

• 临床检验研究论著 •

结肠癌组织中蛋白酶活化受体-1 的表达及意义

汪宏梅

(江苏省泰兴市人民医院检验科, 江苏泰兴 225400)

摘要:目的 探讨结肠癌组织中蛋白酶活化受体-1(PAR-1)mRNA 的表达情况及其临床意义。方法 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 33 例结肠癌患者癌组织及其相应癌旁组织中 PAR-1 mRNA 的表达情况,分析 PAR-1 mRNA 与结肠癌分化程度、病理分期以及转移等指标的相关性。结果 结肠癌组织中 PAR-1 mRNA 的表达明显增高,比邻近癌旁组织平均高 4.99 倍;二者 ΔCt 比较, $t=9.15$, $P<0.01$ 。同时低分化的结肠癌患者组 PAR-1 mRNA 表达量明显高于中、高分化患者组, $P<0.01$;有转移患者组的 PAR-1 mRNA 表达量明显高于无转移患者组, $P<0.01$;而在结肠癌临床 I ~ II 期与 III ~ IV 期患者组之间, PAR-1 mRNA 表达量差异无统计学意义, $P>0.05$ 。结论 PAR-1 mRNA 在结肠癌中高表达,且与结肠癌的分化及是否转移有关。

关键词:蛋白酶活化受体-1; 结肠癌; 实时荧光定量聚合酶链反应; 凝血酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.24.023

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)24-3320-02

Clinical significance of PAR-1 mRNA expression in patients with colorectal carcinoma

Wang Hongmei

(Department of Laboratory Medicine, People's Hospital of Taixing City, Taixing, Jiangsu 225400, China)

Abstract: Objective To explore the expression of protease-activated receptor-1(PAR-1) mRNA in colorectal carcinoma(CRC) and its clinical significance. **Methods** Tissue samples, including 33 cancerous and adjacent non-cancerous tissues were obtained from CRC patients who underwent surgical resection. The expression of PAR-1 mRNA was analyzed by real-time PCR. The relationship between PAR-1 mRNA and clinicopathological features was also evaluated. **Results** The expression of PAR-1 mRNA in CRC was 4.99 times higher than that in the corresponding adjacent non-cancerous tissues ($P<0.05$). Moreover, the expression of PAR-1 mRNA in poorly differentiated CRC patients was significantly higher than that of moderately and well-differentiated group ($P<0.01$). The expression of PAR-1 mRNA in metastasis group was obviously higher than that in without metastasis group ($P<0.01$). However, no significantly difference was observed between the groups in the clinical stage I ~ II and III ~ IV ($P>0.05$). **Conclusion** PAR-1 mRNA has a high expression in colorectal tissues, and has a relationship with the degree of differentiation and metastasis.

Key words: protease-activated receptor-1; colorectal carcinoma; quantitative real-time fluorescence RT-PCR; thrombin

研究表明,对于临床上多数肿瘤患者,其肿瘤微环境中大量的凝血酶存在,并伴随着不同程度的凝血功能亢进,过量富集的凝血酶可参与肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移、血管形成以及组织重构^[1-3]。研究发现,蛋白酶活化受体家族成员(PARs)可作为受体参与介导凝血酶的这种肿瘤生物学行为方面的功能。目前已发现 PARs 共有 4 种亚型,分别命名为 PAR-1~4,其中 PAR-1 是第 1 个被发现的该家族中的成员。PAR-1 主要参与肿瘤微环境中凝血酶介导的肿瘤细胞对内皮细胞以及细胞外基质的黏附,参与促进肿瘤生长、转移以及血管形成^[4-7],但是关于 PAR-1 在结肠癌组织中的表达情况以及功能机制的研究报道较少。本研究运用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)技术检测 PAR-1 mRNA 在结肠癌组织中的表达情况,分析 PAR-1 与肿瘤分化程度、临床分期和是否转移等病理特征的相关性并探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院结肠癌住院患者共 33 例,其中男 21 例,女 12 例,中位年龄 63 岁,均经病理确证为腺癌,其中低分化腺癌 10 例,中、高分化腺癌 23 例;临床分期, I ~ II 期 18 例, III ~ IV 期 15 例;有转移患者 8 例,无远距离转移患者 25 例。所有病例均进行外科手术,结肠癌组织和癌旁组织(距肿瘤边缘距离大于 5 cm)各取材 50~100 mg,加入 1 mL Trizol, -80 °C 保存备用。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成 标本经匀浆器匀浆,静置 10 min,加 200 μ L 氯仿混匀,离心取上清,异丙醇沉淀,75%乙醇洗涤, RNA 纯度与浓度经紫外核酸测定仪检测,260/280 范围在 1.8~2.0 之间。按美国 Fermentas 公司逆转录试剂盒说明进行 cDNA 合成。

1.3 RT-PCR 检测 PCR 反应在美国 ABI 公司 7500 型荧光定量 PCR 仪上进行,仪器配套软件分析扩增曲线、熔解曲线以及循环阈值(Ct)。反应体系和条件按大连宝生物公司(Takara)提供试剂操作说明进行。PAR-1 上游引物为 5'-GCC TGC TTC AGT CTG TGC G-3',下游引物为 5'-CAA TCA CTG CCG GAA AAG TA-3',产物长度 473 bp。内参 β -actin 上游引物为 5'-CAC GAA ACT ACC TTC AAC TCC-3';下游引物为 5'-CAT ACT CCT GCT TGC TGA TC-3',产物长度 262 bp。引物由上海生工生物公司合成。

1.4 统计学处理 PAR-1 mRNA 的相对量按公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算, $\Delta Ct = Ct(\text{PAR-1 基因}) - Ct(\text{内参 } \beta\text{-actin 基因})$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{肿瘤组织}) - \Delta Ct(\text{癌旁组织})$ 。运用 SPSS15.0 软件进行统计分析, ΔCt 值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PAR-1 扩增产物验证分析 熔解曲线结果显示 PAR-1 扩增产物为单一峰,无引物二聚体和非特异性条带产生,见图

1(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”),表明设计的引物特异性好,设计符合要求,可用 RT-RCR 法进行检测。

2.2 PAR-1 与 β -actin 扩增效率比较 将 PAR-1 和内参照 β -actin 的 cDNA 经 1:2、1:4、1:8、1:16 倍比稀释,分别 RT-PCR 得各自 Ct 值,以稀释倍数的对数值为横坐标,各稀释度的 Δ Ct 值为纵坐标,线性回归分析显示,不同稀释倍数标本的 Δ Ct 值之间呈线性关系,得回归方程: $Y=0.033\ 2X+10.644$,直线方程斜率为 0.033 2,其绝对值小于 0.1,提示 PAR-1 与 β -actin 扩增效率相似,符合 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法的应用条件。

2.3 结肠癌组织中 PAR-1 mRNA 的表达 RT-PCR 检测结

果显示,PAR-1 mRNA 在结肠癌组织及相应的癌旁组织中均有表达,但在癌组织中的表达明显增高,比癌旁组织平均高 4.99 倍,二者 Δ Ct 差异有统计学意义($t=9.15, P<0.01$),见表 1。结肠癌组织中 PAR-1 mRNA 含量与病理特征的关系见表 2,低分化的结肠癌患者组 PAR-1 mRNA 表达量明显高于中、高分化组, $P<0.01$;有转移患者组的 PAR-1 mRNA 表达量显著高于无转移患者组, $P<0.01$;而结肠癌临床 I~II 期与 III~IV 期患者组之间的 PAR-1 mRNA 表达无显著差异, $P>0.05$ 。

表 1 结肠癌组织与相应癌旁组织中 PAR-1 表达

组别	<i>n</i>	Ct(PAR-1)	Ct(β -actin)	Δ Ct	$-\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
癌旁组织	33	26.44 $\pm$ 0.89	13.35 $\pm$ 0.81	13.09 $\pm$ 1.00	0.00 $\pm$ 1.00	1.00(0.50~2.00)
结肠癌组织	33	23.89 $\pm$ 1.13	13.12 $\pm$ 0.67	10.77 $\pm$ 1.06*	2.32 $\pm$ 1.06	4.99(2.39~10.41)

*: $t=9.15, P<0.01$,与癌旁组织比较。

表 2 PAR-1 mRNA 含量与结肠癌组织病理特征的相关性

临床参数	<i>n</i>	Δ Ct	<i>t</i>	<i>P</i>	
分化程度	中、高分化	23	11.14±0.63	5.35	<0.01
	低分化	10	9.72±0.85		
临床分期	I～Ⅱ期	18	10.85±0.81	0.76	0.453
	Ⅲ～Ⅳ期	15	10.62±0.93		
转移情况	无	25	11.02±0.57	4.80	<0.01
	有	8	9.81±0.77		

3 讨 论

PAR-1 曾被命名为凝血酶受体-1,该基因位于染色体 5q13,包含 2 个外显子,其蛋白由 425 个氨基酸组成,具有 G 蛋白偶联膜受体结构特点和 PARs 家族共性。正常生理状态下,PAR-1 主要在包括平滑肌细胞、成纤维细胞、内皮细胞、血小板等细胞中表达,具有调节血管内皮活性、血栓形成、免疫系统功能以及参与炎症反应等的中发挥较为重要的作用。然而,已有研究表明,PAR-1 在多种恶性肿瘤组织及肿瘤细胞中高表达,一方面,凝血酶可通过 PAR-1 激活肿瘤细胞,增强其对内皮细胞、血小板以及纤维连接蛋白、vWF 因子等的黏附;另一方面,PAR-1 作为凝血酶的受体直接或间接的参与凝血酶介导的肿瘤细胞增殖、侵袭、转移以及血管生成等一系列恶性生物学行为^[7-10]。因此,国外学者现在多将 PAR-1 看作为一个潜在的癌基因。

目前,国内外学者仅是在细胞水平研究发现 PAR-1 可通过多种途径参与促进肿瘤细胞的恶性进展^[11-12],在临床肿瘤组织中的表达情况及临床价值的探讨鲜有报道。本研究应用 RT-PCR 技术检测了 PAR-1 mRNA 在结肠癌组织中的表达情况,结果显示 PAR-1 mRNA 在结肠癌组织及癌旁组织中均有所表达,但在结肠癌组织中的表达明显增高,平均高出癌旁组织 4.99 倍,二者 Δ Ct 比较, $P<0.01$ 。另外,结肠癌组织中 PAR-1 mRNA 含量与临床病理特征的相关性显示,低分化的结肠癌患者组 PAR-1 mRNA 表达量明显高于中、高分化组, $P<0.01$;有转移患者组的 PAR-1 mRNA 表达量明显高于无转移患者组, $P<0.01$;而临床 I~II 期与 III~IV 期患者组间的 PAR-1 mRNA 表达无显著性差异, $P>0.05$ 。本研究结果显示,PAR-1 在结肠癌中高表达;且与结肠癌分化的程度和是

否转移密切相关,提示 PAR-1 在结肠癌发生、发展中可能发挥较为重要的作用。

PAR-1 在凝血酶参与介导的恶性肿瘤细胞增殖、黏附、侵袭、转移以及血管生成等生物学行为中起着十分重要作用,是参与调节肿瘤细胞复杂生物学行为的重要信号分子。然而新近的研究表明,除凝血酶以外,仍然存在其他物质通过 PAR-1 对肿瘤的侵袭、转移起作用^[13-15]。因此,PAR-1 详细作用机制远未被阐明。相信随着研究的深入,PAR-1 有望成为新的肿瘤诊断标志物以及肿瘤生物治疗的干预靶点。

参考文献

[1] Hu L, Ibrahim S, Liu C, et al. Thrombin induces tumor cell cycle activation and spontaneous growth by down-regulation of p27Kip1, in association with the up- regulation of Skp2 and MiR-222[J]. Cancer Res, 2009, 69(8): 3374-3381.

[2] Wysoczynski M, Liu R, Kucia M, et al. Thrombin regulates the metastatic potential of human rhabdomyosarcoma cells: Distinct role of PAR1 and PAR3 signaling[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(5): 677-690.

[3] Franchini M, Mannucci PM. Thrombin and cancer: from molecular basis to therapeutic implications[J]. Semin Thromb Hemost, 2012, 38(1): 95-101.

[4] Han N, Jin K, He K, et al. Protease-activated receptors in cancer: A systematic review[J]. Oncol Lett, 2011, 2(4): 599-608.

[5] Borensztajn KS, Spek CA. Protease-activated receptors, apoptosis and tumor growth[J]. Pathophysiol Haemost Thromb, 2008, 36(3/4): 137-147.

[6] Villares GJ, Zigler M, Bar-Eli M. The emerging role of the thrombin receptor(PAR-1) in melanoma metastasis-a possible therapeutic target[J]. Oncotarget, 2011, 2(1/2): 8-17.

[7] Zigler M, Kamiya T, Brantley EC, et al. PAR-1 and thrombin: the ties that bind the microenvironment to melanoma metastasis[J]. Cancer Res, 2011, 71(21): 6561-6566.

[8] Naldini A, Filippi I, Ardinghi C, et al. Identification of a functional role for the protease- activated receptor-1 in hypoxic breast cancer cells[J]. Eur J Cancer, 2009, 45(3): 454-460.

[9] Tiburcio M, Costa SM, DE Fatima Duarte M, et al. Characterization of PAR1 and FGFR1 expression in invasive breast carcinomas: Prognostic significance[J]. Oncol Lett, 2012, 4(4): 647-657.

[10] Cisowski J, O'Callaghan K, Kuliopulos A, et (下转第 3323 页)

TGT CTG CGG GA-3'和 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'。将玻璃基片醛基化修饰,通过点样仪将 DNA 探针点到醛基基片上,然后用芯片活化液固定 8 h,使醛基修饰载玻片上醛基的活性增强,提高基因探针的固定效率。固定后 DNA 探针将与醛基玻片共价结合,形成阵列。提取病例组及健康对照组血液基因组 DNA,用 MTHFR 基因特异引物对其含有 MTHFR 基因所在基因片段进行扩增,并将变性后的 DNA 扩增产物与基因芯片上探针进行特异性杂交,采用 Biotin 标记的碱性磷酸酶显色反应,得到结直肠癌患者的 MTHFR 基因位点 C677T 的基因型,进而分析其与结直肠癌的相关性。

1.4 统计学处理 采用 χ^2 检验对获得的数据进行分析,结果用 SPSS10.0 软件进行相关分析, $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结 果

通过扫描芯片,得到样品 DNA 的扩增产物与每个基因位点的野生型和突变型探针杂交形成的杂交图像,图 1 为 CT 杂合子,图 2 为 CC 纯合子,图 3 为 TT 纯合子(图 1~3 见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。78 例结直肠癌患者中 MTHFR 基因的 C677T 位点 CC、CT、TT 基因型分别为 30、42、6 例,所占比例分别为 38.5%、53.8%、7.7%,40 例健康对照组中 MTHFR 基因的 C677T 位点 CC、CT、TT 基因型分别为 14、25、1 例,所占比例分别为 35.0%、62.5%、2.5%。从上述数据统计分析可知 $\chi^2=0.0528$, $P>0.05$,结直肠癌患者的 MTHFR 基因位点 C677T 的突变与其致病性无明显相关。

3 讨 论

亚甲基四氢叶酸还原酶是叶酸代谢途径中的关键酶,它不可逆地催化 5,10-亚甲基四氢叶酸还原为 5-亚甲基四氢叶酸,在此过程中产生 5 腺苷甲硫氨酸这种甲基代谢过程中的通用供体。这对于同型半胱氨酸甲基化生成甲硫氨酸和 dUMP 甲基化为 dTMP 是十分必要的。MTHFR 基因为一多态性基因,其基因有多种突变类型,不同的基因突变类型 MTHFR 表现出各种不同的酶活性和热稳定性。最常见的突变类型是 C677T 点突变,即 677 位核苷酸 C→T 点突变^[4]。此突变具有遍布世界的相对高频率,在不同种族和人群中发生频率存在较大差别,欧洲人等位基因频率是 24%~40%,日本人是 26%~37%,非洲美洲人约 11%^[5]。

已有多个报道指出,MTHFR 基因多态性与肿瘤易感性有关,包括胃癌、乳腺癌、肺癌等^[6],但是关于亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与结直肠癌易感性之间的关系所做的研究还少,并且结论不一。本次研究中发现,在重庆籍汉族人群中,MTHFR 基因多态性在结直肠癌病例和健康人之间的分布有无明显差异, $P>0.05$ 。该结论与 Sameer 等^[7]的结果一致,而

与 Yin 等^[8]的结论有所不同,这种情况也许与 MTHFR 多态性在人种之间的分布有所差异有关。

本研究成功构建了检测 MTHFR C677T 位点的基因芯片,检测方法简单易行,并初步评价了 MTHFR C677T 多态性与结直肠癌易感性的关系。但本研究的样本量偏少,尚需进行大规模的流行病学和临床研究、综合分析,才能更好地探讨基因型与表型的内在联系,找出结直肠癌发生发展的分子遗传学机制,从而指导临床的预防和治疗。

参考文献

[1] Zhong S, Yang JH, Liu K, et al. Quantitative assessment of the association between MTHFR C677T polymorphism and colorectal cancer risk in East Asians[J]. Tumour Biol, 2012, 33(6): 2041-2051.

[2] Delgado-Plasencia L, Medina-Arana V, Bravo-Gutiérrez A, et al. Impact of the MTHFR C677T polymorphism on colorectal cancer in a population with low genetic variability[J]. Int J Colorectal Dis, 2013, 28(9): 1187-1193.

[3] Lee JE, Wei EK, Fuchs CS, et al. Plasma folate, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), and colorectal cancer risk in three large nested case-control studies[J]. Cancer Causes Control, 2012, 23(4): 537-545.

[4] Scher AI, Eiriksdottir G, Garcia M, et al. Lack of association between the MTHFR C677T variant and migraine with aura in an older population; Could selective survival play a role? [J]. Cephalalgia, 2013, 33(5): 308-315.

[5] Linnebank M, Moskau S, Semmler A, et al. A Possible Genetic Link between MTHFR Genotype and Smoking Behavior[J]. PloS one, 2012, 7(12): e53322.

[6] Prasad W, Wilkhoo H. Association of the functional polymorphism C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with colorectal, thyroid, breast, ovarian, and cervical cancers[J]. Onkologie, 2011, 34(8/9): 422-426.

[7] Sameer AS, Shah ZA, Nissar S, et al. Risk of colorectal cancer associated with the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism in the Kashmiri population[J]. Genet Mol Res, 2011, 10(2): 1200-1210.

[8] Yin G, Ming H, Zheng X, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism and colorectal cancer risk; A case-control study[J]. Oncol Lett, 2012, 4(2): 365-369.

(收稿日期:2013-07-30)

(上接第 3321 页)

al. Targeting protease-activated receptor-1 with cell-penetrating pepducins in lung cancer[J]. Am J Pathol, 2011, 179(1): 513-523.

[11] Borensztajn K, Bijlsma MF, Reitsma PH, et al. Coagulation factor Xa inhibits cancer cell migration via protease-activated receptor-1 activation[J]. Thromb Res, 2009, 124(2): 219-225.

[12] Darmoul D, Gratio V, Devaud H, et al. Activation of proteinase-activated receptor 1 promotes human colon cancer cell proliferation through epidermal growth factor receptor transactivation[J]. Mol Cancer Res, 2004, 2(9): 514-522.

[13] Kim SJ, Shin JY, Lee KD, et al. Galectin-3 facilitates cell motility

in gastric cancer by up-regulating protease-activated receptor-1 (PAR-1) and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25103.

[14] Zhu L, Wang X, Wu J, et al. Cooperation of protease-activated receptor 1 and integrin $\alpha\beta 5$ in thrombin-mediated lung cancer cell invasion[J]. Oncol Rep, 2012, 28(2): 553-560.

[15] Cohen I, Maoz M, Turm H, et al. Etk/Bmx regulates proteinase-activated-receptor1 (PAR1) in breast cancer invasion; signaling partners, hierarchy and physiological significance[J]. PLoS One, 2010, 5(6): e11135.

(收稿日期:2013-08-03)