

ADAM12 基因在结直肠癌中的表达及临床意义

吉冰, 孙晔, 张川, 王森, 张悦, 孙跃明*

(南京医科大学第一附属医院结直肠外科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 研究 ADAM12 基因在结直肠癌中的表达水平及其与临床参数和预后的关系。方法: 收集 50 例手术切除的结直肠癌及相应的癌旁组织标本, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测标本中 ADAM12 基因的表达水平, 并分析 ADAM12 基因表达与结直肠癌临床病理特征及预后的关系。同时运用 Western blot 检测其中 5 对结直肠癌组织及配对的癌旁组织中 ADAM12 蛋白的表达情况。结果: ADAM12 基因在结直肠癌中 mRNA 和蛋白水平的表达都显著高于相应的癌旁组织。ADAM12 基因在 76.0%(38/50) 的病例中表现为高表达, 且其高表达与结直肠癌的淋巴转移($P=0.005$)、TNM 分期($P=0.002$)密切相关。高表达 ADAM12 基因与结直肠癌的 3 年生存率显著相关。结论: ADAM12 基因的表达在结直肠癌中明显上调, 且其表达上调与结直肠癌的转移潜能及进展相关, 提示 ADAM12 是结直肠癌的一个潜在分子指标物。ADAM12 的高表达与患者的 3 年生存率显著相关, 可作为判断预后的一个重要指标。

[关键词] ADAM12; 结直肠癌; 预后

[中图分类号] R735.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)08-1015-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20170819

Clinical significance of expression of ADAM12 gene in patients with colorectal cancer

Ji Bing, Sun Ye, Zhang Chuan, Wang Sen, Zhang Yue, Sun Yueming*

(Department of Minimally Invasive Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression pattern of ADAM12 gene in patients with colorectal cancer and analyze its correlation with the clinicopathological parameters and the tumor markers. **Methods:** ADAM12 expression in mRNA level was detected using quantitative real-time PCR in the colorectal cancer tissues and corresponding adjacent normal tissues from 50 patients. The correlations of ADAM12 expression profile with the clinicopathological parameters and prognosis were evaluated. The expression pattern of ADAM12 gene in protein level was detected using Western blot in the colorectal cancer tissues and corresponding adjacent normal tissues from 5 patients. **Results:** ADAM12 expression level was significantly higher in the colorectal cancer tissues than in the corresponding adjacent normal tissues, in both protein and mRNA level. Of the 50 patients, 38 (76%) showed up-regulated ADAM12 expression, which correlated significantly with lymphatic metastasis ($P=0.005$), TNM stage ($P=0.002$) and survival time ($P<0.05$). During the 3-year follow up, 57.89%(22/38) patients in up-regulated died while in normal group, only 17.6%(2/12) died for colorectal cancer ($P=0.013$). **Conclusion:** Up-regulation of ADAM12 in colorectal cancer is correlated with lymphatic metastasis and progression and prognosis, suggesting the value of ADAM12 as a potential marker for colorectal cancer.

[Key words] ADAM12; colorectal cancer; prognosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(08): 1015-1018]

ADAM12 是近年来发现的一个强大的致癌基因^[1], 已被证实于肝癌等多种恶性肿瘤中表达上调^[2-10]。然而, ADAM12 基因在结直肠癌中的表达水平及临床意义目前尚不清楚。因此, 本研究采用实

时荧光定量 PCR 技术检测了 ADAM12 基因在 50 例结直肠癌组织和癌旁组织的表达量, 分析其与结直肠癌临床病理特征之间的相关性, 并进行 3 年的随访, 探讨 ADAM12 基因高表达与结直肠癌预后的关系。

[基金项目] 教育部项目(2012YQ030261); 江苏省自然科学基金(BK20131448)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jssym@vip.sina.com

1 对象和方法

1.1 对象

2012 年 3 月—2013 年 2 月本院手术的 50 例结

直肠癌患者手术标本,其中男 26 例,女 24 例,平均年龄 64 岁(30~90 岁),所有患者术前均未行放疗及化疗。其中 41 例行根治性切除术,9 例行姑息性切除术。37 例行腹腔镜手术,13 例行传统开腹手术。标本经手术切除后,立即放入液氮中保存直至行实时定量 PCR 检测。癌组织取自肿瘤边缘无坏死区,癌旁组织取自距肿瘤 5 cm 以上的正常黏膜组织。同时收集肿瘤大小、淋巴结转移、肝转移、远处转移及 TNM 分期等临床病例资料,其中 TNM 分期按照美国癌症分期联合委员会(AJCC)第 7 版标准进行。本研究已通过南京医科大学第一附属医院伦理委员会审核,所有标本采集前均经患者知情同意。

TRIzol(北京天根公司);逆转录试剂盒、PCR 试剂及定量 PCR 试剂(大连宝生物公司);定量 PCR 仪(TaKaRa 公司,日本);紫外分光光度计(SHIMADZU,岛津公司,日本)。兔抗人 ADAM12 抗体,鼠抗人 GAPDH 抗体及其他实验需要抗体(Abcam 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及逆转录

剪取约 0.1 g 组织放入匀浆器中,加 TRIzol 试剂 1 mL,在冰上进行匀浆。将匀浆液转入 1.5 mL Ep 管,提取总 RNA,用紫外分光光度计测定其 $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 值,检测其纯度和浓度。依照逆转录试剂盒说明书来操作合成 cDNA。

1.2.2 定量 PCR

Real-time PCR 检测 ADAM12 基因 mRNA 的含量。ADAM12 上游引物:5'-CGAGGGGTGAGCT-TATGGAAC-3';下游引物:5'-GCTTTCCCCTTG-TAGTCCAATA-3'; β -actin 上游引物:5'-AGAAAATCTGGCACCAACC-3';下游引物:5'-TAG-CACAGCCTGGATAGCAA-3';PCR 反应体系为 20 μ L,各反应参数如下:2.5 Master Mix 9 μ L;上下游引物(10 μ mol/L)各 0.25 μ L,cDNA 2 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,60 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,扩增 40 个循环,最后 1 个循环 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

癌组织 ADAM12 基因高表达定义为癌组织与癌旁组织的 $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$ 。

1.2.3 Western blot

将收集好的蛋白用 10.5%SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离,用湿转法将凝胶中的蛋白转印至 0.45 cm 的 PVDF 膜上。转膜结束后,将膜置于 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h,加入兔抗人的 ADAM12 多克隆抗体(稀释比例为 1:1 000)置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过

夜。1 \times TBST 洗膜 3 次,15 min/次,加入二抗,于室温孵育 45 min,1 \times TBST 洗膜 3 次,15 min/次,将未结合的抗体洗脱。将膜稍微滴干后加入化学发光试剂进行孵育,用 Tanon5700 通用型化学发光成像分析系统拍照显影。

1.2.4 随访

对 50 例肠癌患者及其家属进行为期 3 年的电话随访(最后随访时间 2016 年 3 月)。收集随访研究对象的生存状况和死亡原因。

1.3 统计学方法

所有统计分析均在 SPSS13.0 软件完成。计量资料不符合正态分布,采用配对样本 Wilcoxon 符号秩和检验。计数资料的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。相关分析采用 Person 相关分析。生存分析采用 Kaplan-Meier 法,生存率的比较采用 Log-rank 法。双侧 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ADAM12 基因在结直肠癌组织中表达上调

定量 PCR 显示,ADAM12 基因在结直肠癌组织中的表达($2^{-\Delta Ct}$)高于对应的癌旁组织($Z = -4.619, P < 0.001$)。本研究中 76.0%(38/50)的结直肠癌病例中,结直肠癌组织中 ADAM12 基因的表达水平高于对应的癌旁组织(图 1)。Western blot 显示,ADAM12 在癌组织中的蛋白表达水平明显高于配对的癌旁组织(图 2)。

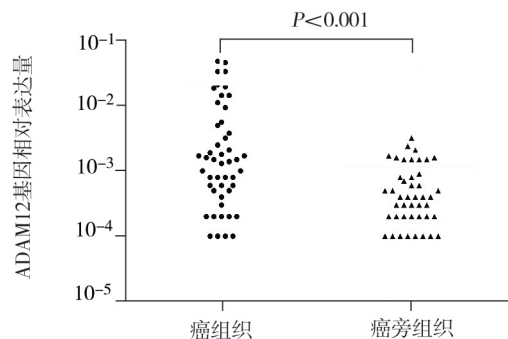


图 1 ADAM12 基因在癌组织和癌旁组织的相对表达量
Figure 1 Expression of ADAM12 gene in patients with colorectal cancer and corresponding adjacent normal tissues in mRNA level

2.2 ADAM12 基因表达与结直肠癌临床病理特征的关系

研究结果显示,ADAM12 基因表达与患者性别、年龄、肿瘤大小和 TNM 分期均无关($P > 0.05$),但是有淋巴结转移患者的高表达比例高于无淋巴结转移患者(61.5% vs. 19.1%, $P = 0.01$, 表 1)。

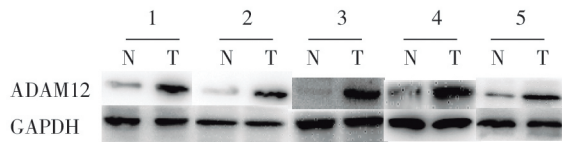


图 2 ADAM12 蛋白在结直肠癌组织(T)及配对癌旁组织(N)中的表达情况

Figure 2 Expression of ADAM12 gene in patients with colorectal cancer and corresponding adjacent normal tissues in protein level

表 1 ADAM12 基因表达与结直肠癌病理学特征的关系

Table 1 The relationship between ADAM12 expression and clinicopathological factors in colorectal cancer

临床特征	n	高表达	低表达	χ^2 值	P 值
性别				1.361	0.243
男	26	8	18		
女	24	4	20		
年龄(岁)				1.648	0.096
>60	32	6	22		
≤60	18	7	11		
TNM 分期				0.001	0.979
I+II	18	13	5		
III+IV	32	23	9		
肿瘤大小(cm)				0.300	0.584
≥5	32	22	10		
<5	18	11	7		
淋巴结转移				5.265	0.010
有	26	16	10		
无	24	7	17		

2.3 ADAM12 基因表达与肠癌患者生存时间的关系

总的随访病例 3 年生存率为 62.5%。其中 44 例完成 3 年随访, 6 例失访。ADAM12 基因高表达组病死率为 57.9%(22/38), 低表达组病死率为 17.6%(2/12), 两组比较差异有统计学意义($P=0.013$), 显示低表达者 3 年生存率更高。Kaplan-Meier 生存曲线 ADAM12 基因低表达的生存时间长于高表达对象($P<0.05$, 图 3)。

3 讨论

ADAMs 是指解整合素金属蛋白酶家族, Wu 等^[1]首次发现并命名。研究表明 ADAMs 是拥有金属蛋白酶, 富含半胱氨酸, 类表皮生长因子等多个功能区

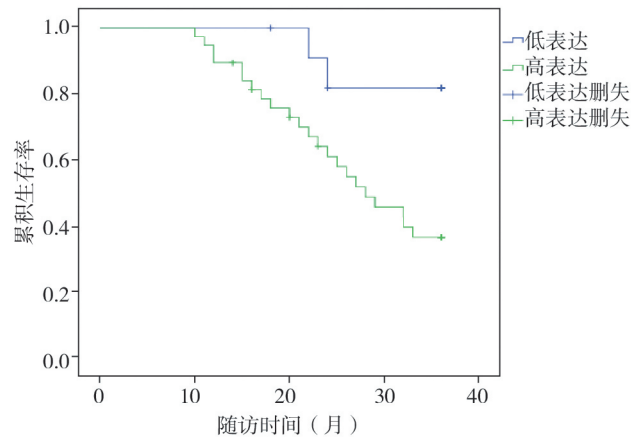


图 3 ADAM12 基因高表达与低表达患者 3 年生存率曲线
Figure 3 The cumulative survival function of ADAM12 gene overexpression and 3 - year survival rate in patients with colorectal cancer

域的膜锚定蛋白家族, 并且该家族中的 9、10、12 (ADAM9、ADAM10、ADAM12) 因子在白血病、红白血病以及淋巴瘤细胞中表达上调。随后, Iba 等^[11]研究发现在乳腺癌细胞中, ADAM12 通过影响细胞黏附功能加快了肿瘤的进展。此外, Kveiborg 等^[6]研究发现, 在乳腺癌细胞与其相对的非癌细胞中细胞凋亡计数为 $(2.0 \pm 1.0)\%$ vs. $(0.3 \pm 0.5)\%$ ($P<0.001$), 并证实了 ADAM12 通过影响细胞凋亡加速了乳腺癌的发生发展。近期, Yang 等^[12]首次阐述了金属蛋白酶家族在骨关节炎的发生发展中所起到的正性作用。

在消化系统肿瘤的研究中, Le Pabic 等^[9]研究发现在肝癌的发生发展中, ADAM12 被 β 转化因子通过 PI3K, ERK1/2 调控而表达上调。随后, Carl-McGrath 等^[7]研究发现, 在胃癌中相对于正常对象, ADAM9, ADAM12, ADAM15 在细胞水平, 组织水平均表达上调。上述研究结果表明, ADAM12 的表达情况与肿瘤的发生发展关系密切。现有研究已经揭示了在肝癌^[9]、乳腺癌^[2, 6, 13-14]、胃癌^[7-8]等常见肿瘤中其表达与细胞黏附^[11]、细胞凋亡^[6]、上皮细胞间质转化^[15-16]等此类已被证实了的肿瘤进展过程密切相关。近期, Duhachek-Muggy 等^[13]发现了 ADAM12 在 claudin 低表型乳腺癌中通过调控 EGFR 信号通路促进了干细胞样表型, 此外, Vlad 等^[17]通过研究发现 ADAM12 和 CDCP1 在卵巢癌中的联合促进作用, 这都提示了 ADAM12 的表达上调是肿瘤的发生和发展中的一个重要事件。然而, 由于结直肠组织细胞与上述组织细胞的基因表达存在差异性, 并且关于 ADAM12 的表达情况与结直肠癌的发生发展的关系尚未涉及, 其在结直肠癌中是否存在相同的表

达方式和生物学作用均有待进一步确定。为此,本研究采用实时定量 PCR 技术检测了 50 例结直肠癌及其相匹配的癌旁组织标本,同时采用 Western blot 技术检测了其中 5 对结肠癌组织及配对癌旁组织,结果显示无论是 mRNA 水平还是蛋白水平,ADAM12 基因在结直肠癌组织中的表达明显高于癌旁组织,且在大部分(76.0%,38/50)病例中 ADAM12 基因的表达上调,提示 ADAM12 在结直肠癌组织中可能也发挥着促癌作用。

在生物学作用方面,本研究发现,ADAM12 的表达上调与结直肠癌的淋巴结转移($P=0.005$)密切相关,这进一步提示 ADAM12 表达上调可能在结直肠癌的转移过程中发挥了重要作用,鉴于 ADAM12 是影响细胞黏附作用的关键基因之一,而细胞黏附在肿瘤发生发展中发挥了重要作用^[9],ADAM12 表达上调可能通过影响细胞黏附作用从而促使结直肠癌的转移。对肿瘤患者的 3 年随访研究证实,ADAM12 高表达患者的 3 年生存率低于低表达患者,揭示了 ADAM12 基因表达水平与预后的关系。

综上所述,本研究证明 ADAM12 基因在结直肠癌中无论是蛋白水平还是 mRNA 水平均表达上调,且其表达上调与结直肠癌的转移潜能和临床预后密切相关,提示 ADAM12 基因表达水平可作为判断结直肠癌的肿瘤生物学和预后的重要参考指标。

[参考文献]

- [1] Wu E, Croucher PI, McKie N. Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 235(2):437-442
- [2] Roy R, Moses MA. ADAM12 induces estrogen-independence in breast cancer cells[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 131(3):731-741
- [3] Mino N, Miyahara R, Nakayama E, et al. A disintegrin and metalloprotease 12 (ADAM12) is a prognostic factor in resected pathological stage I lung adenocarcinoma[J]. *J Surg Oncol*, 2009, 100(3):267-272
- [4] Frohlich C, Albrechtsen R, Dyrskjot L, et al. Molecular profiling of ADAM12 in human bladder cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(24):7359-7368
- [5] Peduto L, Reuter VE, Sehara-Fujisawa A, et al. ADAM12 is highly expressed in carcinoma-associated stroma and is required for mouse prostate tumor progression[J]. *Oncogene*, 2006, 25(39):5462-5466
- [6] Kveiborg M, Frohlich C, Albrechtsen R, et al. A role for ADAM12 in breast tumor progression and stromal cell apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(11):4754-4761
- [7] Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, et al. The disintegrin-metalloproteinases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer [J]. *Int J Oncol*, 2005, 26(1):17-24
- [8] Tanida S, Joh T, Itoh K, et al. The mechanism of cleavage of EGFR ligands induced by inflammatory cytokines in gastric cancer cells[J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(2):559-569
- [9] Le Pabic H, Bonnier D, Wewer UM, et al. ADAM12 in human liver cancers: TGF-beta-regulated expression in stellate cells is associated with matrix remodeling [J]. *Hepatology*, 2003, 37(5):1056-1066
- [10] Tian BL, Wen JM, Zhang M, et al. The expression of ADAM12 (meltrin alpha) in human giant cell tumours of bone[J]. *Mol Pathol*, 2002, 55(6):394-397
- [11] Iba K, Albrechtsen R, Gilpin BJ, et al. Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion[J]. *Am J Pathol*, 1999, 154(5):1489-1501
- [12] Yang CY, Chanalaris A, Troeberg L. ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis-looking beyond the usual suspects[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2017, 25(7):1000-1009
- [13] Duhachek-Muggy S, Qi Y, Wise R, et al. Metalloprotease-disintegrin ADAM12 actively promotes the stem cell-like phenotype in claudin-low breast cancer[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1):32
- [14] Ma B, Ma Q, Jin C, et al. ADAM12 expression predicts clinical outcome in estrogen receptor-positive breast cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10):13279-13283
- [15] Ruff M, Leyme A, Le Cann F, et al. The disintegrin and metalloprotease ADAM12 is associated with TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9):e0139179
- [16] Li H, Duhachek-Muggy S, Dubnicka S, et al. Metalloprotease-disintegrin ADAM12 is associated with a breast tumor-initiating cell phenotype[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 139(3):691-703
- [17] Vlad C, Kubelac P, Onisim A, et al. Expression of CDCP1 and ADAM12 in the ovarian cancer microenvironment[J]. *J Buon*, 2016, 21(4):973-978

[收稿日期] 2016-12-29