

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 12. 001

血清 CD146 表达在结直肠癌早期诊断中的价值及机制^{*}

邱芳华¹, 刘道利², 龙华婧^{2△}, 杨泽填³, 刘丽芳³

(广州市中医医院:1. 感染科;2. 检验科 510130;3. 广州中医药大学 510130)

摘要:目的 明确血清 CD146 在结直肠癌(CRC)早期筛查中的诊断价值及机制。方法 收集 22 例新鲜结直肠癌患者的标本(癌及对应的癌旁组织各 11 例),对 YAP 及 CD146 进行免疫印迹法(WB)检测;在结直肠癌细胞株 HCT-116 及 HT-29 中过表达 YAP 后采用 WB 检测 CD146 表达;选取健康对照者 40 例作为对照组,腺瘤患者 40 例作为腺瘤组,以及 167 例结直肠癌患者作为 CRC 组,采用酶联免疫吸附试验检测血清 CD146 水平。结果 CD146 及其调控因子 YAP 在结直肠癌组织中明显表达上调,HCT-116 及 HT-29 细胞中过表达 YAP 可明显上调 CD146 表达;CRC 组血清 CD146 水平明显高于对照组和腺瘤组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);CRC 患者切除术后血清 CD146 明显低于术前。血清 CD146 水平与结直肠癌分化、肿瘤细胞浸润程度、远处转移呈正相关。结论 血清 CD146 有望作为 CRC 诊断及预后判断的分子标志物,CD146 的表达与 YAP 密切相关。

关键词:结直肠癌; CD146; YAP 调控

中图法分类号:R735.3

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)12-1697-04

The value and mechanism of CD146 expression in the early diagnosis of colorectal cancer^{*}

QIU Fanghua¹, LIU Daoli², LONG Huajing^{2△}, YANG Zetian³, LIU Lifang³

(1. Department of Infectious Disease; 2. Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510130, China; 3. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510130, China)

Abstract: **Objective** To clarify the diagnostic value and mechanism of serum CD146 in early screening of the colorectal cancer. **Methods** A total of 22 tissue samples of colorectal cancer patients were collected for WB detection of YAP and CD146; CD146 expression was detected by WB after overexpression of YAP in HCT116 and HT-29 of colon cancer cell lines. A total of 40 cases of healthy persons were taken as control group. A total of 40 cases of adenoma patients were taken as adenoma group and 167 cases of colorectal cancer were taken as colorectal cancer group, serum CD146 concentration was detected by ELISA. **Results** The expressions of CD146 and its regulatory factor YAP were obviously up-regulated in colorectal carcinoma. The overexpression of YAP in HCT-116 and HT-29 cells can obviously lead to the up-regulation of CD146 expression, and the level of CD146 in the colon cancer group was significantly higher than that in the healthy control group and the adenoma group, and the difference were statistically significant ($P < 0.05$), and the serum CD146 was significantly lower than that before the resection of colon cancer. Serum CD146 level was positively correlated with intestinal differentiation, tumor cell infiltration and distant metastasis. **Conclusion** Serum CD146 can be expected to be a molecular marker for the diagnosis and prognosis of colorectal cancer. The expression of CD146 is closely related to YAP.

Key words: colorectal cancer; CD146; YAP regulation

结直肠癌(CRC)是常见的消化道恶性肿瘤,多年来其发病率在世界范围内高居第 3 位^[1]。在过去 20 多年,曾经低发病率的亚洲地区也呈暴发式增长^[2-3]。近年来,随着我国居民生活方式及饮食结构的转变,

我国大肠癌发病率也急剧上升,严重威胁着人民的健康,并带来了沉重的经济负担^[4]。早期发现 CRC 5 年生存率可高达 97%,一旦复发或转移,即使选择手术治疗,成功率也降至 12%^[5]。因此,寻找一种有效诊

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81503424);广东省自然科学基金资助项目(2014A030313802);广东省广州市产学研协同创新重大专项资助项目(201704020171)。

作者简介:邱芳华,女,副主任技师,主要从事分子生物学研究。 △ 通信作者, E-mail: lhj04708@163.com。

断标志物有重要的社会意义和临床价值。CD146 又称为黑色素瘤细胞黏附分子(MCAM),最初是在黑色素瘤中发现的跨膜糖蛋白^[6]。有研究发现,CD146 可在多种实体瘤中促进肿瘤生长、血管生成及转移,可能是基因治疗的一项精准靶点^[7]。有研究发现,YAP 及 CD146 在肝癌组织中表达上调,YAP 可通过 CREB 信号通路上调 CD146 的表达^[8]。近年研究发现,YAP 在结肠癌中过表达,在癌变进展中起到至关重要的作用^[9-11]。因此,本研究推测,过度活化的 YAP 可能在 CRC 中上调 CD146 表达水平;另一方面,CD146 作为细胞膜分子,可能分泌或脱落释放入血,是 CRC 新的血清生物学标志物。本研究首先采用组织标本验证 YAP 及 CD146 的表达情况,在 CRC 细胞株中过表达 YAP 并检测 CD146 水平;同时比较对照组、腺瘤及 CRC 患者血清中 CD146 水平,以明确其临床诊断意义,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集广州市中医医院 2014—2017 年收治的腺瘤及肠癌组织标本,术后新鲜组织立即放入液氮中保存。其中腺瘤 40 例(腺瘤组),I 期 CRC 32 例,II 期 CRC 40 例,III 期 CRC 46 例,IV 期 CRC 49 例(CRC 组);对照组为健康人群 40 例。所有 CRC 诊断均符合《结直肠癌诊疗规范(2015 版)》。采集所有研究对象空腹外周血 5 mL,3 000 r/min 离心 10 min 后放-80℃保存。

1.2 细胞培养及 YAP 过表达 CRC 细胞株 HCT-116 及 HT-29 均在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中进行培养。YAP cDNA 片段由 Origene(RC231269)购得,并装载于真核表达载体 pcDNA 3.1(+)中。以 pcDNA3.1(+)空载为对照(NC),pcDNA3.1-YAP 为试验组分别转染于 CRC 细胞 HCT-116 及 HT-29 中。转染试剂为 lipofectin 2000(Invitrogen),转染步骤按说明书操作。

1.3 蛋白免疫印迹法(WB)检测 总蛋白由蛋白裂解 RIPA 裂解,BCA 试剂盒进行定量。30 μg 蛋白上样、电泳、转膜、封闭、4℃一抗孵育过夜及常温二抗 1 h,最后进行显色。所用抗体 YAP(14074)、CD146(13475)及 GAPDH(5174)均购自 CST。稀释度为 1:1 000。

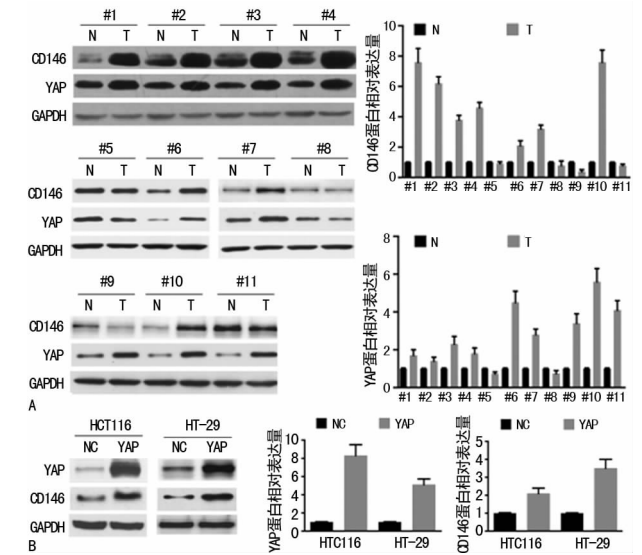
1.4 酶联免疫吸附试验(ELISA) CD146 ELISA 试剂盒购自上海抚生生物科技有限公司。ELISA 严格按照试剂说明书进行,所用样品用缓冲液稀释(1:4),同时制备标准曲线,线性范围为 5~70 000 ng/mL。

1.5 统计学处理 采用 Medcalc 15.6.1 软件进行统计分析。检测结果呈非正态分布数据,采用两独立样本非参数检验进行两组间比较(Mann-Whitney 检

验),受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析评估曲线下面积(AUC)。 χ^2 检验用于参数间相关性分析。

2 结果

2.1 YAP 过表达促进 CRC 细胞 CD146 表达 收集 11 对 CRC 患者的新鲜标本,对 YAP 及 CD146 表达水平进行检测。如图 1A 所示,YAP 及 CD146 在 7 例患者(#1~4, #6~7 及 #10)CRC 组织中表达水平明显升高。为了进一步明确 YAP 对 CD146 表达的调控作用,本研究在 CRC 细胞株 HCT-116 及 HT-29 中过表达 YAP,发现 2 株细胞过表达 YAP 后,CD146 蛋白表达水平明显升高(图 1B)。

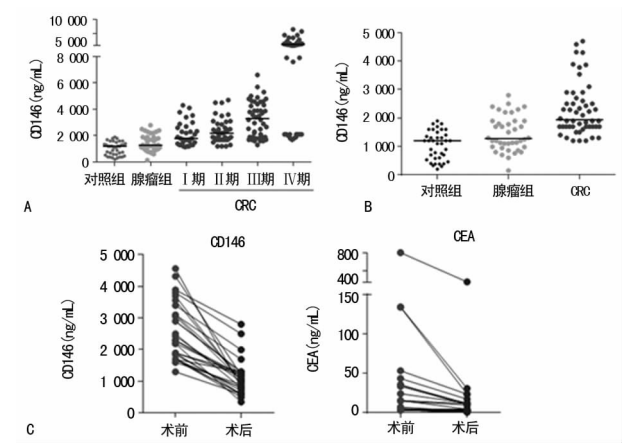


注:A为11例CRC组织YAP及CD146的表达;B为YAP在HCT116及HT-29CRC细胞株中过表达上调CD146;NC为过表达对照空载质粒;N为癌旁组织;T为癌组织

图1 YAP在CRC中过表达并诱导CD146水平上调

2.2 血清CD146在健康者、腺瘤及不同阶段肠癌患者中的表达水平 根据上述结果推测,在肠癌患者血清中可能检测出CD146水平。采用ELISA对对照组,腺瘤组,I、II、III、IV期CRC患者进行血清CD146水平检测。如图2A所示,CRC患者血清CD146水平明显高于对照组及腺瘤组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。因为血清癌胚抗原(CEA)是目前CRC经典的肿瘤标志物,以6.565 ng/mL为截断值(40例健康者第95%百分位数),把上述人群分为CEA阳性组和CEA阴性组。结果表明,在CEA阴性组,除健康者和腺瘤患者外,有相当一部分(31%)CRC患者其血清CD146水平较高,提示血清CD146诊断CRC比CEA有更高的灵敏度(图2B)。诊断指标的灵敏度还表现在肿瘤移除后的变化程度,本研究对上述30例CRC患者进行术后1个月随访,检测其血清CD146及血清CEA水平变化。如图2C所示,血清CD146水平术后较术前明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$),平均相对变化35.72%,CEA术后与术前比较降低不明显,提示CD146作为诊断CRC的

敏感度高。



注:A 为血清 CD146 在对照组、腺瘤组及 CRC 组表达水平;B 为血清 CEA 阴性标本中对照组、腺瘤组及 CRC 组的 CD146 水平;C 为血清 CD146 及 CEA 水平在 CRC 组患者手术前后变化情况

图 2 血清 CD146 在对照组、腺瘤组及 CRC 组的表达水平

2.3 血清 CD146 与 CEA 早期诊断 CRC 的性能比较 见图 3。腺瘤组与对照组比较,CD146 的 AUC 为 0.646(95%CI:0.531~0.750),CEA 的 AUC 为 0.559(95%CI:0.443~0.670),2 项指标均不能进行有效区分腺瘤患者与对照者。早期 CRC 患者(I 期 CRC)CD146 的 AUC = 0.831,95%CI:0.724~0.909,较 CEA 的 AUC = 0.527,95%CI:0.406~0.646 诊断性能更高。所有 CRC 患者血清 CD146 的 AUC 高达 0.925,95%CI:0.881~0.957,而 CEA 的 AUC 为 0.801,95%CI:0.740~0.853。

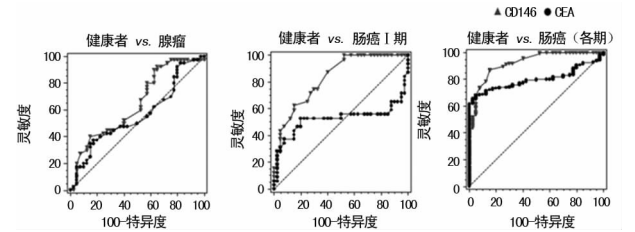


图 3 血清 CD146 及 CEA 诊断 CRC 性能比较

表 1 血清 CD146 水平与临床病理资料的相关性分析(n)

变量		血清 CD146		P
		低水平	高水平	
年龄(岁)	≥65	36	41	0.488 6
	<65	48	42	
性别	女	46	51	0.472 5
	男	38	32	
肿瘤部位	结肠	47	52	0.469 4
	直肠	37	31	
分化程度	高/中分化	83	74	0.021 3
	低分化	1	9	

续表 1 血清 CD146 水平与临床病理资料的相关性分析(n)

变量		血清 CD146		P
		低水平	高水平	
浸润程度(T)	T1/T2	26	14	0.051 1
	T3/T4	58	69	
淋巴结转移	阴性	53	26	<0.000 1
	阳性	30	58	
远处转移	阴性	72	46	<0.000 1
	阳性	12	37	
CEA	低水平	53	30	0.000 9
	高水平	31	53	

2.4 血清 CD146 水平与临床资料相关性分析 对 CD146 在 CRC 患者血清中水平和患者临床资料进行进一步分析,取所有 CRC 患者血清 CD146 中位数作为截断值,将 CRC 患者分为血清 CD146 低水平组及高水平组,对这两组患者临床及病理资料进行分析(表 1),结果显示,血清 CD146 水平与肠癌的分化高低、肿瘤细胞浸润程度、远处转移与否及 CEA 水平高低差异均有统计学意义($P<0.05$)。提示血清 CD146 水平不仅可作为 CRC 患者的早期诊断标志物,也与上述 CRC 患者预后的高危因素密切相关,是临床不良结局的预测指标。

3 讨论

大肠癌在世界范围内发病率、病死率不断上升。随着经济发展和人民生活水平不断提高,以及生活方式、膳食结构的改变,我国大肠癌发病率也呈逐年上升趋势^[12]。目前,CRC 筛查最为准确的方法为肠镜,然而因其具有侵入性,操作前需进行肠道准备、依从性差等原因并没有被普及。大便潜血检查虽然因其无创、价格低廉等被广泛接受,但仅能检出 30%~65% 的肠癌,漏诊率高。CEA 作为目前较为常用的诊断指标存在特异性差及灵敏度过低等问题^[13-15]。因此,临床上急需有效、敏感的标志物尽早对 CRC 进行诊断,以便早期干预和处理。

CD146 是肿瘤细胞表面重要的膜蛋白分子,多项研究表明,CD146 在肿瘤中高表达^[16-18]。CD146 通过直接结合 ERM 接头蛋白与细胞骨架相连来促进细胞伪足的伸长和细胞运动。CD146-ERM 复合物可以结合小 G 蛋白的抑制分子 Rho-GDI 激活 RhoA,而 Rho-PI4P5K 通路激活又进一步增强 CD146 与 ERM 的结合,参与肿瘤细胞的迁移^[19]。JIANG 等^[20]研究表明,CD146 与 VEGFR-2 相互结合,促进体外和体内血管生成。但是否可以作为肠癌的诊断指标,目前相关研究较少。

为明确 CD146 在 CRC 中的诊断作用,本研究首

先利用 WB 检测 CRC 组织及正常组织中 CD146 的表达水平,结果发现,CD146 在 8 例(共 11 例)CRC 中表达上调,且 YAP 与 CD146 均在肠癌组织中高表达,二者具有高度一致性。CRC 细胞株 HCT116 及 HT-29 在细胞株中过表达 YAP 后,CD146 明显上调,证明 CD146 表达升高的原因可能与 YAP 高表达有关,其过表达可引起 CD146 表达上调。

作为细胞表面膜分子,本课题对 CD146 是否释放或脱落进入血液循环系统,是否可以成为诊断 CRC 的新标志物进行了初步研究,结果显示,肠癌患者血清 CD146 明显高于健康对照组,肠癌组 AUC 高达 0.925,早期肠癌组 AUC 为 0.831,均高于同期的 CEA 水平。提示 CD146 与组织中 WB 检测结果吻合,表明 CD146 对 CRC 有较好的诊断意义。

本研究还进行了手术切除后血清 CD146 水平的追踪,结果提示,在患者术后 1 个月,血清 CD146 水平明显下降,而同期 CEA 水平下降不明显,提示 CD146 能够反映肿瘤负荷及切除有效性。

CRC 分化程度、浸润程度、淋巴结转移及远处转移 CRC 患者不良预后的高危因素^[21]。本研究发现,CRC 患者血清 CD146 高表达与其病理分化、侵袭深度、淋巴结转移及远处器官转移呈正相关,表明血清 CD146 水平还可作为 CRC 预后的一个风险因素。

综上所述,本研究结果初步揭示血清 CD146 有望作为 CRC 诊断及预后的分子标志物,同时明确 CD146 的表达与 YAP 密切相关。由于本研究标本数量有限,后续会进行大样本研究,进一步明确 CD146 的临床应用价值。

参考文献

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] POURHOSEINGHOLI M A. Increased burden of colorectal cancer in asia[J]. World J Gastrointest Oncol, 2012, 4(4): 68-70.
- [3] FERLAY J, SHIN H R, BRAY F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008 [J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893-2917.
- [4] CHEN W, ZHENG R, BAAD P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-119.
- [5] DESANTIS C E, LIN C C, MARIOTTO A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(4): 220-228.
- [6] KAMIYAMA T, WATANABE H, IJIMA M, et al. Co-expression of CCR6 and CD146(MCAM) is a marker of effector memory T-helper 17 cells[J]. J Dermatol, 2012, 39(10): 838-842.
- [7] WANG J, YAN X. Cd146, a multi-functional molecule beyond adhesion[J]. Cancer Lett, 2013, 330(2): 150-162.
- [8] WANG J, TANG X, WENG W, et al. The membrane protein melanoma cell adhesion molecule(MCAM) is a novel tumor marker that stimulates tumorigenesis in hepatocellular carcinoma [J]. Oncogene, 2015, 34(47): 5781-5795.
- [9] AVRUCH J, ZHOU D, BARDEESY N. YAP oncogene overexpression supercharges colon cancer proliferation [J]. Cell Cycle, 2012, 11(6): 1090-1096.
- [10] WANG Z, LIU P, ZHOU X, et al. Endothelin promotes colorectal tumorigenesis by activating YAP/TAZ [J]. Cancer Res, 2017, 77(9): 2413-2423.
- [11] LIU Y, WANG G, YANG Y, et al. Increased TEAD4 expression and nuclear localization in colorectal cancer promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a YAP-independent manner[J]. Oncogene, 2016, 35(21): 2789-2800.
- [12] 邵文秀, 古小玲, 骆菊英, 等. 吸烟等相关因素与大肠癌的流行病学研究[J]. 中国热带医学, 2017, 17(7): 679-681.
- [13] VAN G A, MUNOZ-NAVAS M, FERNANDEZ-URIEN I, et al. Capsule endoscopy versus colonoscopy for the detection of polyps and cancer[J]. N Engl J Med, 2009, 361(3): 264-270.
- [14] 赵丽中, 王宏磊. 大肠癌早期诊断研究进展[J]. 中国肿瘤, 2014, 23(2): 103-108.
- [15] 王永琦, 孟津, 何冬雷, 等. miR-21 联合 CEA 在结肠癌诊断中的应用[J]. 中国热带医学, 2015, 15(5): 609-611.
- [16] 任红, 樊静, 康文喜, 等. 大肠癌组织中 CD105、CD146 的表达及转移的研究[J]. 中国医刊, 2011, 46(6): 57-59.
- [17] 陈秀芹, 葛倩倩, 郭琦, 等. CD146 在卵巢上皮性癌及子宫内膜癌中的表达[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(8): 1069-1071.
- [18] 袁红纲, 龙兵, 董自强, 等. CD146 与泌尿系肿瘤关系的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(8): 1162-1165.
- [19] LUO Y, ZHENG C, ZHANG J, et al. Recognition of CD146 as an ERM-binding protein offers novel mechanisms for melanoma cell migration [J]. Oncogene, 2012, 31(3): 306-321.
- [20] JIANG T, ZHUANG J, DUAN H et al. CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis[J]. Blood, 2012, 120(11): 2330-2339.
- [21] SIDERIS M, PAPAGRIGORIADIS S. Molecular biomarkers and classification models in the evaluation of the prognosis of colorectal cancer[J]. Anticancer Res, 2014, 34(5): 2061-2068.