁组织<sup>[16]</sup>,本研究也得到相似结果。笔者分析认为在肿瘤中 MMP-9 表达增强会导致抑制剂 TIMP-1 表达也有所增强,因而肿瘤组织也出现 TIMP-1 高表达现象,但总的 MMPs-TIMPs 平衡破坏,导致肿瘤的侵袭转移。

本结果发现,在结直肠癌组织中 CCDC12 与 Cyclin D1 及 MMP-9 蛋白表达呈正相关性,而与 P21 表达呈负相关性,说明 CCDC12 蛋白与结直肠癌的生长及侵袭有关,CCDC12 可能通过上调 CyclinD1、MMP-9,同时下调 P21 的表达而调控肿瘤细胞周期、促进细胞周围基质降解,从而使结直肠癌易于侵袭转移。但本研究结果仅为临床结果的分析,具体调控关系是否存在还有待深入的研究进行证实。

综上所述,本研究发现 CCDC12 蛋白在结直肠癌肿瘤组织中存在表达增高现象且与部分病理学特征相关,说明 CCDC12 蛋白可能参与肿瘤的生长侵袭过程。CCDC12 参与结直肠癌生长侵袭的机制可能与 CCDC12 与 CyclinD1、MMP-9 及 P21 相互调控、共同作用有关,但具体情况还应扩大研究规模、并进行体内外实验予以证实。

### 参 考 文 献:

- [1] CHEN W, ZHENG R, ZENG H, et al. The incidence and mortality of major cancers in China, 2012[J]. Chin J Cancer, 2016, 35(8): 73.
- [2] DONG J, WANG W, YU K, et al. Outcomes of laparoscopic surgery for rectal cancer in elderly patients[J]. Journal of B.U.on. Official Journal of the Balkan Union of Oncology, 2016, 21(1): 80-86.
- [3] JIN X, CHE D B, ZHANG Z H, et al. Ginseng consumption and risk of cancer: a meta-analysis[J]. J Ginseng Res, 2016, 40(3): 269-277.
- [4] LIU J, ZHOU Q, XU J, et al. Detection of EGFR expression in patients with colorectal cancer and the therapeutic effect of cetuximab[J]. J BUON, 2016, 21(1): 95-100.
- [5] GONG Y, QIU W, NING X, et al. CCDC34 is up-regulated in bladder cancer and regulates bladder cancer cell proliferation, apoptosis and migration[J]. Oncotarget, 2015, 6(28): 25856-25867.
- [6] LIU Y, KHERADMAND F, DAVIS CF, et al. Focused analysis of exome sequencing data for rare germline mutations in familial and sporadic lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2016, 11(1): 52-61.
- [7] YIN D T, XU J, LEI M, et al. Characterization of the novel tumor-suppressor gene CCDC67 in papillary thyroid carcinoma[J]. Oncotarget, 2016, 7(5): 5830-5841.

- [8] KE J, LOU J, ZHONG R, et al. Identification of a potential regulatory variant for colorectal cancer risk mapping to 3p21.31 in Chinese population[J]. *Sci Rep*, 2016(6): 25194.
- [9] BODE A M, DONG Z, WANG H. Cancer prevention and control: alarming challenges in China [J]. *Natl Sci Rev*, 2016, 3(1): 117-127.
- [10] CHENG Y, SONG W. Efficacy of FOLFOXIRI versus XELOXIRI plus bevacizumab in the treatment of metastatic colorectal cancer[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(10): 18713-18720.
- [11] GOPALAKRISHNAN N, SARAVANAKUMAR M, MADANKUMAR P, et al. Colocalization of beta-catenin with Notch intracellular domain in colon cancer: a possible role of Notch1 signaling in activation of CyclinD1-mediated cell proliferation[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 396(1/2): 281-293.
- [12] LIAO K, LI J, WANG Z. Dihydroartemisinin inhibits cell proliferation via AKT/GSK3beta/cyclin D1 pathway and induces apoptosis in A549 lung cancer cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(12): 8684-8691.
- [13] LI Q, DONG Q, WANG E. Rsf-1 is overexpressed in non-small cell lung cancers and regulates cyclinD1 expression and ERK activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420(1): 6-10.
- [14] WANG S, CHEN Y, BAI Y. p21 participates in the regulation of anaplastic thyroid cancer cell proliferation by miR-146b[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(3): 2018-2022.
- [15] JIN H, LI X J, PARK M H, et al. FOXM1-mediated downregulation of uPA and MMP9 by 3, 3'-diindolylmethane inhibits migration and invasion of human colorectal cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(6): 3171-3177.
- [16] IONESCU C, BRAICU C, CHIOREAN R, et al. TIMP-1 expression in human colorectal cancer is associated with SMAD3 gene expression levels: a pilot study[J]. *J Gastrointest Liver Dis*, 2014, 23(4): 413-418.

(王荣兵 编辑)