

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.03.004

文章编号: 1005-8982(2016)03-0018-05

论著

程序性细胞死亡 4 mRNA 在结直肠癌组织中的表达及意义*

李日恒¹, 李爽², 宋艳敏¹, 张爱民¹, 刘渤¹, 胡光¹

(1. 河北大学附属医院 普外科, 河北 保定 071000; 2. 内蒙古兴安盟人民医院 输血科, 内蒙古 乌兰浩特 137400)

摘要:目的 研究腹腔镜结直肠癌根治术癌组织中程序性细胞死亡 4 (*PDCD4*) mRNA 的表达, 以及与结直肠癌临床资料的相关性。**方法** 收集 2012~2014 年腹腔镜手术结直肠癌及癌旁正常组织标本 54 例, 采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测结直肠标本中 *PDCD4* mRNA 水平; 分析 *PDCD4* mRNA 水平与临床资料的相关性。**结果** ① 结直肠癌组织中 *PDCD4* 表达降低甚至不表达, 表达降低率为 64.8% (35/54), ΔCt 值为 (4.50 ± 0.60) ; 正常组织中 *PDCD4* 高表达, ΔCt 值为 (3.54 ± 0.52) , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。② 结直肠癌组织中 *PDCD4* mRNA 水平与分化程度、有无淋巴结转移、肿瘤浸润深度有关, 与性别、年龄、肿瘤部位无关; 分化程度越低, 有淋巴结转移, 浸润越深, 则 *PDCD4* mRNA 表达更低。**结论** 结直肠癌中 *PDCD4* mRNA 表达下降, *PDCD4* mRNA 水平与性别、年龄、肿瘤部位无关, 与分化程度、有无淋巴结转移、肿瘤浸润深度有关。

关键词: 腹腔镜; 结直肠癌; 程序性细胞死亡 4

中图分类号: R735.3

文献标识码: A

Expression of *PDCD4* mRNA in human colorectal cancer and its significance*

Ri-heng Li¹, Shuang Li², Yan-min Song¹, Ai-min Zhang¹, Bo Liu¹, Guang Hu¹

(1. Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding, Hebei 071000, China; 2. Department of Blood Transfusion, Xing'anmeng People's Hospital, Ulanhot, Inner Mongolia 137400, China)

Abstract: Objective To study programmed cell death 4 (*PDCD4*) mRNA expression in colorectal cancer tissues from laparoscopic radical resection, as well as its relationship with the clinical data of colorectal cancer. **Methods** Specimens of colorectal cancer tissues and normal tissues adjacent to carcinoma from 54 cases were collected in laparoscopic surgery between 2012 and 2014. *PDCD4* mRNA level was detected by RT-PCR in colorectal cancer specimens. The relationship between *PDCD4* mRNA level and clinical data was analyzed. **Results** *PDCD4* expression in the colorectal cancer tissues reduced or even was not seen, the rate of lowered *PDCD4* expression was 64.8% (35/54) with ΔCt (4.50 ± 0.60); the normal tissues had high expression of *PDCD4* with ΔCt (3.54 ± 0.52), the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The *PDCD4* mRNA level in the colorectal cancer tissues was correlated with the differentiation degree, lymph node metastasis and tumor infiltration depth, but not correlated with gender, age or tumor location. *PDCD4* mRNA expression was lower in patients with lymph node metastases than those without lymph node metastasis. The lower the degree of differentiation and the deeper infiltration, the lower the *PDCD4* mRNA expression. **Conclusions** *PDCD4* mRNA expression lowers in colorectal cancers. *PDCD4* mRNA level is not correlated with gender, age or tumor location, but correlated with degree of differentiation, lymph node metastasis and tumor infiltration depth.

Keywords: laparoscope; colorectal cancer; programmed cell death 4

收稿日期: 2015-05-04

* 基金项目: 河北省科技计划项目 (No: 13277248)

结直肠癌的发生是多因素、多步骤共同作用的结果,癌基因与抑癌基因表达失衡发挥重要作用。随着分子水平的发展,结直肠癌发病机制的研究有很大进展,为结直肠癌的诊断和治疗提供更为确切的理论依据^[1]。腹腔镜结直肠癌根治术已经作为一种常规手术方式应用于临床^[2-3]。

程序性细胞死亡4 (programmed cell death 4, *PDCD4*),是与细胞凋亡相关的抑癌基因,*PDCD4*参与细胞的转录、翻译及多种信号通路,来发挥抑制肿瘤生长的作用^[4-6]。已经证实 *PDCD4*在结直肠癌、肝癌、肺癌、脑胶质瘤等多种肿瘤组织中表达降低,*PDCD4*表达水平与多种肿瘤患者的预后有关,高表达的 *PDCD4*还能增加化疗药物的敏感性,本文目的是探讨结直肠癌组织中 *PDCD4*转录水平的表达,以及与结直肠癌临床资料的相关性。

1 资料与方法

1.1 病例资料

选取2012~2014年在河北大学附属医院普通外科行腹腔镜结直肠癌根治术的患者54例,取其结直肠癌及癌旁正常组织标本。纳入标准:患者术前未接受放射、化学及免疫治疗,未发生远处转移。收集癌组织时,除已发生坏死的肿瘤组织外,取距癌组织边缘>10 cm的癌旁正常组织,取全层,诊断结果由术后病理检查确定。其中男性32例,女性22例;年龄36~82岁,平均59.69岁;直肠癌19例,结肠癌35例。

1.2 保存方法

腹腔镜结直肠癌根治术中即刻取标本置于液氮中,-80℃冰箱内保存时间≤6个月,手术操作过程严格按照直肠系膜全切除(total mesorectal exsion, TME)原则进行操作。

1.3 试剂与仪器

1.3.1 主要试剂 Omega E.Z.N.A.TM总RNA提取试剂盒、Vazyme Hiscript 第一链cDNA合成试剂盒、Vazyme Hiscript qRT PCR荧光定量试剂盒、去RNA酶的EP管、枪头、8联排、 β -actin和*PDCD4*引物由石家庄市惠友生物科技有限公司提供, β -actin引物、*PDCD4*普通引物根据Primer Premier 5.0软件设计,并通过Pubmed Blast检测其特异性,由上海生工生物工程股份有限公司合成。实验中RNA提取及核酸电泳过程中所需的氯仿、无水乙醇、75%无水乙醇、5×loading buffer、gelred染液、琼

脂糖、1×TAE液、DNA Marker等由河北大学附属医院中心实验室提供。

1.3.2 主要仪器 高速冷冻离心机(Thermo Sorvall ST16R型,德国Thermo Electron LED GmbH Am Kalkberg公司),微量高速冷冻离心机(FRESC021型,德国Thermo Fisher Scientific公司),全波长酶标仪(EPOCH型,美国基因有限公司),全自动凝胶成像仪(Champ Gel 5000型,北京赛智创业科技有限公司),普通聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)仪器(Veriti型,美国Applied Biosystems公司),实时荧光定量PCR仪(7300型,美国Applied Biosystems公司),涡旋振荡器(Vortex-5型,美国其林贝尔仪器制造有限公司),全自动雪花制冰机(IMS-200型,北京德天佑科技发展有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 组织总RNA的提取 取约30 mg组织,根据Omega E.Z.N.A.TM总RNA试剂盒说明书提取总RNA,取产物2 μ l于1%琼脂糖凝胶中电泳,紫外线下观察并记录结果。以显示3条条带且条带清晰为RNA无明显降解。同时在酶标仪检测含量(2000 ng/ μ l)及比值(A260/A280光度值:1.9~2.0)合适后进行逆转录,中途不能及时完成时将产物放置入-20℃或-80℃冰箱冷冻保存,保存时间≤3个月。

1.4.2 逆转录 根据酶标仪结果调整RNA含量,根据Vazyme Hiscript 第一链cDNA合成试剂盒说明书进行逆转录,体系为Oligo dT 1 μ l,总RNA 1 μ g, RNase free ddH₂O 6 μ l混合反应物,65℃预热10 min,冰上骤冷2 min。随后加入2×RT Mix 10 μ l,Hiscript Enzyme Mix 2 μ l,在25℃预变性5 min、42℃变性30 min、85℃退火5 min的反应条件下进行处理,反应结束后产物模板cDNA进行分装稀释,放置于-20℃冰箱内,保存时间≤6个月,待行PCR反应。

1.4.3 逆转录-聚合酶链反应 通过Primer Premier 5.0进行引物设计,NCBI Blast进行引物特异性检测。*PDCD4*正向引物:5'-TGGGAGTGACGCCCTTAG A-3',反向引物:5'-TCCACCTCCTCCACATCATACA-3',产物长度171 bp;内参基因 β -actin正向引物:5'-GTGGACATCCGCAAGAC-3',反向引物:5'-AAAGGGTGTAAACGCAACTAA-3',产物长度302 bp。逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction,RT-PCR)反应体系20 μ l:模板cDNA 2 μ l,Mix 10 μ l,Rox 2 μ l,正、反向引物2 μ l,灭菌蒸馏水4 μ l。反应条件:95℃预变性5 min;95℃

变性 10 s, 60℃退火 32 s, 共 40 个循环; 95℃预变性 15 s, 60℃变性 60 s, 95℃退火 15 s。扩增后的产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 在紫外分析仪上分析并记录图像结果。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 *t* 检验, 计数资料以率表示, 并行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌组织中 PDCD4 mRNA 的表达

PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳结果显示, actin 302 bp, PDCD4 171 bp, 癌组织中 PDCD4 表达降低甚至不表达, 表达降低率为 64.8% (35/54), ΔCt 值为 (4.50 ± 0.60), 正常组织中高表达 ΔCt 值为 (3.54 ± 0.52), 差异有统计学意义 ($P = 0.036$)。 ΔCt 值越高, 表明相对扩增数多, 相对表达量越低。见图 1~3。

2.2 PDCD4 mRNA 水平与结直肠癌临床特征的相关性

结直肠癌组织中 PDCD4 mRNA 水平与性别、

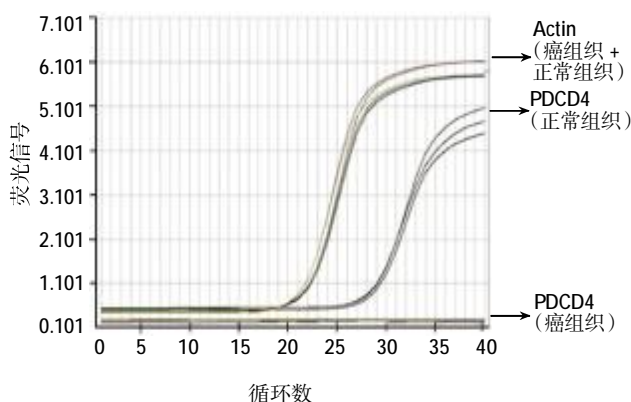
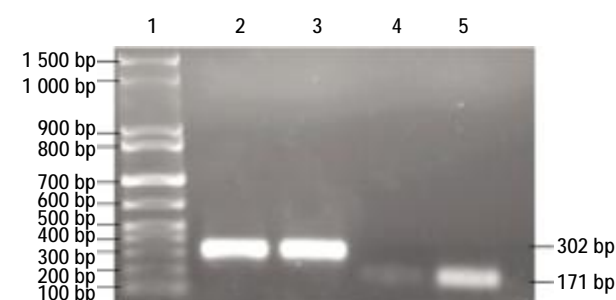
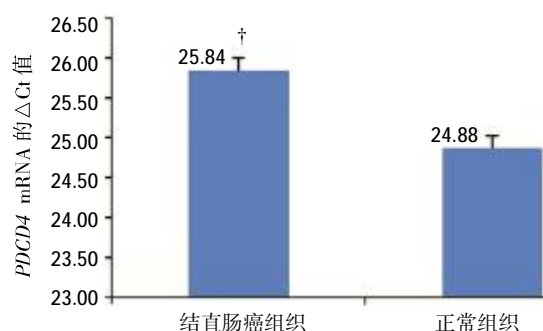


图 1 PDCD4 mRNA 扩增曲线



1: Marker; 2: 结直肠癌组织内参; 3: 正常组织内参; 4: 结直肠癌组织 PDCD4; 5: 正常组织 PDCD4

图 2 PDCD4 mRNA 凝胶电泳结果



† 与正常组织比较, $P = 0.036$

图 3 PDCD4 mRNA 的表达

年龄、肿瘤部位无关, 与分化程度、有无淋巴结转移、肿瘤浸润深度有关。分化程度越低、淋巴结转移、浸润越深, 则 PDCD4 mRNA 表达越低。见附表。

附表 临床特征与结直肠癌组织中 PDCD4 mRNA 水平的相关性

临床特征	例数	PDCD4 mRNA 表达降低例 (%)	P 值
性别			
男	32	19 (59.4)	0.313
女	22	16 (72.7)	
年龄			
<60 岁	29	18 (62.1)	0.829
≥60 岁	25	17 (59.5)	
部位			
结肠	35	20 (57.1)	0.109
直肠	19	15 (78.9)	
分化程度			
I、II 级	30	15 (50.0)	0.011
III 级	24	20 (83.3)	
淋巴结转移			
无	28	14 (50.0)	0.018
有	26	21 (80.8)	
浸润深度			
黏膜肌层	31	16 (51.6)	0.018
浆膜周围	23	19 (82.6)	

3 讨论

结直肠癌的发病率和死亡率日趋上升, 严重危害人类的生命健康。手术切除仍是治疗结直肠癌的主要手段。在完全坚持 TME 原则的前提下, 与传统开腹手术比较, 腹腔镜结直肠癌根治术具有切口小、患者痛苦少、恢复快等优点。

人类 *PDCD4* 首先从胶质瘤细胞中分离出来,其蛋白主要由 N 端、C 端及两个保守的 α -helical MA-3 区域组成,2 个 MA-3 对于绑定 eIF4A 和 RNA 移位是必不可缺的。MA-3 区域与 eIF4GI、eIF4GII 有关的 ATP 依赖的 RNA 解螺旋酶 eIF4A 蛋白的相互作用有关。*PDCD4* 的氨基酸序列中也包含多个磷酸化位点,*PDCD4* 调节转录的过程可能更为复杂^[7]。

PDCD4 在不同组织中的作用机制不同。易波等^[8] 研究显示,*PDCD4* 可能通过上调死亡相关蛋白 5 表达来诱导大肠癌细胞的凋亡。*PDCD4* 还能在一定程度上抑制细胞浸润转移,*PDCD4*-siRNA 敲除的结直肠癌 HT-29 细胞能明显促进结直肠癌细胞的分化,且能明显提高 c-Jun 磷酸化以及 eIF4E、Fas 相关性死亡结构域蛋白样白细胞介素转变酶抑制蛋白的表达;AKI/Pr 激酶 B 可促使 *PDCD4* 的 Ser67、Ser457 位点发生磷酸化,引起 *PDCD4* 发生核转录,使活化剂蛋白 1(activator protein 1, AP1) 调控的转录功能下降,同时影响肿瘤转移^[9]。Yang^[10] 和 Wang 等^[11] 证实 *PDCD4* 蛋白能抑制人类结肠 RKO 细胞中 c-Jun 的激活,引起抑制转录蛋白 AP1 的失活,抑制细胞的恶性转化及血管形成。在结直肠癌细胞 HT-29 中,*PDCD4* 缺失,刺激 AP1 依赖的转录,诱导 c-Jun 蛋白表达水平的升高。*PDCD4* 能抑制 JNK 的活性,从而抑制 c-Jun 的磷酸化,阻止 eIF4E 的磷酸化,使金属蛋白酶 MMP-9 和 MMP-2 表达降低,抑制细胞转移;逆转其磷酸化反应后,金属蛋白酶 MMP-9 和 MMP-2 表达增加,促进细胞转移^[12]。

Zhen 等^[13] 在研究鼻咽癌细胞时证实 *PDCD4* 在 8 种鼻咽癌细胞株中表达降低,其表达下降与进展和不良预后成正相关,同时与肿瘤大小、淋巴结转移、临床分期密切相关;随着分期的增高,*PDCD4* 表达下降的趋势越明显。不论 TNM 分期如何,*PDCD4* 的高水平表达能显著改善患者预后。例如在早期肺癌组织中,与正常组织相比,*PDCD4* mRNA 和 *PDCD4* 蛋白的表达水平明显降低,*PDCD4* 的表达水平与年龄、性别及有无远处转移无明显相关,但与肿瘤大小、淋巴结转移、临床分期及预后相关,差异有统计学意义。*PDCD4* 水平降低的程度越大,肿瘤恶性程度越高,但在非小细胞癌中,*PDCD4* 表达水平与临床参数无相关。而给 K-ras 缺失的裸鼠吸入气溶胶 *PDCD4* 能显著抑制细胞增殖和肿瘤进展过程,并促进凋亡^[14]。本研究收集腹腔镜结直肠癌根治术组织标本,对标本进行检测,分析 *PDCD4* mRNA 水平与

结直肠癌的相关性。结果显示,结直肠癌组织中 *PDCD4* mRNA 水平降低,说明转录水平调节受影响,结直肠癌组织中 *PDCD4* mRNA 水平与性别、年龄、肿瘤部位无关,与分化程度、有无淋巴结转移、肿瘤浸润深度有关。分化程度越低、淋巴结转移、浸润越深,则 *PDCD4* mRNA 表达越低。这与鼻咽癌和早期肺癌的研究结果相似,却与非小细胞癌的研究结果不一致。考虑为 *PDCD4* 在不同的组织中表达量不同,发挥的机制不同,导致这种组织上的差异。薛迪新等^[15] 证实结直肠癌中 *PDCD4* 蛋白的表达与肿瘤浸润深度、无淋巴结转移和临床分期有关,而与年龄、部位、肿瘤大小及有无远处转移无关,*PDCD4* 蛋白表达水平下调提示结直肠癌预后不良,大肠癌组织中 *PDCD4* 蛋白表达缺失可促进结直肠癌细胞增殖。与转录前比较,转录后恢复 *PDCD4* 蛋白的表达水平能更好地治疗大肠癌。

有学者提出恢复转录后 *PDCD4* 蛋白水平比恢复转录前水平对治疗结直肠癌更为重要。蛋白发挥功能必须通过基因转录、翻译的过程,如果转录抑制,翻译就无法进行,因此了解 *PDCD4* 在结肠癌组织中的转录水平才能为重新表达提供依据。*PDCD4* 转录水平的异常调控影响结直肠癌的发生、发展,这为结直肠癌的诊断和治疗提供依据。

参 考 文 献:

- [1] 陈琼,刘志才,程兰平,等. 2003~2007 年中国结直肠癌发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2012, 21(3): 179-182.
- [2] Li Z, Ying X, Shen Y, et al. Laparoscopic versus open surgery for rectal cancer: a clinical comparative study[J]. the Journal of International Medical Research, 2012, 40: 1599-1607.
- [3] 卢利新. 腹腔镜结直肠癌根治术 37 例临床疗效观察[J]. 西部医学, 2013, 25(7): 1060-1061.
- [4] Wen YH, Shi X, Chiriboga L, et al. Alterations in the expression of *PDCD4* in ductal carcinoma of the breast[J]. Oncol Rep, 2007, 18: 1387-1393.
- [5] Kalinichenko SV, Kopantzev EP, Korobko EV, et al. *Pdc4* protein and mRNA level alterations do not correlate in human lung tumors[J]. Lung Cancer, 2008, 62: 173-180.
- [6] Pan YM, Xing R, An J, et al. Amplification of the miR-181c/d cluster is inversely correlated with *PDCD4* expression in gastric cancer[J]. Chin Sci Bull, 2014, 59(19): 2240-2248.
- [7] Shibahara K, Asano M, Ishida Y, et al. Isolation of a novel mouse gene MA-3 that is induced upon programmed cell death[J]. Gene, 1995, 166: 297-301.
- [8] 易波,李其云,饶华民,等. *PDCD4* 对 DAP5 表达及大肠癌细胞凋亡的影响[J]. 天津医药, 2013, 41(6): 520-522.

- [9] Ashish S, Mohammad SB, Kota VR, et al. Aldose reductase inhibition suppresses colon cancer cell viability by modulating microRNA-21 mediated programmed cell death 4 (PDCD4) expression[J]. *European Journal of Cancer*, 2013, 49: 3311-3319.
- [10] Yang HS, Jansen AP, Nair R, et al. A novel transformation suppressor, Pdc4, inhibits AP-1 transactivation but not NF-kappa B or ODC transactivation[J]. *Oncogene*, 2001, 20: 669-676.
- [11] Wang Q, Sun Z, Yang HS, et al. Down regulation of tumor suppressor Pdc4 promotes invasion and activates both β -catenin/Tcf and AP-1-dependent transcription in colon carcinoma cells[J]. *Oncogene*, 2008, 27: 1527-1535.
- [12] Jiang Y, Zhang SH, Han GQ, et al. Interaction of Pdc4 with eIF4E inhibits the metastatic potential of hepatocellular carcinoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2010, 64(6): 424-429.
- [13] Zhen Y, Liu Z, Yang HL, et al. Tumor suppressor PDCD4 modulates mir-184 mediated direct suppressing of C-MYC and BCL2 blocking cell growth and survival in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cell Death and Disease*, 2013, 4: 68-72.
- [14] Zhang Z, Dubois RN. Detection of differentially expressed genes in human colon carcinoma cells treated with a selective COX-2 inhibitor[J]. *Oncogene*, 2001, 20: 4450-4456.
- [15] 薛迪新, 陈积贤, 余红敏, 等. PDCD4 蛋白、Ki67 和 PCNA 在大肠癌中的表达及其临床意义[J]. *浙江医学*, 2012, 34(10): 772-775.

(申海菊 编辑)