

· 论著 ·

结直肠腺癌组织PRRX1蛋白表达及其与微卫星不稳定性的关系分析

谷心语*

南阳医学高等专科学校第一附属医院病理科(河南 南阳 473007)

【摘要】目的 探讨结直肠腺癌组织配对相关同源框1(PRRX1)蛋白表达及其与微卫星不稳定性(MSI)的关系。方法 回顾性分析本院2020年10月至2022年12月收治的168例结直肠腺癌患者的临床资料,均于术中留取结直肠腺癌组织与癌旁正常组织(距癌 ≥ 5 cm)。采用免疫组织化学法检测结直肠腺癌组织和相应癌旁正常组织中PRRX1蛋白表达,并分析PRRX1蛋白表达与临床病理特征的关系。采用PCR法检测结直肠腺癌组织MSI情况,并将其分为微卫星高度不稳定(MSI-H)、微卫星低度不稳定(MSI-L)、微卫星稳定(MSS)3组,比较PRRX1蛋白在3组中的表达情况。采用Spearman分析结直肠腺癌患者PRRX1蛋白表达与MSI的关系。结果 结直肠腺癌组织中PRRX1蛋白阳性表达率高于癌旁正常组织($P<0.05$)。低分化、临床分期为III+IV期、淋巴结转移患者的PRRX1蛋白阳性表达率高于中高分化、临床分期为I+II期、无淋巴结转移患者($P<0.05$)。168例结直肠腺癌患者中,经检测判定为MSS 120例(71.43%), MSI-H 28例(16.67%), MSI-L 20例(11.90%); MSI-H组PRRX1阳性表达率高于MSS组($P<0.05$);经Spearman分析结果显示,PRRX1蛋白表达与MSI呈正相关($r=0.568$, $P=0.023$)。结论 PRRX1蛋白在结直肠腺癌组织中高表达,与患者肿瘤分化程度、临床分期、是否存在淋巴结转移有关,且与患者MSI的发生密切相关。

【关键词】结直肠腺癌; 配对相关同源框1; 微卫星不稳定性; 相关性

【中图分类号】R735.3+7

【文献标识码】A

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2025.1.048

Expression of PRRX1 Protein in Colorectal Adenocarcinoma Tissue and Its Relationship with Microsatellite Instability

GU Xin-yu*

Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473007, Henan Province, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of pairing-related homeobox 1 (PRRX1) protein in colorectal adenocarcinoma tissue and its relationship with microsatellite instability (MSI). **Methods** The clinical data of 168 patients with colorectal adenocarcinoma admitted to our hospital from October 2020 to December 2022 were retrospectively analyzed. Colorectal adenocarcinoma tissues and normal tissue adjacent to the cancer (≥ 5 cm away from cancer) were collected during operation. The expression of PRRX1 protein in colorectal adenocarcinoma tissues and corresponding normal tissue adjacent to the cancer was detected by immunohistochemistry, and the relationship between PRRX1 protein expression and clinicopathological features was analyzed. The MSI of colorectal adenocarcinoma tissues was detected by PCR and divided into three groups of microsatellite high instability (MSI-H), microsatellite low instability (MSI-L) and microsatellite stability (MSS). The expression of PRRX1 protein among the three groups was compared. Spearman was used to analyze the relationship between PRRX1 protein expression and MSI in patients with colorectal adenocarcinoma. **Results** The positive expression rate of PRRX1 protein in colorectal adenocarcinoma tissues was higher than that in normal tissue adjacent to the cancer ($P<0.05$). The positive expression rates of PRRX1 protein in patients with low differentiation, clinical stage III+IV and lymph node metastasis were higher than those in patients with medium and high differentiation, clinical stage I+II and no lymph node metastasis ($P<0.05$). Among 168 patients with colorectal adenocarcinoma, 120 cases (71.43%) were diagnosed as MSS, and 28 cases (16.67%) as MSI-H and 20 cases (11.90%) as MSI-L. The positive expression rate of PRRX1 in MSI-H group was higher than that in MSS group ($P<0.05$). Spearman analysis showed that PRRX1 protein expression was positively correlated with MSI ($r=0.568$, $P=0.023$). **Conclusion** PRRX1 protein is highly expressed in colorectal adenocarcinoma tissues, which is related to the degree of tumor differentiation, clinical stage and lymph node metastasis, and it is closely related to the occurrence of MSI in patients.

Keywords: Colorectal Adenocarcinoma; Pairing-related Homeobox 1; Microsatellite Instability; Correlation

结直肠腺癌是临床常见的恶性肿瘤之一,具有较高的病发率和死亡率^[1]。结直肠腺癌的发生机制较为复杂,目前认为该疾病的发生是伴随多种基因分子遗传学改变的结果^[2]。微卫星不稳定性(MSI)是误配修复系统缺陷的一种表现,该现象首次出现于遗传性非息肉性直肠癌中,MSI可引起遗传物质改变进而导致肿瘤的发生,在癌变的过程中扮演着重要角色^[3-4]。配对相关同源框1(PRRX1)是近年来发现在多种肿瘤的发生与发展中发挥着重要作用的DNA结合蛋白。既往研究报道^[5],PRRX1在胆囊癌组织中呈高表达,参与癌症的病变过程。目前已有研究表明MSI与某些影响肿瘤进展的蛋白如程序性死亡配体1表达呈显著相关性^[6],但关于PRRX1蛋白与MSI在结直肠腺癌患者中是否具有相关性尚未明确,因此本研究通过检测结直肠腺癌标本中PRRX1蛋白表达和MIN的情况并分析两者相关性,以期对结直肠腺癌的早期诊断以及临床个性化治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入标准:经临床诊断^[7]为结直肠腺癌患者;首次治疗,且经手术切除治疗;术前均未进行放疗、靶向治疗等;术中留取患者癌组织及癌旁正常组织(距癌 ≥ 5 cm),并放置于液氮中保存;临床资料完整。排除标准:合并其他恶性肿瘤者;遗传性非息肉性结直肠癌家族史;家族性腺瘤样息肉病。

根据以上标准,回顾性分析本院2020年10月至2022年12月收治的168例结直肠腺癌患者的临床资料,其中男102例,女66例;年龄27~73岁,平均(52.68 ± 7.64)岁;病理组织学分级^[8]:低分化51例,中分化77例,高分化40例;TNM分期^[9]:I+II期97例,III+IV期71例;有淋巴结转移69例,无淋巴结转移99例。本研究经伦理委员会审核批准。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 石蜡组织基因组DNA提取试剂盒购自美国QIAGEN公司;兔抗人PRRX1单克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司;柠檬酸钠缓冲液、磷酸盐缓冲液(PBS)、DAB工

【第一作者】谷心语,男,住院医师,主要研究方向:肿瘤相关病理诊断(诊断方向)。E-mail: guxinyu92@163.com

【通讯作者】谷心语

作液购自福建迈新生物技术公司；微卫星不稳定性检测试剂、多重荧光PCR引物、毛细管电泳试剂盒均购自美国应用生物公司。

1.2.2 PRRX1蛋白表达检测 将标本均进行石蜡包埋、切片、脱水处理，3%H₂O₂封闭30min，PBS洗涤3次，浸入0.01mmol/L柠檬酸钠缓冲液中，高压修复15~30min，待冷却至室温，PBS洗涤3次，采用10%山羊血清封闭抗原30min，滴加PRRX1多克隆抗体4℃孵育过夜，PBS洗涤3次，之后滴加1:200生物素化二抗，室温反应30min，PBS洗涤3次，加入DAB工作液，PBS洗涤3次，显色3min，苏木素复染、封片，光学显微镜下观察并拍照。根据细胞核和细胞浆出现的棕褐色颗粒样染色细胞数目和染色强度判定阳性表达情况^[10]。每个样本在400倍镜下选择10个阳性染色区域分别计算100个肿瘤细胞，取其平均值计算阳性细胞百分率。评分标准如下：<5%为0分，5%~25%为1分，25%~50%为2分，50%~75%为3分，>75%为4分。染色强度判断：黄色为1分，深黄色为2分，棕褐色为3分。总计分为二者乘积，总计分≤2分为阴性或低表达，>2分为阳性或高表达。

1.2.3 MSI检测 提取癌组织DNA及癌旁正常组织DNA，检测临床最常用5个微卫星标记，包括BAT-25、BAT-26、D2S123、D17S250、D5S346，PCR引物序列见表1。抽提的基因组DNA行PCR扩增后，采用8%变形聚丙烯酰胺凝胶电泳孔中进行电泳，电泳结束后进行银盐染色，检测分析MSI状态。MSI判断标准^[11]：配对正常组织与肿瘤组织相比较，检测的全部微卫星不稳定位点均无等位基因的移动或异常等位基因出现，定义为微卫星稳定(MSS)；配对正常组织与肿瘤组织相比较，呈现波峰的移动或数目改变，即等位基因移动或出现新的微卫星等位基因，定义为MSI；微卫星5个位点中2个及2个以上位点出现不稳定者为高频微卫星不稳定(MSI-H)；只有1位点出现不稳定者为低频微卫星不稳定(MSI-L)。

1.2.4 资料收集 收集结直肠癌患者的性别、年龄、分化程度、肿瘤直径、肿瘤位置、TNM分期、是否存在淋巴结转移。

表1 MSI引物序列

位点	引物序列
BAT-25	上游：TCGCCTCCAAGAATGTAAGT
	下游：TCTGCATTTTAACTATGGCTC
BAT-26	上游：TGACTACTTTTGACTTCAGCC
	下游：AACCATTCAACATTTTAAACCC
D2S123	上游：AAACAGGATGCCTGCCTTTA
	下游：GGACTTTCTATGGGAC
D17S250	上游：AAACAGGATGCCTGCCTTTA
	下游：GCTGGCCATATATATATTAAACC
D5S346	上游：ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG
	下游：AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT

表4 PRRX1蛋白在MSI-H、MSI-L、MSS组中的表达情况(n/%)

	MSI-H组(n=28)	MSI-L组(n=20)	MSS组(n=120)
PRRX1蛋白表达情况 阳性	26(92.86)	18(90.00)	88(73.33)
阴性	2(7.14)	2(10.00)	32(26.67)
χ^2		6.901	
P		0.032	

1.3 观察指标

1.3.1 结直肠腺癌组织、相应癌旁正常组织中PRRX1蛋白表达情况以及PRRX1蛋白与临床病理特征的关系。

1.3.2 结直肠腺癌患者MSI的检测情况。

1.3.3 PRRX1在MSI-H、MSI-L、MSS 3组中的表达情况。

1.3.4 结直肠腺癌患者PRRX1蛋白与MSI的关系。

1.4 统计学分析 采用SPSS20.0软件进行数据分析，计数资料采用(n/%)表示，采用检验；采用Spearman分析结直肠腺癌患者PRRX1蛋白表达与MSI的关系。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PRRX1蛋白在结直肠腺癌组织、相应癌旁正常组织中表达情况以及其与临床病理特征的关系 结直肠腺癌组织中PRRX1蛋白阳性表达率高于癌旁正常组织(P<0.05)，见表2。不同性别、年龄、肿瘤直径、肿瘤位置癌组织PRRX1蛋白阳性表达率比较差异无统计学意义(P>0.05)，低分化、临床分期为III+IV期、淋巴结转移患者的癌组织PRRX1蛋白阳性表达率高于中高分化、临床分期为I+II期、无淋巴结转移患者(P<0.05)，见表3。

2.2 结直肠腺癌中MSI检测结果 168例结直肠腺癌患者中共有120例判定为MSS，占比为71.43%；28例判定为MSI-H，占比为16.67%；20例判定为MSI-L，占比为11.90%。

2.3 PRRX1蛋白在MSI-H、MSI-L、MSS 3组中的表达情况 MSI-H组与MSI-L组PRRX1蛋白阳性表达率比较差异无统计学意义(P>0.05)，MSI-L组与MSS组PRRX1蛋白阳性表达率比较差异无统计学意义(P>0.05)，但MSI-H组PRRX1蛋白阳性表达率高于MSS组(P<0.05)，见表4。

2.4 结直肠腺癌患者PRRX1蛋白与MSI的关系 经Spearman分析结果显示，PRRX1蛋白表达与MSI呈正相关(r=0.568，P=0.023)。

表2 结直肠腺癌组织与相应癌旁正常组织中PRRX1蛋白表达情况(n/%)

组别	n	PRRX1蛋白表达	
		阳性	阴性
结直肠腺癌组织	168	132(78.57)	36(21.43)
癌旁正常组织	168	14(8.33)	154(91.67)
		168.654	
P		<0.001	

表3 PRRX1蛋白表达与临床病理特征的关系

临床病理参数	PRRX1蛋白		χ^2	P
	阳性(n=132)	阴性(n=36)		
性别				
男	85(83.33)	17(16.67)	3.497	0.061
女	47(71.21)	19(28.79)		
年龄(岁)				
<60	52(72.22)	20(27.78)	3.017	0.082
≥60	80(83.33)	16(16.67)		
分化程度				
中高分化	86(73.50)	31(26.50)	5.878	0.015
低分化	46(90.20)	5(9.80)		
肿瘤直径(cm)				
≤4	48(72.73)	18(27.27)	2.205	0.138
>4	84(82.35)	18(17.65)		
肿瘤位置				
结肠	86(83.50)	17(16.50)	3.833	0.050
直肠	46(70.77)	19(29.23)		
TNM分期				
I+II期	70(72.16)	27(27.84)	5.595	0.018
III+IV期	62(87.32)	9(12.68)		
淋巴结转移				
无	70(70.71)	29(29.29)	8.855	0.003
有	62(89.86)	7(10.14)		

3 讨论

结直肠腺癌的发生涉及多基因、多步骤的改变,该过程可能包括癌基因、抑癌基因以及其他分子标记的改变,目前大多数改变的生物学意义尚不明确^[12-13]。微卫星参与基因重排和变异、基因表达调控等生命活动,但其核苷酸序列在不同个体中突变率高,易造成简单重复序列的丢失或增加从而引起MSI的发生,MSI阳性会导致机体细胞生命活动紊乱,从而诱发肿瘤^[14]。因此探讨MSI的发生与癌基因或肿瘤相关蛋白是否具有相关性对临床筛查、诊治、预防具有重要意义。

本研究结果显示,PRRX1蛋白在结直肠腺癌组织中阳性表达率高于癌旁正常组织,提示PRRX1蛋白可能在结直肠腺癌的发展过程中发挥着一定作用。PRRX1是由245个氨基酸组成位于人1q24.2染色体上的小分子DNA蛋白物质,主要参与机体转录共激活过程^[15]。PRRX1蛋白阳性表达可通过增加血清反应因子的DNA结合活性,诱导上皮-间质转化诱导因子分化^[16],进而促进结直肠腺癌细胞的迁移和侵袭能力增强。张永斌等^[17]研究发现,PRRX1蛋白在胃癌细胞中的阳性表达率同样正常胃黏膜组织,本研究结果与此相似。本研究结果还显示,癌组织低分化、临床分期为III+IV期、淋巴结转移患者的PRRX1蛋白阳性表达率高于中高分化、临床分期为I+II期、无淋巴结转移患者,提示PRRX1蛋白阳性表达可能与结直肠腺癌恶性程度相关。卢沛林等^[18]研究发现肝癌组织中PRRX1蛋白阳性表达情况与临床分期相关,本研究结果与之相近,均提示PRRX1蛋白表达与肿瘤临床分期具有一定相关性。PRRX1蛋白表达升高可促进癌基因表达,引起癌细胞发生上皮间质转化以及癌组织DNA损伤修复障碍,造成维护修复系统异常,促进癌细胞恶性转化,导致分化程度低。既往研究报道^[19],PRRX1蛋白与肿瘤患者淋巴结转移密切相关,本研究与该报道一致。

本研究结果显示,结直肠腺癌患者中MSI-H的阳性表达率为16.67%,与兴成娟等^[20]报道的17.14%相一致。而Uhlir J等^[21]报道的10844例结直肠癌中MSI-H的阳性率为3.1%,Atef N等^[22]研究指出在100例埃及地区结直肠腺癌患者的4个卫星位点中,MSI的阳性率为30%,本研究与此出现差异性的原因可能为:①所选MSI的基因位点及数目不同;②不同种族间存在一定的差异性;③所选患者的标准不同等。本研究结果还显示,MSI-H组的PRRX1蛋白阳性表达率明显高于MSS组,且PRRX1蛋白表达与MSI呈正相关。MSI是短的重重复DNA序列发生插入或高频缺失等改变,由基因组在复制转录过程中因为错配修复系统缺陷而导致^[23]。当PRRX1蛋白基因发生突变或甲基化时,会造成错位修复蛋白表达沉默,引起某一微卫星由于重复单位的缺失或插入造成微卫星长度与正常组织相比发生变化,从而导致MSI现象的发生。有研究报道^[24],结直肠癌中基因突变后会与误配修复基因的潜在位点相结合从而导致DNA序列发生改变,诱导MSI的发生,因此推测PRRX1蛋白可能通过与hMSH2、hMSH3、hMLH1、MSH6等错配修复基因位点的直接结合参与DNA的修复,从而造成基因位点转录表达异常,导致修复系统缺陷,从而引起MSI的发生,但其具体发生机制仍需临床进一步探索及验证。

综上所述,PRRX1蛋白在结直肠腺癌患者中显著高表达,与肿瘤分化程度、临床分期、是否存在淋巴结转移有关,且与MSI的发生呈正相关。临床可进一步深入研究PRRX1蛋白与MSI二者关系以为结直肠腺癌的发病机制提供更多的理论基础,为结直肠腺癌的筛查、治疗寻找新的靶点。

参考文献

- [1] Ali S, Shahab S, Rauf M, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor of severity in colorectal adenocarcinoma [J]. J Ayub Med Coll Abbottabad, 2022, 34 (3): 431-437.
- [2] Qiu MZ, He CY, Yang XH, et al. Relationship of HER2 alteration and microsatellite instability status in colorectal adenocarcinoma [J]. Oncologist, 2021, 26 (7): e1161-e1170.
- [3] Vg DR, Nayanar SK, Gopinath V, et al. Testing for microsatellite instability in colorectal cancer—a comparative evaluation of immunohistochemical and molecular methods [J]. Gulf J Oncolog, 2022, 1 (39): 70-78.

- [4] 丁培荣. 微卫星高度不稳定结直肠癌的免疫治疗 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2022, 25 (3): 199-204.
- [5] 白明辉, 刘海潮. 配对相关同源框-1蛋白在胆囊癌组织中的表达及意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2017, 26 (2): 185-189.
- [6] 侯少华, 齐立温, 纪小红, 等. 结直肠癌微卫星不稳定性与程序性死亡配体1表达的临床意义 [J]. 宁夏医科大学学报, 2022, 44 (3): 223-227.
- [7] 邵仟仟, 林国乐. 2017.V1版《NCCN 结直肠癌诊治指南》更新解读 [J]. 中国全科医学, 2017, 20 (6): 635-638.
- [8] 张二宁, 朱嵩翔, 鲍志国, 等. 结直肠腺癌CT纹理分析征象与病理组织学的相关性研究 [J]. 中国CT和MRI杂志, 2022, 20 (5): 157-159.
- [9] Zhuang Y, Wang H, Jiang D, et al. Multi gene mutation signatures in colorectal cancer patients: predict for the diagnosis, pathological classification, staging and prognosis [J]. BMC Cancer, 2021, 21 (1): 380.
- [10] Chen Z, Chen Y, Li Y, et al. Prrx1 promotes stemness and angiogenesis via activating TGF- β /smad pathway and upregulating proangiogenic factors in glioma [J]. Cell Death Dis, 2021, 12 (6): 615.
- [11] 黄艳, 许天文, 戴煊斌, 等. PD-L1、CD8在II/III期微卫星高度不稳定性结直肠癌中的表达及临床意义 [J]. 华中科技大学学报 (医学版), 2021, 50 (1): 56-61.
- [12] Liu Y, Wang X. Tumor microenvironment-associated gene C3 can predict the prognosis of colorectal adenocarcinoma: a study based on TCGA [J]. Clin Transl Oncol, 2021, 23 (9): 1923-1933.
- [13] Uson PLS Jr, Riegert-Johnson D, Boardman L, et al. Germline cancer susceptibility gene testing in unselected patients with colorectal adenocarcinoma: a multicenter prospective study [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2022, 20 (3): e508-e528.
- [14] Afrăsănie VA, Marinca MV, Alexa-Stratulat T, et al. KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and microsatellite instability in metastatic colorectal cancer – practical implications for the clinician [J]. Radiol Oncol, 2019, 53 (3): 265-274.
- [15] Chen W, Wu J, Shi W, et al. PRRX1 deficiency induces mesenchymal-epithelial transition through PITX2/miR-200-dependent SLUG/CTNNB1 regulation in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Sci, 2021, 112 (6): 2158-2172.
- [16] Feldmann K, Maurer C, Peschke K, et al. Mesenchymal plasticity regulated by Prrx1 drives aggressive pancreatic cancer biology [J]. Gastroenterology, 2021, 160 (1): 346-361.
- [17] Zhang Y, Yao J, Feng J, et al. Relationship between PRRX1, circulating tumor cells, and clinicopathological parameter in patients with gastric cancer [J]. J BUON, 2020, 25 (3): 1455-1462.
- [18] 卢沛林, 尹东亮, 尹润龙, 等. 配对相关同源框1蛋白在肝癌中的表达及其过表达对肝癌细胞侵袭转移的影响 [J]. 实用医学杂志, 2019, 35 (17): 2693-2698.
- [19] Yao J, Zhang Y, Xia Y, et al. PRRX1 promotes lymph node metastasis of gastric cancer by regulating epithelial-mesenchymal transition [J]. Medicine (Baltimore), 2021, 100 (6): e24674.
- [20] 兴成娟, 陈素贤, 李伦, 等. 结直肠癌中HMG2表达的意义与微卫星不稳定性关系 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39 (2): 285-289.
- [21] Uhlir J, Cecchini M, Sheth A, et al. Microsatellite instability and KRAS mutation in stage IV colorectal cancer: prevalence, geographic discrepancies, and outcomes from the national cancer database [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2021, 19 (3): 307-318.
- [22] Atef N, Alieldin N, Sherif G, et al. Microsatellite instability and life style factors in sporadic colorectal cancer [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2020, 21 (5): 1471-1480.
- [23] 王涛, 张伟, 朱元增, 等. 程序性死亡配体-1表达与微卫星不稳定性胃癌患者预后的关系 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2022, 36 (8): 779-782.
- [24] 裴风云, 吴晶晶, 赵严冬, 等. 程序性死亡蛋白-1抑制剂单药新辅助治疗局部进展期错配修复缺陷或微卫星高度不稳定结直肠癌的安全性及其疗效 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2022, 25 (3): 257-261.

(收稿日期: 2023-02-25)

(校对编辑: 姚丽娜)