

LRFN4 在结直肠癌组织中的表达和临床意义

政峰¹ 翟晓璐² 王维健¹ 郭坤鹏¹ 肖长春¹ 倪启超³

¹上海电力医院普外科,上海 200050;²南通市第一人民医院肿瘤科,南通 226001;

³南通大学附属医院普外科,南通 226001

翟晓璐与政峰对本文有同等贡献

通信作者:倪启超,Email:nqcuser@163.com

【摘要】 目的 观察 LRFN4 在结直肠癌中的表达及其临床意义。方法 分别收集 2002 年 1 月至 2008 年 12 月南通大学附属医院进行结直肠癌手术的 210 例结直肠癌患者癌组织,228 例对应手术切缘(非癌组织),采用免疫组织化学法检测 LRFN4 蛋白表达情况,并分析其与临床病理特征及预后的关系。**结果** 结直肠癌组织中 LRFN4 的阳性表达率为 55.24%(116/210),非癌组织中 LRFN4 的阳性表达率为 37.28%(85/228),差异有统计学意义($\chi^2=14.196, P<0.001$)。结直肠癌组织中 LRFN4 的表达与肿瘤部位($\chi^2=4.133, P=0.042$)、肿瘤浸润深度(T分期)($\chi^2=6.494, P=0.039$)、区域淋巴结转移(N分期)($\chi^2=11.715, P=0.008$)、TNM 分期($\chi^2=13.398, P=0.004$)、癌胚抗原(CEA)($\chi^2=6.017, P=0.049$)显著相关,而与患者性别、年龄、分化程度、远处转移(M分期)无显著相关($P>0.05$)。经 Kaplan-Meier 生存曲线统计分析,LRFN4 在结直肠癌中的高表达与患者总生存率升高相关($P<0.05$)。此外,我们对其进行 Cox 比例风险模型统计分析,LRFN4 的高表达($HR=0.585, P=0.018$)是结直肠癌患者预后良好的独立危险因素。**结论** LRFN4 在结直肠癌组织中高表达,且与临床病理特征及预后密切相关,LRFN4 高表达显著降低了患者的死亡风险。

【关键词】 结直肠癌; LRFN4; 预后

DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20190905-01975

Expression and clinical significance of LRFN4 in colorectal cancer tissue

Zheng Feng¹, Zhai Xiaolu², Wang Weijian¹, Guo Kumpeng¹, Xiao Changchun¹, Ni Qichao³

¹Department of General Surgery, Shanghai Electric Power Hospital, Shanghai, 200050, China; ²Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China; ³Department of General Surgery, Nantong University Affiliated Hospital, Nantong 226001, China

Zhai Xiaolu and Zheng Feng contributed equally to the article

Corresponding author: Ni Qichao, Email: nqcuser@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression and clinical significance of LRFN4 in colorectal cancer. **Methods** A total of 210 cases of colorectal cancer tissues and 228 cases of corresponding surgical margin tissues were collected. Immunohistochemistry was employed to evaluate the expression of LRFN4 in colorectal cancer. The correlation between LRFN4 expression and clinicopathological features of colorectal cancer as well as patient outcome were analyzed. **Results** The positive rate of LRFN4 in colorectal cancer and in non-cancer was 55.24%(116/210), and 37.28%(85/228), respectively. The expression of LRFN4 in colorectal cancer tissues was higher than that in non-cancer tissues ($\chi^2=14.196, P<0.001$). High expression of LRFN4 was significantly correlated with tumor location($\chi^2=4.133, P=0.042$), T staging($\chi^2=6.494, P=0.039$), N staging($\chi^2=11.715, P=0.008$), TNM staging($\chi^2=13.398, P=0.004$), CEA ($\chi^2=6.017, P=0.049$), but without gender, age, degree of differentiation, M staging($P>0.05$). The Kaplan-Meier survival curves indicated that high LRFN4 expression was associated with good survival ($P<0.05$). In addition, Cox proportional hazards model showed that the high expression of LRFN4($HR=0.585, P=0.018$) was an independent risk factor for prognosis in patients with colorectal cancer. **Conclusions** The expression of LRFN4 is up-regulated in colorectal cancer, which is significantly correlated with the clinicopathological features and prognosis. High expression of LRFN4 reduced the risk of death in patients with colorectal cancer.

【Key words】 Colorectal cancer; LRFN4; Prognosis

DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20190905-01975

结直肠癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一,在过去的几十年中,我国的结直肠癌发病率和死亡率呈上升趋势^[1],这种趋势是由饮食结构改变,采用西化生活方式以及癌症早期发现和早期治疗的不足导致的^[2]。目前,我国结直肠癌5年生存率远低于美国和日韩,患者的5年生存率仍低于40%^[3]。因此,筛选有效且灵敏的结直肠癌分子标志物对其预防、早期诊断和改善预后具有重要的意义。

富含亮氨酸的重复序列和含纤连蛋白Ⅲ型结构域的蛋白质(LRFN)家族蛋白被认为是神经元特异性蛋白质,其在神经突生长和突触形成中发挥重要作用^[4-5]。研究发现,LRFN4在多种肿瘤和白血病细胞系中表达^[6]。但目前国内外尚未见LRFN4在结直肠癌中的研究报道。本研究采用210例结直肠癌组织及非癌组织(对应手术切缘)制作组织芯片,用免疫组织化学法和统计学方法进行研究观察,分析LRFN4与结直肠癌患者的临床病理特征及预后的关系,探讨LRFN4在结直肠癌发生发展及预后中的作用。

对象与方法

1. 从 Oncomine 数据库提取数据: Oncomine 数据库(<http://www.oncomine.org/>)收集、分析肿瘤样本的基因表达谱芯片数据,提供肿瘤转录组数据。目前, Oncomine 已收集了来自 715 个数据集的 86 733 个样本,能帮助我们筛选一些值得研究的靶分子或预测表型。在本研究中,从 Oncomine 数据库提取数据。首先在该数据库中设定检索条件,设定条件具体如下:(1)Gene: LRFN4;(2)Primary Filters-Analysis Type: Cancer vs. Normal Analysis;(3)Cancer Type: Colorectal Cancer;(4)Sample Type: Clinical Specimen;(5)Data Type: mRNA。在候选的结果中选择呈现形式,显示 LRFN4 mRNA 在结直肠癌组织与正常组织之间表达的倍数关系、*P*值等。

2. 从癌症基因组图谱(TCGA)数据库提取数据: TCGA 数据库(<http://cancergenome.nih.gov/>)主要储存关于各类肿瘤的基本信息,它是目前为止可以获得的公开数据库里面数据相对全面的一个。在本次研究中,首先从 TCGA 数据库提取标本数据信息。该数据库中设定检索条件如下:(1) Cases

选项, Primary Site: Colorectal。(2) Files 选项, Transcriptome Profiling, Biospecimen, Clinical; Date type: Gene Expression Quantification, Biospecimen Supplement, Clinical Supplement; Experimental Strategy: RNA-Seq。分别下载 Manifest、Metadata 及 Cart 文件进行分析。

3. 临床样本取材与收集: 收集 2002 年 1 月至 2008 年 12 月期间于南通大学附属医院普外科手术切除后病理证实结直肠癌患者的癌组织 210 例(男 77 例,女 133 例),非癌组织 228 例。临床信息(包括性别、年龄、肿瘤部位、分化程度、浸润深度、淋巴结转移等)来自病案记录。本研究通过南通大学附属医院伦理委员会审核批准(2018-K020)。所有纳入患者均签署知情同意书。

4. 组织芯片制备和免疫组化分析: 收集上述病例所对应石蜡组织,光学显微镜下复检,并用记号笔标记取芯位置,用手动组织芯片仪(Quick-Ray, 韩国 UNITMA 公司)取直径为 2.0 mm 的组织制成组织微阵列(TMA)芯片蜡块。将 TMA 切片经脱蜡水化和抗原修复后,滴加兔抗人 LRFN4 多克隆抗体[1:200 稀释, R&D systems (US), Monoclonal ms IgG, Clone#578102, Cat. MAB5445], 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后,滴加 Elivison 二抗试剂盒(福州迈新公司,中国)。免疫组化染色阳性结果为细胞质内出现棕黄色或棕褐色颗粒,在高倍镜下($\times 400$)观察。免疫染色由两名不了解病例临床背景的训练有素的病理学家独立评估。阳性细胞染色强度分值如下: 0 分(阴性), 1 分(弱阳性), 2 分(中等阳性), 3 分(强阳性)。每个组织芯片点的阳性细胞百分比记录为 0~100%, 染色强度和阳性细胞百分比的乘积作为 LRFN4 染色的最终评分^[7]。用 X-tile 软件(美国耶鲁大学)^[8]检测 LRFN4 染色评分和预后的临界值。

5. 统计学处理: LRFN4 蛋白在结直肠癌组织与对照组中的表达差异及其与各临床病理参数之间的关系分析采用 χ^2 检验; 单个临床病理参数与结直肠癌患者生存期的分析采用 Log-rank 单因素生存分析; 有统计学意义因素和结直肠癌预后相关特征的多因素分析采用 Cox 比例风险回归模型; 采用 Kaplan-Meier 方法对 LRFN4 蛋白表达与结直肠癌患者 5 年生存率进行评估。分析采用 SPSS 20.0 统

计软件进行,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Oncomine 数据库及 TCGA 数据库含有大量肿瘤样本转录组数据,我们在 Oncomine 数据库和 TCGA 数据库中提取 LRFN4 基因在 mRNA 水平上均显示 LRFN4 在癌组织中 mRNA 的表达显著高于正常组织($P<0.05$)(图 1)。

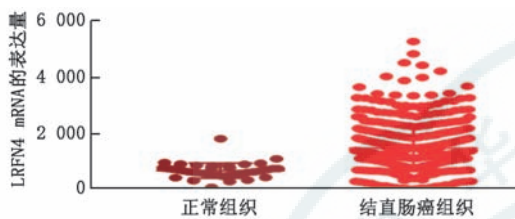


图 1 在 TCGA 数据库中, LRFN4 在结直肠癌组织中 mRNA 的表达显著高于正常组织

2. LRFN4 在结直肠癌组织及非癌组织中的蛋白表达与定位: LRFN4 阳性染色主要定位于癌组织的细胞质中,良性组织中没有明显表达(图 2)。X-tile 软件检测评分以 0~150 分为低或无表达, >150~300 分为高表达时, LRFN4 蛋白高表达与患者预后良好明显相关。经 χ^2 分析后结果显示,结直肠癌组织中 LRFN4 阳性表达率为 55.24%(116/210),非癌组织中 LRFN4 的阳性表达率为 37.28%(85/228),差异有统计学意义($\chi^2=14.196, P<0.001$)。

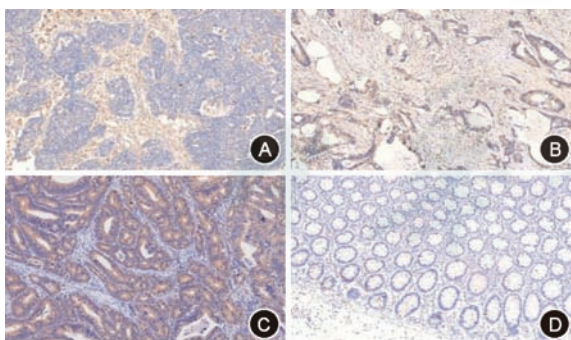


图 2 LRFN4 在不同结直肠癌组织中的表达(免疫组化 $\times 400$) A:低分化癌组织中表达弱阳性;B:中分化癌组织中表达中等阳性;C:高分化癌组织中表达强阳性;D:良性肠黏膜中表达阴性

3. 结直肠癌组织中 LRFN4 的蛋白表达与临床病理特征的关系:在结直肠癌患者中, LRFN4 蛋白阳性表达与肿瘤部位($\chi^2=4.133, P=0.042$)、肿瘤浸润深度(T分期)($\chi^2=6.494, P=0.039$)、区域淋巴结转移(N分期)($\chi^2=11.715, P=0.008$)、TNM 分期($\chi^2=$

13.398, $P=0.004$)、CEA ($\chi^2=6.017, P=0.049$) 显著相关,而与患者性别、年龄、分化程度、远处转移(M分期)无显著相关($P>0.05$)(表 1)。

4. 影响结直肠癌患者的单因素和多因素生存分析: LRFN4 的表达、T 分期、N 分期、TNM 分期与结直肠癌患者的不良预后相关。将上述单因素引入多因素 Cox 回归模型分析发现 LRFN4 的表达、TNM 分期是结直肠癌患者独立预后的指标。K-M plot 生存曲线图显示了高表达的 LRFN4 结直肠癌患者相比于低表达 LRFN4 的患者有较长的生存期(图 3)。LRFN4 高表达显著降低了患者的死亡风险,可作为结直肠癌患者独立的预后因子(表 2)。在癌组织中,随着恶性程度提高,其表达降低;并且预后良好的组中 LRFN4 的表达高于预后差的组,是一个独立的预后因素。

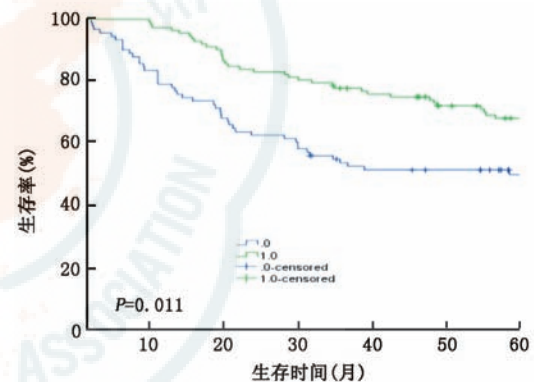


图 3 结直肠癌患者 Kaplan-Meier 生存曲线(例数 $n=210$, X-tile 软件检测评分以 0~150 分为低或无表达, >150~300 分为高表达) 高 LRFN4 表达(绿线, 1)和低 LRFN4 表达(蓝线, 0)的总生存曲线

讨 论

LRFN 又称为突触黏附样分子(SALM), LRFN 家族共有 5 名已知成员(LRFN 1-5),这些分子拥有相似的结构域,但却有各自不同的功能^[9-10]。以前的研究报道 LRFN 家族成员的表达和功能主要限于神经组织^[4-5],而最近 Kuuselo 等^[11]研究发现 LRFN1 参与了胰腺癌细胞的存活,通过 siRNA 下调 LRFN1 导致胰腺癌细胞存活率在统计学上显著降低。Konakahara 等^[6]发现,在某些癌细胞系中表达 LRFN4,例如 Panc-1、JURKAT-1 和 MKN7。在本研究中,我们发现 LRFN4 蛋白主要定位于结直肠癌细胞的细胞质中, LRFN4 在结直肠癌组织中的表达情况与肿瘤部位、肿瘤浸润深度(T分期)、区域淋巴结转移(N分期)、TNM 分期、CEA 显著相关。

表 1 LRFN4 蛋白表达与结直肠癌临床病理参数的关系[例(%)]

临床参数	例数	低或无表达	高表达	χ^2 值	<i>P</i> 值
总数	210	94(44.76)	116(55.24)		
性别				0.018	0.893
男性	77	34(44.16)	43(55.84)		
女性	133	60(45.11)	73(54.89)		
年龄(岁)				0.075	0.784
<60	71	31(43.66)	40(56.34)		
≥60	138	63(45.65)	75(54.35)		
肿瘤部位				4.133	0.042
结肠	153	75(49.02)	78(50.98)		
直肠	57	19(33.33)	38(66.67)		
分化程度				1.551	0.460
高、中分化	163	71(43.56)	92(56.44)		
低分化	20	8(40.00)	12(60.00)		
不详	27	15(55.56)	12(44.44)		
T分期				6.494	0.039
Tis 和 T1	8	2(25.00)	6(75.00)		
T2	43	13(30.23)	30(69.77)		
T3 和 T4	159	79(49.69)	80(50.31)		
N分期				11.715	0.008
0	131	47(35.88)	84(64.12)		
1	39	24(61.54)	15(38.46)		
2	21	11(52.38)	10(47.62)		
3	19	12(63.16)	7(36.84)		
M分期				1.577	0.209
M0	197	86(43.65)	111(56.35)		
M1a 和 M1b	13	8(61.54)	5(38.46)		
TNM分期				13.398	0.004
0~I 期	44	12(27.27)	32(72.73)		
II 期	84	35(41.67)	49(59.33)		
III 期	69	37(53.62)	32(46.38)		
IV 期	13	10(76.92)	3(23.08)		
癌胚抗原				6.017	0.049
≤5	126	51(40.48)	75(59.52)		
>5	29	19(65.52)	10(34.48)		
不详	55	24(43.64)	31(56.36)		

Kaplan-Meier 生存曲线统计分析及 Cox 比例风险模型统计显示, LRFN4 高表达与患者总生存率升高显著相关, 显著降低了患者的死亡风险, 这提示 LRFN4 蛋白的高表达在结直肠癌中可能起着抑制肿瘤进展的作用, 并且可用于评估患者预后。同时, Oncomine 和 TCGA 数据分析显示, LRFN4 在结直肠癌中上调, 这提供了另一层证据, 表明 LRFN4 可能积极参与了结直肠癌的调控和发展。

肿瘤不仅由自主的恶性细胞组成, 还由成纤维细胞、内皮细胞、免疫细胞和特异的间充质细胞组

成。肿瘤细胞可以募集这些不同类型的基质细胞以促进肿瘤生长并向远处转移^[12]。重要的是, 肿瘤浸润的免疫细胞, 特别是肿瘤边缘处巨噬细胞的存在, 通过诱导和维持肿瘤血管生成, 可以刺激肿瘤细胞增殖, 组织浸润, 并向远处转移。据报道 LRFN4 表达在具有巨噬细胞分化的单核细胞中被上调。此外, LRFN4 信号传导在诱导单核细胞/巨噬细胞向炎症区域的迁移中起着至关重要的作用^[6]。因此, 我们推测 LRFN4 可能参与了结直肠癌的传播和复发过程, 诱导巨噬细胞免疫, 肿瘤细胞

表 2 LRFN4 与预后的单因素和多因素分析

预后因素	单因素分析			多因素分析		
	HR 值	95%CI	P 值	HR 值	95%CI	P 值
LRFN4 表达程度(高/低或无)	0.482	0.311~0.748	0.001	0.585	0.375~0.913	0.018
年龄(≤60 岁/>60 岁)	0.955	0.630~1.571	0.983			
性别(男/女)	0.248	0.826~2.095	1.316			
肿瘤部位(结肠/直肠)	1.280	0.802~2.042	0.301			
分化程度(高、中/低/不详)	1.096	0.819~1.466	0.540			
T 分期(Tis 和 T1/T2/T3 和 T4)	5.886	2.444~14.177	<0.001			
N 分期(0/1/2/3)	1.430	1.176~1.739	<0.001			
M 分期(M0/M1a 和 M1b)	1.352	0.588~3.106	0.478			
TNM 分期 (0~ I 期/II 期/III 期/IV 期)	2.076	1.574~2.736	<0.001	1.964	1.482~2.602	<0.001
癌胚抗原(≤5/>5)	1.152	0.907~1.463	0.247			

生长受限制,但随着肿瘤进展,或者蛋白表达降低,该免疫机制难以抵挡,患者预后差。

尽管如此,我们的研究仍存在一些局限性。我们需要对一般人群进行更大的前瞻性研究,以纠正回顾性观察研究的缺陷。此外,需要进一步的试验来确定 LRFN4 是否在结直肠癌中充当肿瘤抑制因子,以及需要阐明 LRFN4 在结直肠癌发生、发展、转移过程中的信号传导途径和潜在机制。

总之,LRFN4 在结直肠癌中高表达,具有重要的临床意义。本课题组将在结直肠癌细胞系中进一步研究 LRFN4 表达差异,通过更多的试验来证实 LRFN4 基因在结直肠癌发生发展中的作用机制,使其能成为结直肠癌的有效预测指标,亦有望成为肿瘤生物治疗的新靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 付强,成静,张金岱,等.长链非编码 RNA LINC00339 在结直肠癌中的表达和作用机制[J].中华医学杂志,2019,99(24):1881-1886. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.24.009.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [3] 李兆申,金震东,令狐恩强.中国早期结直肠癌筛查流程专家共识意见(2019,上海)[J].中华医学杂志,2019,99(38):2961-2970. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.38.001.
- [4] Ko J, Kim S, Chung HS, et al. SALM synaptic cell adhesion-like molecules regulate the differentiation of

excitatory synapses[J]. Neuron, 2006, 50(2): 233-245. DOI: 10.1016/j.neuron.2006.04.005.

- [5] Wang PY, Seabold GK, Wenthold RJ. Synaptic adhesion-like molecules (SALMs) promote neurite outgrowth[J]. Mol Cell Neurosci, 2008, 39(1): 83-94. DOI: 10.1016/j.mcn.2008.05.019.
- [6] Konakahara S, Saitou M, Hori S, et al. A neuronal transmembrane protein LRFN4 induces monocyte/macrophage migration via actin cytoskeleton reorganization[J]. FEBS Lett, 2011,585(14):2377-2384. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.06.011.
- [7] 江涛,吴兆映,史沛聪,等. KIF4A 在结直肠癌中的表达及其临床意义[J].南京医科大学学报(自然科学版),2018,(5):628-632,637. DOI: 10.7655/NYDXBNS20180511.
- [8] Zhai X, Zhu H, Wang W, et al. Abnormal expression of EMT-related proteins, S100A4, vimentin and E-cadherin, is correlated with clinicopathological features and prognosis in HCC[J]. Med Oncol, 2014, 31(6): 970. DOI: 10.1007/s12032-014-0970-z.
- [9] Lie E, Li Y, Kim R, et al. SALM/Lrnf family synaptic adhesion molecules[J]. Front Mol Neurosci, 2018, 11: 105. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00105.
- [10] Nam J, Mah W, Kim E. The SALM/Lrnf family of leucine-rich repeat-containing cell adhesion molecules[J]. Semin Cell Dev Biol, 2011, 22(5): 492-498. DOI: 10.1016/j.semdb.2011.06.005.
- [11] Kuuselo R, Savinainen K, Azorsa DO, et al. Intersex-like (IXL) is a cell survival regulator in pancreatic cancer with 19q13 amplification[J]. Cancer Res, 2007, 67(5): 1943-1949. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3387.
- [12] Liu Y, Chen X, Yang X, et al. High SALM3 expression in tumor cells and fibroblasts is correlated with poor prognosis in gastric cancer patients[J]. Dis Markers, 2019, 2019(4): 1-8. DOI: 10.1155/2019/8282414.

(收稿日期:2019-09-05)

(本文编辑:陈新石)