

EMX2 和 β -catenin Cyclin D1 在结直肠癌组织中的表达及临床意义

孟 媛, 许 斌

作者单位: 113006 辽宁, 抚顺市中心医院病理科

作者简介: 孟 媛(1980 -), 女, 医学硕士, 副主任医师, 研究方向: 临床病理。E-mail: 42401899@ qq. com

通讯作者: 许 斌(1969 -), 女, 医学硕士, 主任医师, 研究方向: 临床病理。E-mail: 646922136@ qq. com

[摘要] **目的** 观察空通气孔同源框 2(EMX2) 和 β -连环蛋白(β -catenin)、细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1) 在正常结直肠黏膜、结直肠癌组织中的表达情况, 探讨结直肠癌发展过程中 EMX2 与 β -catenin、Cyclin D1 的关系。**方法** S-P 法检测 EMX2 和 β -catenin、Cyclin D1 在正常结直肠黏膜、结直肠癌组织中蛋白表达情况, 并分析 EMX2 和 β -catenin、Cyclin D1 与结直肠癌临床病理特征之间及患者预后的关系。**结果** (1) 在正常结直肠黏膜、结直肠癌组织中 EMX2 阳性表达率分别为 76.7% 和 38.2% ($P < 0.01$), EMX2 阳性表达率与结直肠癌临床分期及淋巴结转移有关。在正常结直肠黏膜、结直肠癌组织中 β -catenin 阳性表达率分别为 6.7%、65.5%; Cyclin D1 阳性表达率分别为 10.0%、63.6%。 β -catenin 与 Cyclin D1 阳性表达率与结直肠癌的临床分期、肿瘤分化程度、淋巴结转移有关($P < 0.05$)。 (2) 在结直肠癌组织中 EMX2 和 β -catenin 表达呈负一致性(Kappa 值 = -0.389, $P = 0.000$); EMX2 与 Cyclin D1 表达一致性不明显(Kappa 值 = -0.161, $P = 0.054$)。 (3) 应用 Kaplan-Meier 生存分析表明, 结直肠癌组织中 EMX2 阳性表达与患者较好的预后有关($P = 0.032$)。**结论** 结直肠癌组织中 EMX2 阳性表达减少, EMX2 低表达与结直肠癌患者的临床分期、淋巴结转移及预后密切相关。在结直肠癌患者中检测 EMX2, 可能成为判断患者临床分期和预后指标。

[关键词] 空通气孔同源框 2; β -连环蛋白; 细胞周期蛋白 D1; 结直肠癌; 免疫组织化学染色

[中图分类号] R 730 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2019)09-0984-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2019.09.14

Expressions of EMX2, β -catenin and Cyclin D1 in colorectal cancer tissues and their clinical significances

MENG Yuan, XU Bin. Department of Pathology, Fushun Central Hospital, Liaoning 113006, China

[Abstract] **Objective** To observe the expressions of empty spiracles homeobox 2 (EMX2), β -catenin and Cyclin D1 in normal colorectal mucosa and colorectal cancer tissues and to investigate the relationship between EMX2 and β -catenin, Cyclin D1 in the development of colorectal cancer. **Methods** The immunohistochemical S-P method was used to detect the expressions of EMX2, β -catenin and Cyclin D1 proteins in normal colorectal mucosa and colorectal cancer tissues. The correlations of EMX2, β -catenin and Cyclin D1 and clinicopathologic features in colorectal cancer and the patients' prognosis were analyzed. **Results** (1) The positive rates of EMX2 expression was 76.7% and 38.2% in the normal colorectal mucosa and the colorectal cancer tissues, respectively ($P < 0.01$). The positive rates of EMX2 expression in the colorectal cancer tissues were associated with the clinic stages and lymphatic metastasis. The positive expression rates of β -catenin in the normal colorectal mucosa and the colorectal cancer tissues were 6.7% and 65.5%, respectively. The positive expression rates of Cyclin D1 in the normal colorectal mucosa and the colorectal cancer tissues were 10.0% and 63.6%, respectively. The positive expression rates of β -catenin and Cyclin D1 were associated with the clinic stages, the degree of tumor differentiation and lymphatic metastasis ($P < 0.05$). (2) EMX2 and β -catenin showed negative consistency in colorectal cancer tissues (Kappa = -0.389, $P = 0.000$); The expressions of EMX2 and Cyclin D1 were not obvious (Kappa = -0.161, $P = 0.054$). (3) Kaplan-Meier survival analysis showed that positive EMX2 expression in colorectal cancer tissues was associated with better prognosis ($P = 0.032$). **Conclusion** Positive EMX2 expression reduces in colorectal cancer tissues, suggesting that the low expression of EMX2 is associated with clinic stages, lymphatic metastasis and prognosis. EMX2 detection in patients with colorectal cancer may be an indicator of clinical stage and prognosis.

[Key words] Empty spiracles homeobox 2 (EMX2); β -catenin; Cyclin D1; Colorectal cancer; Immunohistochemical staining

结直肠癌的发病率,已经占恶性肿瘤的第三位,也是癌症中引起死亡的第三大主要原因。虽然通过筛查程序已经降低了结直肠癌的死亡率,但在确定的预测预后标志物方面,仍有相当大的改进空间。最近的研究表明空通气孔同源框 2 (empty spiracles homeobox 2, EMX2) 可能与包括肺癌^[1]、子宫内膜癌^[2]在内的几种人类癌症有关,也有研究^[3]表明在结直肠癌中 EMX2 表达降低与肝转移相关。已有相关研究^[4]表明 Wnt 通路中 β -catenin 和结直肠癌预后相关。那么在结直肠癌中 EMX2 是否也可以调控 Wnt 通路及其下游的因子,本文在结直肠癌组织中应用免疫组织化学方法观察 EMX2、 β -catenin、Cyclin D1 的表达情况,探讨结直肠癌患者中 EMX2 是否与 β -catenin、Cyclin D1 阳性表达具有相关性,EMX2 是否与结肠癌患者预后有关联。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2008-01 ~ 2012-12 辽宁省抚顺市中心医院病理科的结肠癌及直肠癌手术切除标本共 110 例。所有病例临床资料完整,术前均未接受化疗、放射治疗。110 例中包括 68 例结肠癌,42 例直肠癌;男 59 例,女 51 例;年龄为 27 ~ 89 岁,平均年龄 58 岁,其中 ≤ 65 岁 45 例, > 65 岁 65 例;组织学分级:高分化和中分化 82 例,低分化 28 例。根据 2010 AJCC/UICC 结直肠癌 pTNM 分期, I + II 期 45 例, III + IV 期 65 例;49 例有淋巴结转移,61 例无淋巴结转移;4 例有远处转移,106 例无远处转移。另外选取距肿瘤 5 cm 处正常肠黏膜石蜡标本 30 例。手术后 2 年内,每 3 个月随访 1 次,此后每 6 个月随访 1 次,随访时间以月为单位,随访终点是患者死亡或者术后 60 个月。

1.2 试剂 鼠抗人 EMX2 单克隆抗体购自 Abcam 公司。鼠抗人 β -catenin 单克隆抗体、兔抗人 Cyclin D1

单克隆抗体、S-P 即用型试剂盒、DAB 显色液均购买于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法 应用 S-P 法检测 EMX2 和 β -catenin、Cyclin D1 在结直肠癌组织、正常结直肠黏膜中的蛋白表达情况。所有标本均在术后立即经过 4% 中性甲醛溶液固定,4 μ m 厚切片。EMX2 一抗浓度均为 1:100, β -catenin 和 Cyclin D1 为工作液浓度,阴性对照为 PBS 代替一抗。

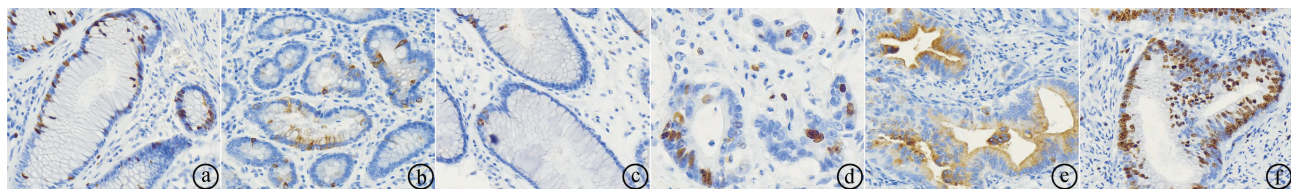
1.4 结果判定 EMX2 阳性表达位于细胞核,棕黄色;参照 Yue 等^[5]标准,采用半定量分数方法:阳性细胞百分率 ($\leq 25\% = 1$, $26\% \sim 50\% = 2$, $> 51\% = 3$) $\times$ 染色强度 (无染色为 0 分,弱染色为 1 分,中度染色为 2 分,强染色为 3 分)。0 分是阴性,1、2、3 分是阳性。 β -catenin 阳性着色部位可为胞膜、细胞质、细胞核,按照 Marnyama 等^[6]文献说明,结直肠癌中阳性表达部位是细胞质。肿瘤细胞 $> 90\%$ 着色,判断结果是阳性;肿瘤细胞 $\leq 90\%$ 着色,判断结果是阴性。Cyclin D1 判读标准是棕黄色颗粒在细胞核表达,肿瘤细胞 $\geq 10\%$ 为阳性,肿瘤细胞 $< 10\%$ 为阴性。

1.5 统计学方法 应用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计数资料用 χ^2 检验,二变量关系用 Kappa 一致性检验,应用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,采用 Log-rank 检验比较患者生存率。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EMX2 和 β -catenin、Cyclin D1 在正常结直肠黏膜组织和结直肠癌组织中的表达情况

2.1.1 EMX2 阳性表达于细胞浆,棕黄色颗粒 (见图 1)。 EMX2 在正常结直肠黏膜组织中的阳性表达率为 (76.7%),明显高于在结直肠癌组织中的阳性表达率 (38.2%),差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。



①EMX2 正常结直肠黏膜表达; ② β -catenin 正常结直肠黏膜表达; ③Cyclin D1 正常结直肠黏膜表达; ④EMX2 结直肠癌表达; ⑤ β -catenin 结直肠癌表达; ⑥Cyclin D1 结直肠癌表达。SP 法, $\times 200$

图 1 EMX2 和 β -catenin、Cyclin D1 在正常结直肠黏膜组织和结直肠癌组织中的病理所见

2.1.2 正常结直肠黏膜组织中 β -catenin 阳性表达率为 6.7%, 结直肠癌组织中 β -catenin 的阳性表达率为 65.5%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.1.3 Cyclin D1 在正常结直肠黏膜中的阳性表达率为 10.0%, 在结直肠癌组织中的阳性表达率为 63.6%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 EMX2 和 β -catenin、Cyclin D1 在正常结肠黏膜组织和结直肠癌组织中表达的阳性率比较(n)

病理组织	例数	EMX2				β -catenin				Cyclin D1			
		+	阳性率(%)	χ^2	P	+	阳性率(%)	χ^2	P	+	阳性率(%)	χ^2	P
正常结肠黏膜组织	30	23	76.7	14.036	0.000	2	6.7	32.692	0.000	3	10.0	27.175	0.000
结直肠癌组织	110	42	38.2			72	65.5			70	63.6		

2.2 结直肠癌组织 EMX2 和 β -catenin、Cyclin D1 表达与临床病理特征的关系

110 例结直肠癌组织中,免疫组织化学结果表明,EMX2 阳性表达率越低,结直肠癌临床分期越高,淋巴结越容易发生转移。

β -catenin 和 Cyclin D1 阳性表达率越高,结直肠癌组织分化越差,临床分期越高,淋巴结越容易发生转移。见表 2。

表 2 110 例结直肠癌组织 EMX2 和 β -catenin、Cyclin D1 的表达与临床病理特征的关系(n)

临床病理特征	例数	EMX2				β-catenin				Cyclin D1			
		+	阳性率(%)	χ ²	P	+	阳性率(%)	χ ²	P	+	阳性率(%)	χ ²	P
肿瘤分化													
高-中分化	82	36	43.9	4.466	0.035	49	59.8	4.626	0.031	46	56.1	7.912	0.005
低分化	28	6	21.4			23	82.1			24	85.7		
临床分期													
I + II	45	35	77.8	69.135	0.000	21	46.7	11.888	0.001	18	40.0	18.386	0.000
III + IV	65	7	10.8			51	78.5			52	80.0		
淋巴结转移													
无	61	37	60.7	29.303	0.000	34	55.7	5.718	0.017	31	50.8	9.721	0.002
有	49	5	10.2			38	77.6			39	79.6		
年龄(岁)													
<65	45	20	44.4	1.265	0.261	26	57.8	1.985	0.159	23	51.1	5.163	0.213
≥65	65	22	33.8			46	70.8			47	66.2		
远处转移													
无	106	41	38.7	0.306	1.000	68	64.2	2.191	0.139	67	63.2	0.232	1.000
有	4	1	25.0			4	100			3	75.0		
肿瘤位置													
直肠	42	19	45.2	1.433	0.231	29	69.0	0.388	0.533	25	59.5	0.497	0.481
结肠	68	23	33.8			43	63.2			45	66.2		

2.3 结直肠癌组织中 EMX2 与 β -catenin、Cyclin D1 的关系

110 例结直肠癌组织中 EMX2 和 β -catenin、Cyclin D1 表达进行 Kappa 一致性检验分析,结果显示 EMX2 和 β -catenin 表达呈负一致性(Kappa 值 = -0.389, $P=0.000$)。见表 3。EMX2 和 Cyclin D1 表达一致性不明显(Kappa 值 = -0.161, $P=0.054$)。见表 4。 β -catenin 与 Cyclin D1 具有一致性(Kappa 值 = 0.404, $P=0.000$)。见表 5。

表 3 110 例结直肠癌组织中 EMX2 与 β -catenin 的关系(n)

EMX2	例数	β -catenin		Kappa 值	P
		-	+		
-	68	12	56	-0.389	0.000
+	42	26	16		

表 4 110 例结直肠癌组织中 EMX2 与 Cyclin D1 的关系(n)

EMX2	例数	Cyclin D1		Kappa 值	P
		-	+		
-	68	20	48	-0.161	0.054
+	42	20	22		

表 5 110 例结直肠癌组织中 β -catenin 与 Cyclin D1 的关系(n)

Cyclin D1	例数	β -catenin		Kappa 值	P
		-	+		
-	40	24	16	0.404	0.000
+	70	14	56		

2.4 结直肠癌患者手术后的生存情况与 EMX2 蛋

白阳性表达的关系 110 例结直肠癌患者手术后的随访时间为 4~60 个月。EMX2 蛋白阳性表达患者 5 年生存率为 42.8%。EMX2 蛋白阴性表达患者 5 年生存率为 21.4%。应用 Log-rank 检验分析结果表明,EMX2 阴性表达组患者预后较差,且两组间的累计生存率差异有统计学意义($\chi^2 = 4.603, P = 0.032$)。见图 2。

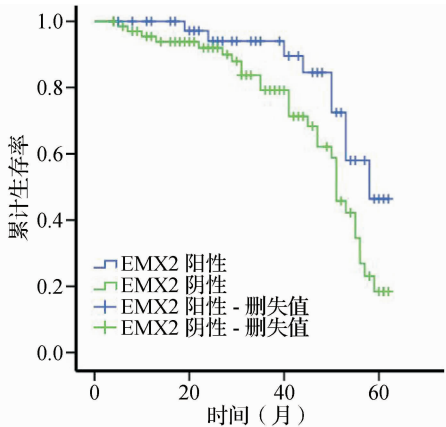


图 2 EMX2 表达与结直肠癌患者生存时间关系图

3 讨论

3.1 同源盒基因(homeobox gene)是控制胚胎发育的基因,主要的作用是调控动物的器官发生以及细胞分化^[7]。EMX2 是同源盒基因中一种,EMX2 基因定位于人染色体 10q26.1,其 mRNA 长 7.1 kb,所编码的蛋白含 252 个氨基酸,在早期胚胎发育中起关键作用^[8]。近来研究表明,EMX2 在一些人类癌症中异常表达,并与一些恶性肿瘤的进展有关。以往报道 EMX2 在肺癌组织样本中显著下调,EMX2 表达抑制了肺癌细胞的增殖,并且是非小细胞肺癌新的预后标记物^[1]。EMX2 低表达与子宫内膜癌^[2]、卵巢恶性肿瘤^[9]、恶性间皮肿瘤^[10]、结直肠癌^[11]、胶质瘤^[12]多种肿瘤存在联系,EMX2 阳性表达降低与患者较差预后相关。本研究发现,EMX2 在结直肠癌组织中低表达(38.2%),而在正常结直肠黏膜组织中高表达(76.7%),这样的结果与以前的研究是一致的。本研究还发现,结直肠癌组织 EMX2 阳性表达率与临床分期及淋巴结转移相关;临床分期越高,EMX2 阳性表达率越低($P < 0.01$),EMX2 阳性表达率越低,淋巴结越容易发生转移($P < 0.01$)。本实验结果表明 EMX2 阳性表达率下降,应该对于结直肠癌的发生、发展有一定的促进作用。肿瘤分期、淋巴结转移都是预后不良的标记物,所以我们推测 EMX2 低表达也可以作为结直肠癌预后较差的指标。

3.2 Wnt 信号通路是组织发育和肿瘤发生的关键

通路,Wnt 信号传导通路异常也是大多数结直肠癌的早期事件^[13,14]。当 Wnt 信号通路被异常激活时, β -catenin 从复合物降解中释放出来,导致 β -catenin 易位进入细胞核,激活下游靶基因^[4~15]。 β -catenin 的下游靶基因主要是与细胞周期与抑制凋亡的基因相关,比如 Cyclin D1、C-myc 等,而这些基因都与细胞增殖相关。以往研究^[16]发现 EMX2 基因可以通过 Wnt 信号通路实现抑制神经干细胞增殖。在肺癌中的研究证明,EMX2 通过调控 Wnt 信号通路来抑制肺癌的恶性行为:在肺癌细胞中上调 EMX2 后,癌细胞的增殖活性降低、侵袭能力减弱,凋亡增加;反之,在肺癌中减少 EMX2 表达,肿瘤细胞的增殖活性增强、肿瘤细胞凋亡减少、肿瘤的侵袭能力增强^[1]。相关的研究可以说明 EMX2 有可能调控 Wnt 信号通路。

3.3 本研究也再次证实,在结直肠癌组织中 β -catenin 及其下游 Cyclin D1 是高表达;并且 β -catenin 和 Cyclin D1 阳性表达率与癌组织分化、临床分期及淋巴结转移相关; β -catenin 和 Cyclin D1 阳性率越高,癌组织分化越差,临床分期越高(P 均 < 0.05),淋巴结越容易发生转移。结直肠癌中 EMX2 基因与 β -catenin 表达有负一致性,EMX2 阳性率表达越低, β -catenin 表达阳性率越高。本研究结果说明,EMX2 基因可能通过调控 Wnt 信号通路 β -catenin,调控肿瘤的发生、发展。但 EMX2 基因与 β -catenin 下游的 Cyclin D1 基因却没有一致性,表明在结直肠癌中 EMX2 只能调控 β -catenin,Cyclin D1 增高与降低应该是 β -catenin 调控的结果。

3.4 结直肠癌已经是死亡率排名第三的恶性肿瘤,虽然筛查程序已经降低了其死亡率,但能够预测预后和患者有转移性疾病的标志物仍有相当大的改进空间。研究结果显示,表达 EMX2 的结直肠癌患者,5 年累计生存率明显高于不表达 EMX2 的患者($P < 0.05$)。通过本研究结果推断,EMX2 阳性表达情况可以作为结直肠癌患者判断预后的一个指标。

综上所述,正常结直肠黏膜和结直肠癌组织中 EMX2 阳性表达率具有明显差异,EMX2 阳性表达率与结直肠癌临床分期、淋巴结转移密切相关,并且 EMX2 基因阴性表达与结直肠癌较差的 5 年生存率相关,以上结果都提示 EMX2 基因在结直肠癌的发生、发展及预后中发挥着重要作用。本研究结果提示,结直肠癌中 EMX2 基因与 β -catenin 阳性表达率具有负相关性,提示 EMX2 基因调控结直肠癌的发生是通过 Wnt 信号通路实现的。但是本研究也有

不足之处,所选具有远处转移的患者较少,因为有相关的报道^[3]结直肠癌中 EMX2 低表达与肝转移具有相关性,但本研究 EMX2 基因与远处转移无相关性。本研究初步判断 EMX2 可以作为结直肠癌的早期诊断及判断预后的指标;基于 EMX2 在结直肠癌中的作用,我们也假设 EMX2 可能成为结直肠癌治疗的一个靶点。但在结直肠癌中 EMX2 基因的具体作用及机制,还需要更多和更深入的研究来证明。

参考文献

1 Okamoto J, Kratz JR, Hirata T, et al. Downregulation of EMX2 is associated with clinical outcomes in lung adenocarcinoma patients [J]. Clin Lung Cancer, 2011,12(4):237-244.

2 Qiu H, Yan Q, Luo X, et al. EMX2 is downregulated in endometrial cancer and correlated with tumor progression [J]. Int J Gynecol Pathol, 2013,32(2):193-198.

3 Aykut B, Ochs M, Radhakrishnan P, et al. EMX2 gene expression predicts liver metastasis and survival in colorectal cancer [J]. BMC Cancer, 2017,17(1):555.

4 Huelsken J, Behrens J. The Wnt signalling pathway [J]. J Cell Sci, 2002,115(Pt 21):3977-3978.

5 Yue D, Li H, Che J, et al. EMX2 Is a Predictive Marker for Adjuvant Chemotherapy in Lung Squamous Cell Carcinomas [J]. PLoS One, 2015,10(7):e0132134.

6 Marnyama K, Ochiai A, Akimoto S, et al. Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer [J]. Oncology,2000,59(4):302-309.

7 Rath MF, Rohde K, Klein DC, et al. Homeobox genes in the rodent pineal gland:roles in development and phenotype maintenance [J]. Neurochem Res, 2013,38(6):1100-1112.

8 Bishop KM, Garel S, Nakagawa Y,et al. Emx1 and Emx2 cooperate to regulate cortical size,lamination, neuronal differentiation, development of cortical efferents, and thalamocortical pathfinding [J]. J Comp Neurol, 2003,457(4):345-360.

9 Liu Z, Ren YA, Pangas SA, et al. FOXO1/3 a-563. nd PTEN Depletion in Granulosa Cells Promotes Ovarian Granulosa Cell Tumor Development [J]. Mol Endocrinol, 2015,29(7):1006-1024.

10 Giroux Leprieur E, Hirata T, Mo M, et al. The homeobox gene EMX2 is a prognostic and predictive marker in malignant pleural mesothelioma [J]. Lung Cancer, 2014,85(3):465-471.

11 Zhang Y,Cao G,Yuan QG,et al. Empty Spiracles Homeobox 2(EMX2) Inhibits the Invasion and Tumorigenesis in Colorectal Cancer Cells [J]. Oncol Res, 2017,25(4):537-544.

12 Falcone C, Daga A, Leanza G, et al. Emx2 as a novel tool to suppress glioblastoma [J]. Oncotarget, 2016,7(27):41005-41016.

13 Mah AT, Yan KS, Kuo CJ. Wnt pathway regulation of intestinal stem cells [J]. J Physiol, 2016,594(17):4837-4847.

14 Krausova M,Korinek V. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer [J]. Cell Signal, 2014,26(3):570-579.

15 欧海玲,覃宇周,张锡流. E-cadherin/p120ctn 与肿瘤关系的研究进展 [J]. 中国临床新医学,2009,2(2):201-204.

16 Gangemi RM, Daga A, Muzio L, et al. Effects of Emx2 inactivation on the gene expression profile of neural precursors [J]. Eur J Neurosci, 2006,23(2):325-334.

[收稿日期 2019-05-13] [本文编辑 韦 颖 韦所苏]

文稿摘要、关键词和作者简介的书写要求

根据国家新闻出版广电总局发出的(1999)17号文件精神,入编正式期刊要执行《中国学术期刊(光盘版)检索与评价数据规范》,要求来稿须书写摘要、关键词和作者简介。论著摘要采用结构式摘要,内容包括目的、方法、结果、结论“四要素”连排,不分段。其他文体可采用报道指示性摘要。摘要均用第三人称写法。关键词尽可能选用《医学索引》(Index Medicus)的医学主题词表(MeSH)中的词语。重点文稿还须增加英文摘要及关键词。作者简介包括姓名、出生年、性别、学历、学位、职称、研究方向(本人所从事的业务专业方向)等。

• 本刊编辑部 •