



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2020.10.006

http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2020.10.006

Chinese Journal of General Surgery, 2020, 29(10):1195-1203.

· 基础研究 ·

羧基酯脂肪酶在结直肠癌中的表达及其生物学功能

王磊^{1,2}, 刘洁⁴, 黄伟^{1,3}

(中南大学湘雅医院 1. 肿瘤科 3. 癌变机理与靶向治疗研究室, 湖南长沙 410008; 2. 中南大学肿瘤研究所, 湖南长沙 410008; 4. 湖南省长沙市中心医院 病理科, 湖南长沙 410004)

摘要

背景与目的: 尽管结直肠癌的治疗水平在不断提高, 但目前其疗效仍难令人满意, 因此继续筛选和鉴定在结直肠癌起始和进展中发挥调控作用的关键分子, 揭示其功能和机制, 是开发诊疗新靶标和进一步提高结直肠癌的治疗水平的重要途径。据此, 本研究首次探讨羧基酯脂肪酶 (CEL) 在结直肠癌中的表达水平, 并初步研究其在结直肠癌中的生物学功能。

方法: 基于收录肿瘤组织基因表达数据的 UALCAN 和 GEPIA 在线数据库, 综合分析 CEL 在结直肠癌和正常组织中的表达水平及其启动子甲基化水平。分别用 qPCR、免疫组化、Western blot 实验检测 CEL 在结直肠癌组织 / 癌旁组织与结直肠癌细胞 / 人正常结肠上皮细胞中的表达。通过转染特异性靶向 CEL 的 siRNA (siCEL), 瞬时敲低人结肠癌 SW620 细胞中 CEL 的表达水平后, 分别用 CCK-8、平板克隆形成、Transwell 迁移和侵袭实验分析 CEL 在结直肠癌中的基本生物学功能。

结果: 癌症相关数据库显示, CEL 在结直肠癌组织中的表达水平明显高于正常组织 ($P < 0.05$; $P < 0.001$), 结直肠癌组织中 CEL 基因的启动子甲基化水平明显低于正常组织 ($P < 0.001$)。qPCR, 免疫组化和 Western blot 结果进一步证实 CEL 在结直肠癌组织中的基因和蛋白表达水平明显高于癌旁组织, 在结直肠癌细胞中的水平明显高于正常结肠上皮细胞 NCM460 ($P < 0.01$; $P < 0.001$)。转染 siCEL 敲低 SW620 细胞中 CEL 的表达水平后, SW620 细胞的生长速度、克隆形成能力、细胞迁移和侵袭能力被明显抑制 ($P < 0.05$; $P < 0.01$; $P < 0.001$)。

结论: CEL 在结直肠癌中高表达, 其高表达可能与其启动子区的低甲基化有关。敲低 CEL 表达能显著抑制结直肠癌细胞的恶性生物学行为, 表明 CEL 高表达促进结直肠癌恶性进展, 因此, CEL 有望成为结直肠癌诊断和治疗的靶标。

关键词

结直肠肿瘤; 羧酸酯酶; 细胞增殖; 肿瘤浸润

中图分类号: R735.3

Expression of carboxyl ester lipase in colorectal cancer and its biological function

WANG Lei^{1,2}, LIU Jie⁴, HUANG Wei^{1,3}

(1. Department of Oncology 3. Research Center of Carcinogenesis and Targeted Therapy, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2. Cancer Research Institute, Central South University, Changsha, Hunan, 410008, China; 4. Department of Pathology, Changsha Central Hospital, Changsha 410004, China)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81702924); 湖南省自然科学基金资助项目 (2018JJ3811)。

收稿日期: 2019-11-13; **修订日期:** 2020-09-20。

作者简介: 王磊, 中南大学湘雅医院 / 中南大学肿瘤研究所实验师, 主要从事肿瘤恶性转化方面的研究。

通信作者: 黄伟, Email: weihuang@csu.edu.cn

Abstract

Background and Aims: Although the treatment of colorectal cancer has been increasingly improved, the current treatment efficacy remains unsatisfactory. Therefore, the consistent screening and identification of the critical molecules that play the regulatory roles in the initiation and progression of colorectal cancer along with revelation of their functions and actions is an important process to develop new diagnostic and therapeutic targets and eventually improve the treatment effect of colorectal cancer. Accordingly, this study was designated for the first time to investigate the expression level of carboxyl ester lipase (CEL) in colorectal cancer, and preliminarily analyze its biological function in colorectal cancer.

Methods: Based on the UALCAN and GEPIA online databases containing cancer gene expression data, the expression of CEL and its promoter methylation status in colorectal cancer and normal tissues were analyzed. Then, the expression of CEL in colorectal cancer tissue/tumor adjacent normal tissue and colorectal cancer cell lines/normal human colonic epithelial cells were further determined by qPCR, immunohistochemical staining and Western blot, respectively. The expression level of CEL in human colorectal cancer SW620 cells was transiently knocked down by transfection with siRNA specifically targeting CEL (siCEL), after that, the primary biological functions of CEL in colorectal cancer were analyzed by CCK-8 assay, plate colony formation assay, Transwell migration and invasion assay, respectively.

Results: The data from cancer-relevant databases showed that the expression of CEL in colorectal cancer tissues was significantly higher than that in normal tissues ($P<0.05$, $P<0.001$), and the promoter methylation level of CEL in colorectal cancer tissues was significantly lower than that in normal tissues ($P<0.001$). The results of qPCR, immunohistochemical staining and Western blot further confirmed that the gene and protein expression levels of CEL in colorectal cancer tissue were significantly higher than those in control tissue, and in colorectal cancer cells were significantly higher than those in normal colonic epithelial cells ($P<0.01$, $P<0.001$). In SW620 cells after CEL expression knock-down by siCEL transfection, the growth speed, colony-forming ability, as well as the migration and invasion abilities were all significantly inhibited ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$).

Conclusion: CEL expression is upregulated in colorectal cancer, which may be related to its hypomethylated promoter. The malignant biological behaviors of colorectal cancer cells can be inhibited by CEL knock-down, suggesting that high CEL expression promotes malignant progression of colorectal cancer. So, CEL may be a potential target for diagnosis and treatment of colorectal cancer.

Key words

Colorectal Neoplasms; Carboxylesterase; Cell Proliferation; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.3

结直肠癌是最常见的消化道恶性肿瘤，其发病率和病死率均位居恶性肿瘤的前列^[1-2]。随着经济的飞速发展和物质生活水平的提高，我国人民群众的生活习惯及饮食结构的发生很大改变，导致结直肠癌等西方国家高发的消化系统肿瘤在我国的发病率呈逐年上升趋势，且中青年的发病占比上升趋势明显^[3-4]。根据2018年国家癌症中心公布的最新全国癌症统计数据，结直肠癌的发病率位列第三，病死率位列第五，且30岁以上人群的发病率快速增高。随着基础研究的深入、积累和转化，结直肠癌的临床诊断和治疗取得了较为显著的提高，结直肠癌患者，尤其是早期患者的

5年生存率及荷瘤生活质量有了较大提升^[5-6]。但整体来看，结直肠癌的早诊率和治疗水平仍有待进一步提升。因此，深入研究结直肠癌的发病机理，开发和鉴定结直肠癌早期诊断标志物和治疗靶点是进一步提升结直肠癌临床疗效有效方式。

羧基酯脂肪酶 (carboxyl ester lipase, CEL) 是由胰岛滤泡细胞分泌并进入消化道，也可以由泌乳的乳腺分泌进入乳汁，参与胆固醇、甘油酯、脂溶性维生素脂等脂质消化和吸收的脂肪酶，可促进乳糜微滴在肠道的生成^[7-9]。CEL蛋白包含753个氨基酸，分子量为79 kD，其编码基因位于9q34.13，长度约为10 kb，包含11个外显子

和10个内含子。CEL基因的第11号外显子富含可变数目串联重复序列(variable-number tandem repeat, VNTR),通常为11~21个。VNTR的多态性是重要的遗传标记,与CEL的功能可能存在相关性^[10-11]。目前,已证实CEL的多态性/突变与动脉粥样硬化、糖尿病及胰腺炎等病理过程密切相关^[12-14]。随着转录组测序数据的完善,CEL也被证实在肿瘤中存在高表达,提示其在多种肿瘤、尤其在消化道肿瘤的发生发展中可能扮演了重要作用^[11, 15-16]。因此,本文研究了CEL在结直肠癌中的表达情况,并利用细胞模型对CEL在结直肠癌中的基本生物学功能进行了初步探讨,为CEL在结直肠癌中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人结直肠癌细胞系SW620、SW480、HCT116和人正常结肠上皮细胞NCM460均为本实验室保存。RPIM-1640培养基为GE公司HyClone品牌,胎牛血清及0.25%胰蛋白酶购自于以色列BI公司。RNAsimple总RNA提取试剂盒(DP419),FastKing一步法除基因组cDNA第一链合成预混试剂(KR118),SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)(FP205)均购自北京天根生化科技有限公司。CEL抗体和 β -actin抗体购买于武汉爱博泰克生物科技有限公司。免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。CEL siRNA转染试剂盒(含对照盒转染试剂)购于广州锐博生物科技有限公司。蛋白快速裂解液、5 \times 蛋白上样缓冲液、BCA蛋白浓度测定试剂盒购自上海雅酶生物科技有限公司。CCK-8、SDS-PAGE胶等试剂购自上海碧云天生物科技有限公司。

1.2 临床标本

56对结直肠癌标本及癌旁标本收集于2017年11月—2019年2月期间在长沙市中心医院普通外科住院的手术初诊患者,且均未接受放疗和化疗等治疗。其中男30例,女26例;年龄25~65岁,平均年龄(48.42 \pm 8.24)岁,其中无转移患者38例,转移患者18例。所有标本均一分为二,一部分于液氮中冻存,用于RNA抽提,一部分于福尔马林中固定,用于后续制作石蜡切片。所有标本均经

病理科确认。所有标本收集前,均签署了患者知情同意书,并获得了长沙市中心医院医学伦理委员会批准。

1.3 方法

1.3.1 数据库分析 UALCAN数据库整合了TCGA的基因表达数据和启动子甲基化数据^[17]。GEPIA数据库除了整合了TCGA数据外,还包含了GTEx中的数据,具有更多的正常样本量^[18]。本文利用UALCAN数据库(<http://ualcan.path.uab.edu>)和GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn>)数据库分析CEL在结直肠癌中的表达情况和启动子区甲基化状态情况。

1.3.2 免疫组织化学实验 按笔者以往方法^[19]和试剂盒说明,进行免疫组化操作,简述如下。石蜡切片标本60 $^{\circ}$ C熔蜡1h,二甲苯脱蜡2次(3min/次)梯度酒精脱水(100% \rightarrow 100% \rightarrow 95% \rightarrow 85% \rightarrow 75%,3min/次),自来水水化1min。切片随后进行高压抗原修复(柠檬酸钠)、内源性过氧化物酶去除、血清封闭、CEL一抗(稀释度:1:100)4 $^{\circ}$ C过夜孵育、生物素标记二抗工作液孵育、HRP标记的链霉亲和素孵育、DAB显色、复染、脱水透明及中性树脂封片后,于正立显微镜下观察。根据染色强度和染色面积进行定量分析,无着色为0分,黄色为1分,棕黄色为2分;阳性细胞比例 \leq 25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分;两者得分之积为最终得分,分数 \geq 4分为高表达,<4分为低表达^[19-21]。

1.3.3 细胞培养 所有细胞的培养基配方均为包含10%胎牛血清的RPIM-1640培养基,于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂的细胞培养箱内培养,细胞汇合度达到70%~80%时,进行消化,传代,接种细胞等操作,在良好的细胞状态下进行相关实验,保证结果的有效性。

1.3.4 siRNA转染 按照已发表文章进行转染操作,简述如下^[22]。转染前1d,将SW620细胞按2 \times 10⁵/孔的密度接种于6孔板中,保证转染前细胞汇合度在30%~40%左右。根据siRNA转染试剂盒的说明进行转染操作,siCEL和siRNA阴性对照序列(siNC)的转染终浓度的100nmol/L,转染6h后,更换含血清的新鲜培养基。siCEL和siNC均购买自广州锐博生物科技有限公司,siCEL序列为:5'-CCC GTT ATG ATC TGG ATC TAT-

3', siNC 序列为公司赠送, 出于商业保密, 未提供具体序列。

1.3.5 总 RNA 抽提及 qPCR 检测 按笔者已发表的论文^[22]和试剂盒说明, 抽提结肠癌组织和细胞的总 RNA 并进行逆转录。利用 SuperReal PreMix Plus 试剂, 参照说明, 配制 qPCR 体系, 利用 ABI 7900 荧光定量 PCR 仪运行 PCR 操作, 检测 CEL 在结肠癌组织和细胞中的相对表达水平, 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量。qPCR 引物如下: CEL 上游引物 5'-TGG GTG ACT CTG TGG ACA TCT-3', 下游引物 5'-GCA GGC ATC TCT TCT TGA AGT T-3', 产物大小 129 bp; GAPDH 上游引物 5'-CTG GGC TAC ACT GAG CAC C-3', 下游引物 5'-AAG TGG TCG TTG AGG GCA ATG-3', 产物大小 101 bp。

1.3.6 细胞总蛋白提取及 Western blot 按文献^[19]方法进行相关操作。简述如下, 待裂解细胞经 PBS 洗涤后, 甩干残余后, 按照 1×10^6 个细胞加入 100 μ L 蛋白裂解液的比例, 于冰上裂解蛋白 15 min, 收集蛋白, 超声处理后, 经 14 000 r/min 离心, 取蛋白上清保存, 分装包装。选取 10 μ L 蛋白进行蛋白浓度测定, 具体步骤参照说明书。蛋白按比例加入 $5 \times$ 蛋白上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min 变性, 冷却后以 30 μ g/孔上样, 经 12% 的 SDS-PAGE 电泳分离后, 利用湿转法将蛋白转印至 PVDF 膜后, 经 5% 脱脂牛奶封闭, CEL 一抗孵育, TBST 洗涤, 二抗孵育, TBST 洗涤后, 利用 Bio-Rad 凝胶成像系统进行化学发光。

1.3.7 CCK-8 分析 根据已发表的论文和试剂说明书进行 CCK-8 实验^[19]。将处于对数生长期的敲低 CEL 表达的 SW620 细胞和对照细胞, 按 1 000 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板, 每隔 24 h, 连续 4 次, 分别取 5 个孔, 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 孵育 1 h 后, 利用 Bio-Tek 酶标仪, 测量 450 nm 波长下, 各孔的吸光值, 扣除空白本底后, 绘制生长曲线。

1.3.8 平板克隆形成实验 按笔者以往方法^[19]进行平板克隆形成实验, 简述如下: 将处于对数生长期的敲低 CEL 表达的 SW620 细胞和对照细胞, 按每孔 1 000 个细胞, 接种于 6 孔板, 每种细胞设置 3 个复孔。细胞连续培养 8 d 后, 利用甲醇固定 15 min, 随后利用 0.5% 结晶紫染色 15 min, 经

自来水漂去游离染色液后, 计算各孔的克隆数目(蓝色)。于倒置显微镜镜下观察每个克隆的细胞数目, >50 个细胞的克隆, 计算为 1 个有效克隆。

1.3.9 Transwell 小室迁移和侵袭实验 按文献^[19]方法进行 Transwell 小室迁移和侵袭实验, 简述如下。消化和收集处于对数生长期的 CEL 表达敲低的 SW620 细胞和对照细胞, 利用 RPMI-1640 培养基(不含血清)重悬细胞, 调整细胞密度至 50 000 细胞/mL, 分别于预铺有 Matrigel 和未铺 Matrigel 的 Transwell 小室中加入 500 μ L 细胞悬液, 使细胞总数为 25 000 个。同时, 在下室孔中(24 孔板)加入 750 μ L 含 15%FBS 的 RPMI-1640 的完全培养基, 于细胞培养箱中继续培养 24 h 后取出, 经甲醇固定 15 min, 0.5% 结晶紫染色 15 min, 经自来水漂洗后, 利用棉签小心刮除 Transwell 小室上层的细胞, 于显微镜下观察细胞穿过情况, 随机选取 5 个视野, 计算穿过细胞的平均数。

1.4 统计学处理

利用 SPSS statistics 20.0 和 Graphpad prism 6.0 进行统计学分析和作图。平均 OD 值、平均克隆数、平均细胞数等计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组数据间比较采用 *t* 检验; 计数资料比较利用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验 ($n < 5$)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 在线数据库分析

为了初步分析 CEL 在结肠癌中的表达水平, 利用 UALCAN 和 GEPIA 在线工具分析 CEL 在结肠癌和正常组织中的表达差异, UALCAN 数据库结果显示, CEL 在结肠癌组织中的表达水平显著高于正常结肠组织 ($P < 0.001$) (图 1A)。GEPIA 数据库同样显示, CEL 在结肠癌组织中的表达水平明显高于正常结肠组织 ($P < 0.05$) (图 1B)。另外 UALCAN 数据库甲基化分析结果显示, 结肠癌组织 CEL 的启动子区甲基化水平明显低于正常结肠组织 ($P < 0.001$) (图 2A-B), 提示启动子区的低甲基化可能是 CEL 在结肠癌中高表达的重要原因。

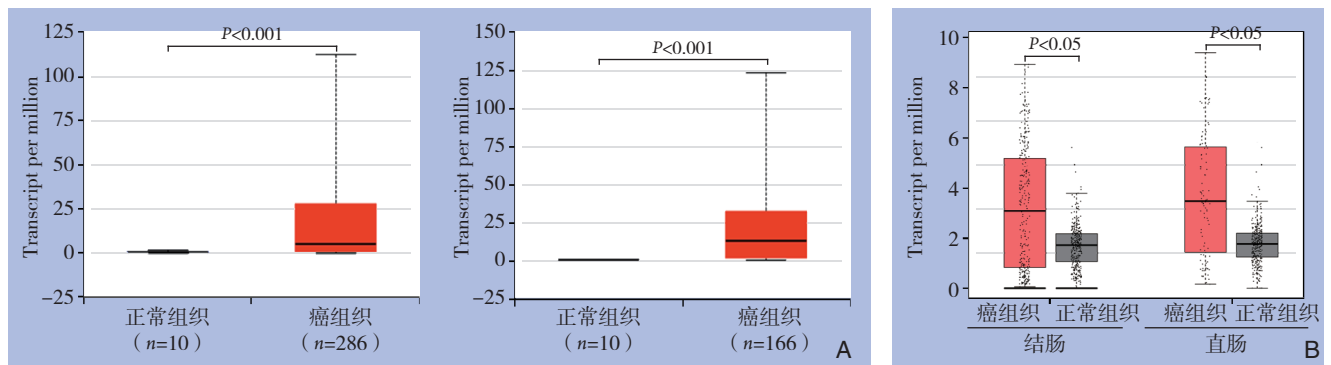


图 1 在线数据库分析 CEL 在结直肠癌中的表达 A: UALCAN 结果显示, CEL 在结肠癌和直肠癌中的表达水平明显高于正常组织; B: GEPIA 结果显示, CEL 在结肠癌和直肠癌中的表达明显高于正常组织

Figure 1 Analysis of the expression level of CEL in colorectal cancer using online databases A: UALCAN results showing that the expression level of CEL in colon cancer and rectal cancer are significantly higher than those in normal tissues; B: GEPIA results showing that the expression of CEL in colon cancer and rectal cancer are significantly higher than those in normal tissues

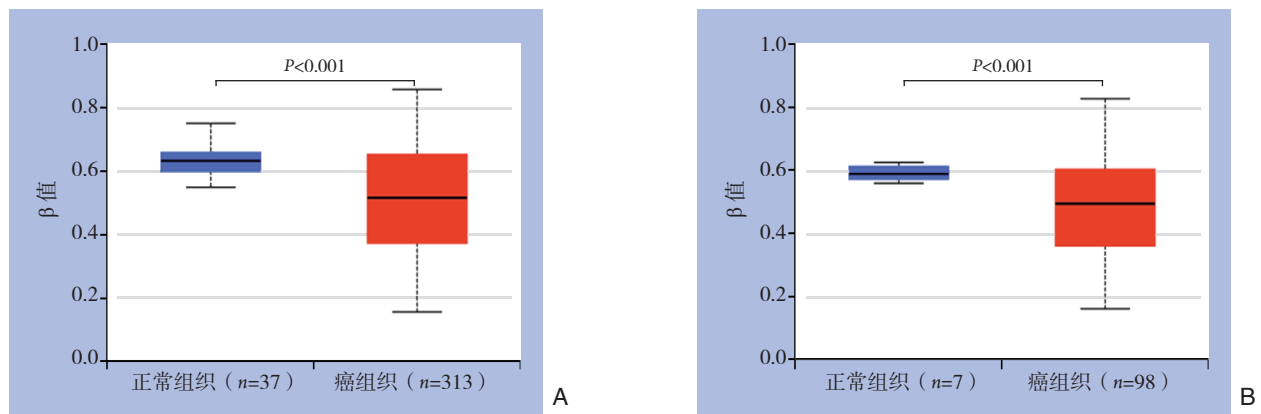


图 2 利用 UALCAN 分析 CEL 在结直肠癌中的启动子甲基化水平 A: 结肠癌中 CEL1 启动子区的甲基化水平明显低于正常组织; B: 直肠癌中 CEL1 启动子区的甲基化水平明显低于正常组织

Figure 2 Analysis of the promoter methylation level of CEL in colorectal cancer using UALCAN A: The promoter methylation level of the CEL1 region in colon cancer is significantly lower than that in normal tissues; B: The promoter methylation level of the CEL1 region in rectal cancer is significantly lower than that in normal tissues

2.2 CEL 在结直肠癌组织和细胞中的表达

为了验证在线分析的相关结果, 在收集的结直肠癌组织及培养的结直肠癌细胞系中检测了 CEL 的表达水平。qPCR 结果显示, CEL 在结直肠癌组织中的表达水平明显高于其在癌旁组织中的表达水平 ($P < 0.001$) (图 3A)。免疫组化结果显示, CEL 蛋白在癌旁组织中低表达, 在结直肠癌组织中高表达, 且在转移癌中表达水平更高, 其表达主要分布于胞浆和胞膜 (图 3B)。qPCR 及 Western blot 结果也证实, CEL 在 SW620 等结直肠癌细胞系中的表达水平和蛋白水平明显高于永生化的正常肠上皮细胞 NCM460 ($P < 0.01$; $P < 0.001$) (图 3C)。

2.3 敲低 CEL 表达对结直肠癌细胞的生长和增殖的影响

为了进一步研究 CEL 在结直肠癌中的功能, 选取 CEL 表达水平较高的 SW620 细胞作为模型, 进行了后续的功能研究。利用脂质体转染方法, 将特异性靶向 CEL 的 siRNA 转入 CEL 高表达的 SW620 细胞系, 从而瞬时敲低 CEL 的表达。Western blot 结果显示, SW620 中 CEL 的表达被 siRNA 明显抑制, 表明瞬时敲低成功 (图 4A)。随后, 利用 CCK-8 和平板克隆形成实验分析敲低 CEL 对 SW620 生长和增殖的影响。结果显示, 与对照组细胞比较, 敲低 CEL 表达后, SW620 的生长和增殖能力明显降低 ($P < 0.05$; $P < 0.01$; $P < 0.001$) (图 4B-C)。

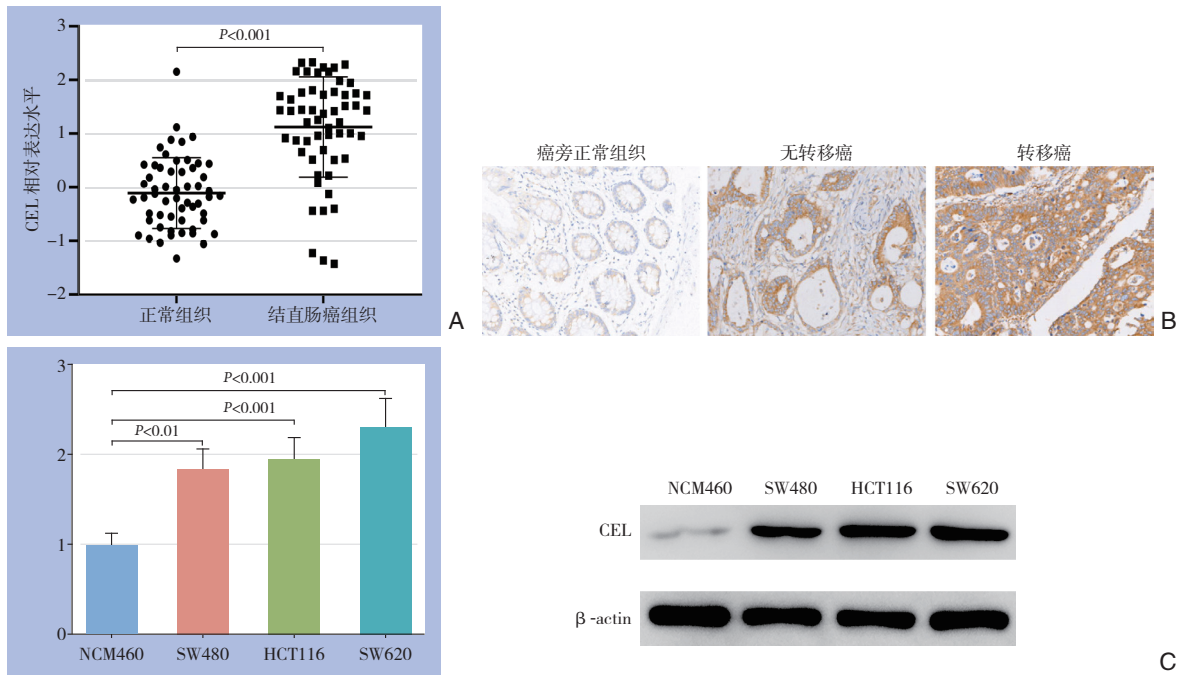


图 3 CEL 在结直肠癌组织和细胞中表达的检测结果 A: qPCR 结果显示, CEL 在结直肠癌中的表达显著高于正常组织; B: 免疫组化结果显示, CEL 在结直肠癌组织中的水平高于正常组织, 且转移癌中的水平高于无转移癌 (× 200); C: qPCR 和 Western blot 结果显示, CEL 在结直肠癌细胞系中的水平明显高于正常结肠上皮细胞

Figure 3 Results of determinations of CEL expression in colorectal cancer tissues and cells A: qPCR results showing that the expression of CEL in colorectal cancer is significantly higher than that in normal tissues; B: The results of immunohistochemistry showing that the level of CEL in colorectal cancer tissue is higher than that in normal tissue, and the level in metastatic cancer is higher than that in non-metastatic cancer; C: Results of qPCR and Western blot showing that the level of CEL in colorectal cancer cell lines is significantly higher than that in normal colonic epithelial cells

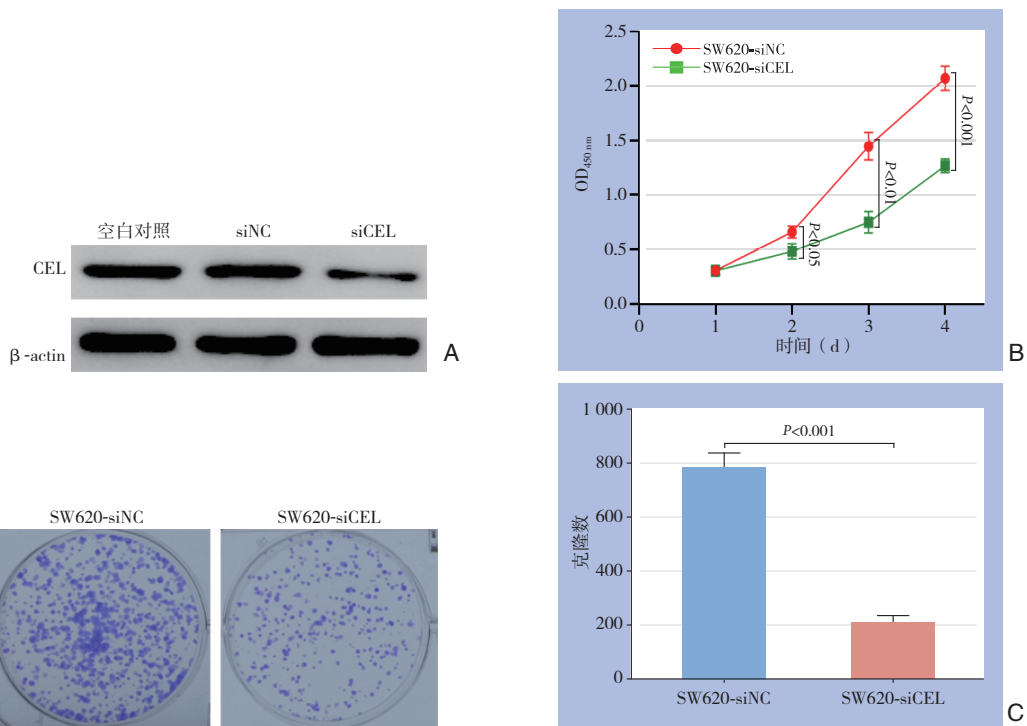


图 4 CEL 对结直肠癌细胞生长和增殖的作用 A: Western blot 显示, SW620 中 CEL 的表达被显著敲低; B: CCK-8 显示, 敲低 CEL 表达, SW620 的生长被明显抑制; C: 克隆形成显示, 敲低 CEL 表达, SW620 的增殖被明显抑制

Figure 4 Effects of CEL on the growth and proliferation of colorectal cancer cells A: Western blot showing that the expression of CEL is significantly knocked down in SW620; B: CCK-8 assay showing that CEL knockdown significantly inhibits the growth of SW620 cells; C: Colony formation showing that CEL knockdown notably inhibits the proliferation of SW620 cells

2.4 敲低 CEL 表达对结直肠癌细胞迁移和侵袭的影响

免疫组化结果提示, CEL在转移的结直肠癌组织中表达更高,提示CEL与结直肠癌细胞的迁移和

侵袭相关。因此,进一步分析CEL表达水平改变对SW620细胞迁移和侵袭能力的影响。Transwell迁移和侵袭实验结果显示,敲低CEL表达后,SW620细胞的迁移和侵袭能力明显降低($P<0.001$) (图5A-B)。

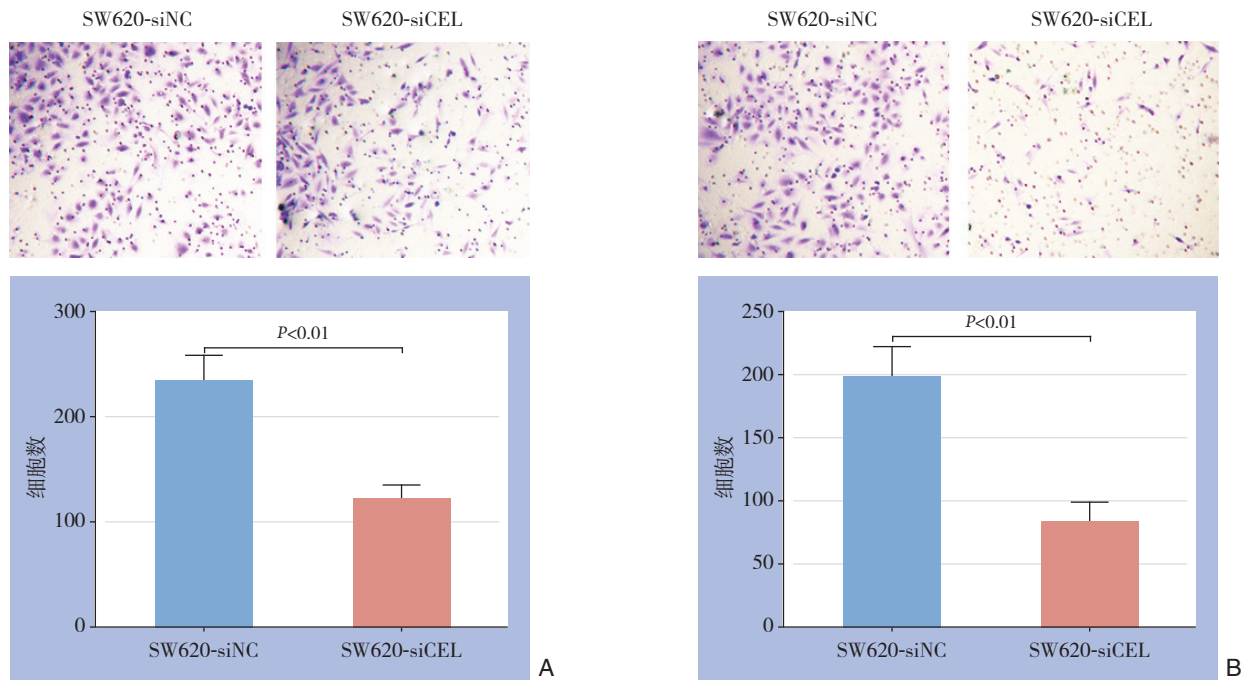


图5 CEL表达对结直肠癌细胞迁移和侵袭的作用 A: Transwell迁移实验显示,敲低CEL表达,SW620的迁移能力被明显抑制; B: Transwell侵袭实验显示,敲低CEL表达,SW620的侵袭能力被明显抑制

Figure 5 Effects of CEL on the migration and invasion of colorectal cancer cells A: Transwell migration experiment showing that CEL knockdown significantly inhibits the migration ability of SW620 cells; B: Transwell invasion experiment showing that CEL knockdown remarkably suppresses the invasion ability of SW620 cells

3 讨论

尽管早期筛查及靶向及免疫治疗等手段的应用,提高了结直肠癌的早期诊断率和治疗水平,但其发病率和病死率仍位居前列,表明结直肠癌的发病机理仍有待进一步揭示。筛选和鉴定结直肠癌发生发展的关键分子,不仅可以揭示和完善发病机理,还可以为临床诊断和治疗提供候选靶点^[23]。随着二代高通量测序技术的问世和生物信息学的发展,促进了包含各种组织、细胞及体液等多样本的高通量测序数据的公共数据库平台的飞速发展。尤其在肿瘤研究领域,基于TCGA, GEO及Oncomine等在线数据库数据分析和挖掘,成为肿瘤关键分子的筛选、鉴定和验证的重要工具。本研究基于TCGA及GTEX等数据库中的数据,利用GEPIA和UALCAN等在线分析工具筛选,发现CEL在结直肠癌中高表达,并在临床标本和细

胞系中进一步验证这一结论,提示CEL可能在结直肠癌的发生发展中发挥了重要作用。

众多研究证实, CEL基因单点突变(缺失或插入)、VNTR长度多态性、拷贝数变异(copy number variants, CNVs)等遗传变异与青少年发病的成人型糖尿病、I型和II型糖尿病、慢性胰腺炎、酒精性胰腺炎、胰腺外分泌综合征及动脉粥样硬化等疾病的发生密切相关^[8-10, 12, 14]。但是CEL在肿瘤中的表达和功能中的研究相对较少。Dalva等^[11]分别分析了包含非酒精性慢性胰腺炎和胰腺癌的德国家系和一个包含462例胰腺癌和882例正常样本的队列中, CEL的CNVs和VNTR多态性与肿瘤的关系,结果显示, CEL CNVs和VNTR多态性在肿瘤组和对照组中差异无统计学意义。Shindo等^[24]的研究结果也显示, CEL-HYB(CEL的杂合性等位基因)的携带率在胰腺导管腺癌组和对照组差异无统计学意义。另外最近的研究证实, CEL在

乳腺癌中高表达, CEL高表达患者的预后更差^[16]。目前, 还未见CEL遗传变异与结肠癌发生发展的报道, 从TCGA等数据库获取的信息显示, CEL突变及CNVs在结直肠癌中的总占比在1%左右, 且未发现与结直肠癌发生显著相关的热点。因此, 基因突变等遗传变异在CEL肿瘤向的功能中作用较小。

癌基因的异常活化和抑癌基因的失活是肿瘤发生和进展的驱动因素, 筛选和鉴定新的癌基因和抑癌基因是全面解析肿瘤发生机制的重要环节。EGFR、Ras、p53等肿瘤关键分子的发现, 极大地促进肿瘤基础和临床的进步, 但仍有众多问题等待解决, 鉴定和解析更多肿瘤发生发展相关的关键基因的功能意义重大^[25-27]。本研究经过在线数据库分析和本地样本验证, 首次证实CEL在结直肠癌中高表达, 提示CEL在结直肠癌中可能发挥了重要作用。DNA甲基化等表观遗传因素在基因表达调控中发挥了重要作用, 启动子区低甲基化和高甲基化分别是癌基因高表达和抑癌基因失活的常见机制^[28]。基于已有甲基化测序数据, 发现结直肠癌组织中CEL启动子区的甲基化转态显著低于正常黏膜组织, 提示启动子低甲基化是CEL在结直肠癌中高表达的重要机制。

持续的增殖信号、逃避生长抑制、抵抗细胞死亡、诱导血管生成、组织和浸润转移、无限复制、能量代谢异常、基因组不稳定和突变、免疫逃逸及促瘤炎症等是肿瘤的十大基本特征^[29]。从最终效应来看, 十大特征的结果是肿瘤的快速增殖和侵袭转移^[29-30]。因此, 本研究进一步分析了CEL表达水平对结直肠癌生长和侵袭能力的影响。敲低CEL表达后, 结直肠癌细胞的生长、增殖和侵袭能力显著降低, 表明CEL高表达能促进结直肠癌细胞的生长和侵袭, 但是其具体机制仍有待进一步揭示。从理论上分析, 结直肠癌中CEL高表达和分泌, 可促进肠道等微环境中脂类等物质的快速消化和吸收, 为肿瘤的快速生长和侵袭提供物质和能量。

综上所述, 本研究首次验证和揭示了CEL在结直肠癌中的表达和基本功能, 表明CEL可能是结直肠癌发生和发展中重要的正调控因子, 深入CEL在结直肠癌中作用、分子机制和临床意义有望为结直肠癌的诊断、治疗和预后判断提供新的靶标。

参考文献

[1] 冯道夫, 章志翔. 程序性细胞死亡蛋白配体1在结直肠癌免疫治

疗中的研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2020, 29(4):473-479. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2020.04.011.

Feng DF, Zhang ZX. Research progress of programmed death ligand 1 in immunotherapy of colorectal carcinoma[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2020, 29(4):473-479. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2020.04.011.

[2] Jin K, Ren C, Liu Y, et al. An update on colorectal cancer microenvironment, epigenetic and immunotherapy[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 89(Pt A):107041. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107041.

[3] 徐谊, 赵晓牧. 年轻人结直肠癌的诊疗进展[J]. 中国普通外科杂志, 2018, 27(4):500-505. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.04.016.

Xu Y, Zhao XM. Advance in diagnosis and treatment of young-onset colorectal cancer[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2018, 27(4):500-505. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.04.016.

[4] Patel SG, Ahnen DJ. Colorectal Cancer in the Young[J]. Curr Gastroenterol Rep, 2018, 20(4):15. doi: 10.1007/s11894-018-0618-9.

[5] Thanikachalam K, Khan G. Colorectal Cancer and Nutrition[J]. Nutrients, 2019, 11(1):164. doi: 10.3390/nu11010164.

[6] 刘鹏, 刘合利. 结直肠癌液体活检的临床应用进展[J]. 中国普通外科杂志, 2019, 28(9):1143-1149. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.09.017.

Liu P, Liu HL. Advances in clinical applications of liquid biopsies for colorectal cancer[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2019, 28(9):1143-1149. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.09.017.

[7] Oracz G, Kujko AA, Fjeld K, et al. The hybrid allele 1 of carboxyl-ester lipase (CEL-HYB1) in Polish pediatric patients with chronic pancreatitis[J]. Pancreatol, 2019, 19(4):531-534. doi: 10.1016/j.pan.2019.04.006.

[8] Khatua B, Trivedi RN, Noel P, et al. Carboxyl Ester Lipase May Not Mediate Lipotoxic Injury during Severe Acute Pancreatitis[J]. Am J Pathol, 2019, 189(6):1226-1240. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.02.015.

[9] Hegyi E. Carboxyl ester lipase (CEL) hybrid genes and chronic pancreatitis. The saga continues[J]. Pancreatol, 2019, 19(4):479-480. doi: 10.1016/j.pan.2019.05.463.

[10] 张荣, 刘丽梅. 羧基酯脂肪酶与糖尿病和胰腺外分泌疾病相关性的研究进展[J]. 上海交通大学学报:医学版, 2015, 35(4):585-588. doi:11.3969/j.issn.1674-8115.2015.04.024.

Zhang R, Liu LM. Advances of carboxyl ester lipase, diabetes, and pancreatic exocrine diseases[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University: Medical Science, 2015, 35(4):585-588. doi:11.3969/j.issn.1674-8115.2015.04.024.

[11] Dalva M, El Jellas K, Steine SJ, et al. Copy number variants and

- VNTR length polymorphisms of the carboxyl-ester lipase (CEL) gene as risk factors in pancreatic cancer[J]. *Pancreatol*, 2017, 17(1):83–88. doi: 10.1016/j.pan.2016.10.006.
- [12] Johansson BB, Fjeld K, El Jellas K, et al. The role of the carboxyl ester lipase (CEL) gene in pancreatic disease[J]. *Pancreatol*, 2018, 18(1):12–19. doi: 10.1016/j.pan.2017.12.001.
- [13] El Jellas K, Johansson BB, Fjeld K, et al. The mucinous domain of pancreatic carboxyl-ester lipase (CEL) contains core 1/core 2 O-glycans that can be modified by ABO blood group determinants[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(50):19476–19491. doi: 10.1074/jbc.RA118.001934.
- [14] Bjorlykke Y, Vethe H, Vaudel M, et al. Carboxyl-ester lipase maturity-onset diabetes of the young disease protein biomarkers in secretin-stimulated duodenal juice[J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(1):521–530. doi: 10.1021/pr500750z.
- [15] Reuss R, Aberle S, Klingel K, et al. The expression of the carboxyl ester lipase gene in pancreas and pancreatic adenocarcinomas[J]. *Int J Oncol*, 2006, 29(3):649–654.
- [16] Cui Y, Jiao Y, Wang K, et al. A new prognostic factor of breast cancer: High carboxyl ester lipase expression related to poor survival[J]. *Cancer Genet*, 2019, 239:54–61. doi: 10.1016/j.cancergen.2019.09.005.
- [17] Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, et al. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses[J]. *Neoplasia*, 2017, 19(8):649–658. doi: 10.1016/j.neo.2017.05.002.
- [18] Tang Z, Li C, Kang B, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1):W98–102. doi: 10.1093/nar/gkx247.
- [19] Xiao T, Zhu W, Huang W, et al. RACK1 promotes tumorigenicity of colon cancer by inducing cell autophagy[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(12):1148. doi: 10.1038/s41419-018-1113-9.
- [20] Yi H, Yi H, Zhu J, et al. A five-variable signature predicts radioresistance and prognosis in nasopharyngeal carcinoma patients receiving radical radiotherapy[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(3):2941–2949. doi: 10.1007/s13277-015-4139-y.
- [21] 李艳, 黄祥, 伊航, 等. Smad4和NF- κ Bp65蛋白在肝癌组织中的表达及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(7):934–938. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.07.019.
- Li Y, Huang X, Yi H, et al. Expressions of Smad4 and NF- κ Bp65 proteins in liver cancer tissue and their significance[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2018, 27(7):934–938. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.07.019.
- [22] Huang W, Liu J, Hu S, et al. miR-181a Upregulation Promotes Radioresistance of Nasopharyngeal Carcinoma by Targeting RKIP[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12:10873–10884. doi: 10.2147/OTT.S228800.
- [23] Ciardiello D, Vitiello PP, Cardone C, et al. Immunotherapy of colorectal cancer: Challenges for therapeutic efficacy[J]. *Cancer Treat Rev*, 2019, 76:22–32. doi: 10.1016/j.ctrv.2019.04.003.
- [24] Shindo K, Yu J, Suenaga M, et al. Lack of association between the pancreatitis risk allele CEL-HYB and pancreatic cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(31):50824–50831. doi: 10.18632/oncotarget.15137.
- [25] Chung J, Sallman DA, Padron E. TP53 and therapy-related myeloid neoplasms[J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2019, 32(1):98–103. doi: 10.1016/j.beha.2019.02.009.
- [26] Wang Z. ErbB Receptors and Cancer[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1652:3–35. doi: 10.1007/978-1-4939-7219-7_1.
- [27] Zhang X, Cheng Q, Yin H, Yang G. Regulation of autophagy and EMT by the interplay between p53 and RAS during cancer progression (Review)[J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(1):18–24. doi: 10.3892/ijo.2017.4025.
- [28] Koch A, Joosten SC, Feng Z, et al. Analysis of DNA methylation in cancer: location revisited[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(7):459–466. doi: 10.1038/s41571-018-0004-4.
- [29] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5):646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [30] Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, et al. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 491:39–45. doi: 10.1016/j.cca.2019.01.011.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 王磊, 刘洁, 黄伟. 羧基酯脂肪酶在结直肠癌中的表达及其生物学功能[J]. *中国普通外科杂志*, 2020, 29(10):1195–1203. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2020.10.006

Cite this article as: Wang L, Liu J, Huang W. Expression of carboxyl ester lipase in colorectal cancer and its biological function[J]. *Chin J Gen Surg*, 2020, 29(10):1195–1203. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2020.10.006