

• 论 著 •

结肠癌组织中 C/EBP α 的表达及其对 SW480 细胞侵袭性的影响王 林¹, 赵小飞¹, 林 山^{2△}, 蒋晓芳²

(武警浙江总队医院:1. 药剂科;2. 肿瘤科, 杭州 310052)

摘要:目的 综合分析结肠癌组织中转录因子 CCAAT/增强子结合蛋白- α (C/EBP α)的表达,并研究 C/EBP α 的表达对结肠癌 SW480 细胞系侵袭性的影响。方法 选取 2014 年 1 月至 2015 年 9 月在该院确诊为结肠癌的 36 例患者临床资料,利用免疫组织化学法分析 36 例结肠癌患者的结肠癌组织和正常组织中的 C/EBP α 表达情况。将结肠癌组中的 C/EBP α 表达情况设为研究组,正常组织中的 C/EBP α 表达情况设为对照组,每组均为 18 例。采用 SPSS17.0 统计学软件进行统计学分析,分析 C/EBP α 的表达与结肠癌临床病理参数之间的关系。在此基础上,利用蛋白免疫印迹法(Western blot)发现 SW480 细胞系为高表达 C/EBP α 肠癌细胞株;构建 pCDGFP-C/EBP α 真核表达质粒,通过细胞划痕实验研究其迁移能力的变化,并检测与肿瘤侵袭相关蛋白(KLF5、MMP-2、MMP-9、ECD)表达量的相关性。结果 免疫组织化学法的相关研究结果显示,在正常组织中,C/EBP α 的低表达率为 6.21%;在结肠癌组织中,C/EBP α 的低表达率为 67.84%,两组数据比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot 结果显示,低表达 C/EBP α 的患者的肿瘤直径越大、TMN 分期越晚,过表达 C/EBP α 的 SW480 细胞的 KLF5、MMP-2、MMP-9 表达越低,而 E 钙黏蛋白(ECD)表达越高。结论 低表达 C/EBP α 与结肠癌的 TMN 分期和转移有着密切关系,过表达 C/EBP α 能够显著降低结肠 SW480 癌细胞的侵袭性,对未来的研究方向有着重要的临床研究价值。

关键词: C/EBP α ; SW480; 结肠癌; 蛋白免疫印迹法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.16.023 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2016)16-2294-03

Expression of C/EBP α in colon carcinoma tissue and its impact on invasion of SW480WANG Lin¹, ZHAO Xiaofei¹, LIN Shan^{2△}, JIANG Xiaofang²

(1. Department of Pharmacy; 2. Department of Oncology, Hospital of Zhejiang Armed Police Force, Hangzhou, Zhejiang 310052, China)

Abstract: **Objective** To analyze the expression of C/EBP α in colon tissue and to study the impact of expression C/EBP α on invasion of SW480 cell lines. **Methods** Clinical data of 36 patients with colon cancer from January 2014 to September 2015 were collected, and C/EBP α expression was detected by immunohistochemistry. C/EBP α expression condition in colon tissue was treated as test group, and the condition in the normal tissue was treated as control group, each group had 18 cases. Using SPSS17.0 statistical software, relationship between the expression and pathological parameters was analyzed. Meanwhile, by Western blot, SW480 C/EBP α cancer cell lines were found to be high expression cell lines. Eukaryotic expression plasmid of pCDGFP-C/EBP α was built, and by cell scratch test (cell wound scratch assay), changes of migration and its relationship with tumor invasion protein (KLF5, MMP-2, MMP-9 and ECD) were detected. **Results** The results of immunohistochemistry showed that in normal tissues, low expression rate of C/EBP α was 6.21%, and low expression rate in colon tissue was 67.84%, difference was statistically significant ($P < 0.05$). Western blot analysis showed that the greater of diameter of tumor in patients with low expression of C/EBP α , the later stages of TMN as well as the higher expression of KLF5, MMP-2 and MMP-9 in over-expression of C/EBP α of SW480 cells, while the lower expression of ECD. **Conclusion** The low expression of C/EBP α is closely related to TMN staging and metastasis of colon cancer. Overexpression of C/EBP α can significantly reduce the SW480 invasion of colon cancer cell, which has important clinical value in the future research.

Key words: C/EBP α ; SW480; colon cancer; western blot

结肠癌是一种消化道恶性肿瘤,常发生于结肠部位,在临床上是一种比较常见的疾病^[1-3]。结肠癌好发于中老年人群,结肠癌的发病率在肠道肿瘤疾病中居于第 3 位,病死率以及致残率较高,而我国即将成为老龄人口大国,因此对结肠癌的相关研究迫在眉睫。笔者将根据相关工作经验,选取武警浙江总队医院 36 例结肠癌患者的病理标本,分析转录因子 CCAAT/增强子结合蛋白- α (C/EBP α) 在结肠癌组织中的表达情况以及其表达与临床病理参数之间的关系,在此基础上分析研究 C/EBP α 的过表达对结肠癌细胞系 SW480 侵袭性的影响,这将为寻找结肠癌的新的分子标志物以及为基因靶向的相关治疗提

供科学数据参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 1 月至 2015 年 9 月在本医院确诊为结肠癌的 36 例患者临床资料,36 例患者的癌组织以及正常组织均制成石蜡标本,利用免疫组织化学法分析 36 例结肠癌患者的结肠癌组织和正常组织中的 C/EBP α 表达情况。把结肠癌组中的 C/EBP α 表达情况设为研究组,把正常组织中的 C/EBP α 表达情况设为对照组,每组均为 18 例。研究组患者中有女 6 例,男 12 例,平均年龄(52.4 ± 2.58)岁;其中有 10 例肿瘤直径 > 5 cm 患者,8 例肿瘤直径 ≤ 5 cm;9 例 T1+T2 期,9

例 T3+T4 期。对照组患者中女 7 例,男 11 例,平均年龄(52.1±2.68)岁。研究组与对照组两组患者在年龄以及性别比例等一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色以及评价 免疫组织化学染色参照相关试剂盒进行,现烤片再脱蜡分化,最后进行抗原修复。封闭非免疫动物血清,在一抗孵育(37℃+1.0 h 或 4℃过夜)、二抗孵育(37℃+0.5 h)后,DAB 显色,由 2 名或者 2 名以上的病理科医师进行评价染色的结果。染色强度评分标准:0 分为无染色者(未表达 C/EBPα),1 分为染色稍稍高于背景者,2 分为显著高于背景者,3 分为染色很深;0<染色指数≤4 表示低表达 C/EBPα;染色指数≥6 表示高表达 C/EBPα。阳性细胞数评分标准:0 分为无阳性细胞,3 分为阳性,4 分为超过 80%。总评分=染色强度评分+阳性细胞数评分。阴性(−)为 0~2 分,弱阳性至阳性(+)为 3~5 分,强阳性(++)为 6~7 分。

1.2.2 质粒构建构建 pCDGFP-C/EBPα 真核表达质粒,引物为:F-CGC GGA TCC GCG AGC CAC CAT GGA GTC GGC CGA CT;R-CCG GAA TTC CGG CGC GCA GTT GCC CAT G,首先利用 PrimeSTAR 聚合酶、通过 PCR 技术从含有人 C/EBPα 的 cDNA 文库中扩增出 C/EBPα 的编码序列,并对 PCR 产物进行琼脂糖电泳并胶回收纯化,对纯化后的 PCR 产物进行双酶切(BamH I 和 EcoR I),同时对 pCDGFP 载体也进行相同的双酶切。

1.2.3 细胞培养与细胞转染 结肠癌细胞株 SW480 购于百恩维生物科技有限公司,使用含 10%胎牛血清在 37℃,10%CO₂ 的 DMEM 培养基进行培养。细胞转染采用脂质体转染法,首先 SW480 细胞和浓度约为 500 ng/L 的 pCDGFP-C/EBPα 质粒,其次取适量转染液(Opti-MEM)分别稀释 15 μL lip2000 和 5 μg 质粒,培养 3~5 h 后,最后更换完全培养基,继续培养 22~70 h。

1.2.4 Western blot 每孔细胞加入 200 L 细胞裂解液,刮下细胞,摇匀,计算 100 g 的蛋白质上样量,加入 4×上样缓冲液,使蛋白质变性。

1.2.5 细胞划痕实验 对转染之后的 pCDGFP-C/EBPα 以及 pCDGFP,未转染的三皿 SW480 细胞进行划痕实验,在转染 6 h 换液后用 PBS 清洗 2~3 次,洗去划下的细胞,继续培养,定期换液,并在 0 h、24 h、48 h 和 72 h 4 个时间点观察细胞的迁移运动情况,每个视野下选取 10 个观测点,准确记录迁移起点到最远点的细胞间距,求平均间距,并通过以下公式计算各组细胞不同时间点的迁移率:迁移率=(划痕初始宽度值-各时间点划痕宽度值)/划痕初始宽度值×100%。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异、组内比较采用 t 检验,计数资料组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组患者的免疫组织化学法结果比较 免疫组织化学法的相关研究结果显示,对照组 C/EBPα 的低表达率为 6.21%,研究组 C/EBPα 的低表达率为 67.84%,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

2.2 C/EBPα 表达和结肠癌临床病理参数的关系 在 36 例结肠癌组织中,C/EBPα 的表达与结肠癌患者的性别、年龄等临床病理参数比较无相关性($P>0.05$);但和结肠癌的肿瘤直径、TNM 分期存在相关性($P<0.05$),见表 2。

表 1 研究组与对照组患者的相关表达				
组别	<i>n</i>	低表达例数(<i>n</i>)	低表达率(%)	正确诊断率(%)
研究组	18	10	67.84	93.33
对照组	18	2	6.21	56.67
χ^2			2.5464	3.6451
<i>P</i>			<0.05	<0.05

表 2 C/EBPα 表达和结肠癌临床病理参数的关系(*n*)

组别	<i>n</i>	年龄		性别		肿瘤直径		TNM 分期	
		≤50 岁	>50 岁	男	女	≤5 cm	>5 cm	T1+T2	T3+T4
低表达	36	10	12	12	13	12	2	1	3
高表达	36	6	8	11	10	13	9	13	19
<i>P</i>		>0.05		>0.05		<0.05		<0.05	

2.3 低表达 C/EBPα 对肿瘤侵袭相关蛋白表达的影响 Western blot 结果显示,低表达 C/EBPα 的患者的肿瘤直径越大、TMN 分期越晚,过表达 C/EBPα 的 SW480 细胞的 KLF5、MMP-2、MMP-9 表达越低,而 E 钙黏蛋白(ECD)表达越高;细胞划痕实验结果表明,48 h 之后,低表达 C/EBPα 的 SW480 细胞的迁移率为 52.87%,过表达 C/EBPα 的 SW480 细胞的迁移率为 22.47%,两组数据比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

结肠癌的主要病因是摄入的纤维素不够以及家族遗传因素等,结肠癌的主要临床表现为早期消化不良,中期出现贫血以及水肿等中毒症状,晚期则出现黄疸以及腹腔积液等临床症

状^[4-9]。结直肠癌的主要类型为以下 2 种:左半结肠癌和右半结肠癌。左半结肠癌的主要表现是粪便干硬,肠胃浸润型;右半结肠癌的主要表现是粪便呈液体形态,多为溃疡性癌。为了有效抑制肿瘤的侵袭,需要分析研究结肠癌的生物分子标记物,从而能够早期诊断。本文中所研究的 C/EBPα 属于 C/EBP 转录因子家族。在 C/EBP 家族中,CCAAT/增强子结合蛋白-α 是最早被发现的一个基因,在哺乳动物中,一共有 6 个 C/EBP 家族成员,均具有高组织特异性。不同的基因因子在不同的器官中发挥着不同的作用,其中 C/EBPα 因子是细胞分化过程中的一个重要关键转录因子。C/EBPα 既高表达于肝脏、胎盘、肺以及脂肪组织等组织中,也能够有效抑制住癌细

胞组织的增殖。从上述现象来看, C/EBP α 转录因子具有比较代表性的抑制癌基因特性, 可以作为今后重点研究的方向。就目前的相关研究结果显示, C/EBP α 转录因子参与进肿瘤组织的发生与发展, 对于 C/EBP α 转录因子的低表达以及过表达都比较少^[10-11]。因此, 本文的主要研究目的是综合分析结肠癌组织中 C/EBP α 的表达, 并研究 C/EBP α 的表达对结肠癌 SW480 细胞系侵袭性的影响, 以期能够从中找到治疗结肠癌患者的有效途径。

本文免疫组织化学法的相关研究结果显示, 在正常组织中, C/EBP α 的低表达率为 6.21%; 在结肠癌组织中, C/EBP α 的低表达率为 67.84%, 两组数据比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。通过构建 pCDGFP-C/EBP α 真核表达质粒, 能够在短时间内转染进 SW480 细胞中, 在上述研究中之所以选择 pCDGFP-C/EBP α 真核表达质粒, 其主要原因是因为 pCDGFP-C/EBP α 真核表达质粒自带绿色荧光蛋白, 在经过转染后可以直接通过荧光显微镜观察其转染效率, 本文的相关研究结果显示细胞划痕实验结果表明, 48 h 之后, 低表达 C/EBP α 的 SW480 细胞的迁移率为 52.87%, 过表达 C/EBP α 的 SW480 细胞的迁移率为 22.47%, 两组数据比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。48 h 转染之后进行的细胞划痕实验, 能够有效观察到不同时间点的迁移率, 结果发现过表达 C/EBP α 48 h 后的 SW480 细胞的侵袭性显著减弱。使用 Western blot 检测了过表达 C/EBP α 48h 后转录调控因子 (KLF5)、金属基质蛋白酶 2、9 (MMP-2、MMP-9)、ECD 等蛋白的表达量变化, 结果发现低表达 C/EBP α 的患者的肿瘤直径越大、TMN 分期越晚, 过表达 C/EBP α 的 SW480 细胞的 KLF5、MMP-2、MMP-9 表达越低, 而 ECD 表达越高, 这与相关文献报道结果保持高度一致^[12-14]。之所以选择检测 MMP-2、MMP-9 蛋白, 主要原因是因为杜彦艳等^[15]报道了 KLF5、MMP-2、MMP-9 的过量表达, ECD 的低表达都将促进结肠癌细胞的侵袭。

综上所述, 低表达 C/EBP α 与结肠癌的 TMN 分期和转移有着密切关系, 过表达 C/EBP α 能够显著降低结肠 SW480 癌细胞的侵袭性, 对未来的研究方向有着重要的临床研究价值。

参考文献

- [1] 罗慧, 杨洋, 许彩民, 等. 亚硒酸钠对结直肠腺癌 HCT116 和 SW480 细胞中 β -catenin 及下游靶基因 cyclin D1 表达的影响[J]. 中国医学科学院学报, 2011, 33(6): 654-658.
- [2] 史玲, 苏坚, 廖前进, 等. 二烯丙基二硫下调 LIMK1 抑制人结肠癌 SW480 细胞迁移与侵袭[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(2): 200-205.

- [3] 苏坚, 史玲, 周钰娟, 等. DADS 下调肌动蛋白解聚因子抑制人结肠癌 SW480 细胞迁移与侵袭[J]. 中国肿瘤临床, 2012, 39(6): 310-314.
- [4] 梁文龙, 曹杰, 杨平, 等. 藤黄酸对人结肠癌 SW480 细胞裸鼠移植瘤生长及血管生成的影响[J]. 广东医学, 2014, 15(16): 2498-2501.
- [5] 瞿金妙, 尤捷, 刘海光, 等. 氟尿嘧啶对人结肠癌 SW480 细胞 ABCG2 表达的影响[J]. 中华胃肠外科杂志, 2013, 16(1): 89-92.
- [6] 马宇霆, 王丹, 王瑞平, 等. 健脾化痰方对缺氧微环境下结肠癌 SW480 细胞生物学行为的影响[J]. 成都医学院学报, 2015, 10(3): 265-268.
- [7] 魏付桥, 谢文彪, 申清香, 等. 异硫氰酸苯乙酯通过 PI3K-NF- κ B-MMP-9 途径抑制结肠癌 SW480 细胞的迁移和侵袭[J]. 基础医学与临床, 2014, 34(7): 927-932.
- [8] 曾元凤, 肖移生, 罗小江, 等. FMNL3 基因转染对结直肠腺癌 SW480 细胞 EMT 和体外侵袭能力的影响[J]. 重庆医学, 2014, 15(12): 1460-1462, 1467.
- [9] 竺平, 谷云飞, 杨柏霖, 等. 有毒中药对人结肠癌 HCT116 和 SW480 细胞的生长抑制作用[J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(4): 351-354.
- [10] 苏坚, 史玲, 周钰娟, 等. DADS 通过 Rac1-ADF/cofilin1 通路抑制人结肠癌 SW480 细胞迁移与侵袭[J]. 中国肿瘤临床, 2013, 15(8): 815-820.
- [11] 郭睿, 李喜霞, 解军, 等. siRNA 表达载体对 SW480 细胞原癌基因 Pokemon 的抑制[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(1): 7-13.
- [12] 谭泽明, 伍莹, 张华莉, 等. CoCl₂ 缺氧诱导 SW480 细胞化疗耐药及其机制[J]. 中南大学学报(医学版), 2006, 31(3): 345-349.
- [13] 刘志毅, 金虎, 翟春亮, 等. 放疗增强对转染 pAdKDR/CD/TK 自杀基因系统的 SW480 大肠癌细胞的杀伤作用[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(10): 1767-1770.
- [14] 王建新, 吕艳锋, 韩冰冰, 等. 靶向 EZH2 基因的短发夹 RNA 表达载体的构建及其对人结肠腺癌 SW480 细胞的增殖抑制作用[J]. 中华肿瘤杂志, 2012, 34(7): 730-733.
- [15] 杜彦艳, 刘鑫, 单保恩, 等. 香加皮红柳苷通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路诱导结肠癌细胞 SW480 凋亡[J]. 癌症, 2009, 28(5): 456-460.

(收稿日期: 2016-02-10 修回日期: 2016-04-19)

(上接第 2293 页)

- [2] 宋晓丽, 张翠萍, 刘志兵, 等. 金湖县黎城镇中小学生肠道寄生虫感染情况调查分析[J]. 中国农村卫生, 2014, 16(1): 53-55.
- [3] 石晶, 尹燕双, 王金花, 等. 在校大学生寄生虫感染情况调查与分析[J]. 卫生职业教育, 2013, 31(2): 106-107.
- [4] 张跃天, 姜海娟, 梁俊杰, 等. 2012 年新疆阜康市儿童寄生虫感染调查分析[J]. 疾病预防控制通报, 2013, 28(1): 80-90.

- [5] 张倩, 陈颖丹, 许隆祺, 等. 我国土源性线虫病综合防治示范区 3 年防治效果[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2011, 23(5): 476-482.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 2006~2015 年全国重点寄生虫病防治规划[Z]. 北京: 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 2006.

(收稿日期: 2016-02-12 修回日期: 2016-04-21)