

CAPN4 在结直肠癌中的表达及其临床意义

龚 慧 杜冀晖 王开昕 李一凡 王 磊 黄 虞 王 秀 掌 娟

摘要 目的 研究 CAPN4(calpain small subunit 1)在结直肠癌中的表达及其临床意义。方法 免疫组织化学法检测 10 对结直肠癌组织和相应的癌旁非瘤组织中 CAPN4 的表达,并检测 74 例结直肠癌组织中 CAPN4 的表达,结合临床随访资料探讨其表达与临床病理因素和预后的相关性。结果 结直肠癌组织中 CAPN4 的表达均高于相应的癌旁非瘤组织。CAPN4 的表达强度与结直肠癌患者的 Dukes 分期($P=0.000$),TNM 分期($P=0.000$),病理分级($P=0.021$)和生存预后($P=0.040$)显著相关,而与患者的年龄和性别无相关性。Kaplan - Meier 分析显示,CAPN4 高表达病例组生存时间明显少于 CAPN4 低表达病例组,经 Log - rank 检验,差异有统计学意义。结论 CAPN4 在结直肠癌中表达上调,其表达差异与结直肠癌 Dukes 分期、TNM 分期、病理分级和患者生存预后呈显著负相关,提示其可能与结直肠癌的发生、发展相关。

关键词 结直肠癌 CAPN4 预后 免疫组织化学

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.02.015

Expression and Clinical Significance of CAPN4 in Human Colorectal Cancer. Gong Hui, Du Jihui, Wang Kaixin, et al. Central Laboratory, Shenzhen Nanshan People's Hospital/Affiliated Shenzhen Sixth Hospital of Guangdong Medical University, Guangdong 518052, China

Abstract Objective To investigate the expression and clinical significance of calpain small subunit 1 (CAPN4) in colorectal cancer(CRC). **Methods** The expression of CAPN4 was detected by immunohistochemistry in 10 cases of CRC tissues and the adjacent non - tumor tissues and 74 samples CRC tissues. Clinicopathological data was analyzed to reveal the correlation between CAPN4 expression and clinicopathological characteristics and prognosis of CRC patients. **Results** Immunohistochemistry analysis showed that CAPN4 expression in CRC tissues was higher than that in adjacent non - tumor tissues. CAPN4 expression was significantly correlated with Dukes' stages ($P=0.000$), TNM stages ($P=0.000$), histopathological grading ($P=0.021$) and prognosis ($P=0.04$), whereas CAPN4 expression was not correlated with patient age and gender. Kaplan - Meier analysis demonstrated that high CAPN4 expression was correlated with a short survival time. **Colocusion** The increased expression of CAPN4 was significantly correlated with Dukes' stages, TNM stages, histopathological grading and prognosis in CRC, indicating that it may play a role in the oncogenesis and development of CRC.

Key words Colorectal cancer; CAPN4; Prognosis; Immunohistochemistry

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的消化系统恶性肿瘤之一,其全球发生率居恶性肿瘤的第3位,病死率则位居癌症病死率的第4位^[1]。由于结直肠癌起病隐匿、早期症状不典型且恶性程度高,约1/3的患者确诊时已处中晚期,预后不良。因此,寻求更为特异的结直肠癌分子标志物具有重要的临床意义。

研究发现 CAPN4(calpain small subunit 1)作为钙蛋白酶的一个亚基,在黑色素瘤、鼻咽癌、肝细胞癌、肝内胆管癌和肾细胞癌中表达上调,提示其可能在肿

瘤发生、发展过程中发挥了一定的作用。深入研究表明 CAPN4 促进黑色素瘤细胞的上皮间质转化,高表达 CAPN4 可以促进肝细胞癌细胞增殖、侵袭和转移,而下调 CAPN4 的表达可以有效地抑制鼻咽癌细胞侵袭和迁移^[2-5]。然而,CAPN4 在结直肠癌中的研究尚未见报道。本研究采用免疫组织化学法检测 CAPN4 在结直肠癌中的表达,探讨其表达水平与结直肠癌临床病理特征及患者生存预后之间的相关性,为进一步实验研究提供思路。

材料与方法

1. 标本资料:收集广东医科大学附属深圳第六医院 2013 ~ 2014 年确诊为结直肠癌患者的手术切除癌组织和相应的癌旁非瘤组织石蜡包埋标本 10 对。此外,笔者收集 2003 ~ 2009 年确诊为结直肠癌患者的手术切除癌组织石蜡包埋标本 74 例,并将此 74 例标本纳入统计学分析,标本资料详细情况见表 1。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81402310);深圳市科技计划项目(JCYJ20140411093600199)

作者单位:518052 深圳市南山区人民医院、广东医科大学附属深圳第六医院中心实验室(龚慧、杜冀晖、李一凡、王磊、黄虞),病理科(王开昕、掌娟),检验科(王秀)

通讯作者:龚慧,电子信箱:gonghui2008ok@163.com

以上标本经石蜡切片、HE 染色后由两位资深病理医生确诊诊断。所有结直肠癌患者术前未接受化疗、放疗和免疫治疗等。本研究经笔者医院伦理委员会批准。

表 1 结直肠癌患者的临床病理特征和 CAPN4 的表达

临床病理特征	类别	例数 (n)	百分比 (%)
性别	男性	43	58.1
	女性	31	41.9
年龄 (岁)	≤60	29	39.2
	>60	45	60.8
肿瘤部位	结肠	44	59.5
	直肠	30	40.5
Dukes 分期	A	10	13.5
	B	21	28.4
	C	30	40.5
	D	13	17.6
临床分期	I	10	13.5
	II	22	29.7
	III	29	39.2
	IV	13	17.6
T 分级	T ₁	1	1.4
	T ₂	20	27.0
	T ₃	23	31.1
	T ₄	30	40.5
N 分级	N ₀	37	50.0
	N ₁	28	37.8
	N ₂	9	12.2
M 分级	M ₀	60	81.1
	M ₁	14	18.9
病理分级	高分化	14	18.9
	中分化	36	48.7
	低分化	24	32.4
生存状态	存活	36	48.6
	死亡	38	51.4
CAPN4 表达	低表达	38	51.4
	高表达	36	48.6

2. 主要试剂:兔抗人 CAPN4 多克隆抗体购自美国 Sigma 公司,稀释浓度为 1:1000,免疫组织化学 SP 法试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司,DAB 试剂盒购自北京中杉金桥公司。

3. 免疫组织化学染色:所有标本均经 10% 中性甲醛溶液固定,常规石蜡包埋切片。免疫组织化学采用 SP 法,以 PBS 代替一抗为阴性对照。标本经烤片、脱蜡、水化、柠檬酸钠缓冲液抗原修复后,用 3% 过氧化氢溶液阻断内源性过氧化氢酶,血清封闭非特异性抗原表位,一抗 4℃ 孵育过夜,二抗 37℃ 孵育 15min,DAB 显色后,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片镜检。

4. 结果判断标准:CAPN4 蛋白阳性细胞着色主要位于细胞质内,显色呈淡黄色至棕黄色。随机选择 10 个高倍镜视野计数 (×400),评分标准:计数阳性细胞百分比,<25% 为 0 分,25%~50% 为 1 分,50%~75% 为 2 分,>75% 为 3 分。按细胞着色程度评分:无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。以阳性细胞百分比得分×着色程度得分为最终染色评分,0~3 分为低表达,>3 分为高表达。

5. 统计学方法:应用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计学分析处理,实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,CAPN4 在结直肠癌中的表达和各临床病理因素之间的关系采用 χ^2 检验和 Fisher 精确概率法分析;运用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线并进行生存分析,采用 Log-rank 检验比较两组之间生存率差别,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. CAPN4 结直肠癌组织中的表达:CAPN4 阳性染色主要定位于细胞质,10 例结直肠癌组织中 CAPN4 的表达呈阳性表达,均高于相对应的癌旁非瘤组织(图 1)。CAPN4 在低度恶性组(I/II)中呈弱阳性表达,在高度恶性组(III/IV)中呈强阳性表达(图 2)。

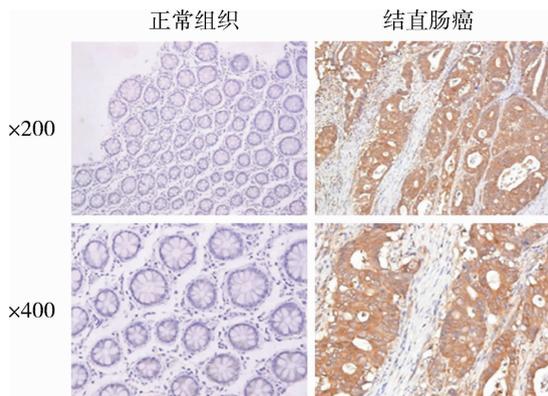


图 1 CAPN4 在正常结直肠组织和结直肠癌中的表达

2. CAPN4 的表达与结直肠癌各临床病理因素之间的相关性:根据免疫组化评分将 74 例结直肠癌标本分为低表达组和高表达组。通过两组的对比结果显示 CAPN4 的表达强度与结直肠癌患者的 Dukes 分期 ($P = 0.000$),临床 TNM 分期 ($P = 0.000$),病理分级 ($P = 0.021$) 和患者生存预后 ($P = 0.040$) 显著相关,但与患者的年龄和性别无显著相关性(表 2)。

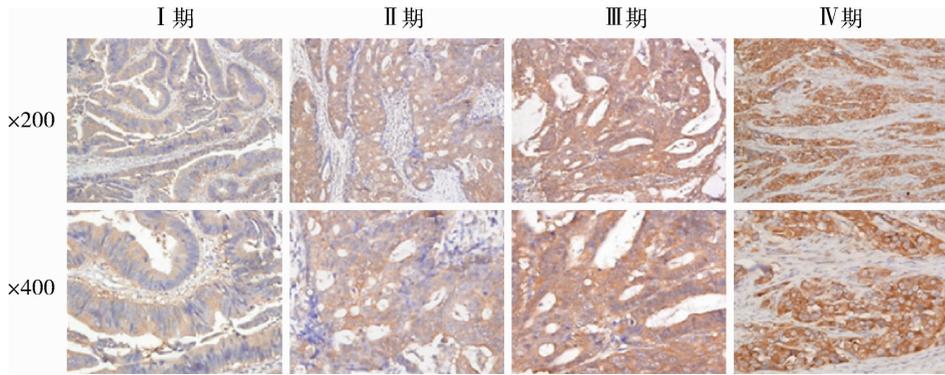


图 2 免疫组化检测 CAPN4 在结直肠癌组织中的表达(临床分期 I ~ IV 期)

表 2 CAPN4 的表达水平与结直肠癌临床病理特征之间的关系 (n)

临床病理特征		CAPN4 表达情况		P
		低表达	高表达	
性别	男性	21	22	0.644
	女性	17	14	
年龄(岁)	≤60	12	17	0.234
	>60	26	19	
Dukes 分期	A	10	0	0.000
	B	15	6	
	C	13	17	
	D	0	13	
临床分期	I	10	0	0.000
	II	15	7	
	III	13	16	
	IV	0	13	
T 分级	T ₁	1	0	0.005
	T ₂	14	6	
	T ₃	15	8	
	T ₄	8	22	
N 分级	N ₀	25	12	0.014
	N ₁	11	17	
	N ₂	2	7	
M 分级	M ₀	38	22	0.000
	M ₁	0	14	
病理分级	高分化	10	4	0.021
	中分化	21	15	
	低分化	7	17	
生存状态	存活	23	13	0.040
	死亡	15	23	

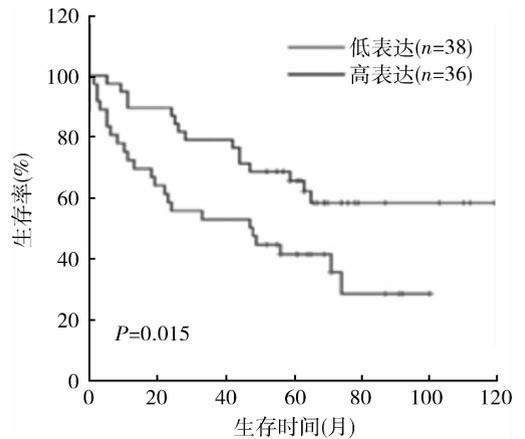


图 3 结直肠癌患者 CAPN4 低表达组和高表达组的生存曲线

讨 论

据统计,世界上每年结直肠癌新增病例多达 100 万,且每年大约有 50 万人死于结直肠癌^[6]。由于结直肠癌起病隐匿、早期症状不典型且恶性程度高,约 1/3 的患者确诊时已处中晚期,预后不良。因此,深入地研究结直肠癌的发病机制,探讨其发生、发展的分子机制,寻求更为有效的结直肠癌早期诊断、早期治疗及预后评估方法是医疗卫生科研工作者迫在眉睫的一项挑战。

Calpains 是一类钙依赖性硫蛋白酶家族分子,参与细胞信号转导、细胞增殖、细胞分化、凋亡、细胞膜融合以及血小板活化过程。研究表明在哺乳动物体内共发现了 15 种蛋白属于该家族^[7,8]。近期研究揭示 Calpains 的活性与肿瘤侵袭等生物学行为密切相关,且通过激活内源性信号通路参与了肿瘤的发生、发展过程^[9]。CAPN4 作为 Calpains 一个亚基,在维持 Calpains 稳定性和活性方面发挥了关键性作用。研究表明,敲除 CAPN4 的小鼠和 CAPN4 缺失的人类

3. CAPN4 的表达与结直肠癌患者生存预后之间的相关性:根据免疫组化评分将 74 例结直肠癌标本分为低表达组和高表达组,运用 Kaplan - Meier 法绘制生存曲线并进行生存分析,分析结果显示 CAPN4 高表达病例组生存时间明显少于 CAPN4 低表达病例组,经 Log - rank 检验,两组间比较差异有统计学意义($\chi^2 = 5.907, P = 0.015$,图 3)。

细胞中 Calpains 的生物学功能丧失,且敲除 CAPN4 可以导致成纤维细胞迁移能力和黏着能力降低^[10,11]。由此,人们推测 CAPN4 可能在转移性恶性肿瘤细胞迁移和黏附能力方面发挥了不可替代的作用。而近期多项研究证实了这一假设,CAPN4 确实参与了恶性肿瘤的发生、发展及转移等过程^[12]。

目前,多项研究表明 CAPN4 在黑色素瘤、鼻咽癌、肝细胞癌、肝内胆管癌和肾细胞癌中表达升高,深入研究表明 CAPN4 低表达的患者五年生存率显著高于 CAPN4 高表达患者,且 CAPN4 低表达的患者累积复发率低于 CAPN4 高表达的患者,提示其可能在肿瘤发生、发展过程中扮演了一定的角色,但尚未见 CAPN4 在结直肠癌中的研究^[2-5,13]。本研究发现 CAPN4 在结直肠癌组织中的表达高于相应的癌旁非癌组织,且高度恶性组结直肠癌患者癌组织中 CAPN4 的表达明显高于低度恶性组。通过进一步分析,笔者发现 CAPN4 的表达强度与结直肠癌患者的 Dukes 分期,临床 TNM 分期,病理分级和患者生存预后呈显著负相关。通过进行预后随访和生存曲线分析,笔者发现高表达 CAPN4 病例组的生存时间明显少于低表达 CAPN4 的病例组,提示 CAPN4 的表达可能影响患者的术后生存时间,CAPN4 有望成为评估结直肠癌患者预后情况的一个分子标志物。

有学者对 CAPN4 在肿瘤发生、发展过程中的作用及分子机制进行了探讨,Wang 等^[2]研究发现 CAPN4 可以通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促进黑色素瘤细胞的上皮间质转化。Zheng 等^[3]研究表明 CAPN4 通过激活 NF- κ B 信号通路诱导 MMP2 的表达从而促进鼻咽癌转移,影响患者生存预后。Gu 等^[14]研究发现 CAPN4 可以通过上调 MMP2 的表达促进非小细胞肺癌的发生、发展。研究发现 HBV 可以通过上调 CAPN4 促进肝细胞癌转移^[15]。深入研究表明,CAPN4 通过激活 FAK-Src 信号通路促进肝细胞癌的生长及转移,CAPN4 高表达的肝癌患者,其复发风险升高,生存率降低^[16]。Bai 等^[5]研究表明 CAPN4 表达上调与肝移植治疗后的肝细胞癌细胞侵袭和转移有关。此外,尚有研究表明 CAPN4 高表达与肝内胆管上皮癌的转移和侵袭密切相关,提示其有望成为治疗肝内胆管上皮癌的分子靶标^[4]。

综上所述,本研究发现 CAPN4 蛋白的表达水平与结直肠癌临床分级、TNM 分级、病理分化程度和患者总体生存率显著相关,提示 CAPN4 有望成为评估结直肠癌患者预后的新分子标志物。然而,CAPN4

蛋白在结直肠癌发生、发展过程中的具体作用及相关分子机制仍不清楚,有待于进一步研究。

参考文献

- Zhang P, Zuo Z, Wu A, et al. miR-600 inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting p53 in mutant p53-expressing human colorectal cancer cell lines[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(3): 1789-1796
- Wang E, Wang D, Li B, et al. Capn4 promotes epithelial-mesenchymal transition in human melanoma cells through activation of the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(1):379-387
- Zheng PC, Xiong C, Zhu HW, et al. CAPN4 is a marker of poor clinical outcomes and promotes nasopharyngeal carcinoma metastasis via nuclear factor-(B-induced matrix metalloproteinase 2 expression[J]. *Cancer Sci*, 2014, 105:630-638
- Zhang C, Bai DS, Huang XY, et al. Prognostic significance of CAPN4 overexpression in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *PLoS One*, 2013, 8:e54619
- Bai DS, Dai Z, Zhou J, et al. CAPN4 overexpression underlies tumor invasion and metastasis after liver transplantation for hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2009, 49:460-470
- PD Baode P Dasgupta, JF Aitken, et al. Geographic remoteness, area-level socioeconomic disadvantage and inequalities in colorectal cancer survival in Queensland: a multilevel analysis[J]. *BMC Cancer*. 2013, 24: 493
- Goll DE, Thompson VF, Li H, et al. The calpain system[J]. *Physiol Rev*, 2003, 83:731-801
- Saez ME, Ramirez-Lorca R, Moron FJ, et al. The therapeutic potential of the calpain family: new aspects[J]. *Drug Discov Today*, 2006, 11:917-923
- Carragher NO, Fonseca BD, Frame MC. Calpain activity is generally elevated during transformation but has oncogene-specific biological functions[J]. *Neoplasia*, 2004, 6:53-73
- Arthur JS, Elce JS, Hegadorn C, et al. Disruption of the murine calpain small subunit gene, CAPN4: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20:4474-4481
- Dourdin N, Bhatt AK, Dutt P, et al. Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(51): 48382-48388
- Roumes H, Leloup L, Dargelos E, et al. Calpains: markers of tumor aggressiveness[J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316:1587-1599
- Zhuang Q, Qian X, Cao Y, et al. Capn4 mRNA level is correlated with tumour progression and clinical outcome in clear cell renal cell carcinoma[J]. *J Int Med Res*, 2014, 42(2):282-291
- Gu J, Xu FK, Zhao GY, et al. Capn4 promotes non-small cell lung cancer progression via upregulation of matrix metalloproteinase 2[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(3):51
- Zhang X, You X, Wang Q, et al. Hepatitis B virus X protein drives multiple cross-talk cascade loops involving NF-(B, 5-LOX, OPN and CAPN4 to promote cell migration[J]. *PLoS One*, 2012, 7: e31458
- Dai Z, Zhou SL, Zhou ZJ, et al. CAPN4 contributes to tumour growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by activation of the FAK-Src signalling pathways[J]. *J Pathol*, 2014, 234(3):316-328

(收稿日期:2017-05-18)

(修回日期:2017-05-20)