

## 结直肠癌中CEACAM6和 $\beta$ -catenin的表达分析及意义

王 晔<sup>1</sup> 张志勇<sup>2\*</sup> 吴晨鹏<sup>2</sup> 张 林<sup>2</sup> 李雪梅<sup>2</sup> 冯俊伟<sup>3</sup><sup>1</sup>唐山市工人医院泌尿外科, 唐山 06300; <sup>2</sup>唐山市工人医院病理科, 唐山 06300;<sup>3</sup>唐山市工人医院肿瘤外科, 唐山 063000)

**摘要** 通过免疫组织化学及Real-time PCR法检测结直肠癌组织中CEACAM6和 $\beta$ -catenin蛋白及mRNA的表达, 分析其表达与结直肠癌临床病理特征的关系, 为结直肠癌的诊治提供实验数据。结果显示, 在结直肠癌组织中CEACAM6蛋白阳性表达率及mRNA表达水平增高,  $\beta$ -catenin蛋白异常表达率及mRNA的表达水平增高。CEACAM6和 $\beta$ -catenin蛋白及mRNA的表达与淋巴结转移及TNM分期密切相关, 二者表达呈正相关。CEACAM6和 $\beta$ -catenin在结直肠癌发生发展过程中可能有促进作用, 联合检测二者可为结直肠癌的诊治提供帮助。

**关键词** 结直肠癌; CEACAM6;  $\beta$ -catenin; 免疫组织化学; Real-time PCR

### Significance and Expressions of CEACAM6 and $\beta$ -catenin in Colorectal Carcinomas

Wang Ye<sup>1</sup>, Zhang Zhiyong<sup>2\*</sup>, Wu Chenpeng<sup>2</sup>, Zhang Lin<sup>2</sup>, Li Xuemei<sup>2</sup>, Feng Junwei<sup>3</sup><sup>1</sup>Department of Urinary Surgery, Tangshan Gongren Hospital, Tangshan 063000, China; <sup>2</sup>Department of Pathology, Tangshan Gongren Hospital, Tangshan 063000, China; <sup>3</sup>Department of Oncology Surgery, Tangshan Gongren Hospital, Tangshan 063000, China)

**Abstract** The expressions of CEACAM6 and  $\beta$ -catenin protein and mRNA in the primary tumours ( $n=228$ ) and marginal mucosa samples ( $n=228$ ) of colorectal carcinomas were examined by immunohistochemistry and Real-time PCR to provide experimental data for diagnosis and treatment of colorectal carcinomas. Furthermore, the relationship between the expressions of CEACAM6,  $\beta$ -catenin and the clinicopathological features was analyzed. The expressions of CEACAM6 protein and mRNA were increased in the primary tumours of colorectal carcinomas. The aberrant expressions of  $\beta$ -catenin protein and mRNA were also increased in the primary tumours of colorectal carcinomas. The expressions of CEACAM6 and  $\beta$ -catenin were correlated with lymph node metastasis and TNM stages. Positive correlation between CEACAM6 and  $\beta$ -catenin protein and mRNA were found in colorectal carcinoma. CEACAM6 and  $\beta$ -catenin might play an important role in the pathogenesis and progress of colorectal carcinoma. Combined detection of CEACAM6 and  $\beta$ -catenin could be helpful for diagnosis and treatment of colorectal carcinoma.

**Key words** colorectal carcinoma; CEACAM6;  $\beta$ -catenin; immunohistochemistry; Real-time PCR

收稿日期: 2013-05-03 接受日期: 2013-06-14

河北省卫生厅医学科学研究重点项目(批准号: 20120182)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0315-3722441, E-mail: zhiyongzhang1@hotmail.com

Received: May 3, 2013 Accepted: June 14, 2013

This work was supported by the Medical Science Research Key Projects of Department of Health of Hebei Province (Grant NO.20120182)

\*Corresponding author. Tel: +86-315-3722441, E-mail: zhiyongzhang1@hotmail.com

网络出版时间: 2013-06-26 10:29 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130626.1029.002.html

结直肠癌是常见恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>, 早筛查、早发现、早治疗可望明显改善预后。CEACAM6是癌胚抗原相关细胞黏附分子, 在多种恶性肿瘤中表达水平提高。 $\beta$ -catenin为Wnt信号转导通路的下游元件, 在该信号通路中发挥了重要的信号转导作用, 对肿瘤增殖及抗凋亡有重要的影响。本研究通过免疫组织化学和Real-time PCR法检测了结直肠癌中CEACAM6、 $\beta$ -catenin蛋白及mRNA表达情况, 探讨其临床意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 标本 收集2010年1月至2011年12月唐山市工人医院结直肠癌术后标本共228例, 同时收集肿瘤组织对应的切缘无瘤黏膜组织。其中男性144例、女性84例, 年龄27~89岁, 平均年龄为(61.94±11.12)岁; 结肠癌94例、直肠癌134例; TNM I期39例、II期116例、III期70例、IV期3例; 无淋巴结转移151例, 有淋巴结转移77例; 高分化122例、中分化65例、低分化41例。另收集2010年5月至2012年11月结直肠癌手术新鲜标本20例, 对应无瘤黏膜10例。

1.1.2 试剂 CEACAM6兔抗人单克隆抗体购自美国Abcam公司,  $\beta$ -catenin鼠抗人单克隆抗体及两步法免疫组化试剂盒购自北京中杉生物科技有限责任公司。Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG试剂盒购自美国Invitrogen公司。

### 1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 染色严格按照说明书进行操作。以PBS代替一抗作为阴性对照。CEACAM6以胞浆出现棕黄色为阳性表达。 $\beta$ -catenin以胞膜出现完整连续的棕黄色为阳性表达, 而胞浆中出现棕黄色颗粒为异常表达。以CEACAM6阳性细胞数和 $\beta$ -catenin异常表达细胞数所占百分比作为判断标准, 1%~25%为(-), 26%~50%为(+), 51%~75%为(++), 76%~100%为(+++), 为了便于统计, 将(-)和(+)合并为(-), 将(++)和(+++)合并为(+)

1.2.2 Real-time PCR 反转录37 °C下反应50 min, 然后在70 °C下将酶进行灭活处理15 min, cDNA产物用DEPC水进行5倍稀释。 $\beta$ -actin上游引物: 5'-CAG GAA GTC CCT TGC CAT CC-3', 下游引物: 5'-ACC AAA AGC CTT CAT ACA TCT CA-3'; CEACAM6上游引物: 5'-TTC TAT CCC TGA GAG GAG GCT-3', 下游引物: 5'-CAG GTT GTG

GGC GAG TAG AA-3';  $\beta$ -catenin上游引物: 5'-AAC GGC TTT CGG TTG AGC TG-3', 下游引物: 5'-TGG CGA TAT CCA AGG GCT TC-3'(PCR引物均由美国Invitrogen公司合成)。Real-time PCR条件为: 95 °C预变性10 min; 然后95 °C, 10 s→60 °C, 20 s→72 °C, 10 s; 进行40个循环。以上各步骤均严格按照说明书进行。反应结束后计算3个复孔CT平均值, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算相对表达量。

1.2.3 统计学分析 应用SPSS 13.0统计软件对数据进行分析处理, 蛋白表达比较采用 $\chi^2$ 检验, 相关性分析采用spearman检验, 组间均数比较采用 $t$ 检验, 均以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CEACAM6和 $\beta$ -catenin蛋白在结直肠切缘无瘤黏膜及癌组织中的表达

癌组织中CEACAM6蛋白表达阳性率[84.2% (192/228)]明显高于切缘无瘤黏膜组织54.8% (125/228), 差异有统计学意义( $\chi^2=46.456, P<0.001$ );  $\beta$ -catenin蛋白在癌组织中异常表达率明显高于切缘无瘤黏膜组织[83.3%(190/228) vs 61.0%(139/228)]差异有统计学意义( $\chi^2=28.386, P<0.001$ , 图1)。

### 2.2 结直肠癌中CEACAM6和 $\beta$ -catenin蛋白的表达与其临床病理特征的关系

结直肠癌中, CEACAM6表达阳性率在有淋巴结转移病例中明显高于无淋巴结转移病例( $\chi^2=7.556, P=0.006$ )、在III/IV期病例中表达阳性率明显高于I期/II期病例( $\chi^2=11.017, P=0.001$ )。而且 $\beta$ -catenin在有淋巴结转移病例异常表达率明显高于无淋巴结转移病例( $\chi^2=11.017, P=0.001$ )、在III/IV期病例中异常表达率明显高于I期/II期病例( $\chi^2=9.676, P=0.002$ ), 而二者蛋白表达与性别、年龄、肿瘤部位、分化程度及组织学分型之间均无相关性( $P>0.05$ , 表1)。

### 2.3 CEACAM6和 $\beta$ -catenin蛋白表达相关性分析

经过spearman检验, 在结直肠癌组织中CEACAM6和 $\beta$ -catenin蛋白的表达呈正性相关( $r=0.73, P=0.023$ )。

### 2.4 CEACAM6和 $\beta$ -catenin mRNA在结直肠无瘤黏膜及癌组织中的表达

CEACAM6 mRNA在结直肠切缘无瘤黏膜中低于癌中的相对表达量(0.006±0.002 vs 0.014±0.005), 差异均有统计学意义( $t=5.442, P<0.001$ );  $\beta$ -catenin mRNA在结直肠无瘤黏膜中低于癌中的相对表达量

表1 CEACAM6与β-catenin蛋白的表达与结直肠癌临床病理特征的关系

Table 1 The relationship between CEACAM6 and β-catenin protein and clinicopathological features of colorectal carcinomas

变量 Variables	例数 <i>n</i>	CEACAM6		阳性率(%) Positive rate(%)	$\chi^2$ $\chi^2$	<i>P</i> <i>P</i>	β-catenin		异常表达率(%) Abberant rate(%)	$\chi^2$ $\chi^2$	<i>P</i> <i>P</i>
		+	-				+	-			
Gender											
Male	144	118	26	81.9	1.510	0.219	122	22	84.7	0.543	0.461
Female	84	74	10	88.1			68	16	81.0		
Age(year)											
≤60	116	99	17	85.3	0.229	0.633	95	21	81.9	0.351	0.554
>60	112	93	19	83.0			95	17	84.8		
Histological types											
Tubular, papillary adenocarcinoma	186	159	27	85.5	1.231	0.267	159	27	85.5	3.362	0.067
Mucoid adenocarcinoma	42	33	9	78.6			31	11	73.8		
Location											
Colon	94	80	14	85.1	0.097	0.756	78	16	83.0	0.014	0.904
Rectum	134	112	22	83.6			112	22	83.6		
Differentiation											
Well+medium	187	158	29	84.5	0.062	0.803	155	32	82.9	0.149	0.700
Worse	41	34	7	82.9			35	6	85.4		
Lymphatic metastasis											
N	151	120	31	79.5	7.556	0.006	117	34	77.5	11.017	0.001
Y	77	72	5	93.5			73	4	94.8		
Stages											
I+II	155	122	33	78.7		0.001	121	34	78.1	9.676	0.002
III+IV	73	70	3	95.9	11.017		69	4	94.5		

表2 结直肠癌中CEACAM6和β-catenin mRNA的表达与临床病理特征的关系

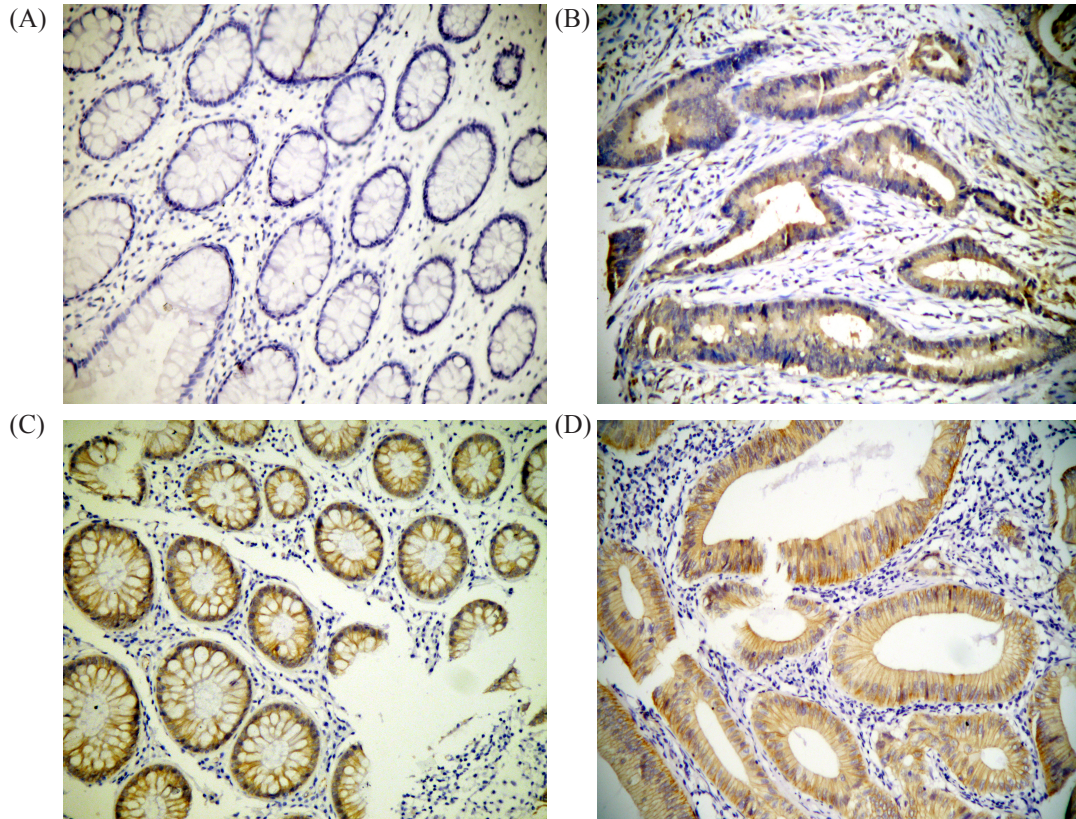
Table 2 The relationship between the expression of CEACAM6 and β-catenin mRNA and clinicopathological features of colorectal carcinomas

变量 Variables	例数 <i>n</i>	CEACAM6 mRNA	<i>t</i>	<i>P</i>	β-catenin mRNA	<i>t</i>	<i>P</i>
		CEACAM6 mRNA	<i>t</i>	<i>P</i>	β-catenin mRNA	<i>t</i>	<i>P</i>
Gender							
Male	13	0.013 7±0.003 5	1.131	0.272 8	0.023 9±0.013 1	0.494	0.627
Female	7	0.016 4±0.007 1			0.021 1±0.010 3		
Age(year)							
≤60	10	0.014 4±0.034 0	0.257	0.800	0.022 7±0.008 9	0.0822	0.935
>60	10	0.015 0±0.065 0			0.023 2±0.015 0		
Histological types							
Tubular, papillary adenocarcinoma	17	0.013 7±0.003 8	1.419	0.173	0.021 1±0.000 9	1.671	0.112
Mucoid adenocarcinoma	3	0.017 3±0.005 7			0.033 2±0.022 0		
Location							
Colon	10	0.013 5±0.003 6	0.978	0.341	0.024 5±0.014 7	0.551	0.588
Rectum	10	0.015 8±0.062 0			0.021 5±0.009 0		
Differentiation							
Well+medium	15	0.014 5±0.002 8	0.530	0.649	0.023 8±0.012 3	0.987	0.352
Worse	5	0.015 1±0.056 0					
Lymphatic metastasis							
N	11	0.011 2±0.001 5	5.378	<0.001	0.014 1±0.003 7	6.470	<0.001
Y	9	0.019 0±0.004 5			0.033 8±0.009 2		



(续表2)

变量 Variables	例数 <i>n</i>	CEACAM6 mRNA CEACAM6 mRNA	<i>t</i> <i>t</i>	<i>P</i> <i>P</i>	$\beta$ -catenin mRNA $\beta$ -catenin mRNA	<i>t</i> <i>t</i>	<i>P</i> <i>P</i>
Stages							
I+II	12	0.011 5±0.001 7	5.595	<0.001	0.015 2±0.005 1	5.915	<0.001
III+IV	8	0.019 5±0.004 5			0.034 6±0.009 5		



A: CEACAM6在结直肠切缘无瘤黏膜中表达阴性; B: CEACAM6在结直肠癌组织中胞浆表达阳性; C:  $\beta$ -catenin在切缘无瘤黏膜中胞膜表达阳性; D:  $\beta$ -catenin在结直肠癌组织中胞浆异常表达。

A: negative expression of CEACAM6 in marginal mucosa; B: positive expression of CEACAM in cytoplasm of colorectal carcinoma; C: positive expression of  $\beta$ -catenin in cytomembrane of marginal mucosa; D: aberrant expression of  $\beta$ -catenin in cytoplasm of colorectal carcinoma.

图1 CEACAM6和 $\beta$ -catenin蛋白在结直肠切缘无瘤黏膜和癌中的表达(IHC, 200 $\times$ )

Fig.1 The expressions of CEACAM6 and  $\beta$ -catenin protein in marginal colorectal mucosa and colorectal carcinoma (IHC, 200 $\times$ )

( $0.009\pm 0.003$  vs  $0.022\pm 0.012$ ), 差异均有统计学意义 ( $t=2.792$ ,  $P<0.001$ )。

### 2.5 结直肠癌CEACAM6和 $\beta$ -catenin mRNA的表达与其临床病理特征的关系

在结直肠癌中, CEACAM6和 $\beta$ -catenin mRNA表达水平在伴有淋巴结转移及III/IV期病例明显高于无淋巴结转移及I期/II期病例, 差异有统计学意义 ( $P<0.001$ ), 而与性别、年龄、肿瘤部位、分化程度及组织学分型均无相关性 ( $P>0.05$ , 表2)。

### 2.6 CEACAM6和 $\beta$ -catenin mRNA表达相关性分析

经过spearman检验, 在结直肠癌组织中

CEACAM6和 $\beta$ -catenin mRNA的表达呈正性相关 ( $r=0.89$ ,  $P=0.033$ )。

## 3 讨论

细胞黏附分子(cell adhesion molecule, CAM)是一类在细胞之间或者细胞与细胞外基质之间发挥黏附作用的糖蛋白, 其功能状态、表达水平与肿瘤侵袭、转移关系密切。目前, 研究认为细胞黏附分子免疫球蛋白超家族成员CEACAM6表达升高时, 可破坏正常细胞和组织结构<sup>[2]</sup>, 在多种恶性肿瘤中表达水平增高。潘海邦等<sup>[3]</sup>研究表明, CEACAM6在胃



癌中高表达, 且与浸润深度、临床分期密切相关。Duxbury等<sup>[4]</sup>认为胰腺癌中CEACAM6蛋白高表达水平与患者预后差密切相关。肝细胞癌组织中的表达与肿瘤包膜是否完整、有无静脉癌栓以及肿瘤分期密切相关, 而CEACAM6在肝炎肝硬化组织和肝海绵状血管瘤组织中没有表达<sup>[5]</sup>。Kim等<sup>[6]</sup>通过Real-time PCR和免疫组织化学方法检测结肠癌组织中发现CEACAM6的表达水平显著增高, 与Dukes'分期密切相关。本研究结果同Kim等<sup>[6]</sup>的研究结果基本一致, CEACAM6蛋白在结直肠癌中表达阳性率明显高于切缘无瘤黏膜组织, 并且在伴有淋巴结转移以及III/IV期病例中更为显著, 表明CEACAM6高表达可能与结直肠癌发病密切相关, 并可能在肿瘤的转移过程中发挥了重要作用。

$\beta$ -catenin作为Wnt信号转导通路的下游元件发挥信号转导作用, 已知Wnt信号使 $\beta$ -catenin磷酸化, 然后进入核内调控靶基因的表达水平, 对细胞生长、增殖、凋亡等一系列生命过程进行调控。Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导通路与多种肿瘤发生有关<sup>[7]</sup>。Rodríguez-Sastre等<sup>[8]</sup>在对宫颈癌的研究中发现,  $\beta$ -catenin异常表达与宫颈癌的发生关系密切, 而且 $\beta$ -catenin蛋白表达失调可能由Wnt信号转导通路的激活引起的。徐洪涛等<sup>[9]</sup>认为,  $\beta$ -catenin在非小细胞肺癌中存在异常表达, 并且与分化程度和淋巴结转移密切相关。刘臻等<sup>[10]</sup>研究表明, 乳腺癌患者中 $\beta$ -catenin的表达同腋窝淋巴结转移密切相关。结直肠癌中异常表达的 $\beta$ -catenin不能被正常降解, 进入胞核后启动Wnt/ $\beta$ -catenin通路, 通过激活下游靶基因如MMP-7和CD44而影响大肠癌的侵袭、转移与预后<sup>[11-13]</sup>。本研究中 $\beta$ -catenin蛋白在结直肠癌中异常表达率增高, 在伴有淋巴结转移及临床分期较高的病例中 $\beta$ -catenin蛋白异常表达率增高明显, 表明 $\beta$ -catenin作为一种促癌因子可能参与了结直肠癌发生发展过程, 并且同肿瘤的转移密切相关。

研究表明, 在结直肠癌患者中CEACAM6和 $\beta$ -catenin蛋白存在正性相关, 而且均与肿瘤的转移密切相关, 提示二者可能存在某种内在联系, 共同影响了结直肠癌的生物学行为。联合检测CEACAM6和 $\beta$ -catenin可有助于结直肠癌的诊治。但CEACAM6是否通过Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路参与了结直肠癌的

发生发展过程, 其机制尚待进一步探讨。

## 参考文献 (References)

- 1 Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127(12): 2893-917.
- 2 Riley CJ, Engelhardt KP, Saldanha JW, Qi W, Cooke LS, Zhu Y, *et al.* Design and activity of a murine and humanized anti-CEACAM6 single-chain variable fragment in the treatment of pancreatic cancer. *Cancer Res* 2009; 69(5): 1933-40.
- 3 潘海邦, 王 波, 杨爱军, 关泉林. 胃癌组织中CEACAM6、MMP-9的表达及其与临床病理的关系. 第三军医大学学报 (Pan Haibang, Wang Bo, Yang Aijun, Guan Quanlin. Expressions of CEACAM6 and MMP-9 in gastric carcinoma and their relationship with clinicopathological features: Report of 54 cases. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae* 2010; 32(24): 2632-5.
- 4 Duxbury MS, Matros E, Clancy T, Bailey G, Doff M, Zinner MJ, *et al.* CEACAM6 is a novel biomarker in pancreatic adenocarcinoma and PanIN lesions. *Ann Surg* 2005; 241(3): 491-6.
- 5 李 科, 刘明华. 癌胚抗原相关细胞黏附分子6蛋白在肝细胞癌组织中的表达及临床意义. 第三军医大学学报 (Li Ke, Liu Minghua. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae* 2011; 33(17): 1883-4.
- 6 Kim KS, Kim JT, Lee SJ, Kang MA, Choe IS, Kang YH, *et al.* Overexpression and clinical significance of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 in colorectal cancer. *Clin Chim Acta* 2013; 415: 12-9.
- 7 Barker N, Clevers H. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(4): 997-1014.
- 8 Rodríguez-Sastre MA, González-Maya L, Delgado R, Lizano M, Tsubaki G, Mohar A, *et al.* Abnormal distribution of E-cadherin and  $\beta$ -catenin in different histologic types of cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2005; 97(2): 330-6.
- 9 徐洪涛, 王 亮, 林 东, 刘 洋, 刘 楠, 王恩华. 非小细胞肺癌中Axin与 $\beta$ -连环素异常表达的关系. 中华病理学杂志 (Xu Hongtao, Wang Liang, Lin Dong, Liu Yang, Liu Nan, Wang Enhua. Expressions of Axin and  $\beta$ -catenin in non-small cell lung cancer. *Chinese Journal of Pathology* 2005; 34(10): 519-23.
- 10 刘 臻, 张 强, 马文锋, 王 岱, 杨 栋, 元 明. 上皮钙黏蛋白、 $\alpha$ -连环素和 $\beta$ -连环素在乳腺癌中的表达及意义. 中华外科杂志 (Liu Zhen, Zhang Qiang, Ma Wenfeng, Wang Dai, Yang Dong, Qi Ming. *Chinese Journal of Surgery* 2005; 43(7): 307-8.
- 11 Visca P, del Nonno F, Botti C, Marandino F, Sebastiani V, Di Tondo U, *et al.* Role and prognostic significance of D44s expression in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2002; 8(10): 2671-5.
- 12 Bendardaf R, Elzagheid A, Lamlum H, Ristamäki R, Collan Y, Pyrhönen S. E-cadherin, CD44s and CD44v6 correlate with tumour differentiation in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2005; 13(9): 831-5.
- 13 Li M, Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y, Shinomura Y. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med* 2006; 231(11): 20-7.