

• 基础医学 •

文章编号: 1002-0217(2015)03-0205-04

生物钟基因 Cry1 在消化道腺癌中的表达及其与临床病理特征的关系

刘海军¹ 徐 蕾¹ 凌烈峰¹ 王文军² 何 雷² 冯遵永¹ 章 尧¹

(1. 皖南医学院 生物化学与分子生物学教研室, 安徽 芜湖 241002; 2. 皖南医学院附属弋矶山医院 病理科, 安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 探讨生物钟基因 Cry1 在消化道腺癌中的表达及其与临床病理特征之间的关系。方法: 采用免疫组织化学法检测生物钟基因 Cry1 在 63 例消化道腺癌组织和对应癌旁组织中的表达, 分析两者之间的关系以及 Cry1 的表达与临床病理特征之间的关系。结果: 生物钟基因 Cry1 在 63 例消化道腺癌组织和对应癌旁组织中表达强度无显著相关性 ($P > 0.05$), Cry1 的高表达与肿瘤的低分化相关 ($P < 0.05$); Cry1 的表达定位在细胞核和细胞质中, 癌组织和癌旁组织之间的亚细胞分布差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。结论: 生物钟基因 Cry1 在低分化腺癌中的表达增高以及在癌组织中的亚细胞定位发生改变, 提示 Cry1 蛋白定位在消化道腺癌的发生发展中可能发挥作用, Cry1 的表达也可能与肿瘤的恶性程度有关。

【关键词】生物钟基因; Cry1; 消化道腺癌; 免疫组织化学

【中图分类号】R 735 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2015.03.001

Expression of circadian clock gene cryptochrome-1 in gastrointestinal adenocarcinoma and its relationship with clinicopathologic characteristics

LIU Haijun, XU Lei, LING Liefeng, WANG Wenjun, HE Lei, FENG Zunyong, ZHANG Yao

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To investigate the expression of circadian clock gene cryptochrome-1 (Cry1) in gastrointestinal adenocarcinoma and its relationship with clinicopathologic characteristics. **Methods:** Immunohistochemistry was used to detect the expression of Cry1 in 63 clinical specimens from tumor and its adjacent tissues. Statistical analysis was performed to evaluate the relationship between tumor tissue and its adjacent tissues as well as association of Cry1 expression with clinicopathologic parameters. **Results:** Cry1 expression was not significant in cancerous and noncancerous tissues from 63 patients of gastrointestinal adenocarcinoma ($P > 0.05$), yet upregulated Cry1 expression indicated poorly differentiated gastrointestinal adenocarcinoma ($P < 0.05$). Cry1 was stained in the cytoplasm and nuclear regions, which suggested statistical difference of subcellular distribution between carcinoma and adjacent mucosa. ($P < 0.01$). **Conclusion:** Upregulated expression of Cry1 in poorly differentiated adenocarcinoma and the change of subcellular distribution in cancer tissues indicate that subcellular localization of Cry1 may play a role in the development of gastrointestinal adenocarcinoma, and the expression level of this protein may affect the malignancy of tumor.

【Key words】circadian clock gene; Cry1; gastrointestinal adenocarcinoma; immunohistochemistry

昼夜节律现象广泛存在于自然界各种生物体中, 生物钟基因的发现以及对其活动规律的揭示, 使得我们对生物昼夜节律的研究获得了突破性的进展。目前已知的人类生物钟基因有 Clock、Bmal1、Per1、Per2、Per3、Cry1、Cry2 等, 他们分别编码不同的生物钟基因蛋白, 在昼夜节律的调控过程中各自发挥不同的作用。Clock 与 Bmal1 形成二聚体在细胞核内与靶基因增强子的 E-Box 序列结合, 驱动 3 种 Per 基因 (Per1、Per2、Per3) 和 2 种 Cry 基因 (Cry1、Cry2) 转录^[1]。生成的 Per 和 Cry 蛋白形成异源二

聚体 Per: Cry 复合物, 此复合物又能够抑制 Clock: Bmal1 二聚体介导的转录, 构成哺乳动物生物钟反馈回路的负性调节成分^[2]。昼夜节律紊乱有可能导致某些肿瘤的发病率增加^[3]。控制哺乳动物生物节律的主钟位于下丘脑视交叉上核 (SCN), 而无论是外科切除 SCN^[4] 或者人为地将 24 h 昼夜变化调整为 8 h, 从而使小鼠的昼夜节律打乱^[5], 植入性肿瘤生长速度比对照组均有明显增加。Cry1 作为生物钟基因家族中的最重要成员之一, 其表达失调将导致生物体昼夜节律紊乱^[6]。当前国内外学者

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (30900243)

收稿日期: 2015-01-05

作者简介: 刘海军 (1980-), 男, 2012 级硕士研究生, (电话) 13855354463, (电子信箱) liuhaijun@wnmc.edu.cn;

章 尧, 男, 教授, 硕士生导师, (电子信箱) zhangyao@ahedu.gov.cn, 通讯作者。

已开始着手于生物钟基因 Cry1 与肿瘤的研究, 临床研究方面显示 Cry1 的表达失调与慢性 B 淋巴细胞白血病、结直肠癌、肝癌、乳腺癌、前列腺癌的发生发展也有一定的关联^[7-14]。在机制方面, 有证据表明 Cry1 可以负调控不依赖 p53 的细胞凋亡通路^[15] 或者激活 NF-κB 通路导致 IL-6 和 TNFα 等炎症因子表达增加, 从而引起肿瘤的发生率增加^[16], 但也有研究认为 Cry1 能够抑制血管内皮生长因子的生成而抑制肿瘤的发生^[17]。

本文选取消化道腺癌 63 例作为研究对象, 研究生物钟基因 Cry1 在消化道腺癌中的表达、亚细胞分布及其与临床病理特征之间的关系。

1 材料与方法

1.1 标本收集 病例取自皖南医学院附属弋矶山医院 2013 年 8 月~2014 年 3 月间手术切除的 63 例消化道腺癌存档石蜡标本(其中胃腺癌 30 例、结直肠腺癌 33 例)。患者年龄 41~81 岁, 平均(62.1 ± 21.1)岁, 其中男性 40 例, 女性 23 例; 中分化 33 例, 低分化 30 例; 肿瘤直径 >5 cm 者 16 例, 肿瘤直径 ≤5 cm 者 47 例; 无淋巴结转移者 25 例, 有淋巴结转移者 38 例; 侵袭深度 T1、T2 期 16 例, T3、T4 期 47 例; TNM 分期 I、II 期 33 例, III、IV 期 30 例; 所有病例术前均未接受化疗、放疗及其他抗癌治疗, 术后经病理组织学检查证实。

1.2 主要抗体和试剂 鼠抗人 Cry1 单克隆抗体购自 abcam; 通用型 PV-6000 二抗试剂盒、山羊血清工作液、抗体稀释液、DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥有限公司; 柠檬酸盐缓冲液、PBS 购自福州迈新公司; 3% H₂O₂ 购自河北健宁药业有限公司。

1.3 实验方法 石蜡标本 4 μm 厚切片, 常规脱蜡至水。组织抗原修复采用柠檬酸盐缓冲液高温高压修复 10 min, 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min, 以阻断内源性过氧化物酶活性, 正常山羊血清封闭液室温下孵育 20 min, Cry1 一抗(1:100) 4℃ 孵育过夜, 即用型 PV-6000 通用型二抗 37℃ 孵育 15 min, DAB 显色, 显微镜下观察, 达到最合适着色强度时(目的蛋白阳性最强, 背景最低) 自来水冲洗终止显色。苏木素复染, 脱水, 透明, 中性树胶封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4 免疫组化染色结果的评估 免疫组化染色结果由两名病理科医师分别双盲阅片判定, Cry1 蛋白在细胞核、胞质中的表达以呈现清晰淡黄色至棕褐色颗粒为阳性标准。每张切片均在高倍显微镜下

(×400) 选择细胞密集区观察 5 个视野, 评分后取平均值。按阳性细胞所占比例分为: >50% 为 3 分、26%~50% 为 2 分、5%~25% 为 1 分、<5% 为 0 分; 染色强度分级: 阴性为 0 分、淡黄色为 1 分、棕黄色为 2 分、棕褐色为 3 分; 两者之积分为 4 种, 0 分为阴性(-)、1 分为弱阳性(+)、2~4 分为阳性(++)、>6 分为强阳性(+++)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理。癌组织和癌旁组织中 Cry1 表达强度比较采用秩和检验, 其他数据比较采用卡方检验, P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cry1 在消化道腺癌中的表达及亚细胞分布 生物钟基因 Cry1 蛋白在消化道腺癌组织和癌旁组织中均有表达(见图 1), 在表达强度方面两者之间差异无统计学意义(P > 0.05), 见表 1。Cry1 蛋白在细胞核和细胞质中均有表达, 癌组织中核表达阳性 29 例, 胞质表达阳性 25 例, 癌旁组织中核表达阳性 47 例, 胞质表达阳性 4 例, Cry1 蛋白在癌组织和癌旁组织中的亚细胞分布差异具有统计学意义(P < 0.01), 见表 2。

2.2 Cry1 蛋白的表达、亚细胞分布与消化道腺癌临床病理特征的关系 Cry1 蛋白在消化道腺癌组织中的表达强度与肿瘤分化程度相关, 低分化的腺癌表达高于中分化的腺癌(P < 0.05), 与患者的性别、年龄、肿瘤大小、侵袭深度、有无淋巴结转移和 TNM 分期均无相关性(P > 0.05)。Cry1 蛋白在消化道腺癌中的亚细胞分布与患者的性别、年龄、肿瘤大小、侵袭深度、分化程度、有无淋巴结转移和 TNM 分期等无相关性(P > 0.05), 见表 3。

3 讨论

隐色素(Cry) 基因是生物钟基因家族中最重要的成员之一, 定位于人染色体 12q23.3, 其编码一种黄素蛋白, 是调控昼夜节律的振荡器中一个关键的核心组件, 作为生物钟基因负反馈环的主要组成部分, Cry1 可以不依赖于 Per 或两者复合物, 直接与 Clock 或 Bmal1 或 Clock: Bmal1 复合物起作用抑制转录, 据此有人认为 Cry1 的负反馈作用可能是由于其抑制活性强于任何 Per 蛋白, 其表达失调必然会导致昼夜节律的紊乱, 昼夜节律紊乱又会诱发糖代谢紊乱、肿瘤等疾病。

表1 Cry1 在胃腺癌、结直肠腺癌、消化道腺癌组织和癌旁组织中的表达

Tab 1 Cry1 expression in gastric adenocarcinoma colorectal adenocarcinoma gastrointestinal adenocarcinoma and the adjacent tissues

Cry1 的表达	胃腺癌(n = 30)		结直肠腺癌(n = 33)		消化道腺癌(n = 63)	
	癌组织	癌旁组织	癌组织	癌旁组织	癌组织	癌旁组织
-	4	6	5	6	9	12
+	8	7	20	11	28	18
++	13	10	7	12	20	22
+++	5	7	1	4	6	11
Z	0.067		1.389		0.909	
P	0.947		0.165		0.363	

表2 Cry1 在胃腺癌、结直肠腺癌、消化道腺癌组织和癌旁组织中的亚细胞分布

Tab 2 The subcellular distribution of Cry1 in gastric adenocarcinoma colorectal adenocarcinoma gastrointestinal adenocarcinoma and the adjacent tissues

Cry1 的表达	胃腺癌(n = 30)				结直肠腺癌(n = 33)				消化道腺癌(n = 63)				
	癌组织	癌旁组织	χ^2	P	癌组织	癌旁组织	χ^2	P	癌组织	癌旁组织	χ^2	P	
核表达	阴性	15	8	3.455	0.063	19	10	4.982	0.026	34	18	8.383	0.004
	阳性	15	22			14	23			29	45		
胞质表达	阴性	19	28	7.954	0.005	19	29	7.639	0.006	38	57	15.445	0.000
	阳性	11	2			14	4			25	6		

表3 Cry1 在消化道腺癌中的表达和亚细胞分布与临床病理特征的关系

Tab 3 The expression and subcellular distribution of Cry1 in gastrointestinal adenocarcinoma and correlation with clinicopathological features

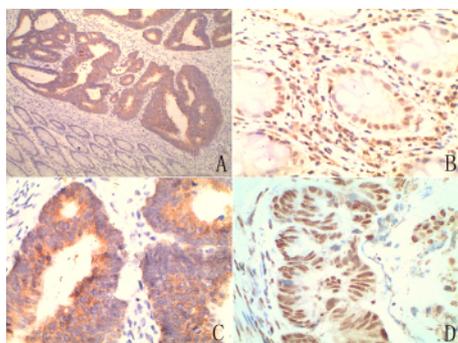
特征	例数	Cry1 蛋白的表达		χ^2	P	核表达		χ^2	P	胞质表达		χ^2	P
		低表达*	高表达**			阴性	阳性			阴性	阳性		
性别													
男	40	21	19	1.755	0.185	22	18	0.047	0.828	22	18	1.294	0.255
女	23	16	7			12	11			16	7		
年龄(岁)													
≤60	27	16	11	0.005	0.941	16	11	0.532	0.466	16	11	0.022	0.882
>60	36	21	15			18	18			22	14		
肿瘤大小													
≤5 cm	47	26	21	0.888	0.346	24	23	0.628	0.428	29	18	0.148	0.700
>5 cm	16	11	5			10	6			9	7		
侵袭深度													
T1 + T2	16	10	6	0.126	0.723	9	7	0.045	0.832	11	5	0.637	0.425
T3 + T4	47	27	20			25	22			27	20		
分化程度													
中分化	33	24	9	5.602	0.018	20	13	1.229	0.268	17	16	2.243	0.134
低分化	30	13	17			14	16			21	9		
淋巴结转移													
无	25	16	9	0.475	0.491	17	8	3.285	0.070	13	12	1.198	0.274
有	38	21	17			17	21			25	13		
TNM 分期													
I + II	33	19	14	0.038	0.845	20	13	1.229	0.268	19	14	0.218	0.641
III + IV	30	18	12			14	16			19	11		

* 低表达包含阴性(-)和弱阳性(+),** 高表达包含阳性(++)和强阳性(+++)

消化道腺癌是一种复杂的由多基因、多因素、多步骤演化而最终发生的难治性疾病。本文选取 30 例胃腺癌和 33 例结直肠腺癌作为研究对象, 尽管两种肿瘤的致病因素和发病机制略有不同, 但同属于消化道腺癌范畴, 因此我们对 63 例消化道腺癌患者病理标本检测结果先分类分析再合并分析, 检测结果发现人生物钟基因 Cry1 在癌组织和癌旁组织中

均有表达, 但两者之间表达强度差异无统计学意义。我们的研究结果与先前的报道有相似之处, 如 Oshima 等^[10] 研究发现 Cry1 在结直肠癌组织和癌旁组织之间无显著差别, Cry1 高表达和低表达患者的生存率也无明显差异, 但也有部分研究结果显示 Cry1 在部分肿瘤组织中表达上调, 如 Yu Hongyan 等^[9] 发现 Cry1 在癌组织中高表达, 并且与淋巴结转移状态

和肿瘤的 TNM 分期相关 ,Cry1 高表达的 B-CLL 患者的无进展生存期显著缩短^[7] ,也有学者研究发现 Cry1 在肝癌组织中表达下调^[13] ,Cry1 在肿瘤组织中的表达尚未有一致的结果 ,造成此种现象的原因可能与不同肿瘤的特性及样本量的大小有关 ,也可能与种族差异或病例分布区域相关。当然 ,免疫组织技术在基因蛋白表达的定量方面也有自身的局限性 ,精确定量比较还需进一步通过 Real time PCR 和 Western blot 检测。



A: Cry1 在结直肠腺癌和癌旁组织中的表达(DAB ×100) ; B: Cry1 在癌旁组织中的表达(DAB ×400) 阳性表达位于细胞核; C: Cry1 在癌组织表达(DAB ×400) ,阳性表达位于细胞质; D: Cry1 在癌组织表达(DAB ×400) ,阳性表达位于细胞核

图1 Cry1 在结直肠腺癌和癌旁组织中的表达

Fig1 Cry1 expression in colorectal adenocarcinoma and its adjacent tissues

先前的研究者通过小鼠实验检测认为 Cry1 蛋白是核内蛋白^[2] ,也有报道提出了 Cry1 蛋白在肿瘤组织和癌旁组织中均有表达^[8] ,但是没有进一步做亚细胞分布的统计研究。据我们所知 ,本文首次进行了 Cry1 蛋白在肿瘤组织和癌旁组织中亚细胞分布的研究。我们的研究证实了 Cry1 蛋白在癌组织、癌旁组织中的细胞核和细胞质中均有表达 ,通过统计学比较发现 Cry1 蛋白在癌组织和癌旁组织中均以细胞核表达为主 ,但是在癌组织中 Cry1 蛋白在细胞质中的表达比例(25/63) 显著高于癌旁组织(4/63) ,两者的亚细胞分布差异具有统计学意义 ,Cry1 蛋白在消化道腺癌中的亚细胞分布与患者的性别 ,年龄 ,肿瘤大小、侵袭深度、分化程度、有无淋巴结转移和 TNM 分期等无相关性 ,基于此结果 ,我们推测在肿瘤的发生发展过程中 Cry1 蛋白可能发生了由核内向核外的迁移或者 Cry1 蛋白合成后入核受阻 ,这一现象与肿瘤的发生发展有一定的关联 ,但具体的机制还不明了 ,我们将在以后的研究中就此方面做更进一步的研究。

【参考文献】

[1] Nicholas Gekakis ,David Stakins ,Hubert B Nguyen *et al.* Role of

the clock protein in the mammalian circadian mechanism[J]. *Science* ,1998 ,280: 1564 – 1569.

[2] Lauren P Shearman ,Sathyanarayanan Sriram ,David R Weaver *et al.* Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock [J]. *Science* 2000 ,288: 1013 – 1019.

[3] Sarah P Megdal ,Candyce H Kroenke ,Francine Laden *et al.* Night work and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis [J]. *European Journal of Cancer* 2005 ,41(13) : 2023 – 2032.

[4] Elisabeth Filipski ,Verdun M King ,Li Xiaomei *et al.* Disruption of circadian coordination accelerates malignant growth in mice [J]. *Pathol Biol(Paris)* 2003 ,51(4) : 216 – 219.

[5] Elisabeth Filipski ,Li Xiaomei ,Francis Lévi *et al.* Disruption of circadian coordination and malignant growth [J]. *Cancer Causes Control* 2006 ,17(4) : 509 – 514.

[6] Gijbertus T J Van der Horst ,Manja Muijtjens ,Kumiko Kobayashi , *et al.* Mammalian CRY1 and CRY2 are essential for maintenance of circadian rhythms [J]. *Nature* ,1999 ,398: 627 – 630.

[7] Eloisa Jantus Lewintre ,Cristina Reinoso Martin ,Carlos Garcia Ballesteros ,*et al.* Cryptochrome-1 expression: a new prognostic marker in B-cell chronic lymphocytic leukemia [J]. *Haematologica* 2008 ,94(2) : 280 – 284.

[8] Maher Hanoun ,Lewin Eisele ,Masako Suzuki *et al.* Epigenetic silencing of the circadian clock gene CRY1 is associated with an indolent clinical course in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Plos one* 2012 ,7(3) : e34347.

[9] Yu Hongyan ,Meng Xiangqi ,Huang Wenlin *et al.* Cryptochrome 1 overexpression correlates with tumor progression and poor prognosis in patients with colorectal cancer [J]. *Plos One* ,2013 ,8(4) : e61679.

[10] Takashi Oshima ,Seiich Takenoshita ,Makoto Akaike *et al.* Expression of circadian genes correlates with metastasis and outcomes in colorectal cancer [J]. *Oncology Reports* ,2011 ,25(5) : 1439 – 1446.

[11] Hu Mingluen ,Yeh Kuntu ,Lin Paimei *et al.* Deregulated expression of circadian clock genes in gastric cancer [J]. *BMC Gastroenterology* 2014 ,14: 67.

[12] Kiefer T ,Ram PT ,Yuan L *et al.* Melatonin inhibits estrogen receptor transactivation and cAMP levels in breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res Treat* 2002 ,71(1) : 37 – 45.

[13] Chu LW ,Zhu Y ,Yu K *et al.* Variants in circadian genes and prostate cancer risk: a population-based study in China [J]. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 2008 ,11(4) : 342 – 348.

[14] 张艳 ,周筱梅 ,顾健人 等. 生物节律相关基因 Cry1 与肝癌的相关性探讨 [J]. *肿瘤* 2005 ,25(4) : 301 – 306.

[15] Nuri Ozturk ,Jin Hyup Lee ,Shobhan Gaddameedhi *et al.* Loss of Cryptochrome reduces cancer risk in p53 mutant mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ,106(8) : 2841 – 2846.

[16] Rajesh Narasimamurthy ,Megumi Hatori ,Surendra K Nayak *et al.* Circadian clock protein Cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines [J]. *PNAS* ,2012 ,109(31) : 12662 – 12667.

[17] Satoru Koyanagi ,Yukako Kuramoto ,Hiroo Nakagawa *et al.* A molecular mechanism regulating circadian expression of vascular endothelial growth factor in tumor cells [J]. *Cancer Research* 2003 ,63(21) : 7277 – 7283.