

磷脂酶 C ϵ 1 在结肠癌组织中的表达及意义^{*}

李晓冉, 杨 昆, 黄晓丽 Δ

四川大学华西医院 老年医学中心(成都 610041)

【摘要】 目的 通过检测结肠癌组织及其癌旁组织中磷酸肌醇特异性的磷脂酶 C ϵ 1 (PI-PLC ϵ 1) 的表达情况, 探讨 PI-PLC ϵ 1 在结肠癌发病过程中的临床意义。**方法** 采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 及免疫组化的方法检测 42 例结肠癌组织及其相对应的癌旁组织中 PI-PLC ϵ 1 的表达情况, 并分析肿瘤分化程度及肿瘤部位对于结肠癌组织中 PI-PLC ϵ 1 表达情况的影响。**结果** qRT-PCR 结果显示, 结肠癌组织中 PI-PLC ϵ 1 基因的表达低于其癌旁组织 ($P < 0.05$), 不同肿瘤分化程度及肿瘤部位结肠癌组织中 PI-PLC ϵ 1 基因的表达差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。免疫组化结果显示, 结肠癌组织中 PI-PLC ϵ 1 蛋白的阳性表达率低于其癌旁组织 ($P < 0.05$)。不同肿瘤分化程度结肠癌组织中 PI-PLC ϵ 1 蛋白的阳性表达率差异没有统计学意义 ($P > 0.05$), 但不同肿瘤部位中 PI-PLC ϵ 1 蛋白的阳性表达率差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** PI-PLC ϵ 1 在结肠癌组织中的表达显著减少, 且与肿瘤分化程度无关。

【关键词】 结肠癌 PI-PLC ϵ 1 qRT-PCR 免疫组织化学

Expression and Significance of PI-PLC ϵ 1 in Colon Cancer LI Xiao-ran, YANG Kun, HUANG Xiao-li Δ .

Department of Geriatrics Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Δ Corresponding author, E-mail: xiaoxiao334@sina.cn

【Abstract】 Objective To study the expression and clinical significance of phosphoinositide-specific phospholipase C ϵ 1 (PI-PLC ϵ 1) in the pathogenesis of colon cancer. **Methods** qRT-PCR and immunohistochemistry were used to detect the expression of PI-PLC ϵ 1 in the 42 cases of colon cancer tissues and their corresponding adjacent tissues. And the effects of tumor differentiation and tumor site on the expression PI-PLC ϵ 1 of colon cancer tissues were compared. **Results** The results of qRT-PCR showed that the expression of PI-PLC ϵ 1 in colon cancer tissue significantly lower than that in the adjacent tissue ($P < 0.05$). The expression of PI-PLC ϵ 1 gene of colon cancer tissue was not effected by tumor differentiation and tumor site ($P > 0.05$). The results of immunohistochemistry showed that the positive expression rate of PI-PLC ϵ 1 protein in colon cancer tissue was significantly lower than that in the adjacent tissue ($P < 0.05$). The positive expression rate of PI-PLC ϵ 1 protein was not effected by tumor differentiation ($P > 0.05$), but the expression was different in tumor site ($P < 0.05$). **Conclusion** Expression of PI-PLC ϵ 1 was reduced in colon tissue and barely to tumor differentiation.

【Key words】 Colon cancer PI-PLC ϵ 1 qRT-PCR Immunohistochemistry

结肠癌是最常见的恶性肿瘤之一, 其病因、发病机制国内外尚不完全清楚, 且治疗预后不理想。我国结肠癌的发病率和死亡率位居前列, 远远超过美国^[1], 因此, 探寻早期诊断和治疗结肠癌的新方法显得十分重要。磷酸肌醇特异性的磷脂酶 C ϵ 1 (phosphoinositide-specific phospholipase C ϵ 1, PI-PLC ϵ 1) 是近年来发现的一新型磷酸肌醇特异性的磷脂酶 C (PI-PLC) 家族同工酶, 研究^[2] 发现, PI-PLC ϵ 1 与食管癌、胃癌的发生风险密切相关。本研究拟采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 及免疫组

化的方法测定 PI-PLC ϵ 1 基因、蛋白在结肠癌组织和癌旁组织中的表达情况, 并分析不同临床病理特征对于结肠癌组织中 PI-PLC ϵ 1 表达的影响。

1 资料与方法

1.1 材料

收集四川大学华西医院 2013 年 10 月至 2014 年 6 月结肠癌手术切除标本 42 例, 其中男性 24 例, 女性 18 例, 平均年龄 62 岁。所有病例均经病理确诊, 手术前未接受任何放疗、化疗及生物治疗。同时收集每例患者距离癌组织边缘 5 cm 以上的正常组织作为对照。所有标本在离体后立即取材, 将每例样本组织分成两半, 其中一半取材后保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

^{*} 四川省科技厅项目 (No. 2012JY0087) 及四川省卫生厅项目 (No. 川干研 2016-112) 资助

Δ 通信作者, E-mail: xiaoxiao334@sina.cn

的冰箱内等待行 qRT-PCR 检测;另一半用于制作行免疫组化检测所需的石蜡切片。总 RNA 提取试剂盒、SYBR Green qPCR master mix 购自美国 Omega 公司,逆转录试剂盒购自立陶宛 Fermenta 公司。一抗(兔抗人 PLC ϵ 1 多抗)购自美国 Sigma 公司,SP 试剂盒及 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。引物由上海英潍捷基公司合成,PI-PLC ϵ 1 前引物:5'-GCAACTACAACGCTGTCATGGAG-3',后引物:5'-CCTCATGGTCTCATATCAGACTGG-3';内参 Actb 前引物:5'-CTCCCTGGAGAAGAGCTACGAGC-3',后引物:5'-CCAGGAAGGAAGGCTGGAAGAG-3'。

1.2 qRT-PCR 法检测 PI-PLC ϵ 1 基因表达水平

严格按照总 RNA 提取试剂盒(离心柱法)的说明书提取总 RNA,使用紫外分光光度仪检测 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值,在 1.90~1.99 之间,说明总 RNA 的纯度较高;检测到的总 RNA 质量浓度在 201.3~498.5 ng/ μ L,符合实验要求。参考逆转录试剂盒说明书,将 RNA 逆转录为 cDNA 后,参考 SYBR Green qPCR master mix 的说明书进行 PCR 反应。PCR 反应体系:2 $\times$ Perfectstart SYBR Green qPCR Master Mix 12.5 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,cDNA 模板 2 μ L,加 DEPC 水至 25 μ L。PCR 反应程序:预变性 95 $^{\circ}$ C,10 min;变性 95 $^{\circ}$ C,15 s;退火 60 $^{\circ}$ C,20 s;延伸 72 $^{\circ}$ C,20 s;共进行 40 个循环。溶解曲线分析的条件参考荧光定量 PCR 仪的说明书进行设定(95 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,68 $^{\circ}$ C 30 s)。结果以 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}表示目的基因的相对表达量。

1.3 免疫组化法检测 PI-PLC ϵ 1 蛋白表达水平

常规制作石蜡切片,将组织切片二甲苯中浸泡脱蜡后,切片依次放入 100%、95%、90%、80%、70%的酒精中浸泡,然后依次将切片清水充分水化、双氧水浸泡、PBS 缓冲液冲洗、柠檬酸盐缓冲液中修复抗原,取出玻片,再用蒸馏水及 PBS 缓冲液冲洗。滴加一抗,4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存过夜。滴加二抗,置于 37 $^{\circ}$ C 温箱加热 30 min。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液,用 PBS 缓冲液反复冲洗,再经 DAB 显色、苏木素中复染、反向梯度酒精脱水后,置于通风柜中晾干,封片。阴性对照:用 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。阳性标准:PI-PLC ϵ 1 在细胞浆或细胞核中被染为棕黄色即为阳性表达。在 400 倍显微镜下任意选取 5 个视野,每个视野计数 200 个细胞,根据阳性细胞占总细胞百

分比,将结果分为:阴性(-) $\leq$ 10%,弱阳性(+) $>$ 10% $\sim\leq$ 30%,阳性(++) $>$ 30% $\sim\leq$ 60%,强阳性(+++) $\geq$ 60%;“+”以上定义为阳性表达。

1.4 统计学方法

qRT-PCR 结果均用 $\bar{x}\pm s$ 或 $P_{50}(P_{25}\sim P_{75})$ 的形式表示,两组之间的比较,符合正态分布的采用配对样本 t 检验进行分析,不符合正态分布的采用秩和检验。不同临床病理特征结肠癌组织中 PI-PLC ϵ 1 的表达差异采用两组独立样本的 t 检验进行分析,多个样本均数的两两比较采用 SNK 法进行分析。结肠癌组织和癌旁正常组织以及不同临床病理特征的结肠癌组织中 PI-PLC ϵ 1 蛋白的阳性表达率差异采用 Fisher 精确概率计算法进行比较或 χ^2 检验进行比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PI-PLC ϵ 1 基因的表达情况

癌组织中 PI-PLC ϵ 1 基因的表达水平[0.31(0.01~1.95)]低于癌旁组织[2.96(0.26~45.25)]($P<0.05$)。

2.2 不同临床病理特征对结肠癌组织中 PI-PLC ϵ 1 基因表达的影响

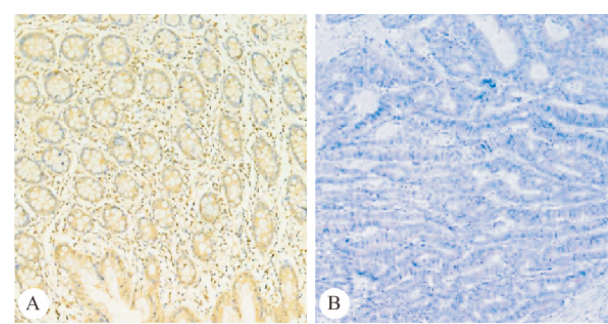
将 42 例结肠癌组织按肿瘤分化程度及肿瘤部位进行分组,发现不同性别、年龄、肿瘤分化程度、淋巴结转移及肿瘤部位的结肠癌组织中,PI-PLC ϵ 1 的表达差异没有统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 不同临床病理特征的结肠癌组织中 PI-PLC ϵ 1 基因的表达
Table 1 The expression of PI-PLC ϵ 1 in colon cancer tissue with clinicopathological features

Groups	<i>n</i>	2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}	<i>P</i>
Sex			0.80
Male	24	0.24 (0.02-1.95)	
Female	18	0.31 (0.01-1.27)	
Age			0.96
$\geq$ 60 yr.	27	0.33 (0.01-1.27)	
$<$ 60 yr.	15	0.25 (0.03-1.95)	
Tumor differentiation			0.40
Well	3	0.07 (0.03-0.14)	
Moderately	20	0.39 (0.03-1.27)	
Poorly	19	0.40 (0.01-1.95)	
Lymph node metastasis			0.45
Positive	24	0.41 (0.01-1.95)	
Negative	18	0.32 (0.03-1.02)	
Tumor site			0.54
Right	9	0.45 (0.02-1.95)	
Left	33	0.35 (0.01-1.27)	

2.3 PI-PLC ϵ 1 蛋白在结肠癌组织和癌旁正常组织中的表达

PI-PLCε1 蛋白主要表达在结肠组织的浆膜上，在结肠组织中呈弥漫分布的棕黄色颗粒。结肠癌组织 PLCε1 蛋白的阳性表达率(11/42, 26. 2%) 低于癌旁正常组织(35/42, 83. 3%)，差异有统计学意义($P<0. 05$)。见附图。



附图 PI-PLCε1 在正常组织(A)和结肠癌组织(B)的表达。SABC ×200

Fig Expression of PI-PLCε1 in the adjacent tissue (A) and colon cancer tissue (B). SABC ×200

2.4 不同分化程度及部位的结肠癌组织中 PI-PLCε1 蛋白的表达

经统计分析发现，不同肿瘤分化程度结肠癌组织中 PI-PLCε1 蛋白的阳性表达率差异无统计学意义($P>0. 05$)，但不同肿瘤部位中 PI-PLCε1 蛋白的阳性表达率差异有统计学意义($P<0. 05$)。见表 2。

表 2 不同分化程度及部位的结肠癌组织中 PI-PLCε1 蛋白的表达

Table 2 The expression of PI-PLCε1 in colon cancer tissue with clinicopathological features

Group	n	Positive/case (%)	P
Tumor differentiation			0. 070
Well	3	2 (66. 7)	
Moderately	20	6 (30. 0)	
Pooly	19	2 (10. 5)	
Tumor site			0. 004
Right	9	7 (77. 8)	
Left	33	4 (12. 1)	

3 讨论

人 PI-PLCε1 基因定位于 10 号染色体 q23，全长共 297 581 bp，共有 34 个外显子^[4]，该基因表达的 PI-PLCε1 蛋白是近年来新发现的 PI-PLC 家族同工酶。PI-PLCε1 除具有 PI-PLC 同工酶所共有的结构域外，在其氨基末端还有一个 CDC25 结构域，在其羧基末端有两个 RAS 相关结构域，分别为 RA1 和 RA2^[5]。CDC25 是 PI-PLCε1 特有的结构域，具有鸟苷酸交换因子的作用，可激活 RAS 家族，

使无活性的 GDP · RAS 激活，进一步激活下游的 MAPK/ERK 信号通路。RA1 和 RA2 是两个相邻区域，尽管两者在结构上相似，但在功能上却各有不同^[6]。RA2 与 RAS 家族的 GTP 蛋白酶直接接触，与 PI-PLCε1 的激活有关，RA1 可能与蛋白的稳定性相关。WANG 等^[7]，ABNET 等^[2]及 WU 等^[8]先后发现 PI-PLCε1 基因突变与食管癌的发生密切相关，其中 rs2274223 位点和 rs3765524 位点的突变很可能会导致其编码的蛋白的结构和功能发生异常，PI-PLCε1 酶的异常很可能会导致其上下游信号通路的其他分子发生异常，进而促进肿瘤的发生。

本研究应用 qRT-PCR 和免疫组化的方法检测了结肠癌组织及其相对应的癌旁组织中 PI-PLCε1 基因和蛋白的表达，结果显示结肠癌组织中 PI-PLCε1 基因的表达低于其相对应的癌旁组织。提示 PI-PLCε1 基因的表达减少可能参与了结肠癌的发病过程，PI-PLCε1 可能是结肠癌的抑癌基因。CHEN 等^[9]的研究发现 PI-PLCε1 在胃癌组织的表达显著高于胃癌旁组织。WANG 等^[10]通过对 417 例结肠癌患者及 416 例正常人中 PI-PLCε1 基因 rs2274223 位点进行比较，发现 rs2274223 位点 A>G 基因改变可能会减少 PI-PLCε1 基因的表达，并提高结直肠癌的发生风险，与本研究的结果具有一致性。但 LI 等^[11]的研究结果显示，敲除 PI-PLCε1 基因可以抑制腺瘤小鼠肿瘤血管的生成及减少肿瘤相关的炎症因子，提示 PI-PLCε1 可以促进结肠肿瘤的生成，与本研究矛盾。

PI-PLCε1 基因在不同肿瘤中表现出不同的作用，即可能是癌基因，也可能是抑癌基因，可能与 PI-PLCε1 参与了激活 Ras/MAPK 等信号通路有关。本研究的结果提示 PI-PLCε1 可能是结肠癌的抑癌基因，但 PI-PLCε1 在结肠癌发病过程中的具体作用机制还需进一步研究。另外本研究通过 qRT-PCR 法检测发现，肿瘤分化程度及肿瘤部位对结肠癌组织中 PI-PLCε1 的表达没有影响，提示几乎在所有结肠癌组织中，PI-PLCε1 的表达均有下降。然而，免疫组化检测发现，不同肿瘤分化程度结肠癌组织中 PI-PLCε1 蛋白的阳性表达率差异无统计学意义，但不同肿瘤部位中 PI-PLCε1 蛋白的阳性表达率差异有统计学意义($P<0. 05$)，即右半结肠癌中 PI-PLCε1 蛋白的表达高于左半结肠。由于本研究样本量相对较少，因此本研究的结果具有一定的局限性，PI-PLCε1 在结肠癌中的表达下降是否可以促进结肠癌的发生尚需进一步研究。(下转第 904 页)

- [3] SHI Z, CHEN H, LIAN Z, *et al.* Factors that impact health-related quality of life in neuromyelitis optica spectrum disorder: anxiety, disability, fatigue and depression. *J Neuroimmunol*, 2016, 293: 54-58 [2016-04-15]. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.02.011>.
- [4] WINGERCHUK DM, LENNON VA, PITTOCK SJ, *et al.* Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology*, 2006, 66(10): 1485-1489.
- [5] HAMILTON M. The assessment of anxiety states by rating. *Br J Med Psychol*, 1959, 32(1): 50-55.
- [6] HAMILTON M. Development of a rating scale for primary depressive illness. *Br J Soc Clin Psychol*, 1967, 6(4): 278-296.
- [7] MILLER A, DISHON S. Health-related quality of life in multiple sclerosis: the impact of disability, gender and employment status. *Qual Life Res*, 2006, 15(2): 259-271.
- [8] KANAMORI Y, NAKASHIMA I, TAKAI Y, *et al.* Pain in neuromyelitis optica and its effect on quality of life: a cross-sectional study. *Neurology*, 2011, 77(7): 652-658.
- [9] KIM SM, GO MJ, SUNG JJ, *et al.* Painful tonic spasm in neuromyelitis optica: incidence, diagnostic utility, and clinical characteristics. *Arch Neurol*, 2012, 69(8): 1026-1031.
- [10] QIAN P, LANCIA S, ALVAREZ E, *et al.* Association of neuromyelitis optica with severe and intractable pain. *Arch Neurol*, 2012, 69(11): 1482-1487.
- [11] ZHAO S, MUTCH K, ELSONE L, *et al.* Neuropathic pain in neuromyelitis optica affects activities of daily living and quality of life. *Mult Scler*, 2014, 20(12): 1658-1661.
- [12] KALIA LV, O'CONNOR PW. Severity of chronic pain and its relationship to quality of life in multiple sclerosis. *Mult Scler*, 2005, 11(3): 322-327.
- [13] BRUCE JM, ARNETT P. Clinical correlates of generalized worry in multiple sclerosis. *J Clin Exp Neuropsychol*, 2009, 31(6): 698-705.
- [14] NEWLAND PK, FEARING A, RILEY M, *et al.* Symptom clusters in women with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurosci Nurs*, 2012, 44(2): 66-71.
- [15] BRADL M, KANAMORI Y, NAKASHIMA I, *et al.* Pain in neuromyelitis optica—prevalence, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurol*, 2014, 10(9): 529-536.
- [16] NAQVI F, CERVO F, Fields S. Evidence-based review of interventions to improve palliation of pain, dyspnea, depression. *Geriatrics*, 2009, 64(8): 8-10, 12-14.
- [17] 殷晓菁, 胡玲玲, 谢红娜, 等. 多发性硬化与抑郁、焦虑的相关性研究. *卒中与神经疾病*, 2012, 19(4): 237-239.
- [18] 冯凯, 张星虎, 许贤豪. 视神经脊髓炎研究发展史. *中国现代神经疾病杂志*, 2014, 14(9): 744-750.

(2017-03-26 收稿, 2017-07-05 修回)

编辑 沈进

(上接第 879 页)

总之,本研究证实了 PI-PLC ϵ 1 在结肠癌组织中的表达显著低于其癌旁正常组织,并且肿瘤分化程度对结肠癌组织中 PI-PLC ϵ 1 的表达量没有影响。为进一步研究 PI-PLC ϵ 1 及其介导的信号通路在肿瘤发生过程中的作用并指导肿瘤的临床治疗具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 陈万青, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 2011 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析. *中国肿瘤*, 2015, 24(1): 1-10.
- [2] ABNET CC, FREEDMAN ND, HU N, *et al.* A shared susceptibility locus in PLCE1 at 10q23 for gastric adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. *Nat Genet*, 2010, 42(9): 764-767.
- [3] KELLEY GG, REKS SE, ONDRAKO JM, *et al.* Phospholipase C ϵ : a novel Ras effector. *EMBO J*, 2001, 20(4): 743-754.
- [4] BUNNEY TD, HARRIS R, GANDARILLAS NL, *et al.* Structural and mechanistic insights into ras association domains of phospholipase C epsilon. *Mol Cell*, 2006, 21(4): 495-507.
- [5] WING MR, BOURDON DM, HARDEN TK. PLC- ϵ : a shared effector protein in Ras-, Rho-, and G $\alpha\beta\gamma$ -mediated signaling. *Mol Interv*, 2003, 3(5): 273-280.
- [6] SONG C, HU CD, MASAGO M, *et al.* Regulation of a novel human phospholipase C, PLC ϵ , through membrane targeting by Ras. *J Biol Chem*, 2001, 276(4): 2752-2757.
- [7] WANG LD, ZHOU FY, LI XM, *et al.* Genome-wide association study of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese subjects identifies susceptibility loci at PLCE1 and C20orf54. *Nat Genet*, 2010, 42(9): 759-763.
- [8] WU C, HU Z, HE Z, *et al.* Genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for esophageal squamous-cell carcinoma in Chinese populations. *Nat Genet*, 2011, 43(7): 679-684.
- [9] CHEN J, WANG W, ZHANG T, *et al.* Differential expression of phospholipase C epsilon 1 is associated with chronic atrophic gastritis and gastric cancer. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47563 [2016-02-12]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047563>.
- [10] WANG Q, CHEN P, CHEN D, *et al.* Association between phospholipase C epsilon gene (PLCE1) polymorphism and colorectal cancer risk in a Chinese population. *J Int Med Res*, 2014, 42(2): 270-281.
- [11] LI M, EDAMATSU H, KITAZAWA R, *et al.* Phospholipase C ϵ promotes intestinal tumorigenesis of ApcMin/+ mice through augmentation of inflammation and angiogenesis. *Carcinogenesis*, 2009, 30(8): 1424-1432.

(2017-04-05 收稿, 2017-08-30 修回)

编辑 汤洁