

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.09.04

# CLDN23 基因在结肠癌中的临床意义和预后价值

张政, 郑东, 尹晶平, 朱琼芳, 丰斌, 梁玉婷, 黄惠芳, 邱骏(苏州大学附属第一医院临床检测中心, 江苏苏州 215006)

**摘要:**目的 检测 *CLDN23* 基因在结肠癌中的表达情况, 分析其临床意义和预后价值。方法 登录癌症基因组数据库 (the cancer genome atlas, TCGA) 下载结肠癌转录本测序数据和相应患者的临床病理资料, 使用 R 3.6.0 软件提取并分析 *CLDN23* 基因在结肠癌中的表达情况。根据 *CLDN23* 基因在结肠癌患者中表达水平的中位数, 将结肠癌患者分为高、低表达 2 组, 使用卡方检验分析 *CLDN23* 基因表达与患者临床病理参数的关系, 使用 Log rank 检验分析 2 组之间总体生存率的差异。利用单因素和多因素 Cox 回归分析 *CLDN23* 基因在结肠癌中的预后价值。结果 与正常组织相比, *CLDN23* 基因在结肠癌组织中显著下调 ( $P < 0.001$ )。Log rank 检验分析结果提示, 低表达组患者的总体生存率较高表达组患者更低 ( $P = 0.018$ )。多因素 Cox 回归分析结果提示, *CLDN23* 基因可作为结肠癌患者的独立预后因子 ( $HR = 1.47, 95\% CI: 1.09 \sim 1.96, P = 0.01$ )。结论 *CLDN23* 基因在结肠癌组织中表达下调, 与结肠癌恶性进展相关, 可作为结肠癌的预后因子和潜在的分子标志物。

**关键词:** *CLDN23*; 结肠癌; TCGA; 表达; 临床意义; 预后

中图分类号: R446

文献标志码: A

## Clinical significance and prognostic value of *CLDN23* gene in colon cancer

ZHANG Zheng, ZHENG Dong, YIN Jingping, ZHU Qiongfang, FENG Bing, LIANG Yuting, HUANG Hui Fang, QIU Jun (Clinical Laboratory Center, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression level of *CLDN23* gene in colon cancer and analyze its clinical significance and prognostic value. **Methods** The transcript sequencing data and the corresponding clinicopathological data of the patients with colon cancer were downloaded from the cancer genome atlas (TCGA) database, and the expression status of *CLDN23* gene in colon cancer was extracted and analyzed by the R 3.6.0 software. Based on the median value of *CLDN23* expression, the patients with colon cancer were divided into high and low expression groups. The correlation between the expression level of *CLDN23* gene and clinicopathological parameters was analyzed by the Chi-square test, and the difference in overall survival between *CLDN23* high and low expression groups by the Log rank test. The prognostic value of *CLDN23* in colon cancer was evaluated by the univariate and multivariate Cox regression analysis. **Results** Compared with normal tissues, the expression level of *CLDN23* gene in colon cancer tissues was significantly down-regulated ( $P < 0.001$ ). Log rank test results indicated that the overall survival rate of the patients with low expression of *CLDN23* was lower than that with high expression of *CLDN23* ( $P = 0.018$ ). Multivariate Cox regression analysis showed that *CLDN23* gene could be used as an independent prognostic factor of colon cancer patients ( $HR = 1.47, 95\% CI: 1.09-1.96, P = 0.01$ ). **Conclusion** The expression of *CLDN23* gene is down-regulated in colon cancer tissues, which may be associated with the malignant progression of colon cancer, and can be used as a prognostic factor and potential molecular marker of colon cancer.

**Key words:** *CLDN23*; colon cancer; TCGA; expression; clinical significance; prognosis

结直肠癌是世界第三大常见恶性肿瘤, 目前已证实多种因素与结直肠癌的发生、发展密切相关<sup>[1]</sup>。研究显示, 吸烟、饮酒、超重或肥胖、缺乏运动、蔬菜水果摄入量低、红色肉类和加工肉类摄入量高等因素约占我国结直肠癌发病率和死亡率的 46%<sup>[2]</sup>。虽然 TNM 分期系统被临床用于指导结直肠癌患者的治疗和预后, 但也存在一定的局限, 例如, 相同病理类型、TNM 分期和治疗方案的患者预后和结局可能完全不同<sup>[3]</sup>。因此, 研究者开始关注于寻找预后分子标志物, 以指导结直肠癌的临床决策。

*CLDN23* (*claudin-23*) 基因是 *claudin* 基因家族

的成员之一。Claudins 蛋白家族是组成细胞间紧密连接必不可少的骨架蛋白, 能维持细胞间的完整性, 调节离子和分子的扩散, 并参与维持细胞极性和细胞间信号的传递<sup>[4-5]</sup>。研究指出, *claudins* 蛋白的异常表达往往影响肿瘤细胞的生物学行为<sup>[6]</sup>。*CLDN23* 基因被报道与胃癌<sup>[7]</sup>、胰腺癌<sup>[8]</sup>等肿瘤的发生、发展存在关联, 表明 *CLDN23* 是一个潜在的肿瘤分子标志物。本研究通过生物信息学的方法, 综合多种数据库, 探讨 *CLDN23* 基因在结肠癌中的临床和预后意义, 旨在为结肠癌提供新型预后分子标志物。

作者简介: 张政, 1992 年生, 男, 技师, 硕士研究生, 从事临床免疫学检验研究。

通信作者: 邱骏, 主任技师, E-mail: 13606136542@126.com。

### 1 材料与方 法

**1.1 转录本测序数据的下载与处理** 下载癌症基因图谱数据库 (TCGA) 中结肠癌转录本测序数据。其中包括结肠癌组织样本 473 例,正常组织对照 41 例。使用 R 3.6.0 软件提取 *CLDN23* 基因在结肠癌组织和正常组织中的表达量,利用 Mann-Whitney *U* 检验比较 2 组间的表达差异。基于 *CLDN23* 基因在结肠癌组织表达水平的中位值,将患者分为高、低表达 2 组。

**1.2 临床数据的下载与处理** 下载 TCGA 中结肠癌患者的临床资料,删除临床资料缺失和生存时间为 0 的患者信息,提取患者的临床特征(包括年龄、性别、T 分期、N 分期、M 分期和病理 Stage 分期)。利用卡方检验分析 *CLDN23* 基因表达与患者临床病理参数的关系。

**1.3 *CLDN23* 基因与结肠癌患者预后关系的分析** 使用 Log rank 检验分析高、低表达 2 组之间总体生存率的差异。使用单因素和多因素 Cox 回归分析与结肠癌患者预后相关的临床因素,探讨 *CLDN23* 基因表达在结肠癌中的预后价值。

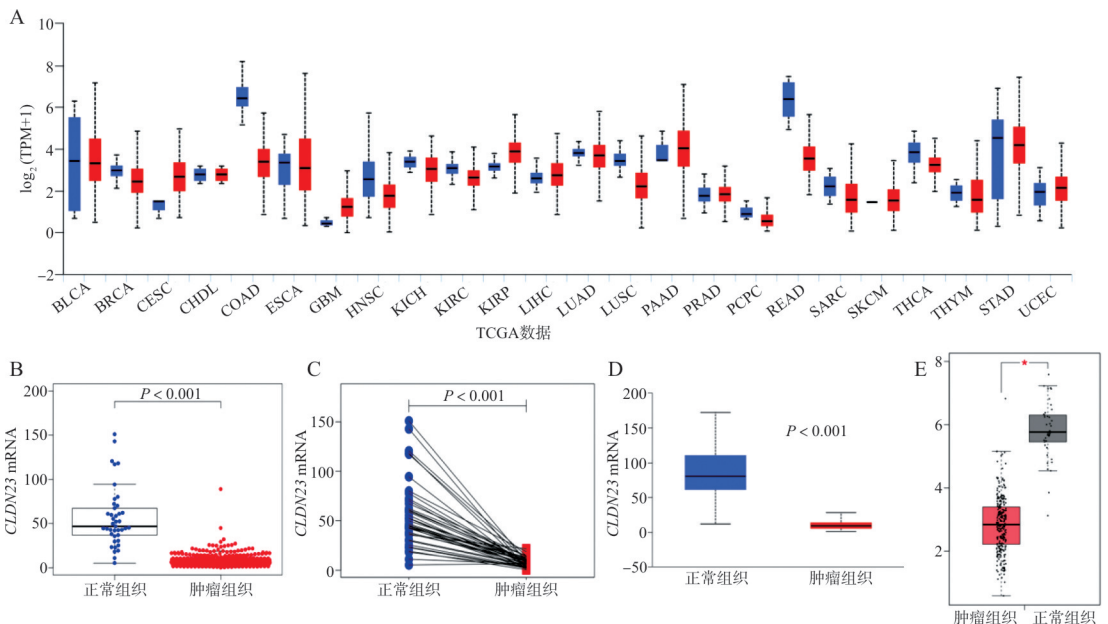
**1.4 GEPIA 和 OncoLnc 数据库分析** 使用 GEPIA 数据库验证 *CLDN23* 基因在结肠癌中的表达以及与患者的预后关系。在 GEPIA 数据库界面中,设置条件如下:(1) Gene 中输入“*CLDN23*”;(2) Datasets Selection 选择 COAD;(3) Matched Normal data 选择

“Match TCGA normal data”;(4) Methods 选择 Overall Survival 和 Disease Free Survival,其他条件选择默认。此外,OncoLnc 数据库亦被用于验证分析 *CLDN23* 基因与结肠癌患者总体生存率的关系。

**1.5 统计学分析** 使用 R 3.6.0 软件和 IBM SPSS Statistics 25.0 软件进行统计学分析。使用非参数检验 (Mann-Whitney *U* 检验) 分析 *CLDN23* 基因在结肠癌组织和正常组织中的表达差异,使用卡方检验分析 *CLDN23* 与患者临床病理参数的关系。生存分析使用 Log rank 检验,单因素和多因素 Cox 回归用于分析 *CLDN23* 基因在结肠癌中的预后作用。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 *CLDN23* 基因在结肠癌组织中显著下调** *CLDN23* 基因在 TCGA 中的肿瘤表达情况见图 1A。在 TCGA 结肠癌数据集中,共有 41 例正常组织,473 例结肠癌组织。Mann-Whitney *U* 检验结果显示,与正常组织相比,*CLDN23* 基因在结肠癌组织中的表达下调( $P < 0.001$ ) (图 1B)。删除非配对的样本,只保留 41 对癌组织和癌旁组织进行分析,结果显示,*CLDN23* 基因在结肠癌组织中表达显著降低 ( $P < 0.001$ ) (图 1C)。UALCAN 数据库和 GEPIA 数据库分析结果也表明了 *CLDN23* 基因在结肠癌样本中表达下调(图 1D、1E)。



注:A,*CLDN23* 基因在 TCGA 肿瘤中的表达;B,*CLDN23* 基因在结肠癌和正常组织中的表达;C,在 41 对结肠癌和癌旁配对样本中 *CLDN23* 基因的表达;D,在 UALCAN 数据库中,*CLDN23* 基因在结肠癌中的表达;E,在 GEPIA 数据库中,*CLDN23* 基因在 TCGA 结肠癌 (COAD) 中的表达。

图 1 *CLDN23* 基因在 TCGA 肿瘤中的表达分析

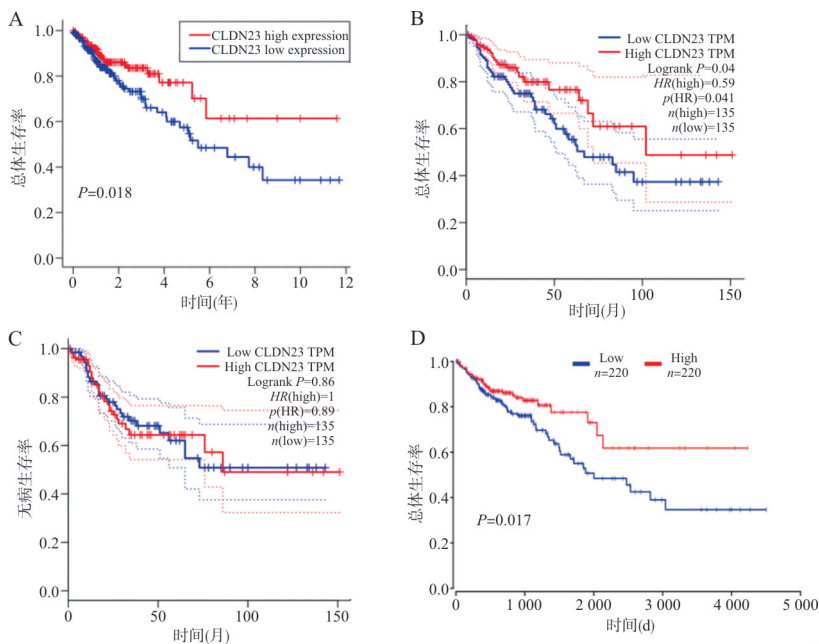
**2.2 CLDN23 基因与结肠癌患者临床病理参数的关系** 卡方检验分析结果显示, *CLDN23* 与结肠癌患者的 N 分期显著相关 ( $P=0.046$ )。见表 1。

**表 1** *CLDN23* 基因与结肠癌患者临床病理参数的相关性分析 ( $n$ )

变量	低表达组	高表达组	$\chi^2$ 值	$P$ 值
年龄(岁)			2.150	0.143
<60	56	44		
$\geq 60$	129	143		
性别			0.680	0.410
男	95	104		
女	90	83		
Stage 分期			0.008	0.930
I + II 期	107	109		
III + IV 期	78	78		
T 分期			0.543	0.461
T <sub>1</sub> +T <sub>2</sub> 期	33	39		
T <sub>3</sub> +T <sub>4</sub> 期	152	148		
M 分期			0.380	0.538
M <sub>0</sub> 期	154	160		
M <sub>1</sub> 期	31	27		
N 分期			3.982	0.046
N <sub>0</sub> +N <sub>1</sub> 期	142	168		
N <sub>2</sub> +N <sub>3</sub> 期	37	25		

**2.3 CLDN23 基因与结肠癌患者预后的相关性分析** 使用 Log rank 检验分析高、低表达 2 组患者的总体生存率的差异, 结果见图 2A。与高表达组相比, 低表达 *CLDN23* 基因患者的总体生存率较差 ( $P=0.018$ )。GEPIA 数据库分析显示, 低表达 *CLDN23* 基因患者的总体生存率较差 ( $P=0.04$ , 图 2B), 但 *CLDN23* 基因表达与患者的无病生存期无显著关联 ( $P=0.88$ , 图 2C)。OncoLnc 数据库分析表明, 低表达 *CLDN23* 基因的结肠癌患者的总体生存率不良 ( $P=0.017$ , 图 2D)。

**2.4 CLDN23 基因可作为结肠癌的独立预后因子** 在 TCGA 结肠癌中, 结合患者的临床资料和生存数据, 使用单因素和多因素 Cox 回归分析 *CLDN23* 基因的预后作用。单因素 Cox 回归分析结果显示, 年龄、病理分期、T 分期、N 分期、M 分期均可以影响结肠癌患者的生存 ( $P<0.05$ ); 而多因素 Cox 回归分析结果显示, 只有年龄 ( $HR=1.04$ ,  $95\% CI: 1.01 \sim 1.06$ ,  $P=0.002$ ) 和 *CLDN23* 基因表达 ( $HR=1.47$ ,  $95\% CI: 1.09 \sim 1.96$ ,  $P=0.01$ ) 可以作为结肠癌患者的独立预后因子, 见表 2。



注: A, TCGA 数据库中, *CLDN23* 基因表达与结肠癌患者总体生存率的生存曲线; B 和 C, GEPIA 数据库中, *CLDN23* 基因表达与患者总体生存率和无病生存率的生存曲线; D, OncoLnc 数据库中, *CLDN23* 基因表达与患者总体生存率的关系曲线。

**图 2** *CLDN23* 基因与结肠癌患者预后关系的生存曲线

表 2 单因素和多因素 Cox 回归分析

因素	单因素 Cox 回归分析			多因素 Cox 回归分析		
	HR	95%CI	P 值	HR	95%CI	P 值
年龄	1.02	1.00~1.04	0.029*	1.04	1.01~1.06	0.002*
性别	1.13	0.70~1.82	0.627	—	—	—
Stage 分期	2.47	1.87~3.25	<0.001*	1.72	0.77~3.87	0.185
T 分期	3.21	1.99~5.17	<0.001*	1.64	0.93~2.92	0.087
M 分期	4.99	3.05~8.18	<0.001*	1.66	0.56~4.97	0.364
N 分期	2.11	1.60~2.79	<0.001*	1.15	0.71~1.87	0.565
CLDN23	1.56	1.17~2.09	0.003*	1.46	1.09~1.95	0.010*

注: \*,  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

研究表明,上皮细胞极性是影响癌症起始和转移形成的主要因素,上皮细胞极性的丧失可促进细胞发生上皮-间质转化(EMT)和恶性转化,在肿瘤发生的起始阶段和肿瘤发展的后期具有重要作用<sup>[9]</sup>。上皮细胞的极性取决于包括紧密连接(tight junctions, TJs)和粘附连接的顶端连接复合体的建立<sup>[10]</sup>。紧密连接是这些细胞间连接中最顶端的,在维持细胞极性和调节细胞旁通透性中起着至关重要的作用,它可以通过下调或上调紧密连接蛋白来改变紧密连接,从而触发恶性转化,致使癌症进展<sup>[11-12]</sup>。CLDNs (Claudins) 是紧密连接的核心组件,对紧密连接的形成至关重要。CLDNs 蛋白会形成细胞旁屏障,可以封闭上皮层,维持细胞极性以及控制离子和小分子在上皮细胞之间的流通,此外,这些蛋白质还参与调节细胞形态和细胞间信号如 WNT/ $\beta$ -catenin、JAK-STAT3 和 Notch 信号级联等途径<sup>[13-15]</sup>。

目前,有许多学者进行了 CLDNs 基因/蛋白质与结直肠癌的关系研究。Jiang 等<sup>[16]</sup>研究表明,claudin-1 的低表达与结直肠癌患者预后不良有关;通过促进 TNF- $\alpha$  诱导的 EMT 可促进结直肠癌细胞的迁移<sup>[17]</sup>。claudin-2 基因被报道在结直肠癌组织中表达上调,通过调控 YAP 活性以及 miR-222-3p 的表达,可以促进结直肠癌干细胞的自我更新<sup>[18]</sup>。下调的 claudin-3 可以通过 IL-6/gp130/Stat3 信号促进结直肠癌恶性肿瘤的发生<sup>[19]</sup>。claudin-4 表达的严重缺失被证实与结直肠癌的远处转移显著相关<sup>[20]</sup>。Wang 等<sup>[21]</sup>研究指出,claudin-7 蛋白在结直肠癌组织中表达下调,并通过 EMT 途径促进结直肠癌的侵袭和转移。claudin-11 基因甲基化被报道与结直肠癌的转移和不良生存有关<sup>[22]</sup>。此外,claudin-12<sup>[23]</sup>、claudin-18<sup>[24]</sup>等均被证明在结直肠癌组织中表达异常,促进结直肠癌的发生。

本研究通过分析结肠癌数据集发现,CLDN23 基因在结肠癌组织中表达显著下调,并且与患者的 N 分期相关。低表达的 CLDN23 基因与患者的总体生存率相关,且表达水平越低,患者的预后越差。多因素 Cox 回归分析结果提示,CLDN23 基因表达可以作为结肠癌患者的独立预后因素。

有学者发现,claudin-23 在结直肠癌中的表达降低,可能是受到组蛋白甲基化酶 EZH2 的调控,导致 claudin-23 基因启动子高度甲基化,因而抑制其表达,且 claudin-23 可以明显提升结直肠癌细胞侵袭能力,并与肿瘤转移密切相关<sup>[25]</sup>。虽然陈薇等<sup>[25]</sup>分析了 claudin-23 基因在结直肠癌中的表达,但该研究仅采用了 6 对癌组织及相应癌旁组织进行分析,并且未探究 claudin-23 基因与结肠癌患者临床病理参数和预后的联系。Lu 等<sup>[7]</sup>分析发现,在浅表性胃炎组织、萎缩性胃炎和胃癌组织中 CLDN23 基因表达水平逐渐降低,下调的 CLDN23 基因与肿瘤血管栓子的形成显著相关。此外,CLDN23 基因被指出可以作为肠型胃癌的候选抑癌基因<sup>[26]</sup>。孙宏治等<sup>[27]</sup>研究发现,CLDN23 基因在仓鼠胰腺癌组织中表达降低,并可以增强胰腺癌细胞的侵袭能力,CLDN23 基因的异常表达可能激活 MEK 信号通路。claudin-23 还可能成为防止侵袭和转移的分子治疗的新靶点<sup>[8]</sup>。

综上所述,CLDN23 基因在结肠癌中表达下调,并与结直肠癌恶性进展相关,提示患者不良的生存结局。因此,CLDN23 基因可作为结直肠癌新型的预后分子标志物,以指导结肠癌患者的临床决策。

### 4 参考文献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Gu MJ, Huang QC, Bao CZ, et al. Attributable causes of colorectal cancer in China[J]. BMC cancer, 2018, 18(1): 38.
- [3] Chen ZY, Wang X, Wu T, et al. Progress of molecular subtypes of

- colorectal cancer[J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2017, 39(9): 641-645.
- [4] Gunzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability[J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(2): 525-569.
- [5] Ouban A. Claudin-1 role in colon cancer: An update and a review [J]. *Histol Histopathol*, 2018, 33(10): 1013-1019.
- [6] 于凤娇, 达林泰. Claudins 蛋白与恶性肿瘤转移相关性的研究进展[J]. *医学综述*, 2017, 23(7): 1316-1319, 1324.
- [7] Lu Y, Jing J, Sun L, *et al.* Expression of claudin-11, -23 in different gastric tissues and its relationship with the risk and prognosis of gastric cancer[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0174476.
- [8] Wang W, Tan X, Zhou L, *et al.* Involvement of the expression and redistribution of claudin-23 in pancreatic cancer cell dissociation[J]. *Mol Med Rep*, 2010, 3(5): 845-850.
- [9] Royer C, Lu X. Epithelial cell polarity: a major gatekeeper against cancer? [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(9): 1470-1477.
- [10] Anderson JM, Van Itallie CM. Physiology and function of the tight junction [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(2): a002584.
- [11] Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, *et al.* Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 283(1): C142-C147.
- [12] Oshima T, Miwa H. Gastrointestinal mucosal barrier function and diseases[J]. *J Gastroenterol*, 2016, 51(8): 768-778.
- [13] Ding L, Lu Z, Lu Q, *et al.* The claudin family of proteins in human malignancy: a clinical perspective[J]. *Cancer Manag Res*, 2013, 5: 367-375.
- [14] Findley MK, Koval M. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins[J]. *IUBMB Life*, 2009, 61(4): 431-437.
- [15] Singh AB, Uppada SB, Dhawan P. Claudin proteins, outside-in signaling, and carcinogenesis[J]. *Pflugers Arch*, 2017, 469(1): 69-75.
- [16] Jiang L, Yang L, Huang H, *et al.* Prognostic and clinical significance of claudin-1 in colorectal cancer: A systemic review and meta-analysis[J]. *Int J Surg*, 2017, 39: 214-220.
- [17] Bhat AA, Ahmad R, Uppada SB, *et al.* Claudin-1 promotes TNF-alpha-induced epithelial-mesenchymal transition and migration in colorectal adenocarcinoma cells[J]. *Exp Cell Res*, 2016, 349(1): 119-127.
- [18] Paquet-Fifield S, Koh SL, Cheng L, *et al.* Tight junction protein claudin-2 promotes self-renewal of human colorectal cancer stem-like cells[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(11): 2925-2938.
- [19] Ahmad R, Kumar B, Chen Z, *et al.* Loss of claudin-3 expression induces IL6/gp130/Stat3 signaling to promote colon cancer malignancy by hyperactivating Wnt/beta-catenin signaling [J]. *Oncogene*, 2017, 36(47): 6592-6604.
- [20] Suren D, Yildirim M, Kaya V, *et al.* Loss of tight junction proteins (Claudin 1, 4, and 7) correlates with aggressive behavior in colorectal carcinoma[J]. *Med Sci Monit*, 2014, 20: 1255-1262.
- [21] Wang K, Li T, Xu C, *et al.* Claudin-7 downregulation induces metastasis and invasion in colorectal cancer via the promotion of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(3): 797-804.
- [22] Li J, Zhou C, Ni S, *et al.* Methylated claudin-11 associated with metastasis and poor survival of colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(56): 96249-96262.
- [23] Grone J, Weber B, Staub E, *et al.* Differential expression of genes encoding tight junction proteins in colorectal cancer: frequent dysregulation of claudin-1, -8 and -12[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2007, 22(6): 651-659.
- [24] Matsuda M, Sentani K, Noguchi T, *et al.* Immunohistochemical analysis of colorectal cancer with gastric phenotype: claudin-18 is associated with poor prognosis[J]. *Pathol Int*, 2010, 60(10): 673-680.
- [25] 陈薇, 朱肖男, 王瑾, 等. claudin-23 在结直肠癌组织中的表达及其对人结直肠癌细胞生物学行为的影响[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2018, 49(3): 331-336.
- [26] Katoh M, Katoh M. *CLDN23* gene, frequently down-regulated in intestinal-type gastric cancer, is a novel member of *CLAUDIN* gene family[J]. *Int J Mol Med*, 2003, 11(6): 683-689.
- [27] 孙宏治, 王巍, 李晴, 等. siRNA 沉默 *CLDN23* 基因后对仓鼠胰腺癌细胞解离及侵袭能力的影响[J]. *山东医药*, 2011, 51(33): 28-29.

(收稿日期:2020-02-13)

(本文编辑:许晓蒙)