

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.14.013

· 临床研究 ·

生物钟基因 PER2 在结直肠癌中的表达及意义*

张鑫 周志杰 肖超 孙星 周崇治 王晓亮[△]

(上海交通大学附属第一人民医院普通外科 上海 200080)

摘要 目的:探讨 PER2 基因表达水平和结直肠癌发生发展的关系。**方法:**收集 203 例在上海市第一人民医院接受根治性肠切除术结直肠癌患者的标本,通过实时定量 PCR 和免疫组织化学技术检测 PER2 在肿瘤组织和邻近正常组织中的表达水平,并对 PER2 的表达与患者的病理资料和临床预后的相关性进行统计学分析。**结果:**PER2 在结直肠癌患者肿瘤组织的表达较正常组织减少 ($P<0.001$)。与 PER2 阳性患者相比,PER2 阴性的结直肠癌患者有远处转移($P=0.026$)、AJCC 分期为 IV 期($P=0.011$)的比例更高。**结论:**PER2 基因在结直肠癌患者中存在低表达现象,其对于患者的 AJCC 分期评价以及了解患者有无远处转移有一定的参考价值。

关键词:结直肠癌;生物钟基因;PER2

中图分类号:R735.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)14-2667-08

Expression and Significance of Clock Gene PER2 in Colorectal Cancer*

ZHANG Xin, ZHOU Zhi-jie, XIAO Chao, SUN Xing, ZHOU Chong-zhi, WANG Xiao-liang[△]

(Department of General Surgery, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of PER2 and its correlation with the development of colorectal cancer. **Methods:** A total of 203 cases of colorectal cancer patients who underwent radical enterectomy in Shanghai General Hospital were included. By real-time PCR and immunohistochemistry, PER2 expression in the tumor tissue and adjacent normal tissue were detected, and the correlation of PER2 expression with the pathological characteristics and clinical outcome were statistically analyzed. **Results:** PER2 expression in tumor was significantly lower than that of the normal tissue in colorectal cancer patients ($P<0.001$). As compared to PER2-positive tumors, a larger proportion of colorectal cancer patients with PER2-negative tumors had distant metastases ($P=0.026$) and were AJCC stage IV ($P=0.011$). **Conclusion:** PER2 gene expression decrease in colorectal cancer patients, and PER2 may be helpful for AJCC staging of the patients and assessing whether they have tumor metastasis or not.

Key words: Colorectal cancer; Clock gene; PER2

Chinese Library Classification(CLC): R735.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)14-2667-08

前言

据统计,结直肠癌目前在美国因癌致死的恶性肿瘤中居第三位^[1]。由于人们生活方式和饮食习惯的改变,我国结直肠癌的发病率呈上升趋势^[2,3]。手术仍是目前结直肠癌的首选治疗方案,化疗和放疗作为辅助治疗。结直肠癌的发生涉及众多基因表达的变化,患者的总体预后并不乐观^[4]。针对结直肠癌患者的基因检测可能有助于制定治疗方案及预后判断。

生物钟基因 PER2 是 period 基因家族的一员。人类 PER2 基因位于 2 号染色体 2q37.3,有 51529 个碱基对。与其他生物钟基因一样,PER2 基因被转录翻译成 PER2 蛋白,并影响昼夜节律^[5]。昼夜节律几乎存在于所有物种的新陈代谢和生理过程中,并受生物钟基因调节,生物钟基因同时参与调节细胞的多

种功能,包括细胞增殖、分化和代谢等^[6]。因此,昼夜节律紊乱与多种病理生理改变有关,如恶性肿瘤、代谢性疾病和精神疾病等^[7,8]。已有研究证实昼夜节律紊乱与包括乳腺癌、前列腺癌、子宫内膜癌和结肠癌在内的多种癌症发生发展相关^[9]。本研究通过实时定量 PCR 和免疫组织化学技术检测了结直肠癌组织中 PER2 基因表达及其与结直肠癌发生发展的相关性,结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 病例资料

回顾性分析在上海市第一人民医院行根治性肠切除术 203 例结直肠癌患者的临床资料,入组患者术前均未行化疗或者放疗,均签署由上海市第一人民医院伦理委员会批准的知情

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81472241, 81670514)

作者简介:张鑫(1984-),硕士研究生,主要研究方向:外科学, E-mail: zhangxinmd@sjtu.edu.cn

△ 通讯作者:王晓亮(1975-),副主任医师,硕士研究生导师,主要研究方向:外科学, E-mail: xiaoliangwang1975@aliyun.com

(收稿日期:2018-12-08 接受日期:2018-12-30)

同意书。随访的实施严格遵照美国国家综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)的结肠癌指南。总生存(Overall survival, OS)和无病生存(Disease-free survival, DFS)分别定义为从初次手术到死亡的间隔和从初次手术到临床或影像学证实的复发或转移的间隔。最终有 86 例男性和 117 例女性患者接受手术,年龄中位数为 66 岁(范围 22-95 岁),平均随访时间为 61 个月(范围 9-89 个月)。

结肠癌患者的正常结肠组织和肿瘤组织标本采集于其接受手术时。肿瘤组织和肉眼观邻近正常组织被速冻在液氮中并保存于 -80℃。两位病理科专家分别对正常和肿瘤组织的 HE 染色切片进行鉴定。美国 AJCC 癌症分期手册第六版被用于肿瘤分期。

1.2 总 RNA 的提取与实时定量 PCR

使用 RNeasy Mini Kit (Qiagen, 德国), 分别提取 40 例结肠癌和 40 例直肠癌肿瘤组织和配对正常组织的总 RNA, 然后根据说明书步骤, 使用 SYBR Green RNA PCR kit (Fermentas, 深圳), 对 PER2 的 mRNA 水平进行实时定量 PCR 检测。PER2 基因引物序列(5'-3')如下, R: TACCTACTCCCGTGC GGCTGTT, F: AATGAGGCTGCCACCCTGAAGA; 内参基因(actin)引物序列(5'-3')如下, R: CAAGAAAGGGTGTAACGCAACTA, F: ACGTGGACATCCGCAAGAC。每个标本至少重复三次, C_t 取平均值。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分别比较每个肿瘤样本与其配对正常组织的平均 mRNA 水平。 ΔC_t =PER2 基因 C_t 值 - actin 基因 C_t 值, $\Delta\Delta C_t$ =癌组织 PER2 的 ΔC_t 值 - 正常组织 PER2 的 ΔC_t 值。

1.3 组织芯片构建与免疫组织化学技术

使用 2 mm 打孔针分别从福尔马林固定、石蜡包埋的肿瘤组织标本和正常标本中采集目标组织, 成功构建组织芯片(上海生物芯片有限公司, 上海)后, 分别筛选出肿瘤组织和正常黏膜组织最佳的 HE 染色切片。使用抗 PER2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, 美国)于 4℃ 孵育过夜, 然后使用 HRP 标记的羊抗鼠二抗聚合物(DakoCytomation, 丹麦)在室温下孵育 30 分钟。使用 Mayer 苏木素染色液对组织切片进行复染。未经抗 PER2 抗体孵育的正常黏膜组织作为阴性对照。

由两位对患者预后不知情的病理科专家分别评估以减少偏倚。PER2 染色强度评分为 0 分(阴性)、1 分(弱阳性)、2 分(强阳性)。通过判断阳性染色细胞的比例, 染色范围评分为 0 分(0%)、1 分(1-25%)、2 分(26-50%)、3 分(51-75%)、4 分(76-100%)。根据最后的染色评分(为强度和范围评分之和), 将标本分为阴性(0-1)分、弱阳性(2-4 分)、强阳性(5-6 分)。弱阳性和强阳性均被视为阳性。

1.4 统计学分析

应用 SPSS(19.0 版)统计软件分析。连续变量以均数±标准差表示, 应用配对样本 t 检验比较结肠癌患者正常组织和癌组织 PER2 总表达水平(ΔC_t)。分类变量以计数和比例表示, 差异性比较采用 Pearson χ^2 检验或 Fisher 确切概率检验。为比较原发肿瘤和正常邻近组织的 PER2 染色和表达水平, 分别采用 McNemar 检验和 Wilcoxon 符号秩检验。采用 Cox 回归分析法了解 PER2 表达和入组患者临床特征间的相关性。Kaplan-Meier 法分析按 PER2 表达分组的 OS 和 DFS 时间。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠癌肿瘤组织与邻近正常组织 PER2 表达的比较

使用实时定量 PCR 技术分别对 40 例结肠癌患者和 40 例直肠癌患者的正常组织和配对肿瘤组织进行检测, 了解其 PER2 基因的 mRNA 表达情况。结肠癌组织 PER2 的 C_t 均值差(ΔC_t)为 2.32 ± 1.32 , 正常组织 PER2 的 ΔC_t 为 1.00 ± 1.10 ($P<0.001$; 图 1), 基因表达变化比率($2^{-\Delta\Delta C_t}$)为 0.56 ± 0.52 (0.07-2.88)。该组中 55% 的患者其肿瘤组织 PER2 基因 mRNA 表达水平明显低于正常组织, 而 42.5% 的患者其 PER2 基因 mRNA 表达在肿瘤组织与正常组织间无显著性差异。直肠癌组织 PER2 的 ΔC_t 为 1.71 ± 2.19 , 正常组织 PER2 的 ΔC_t 为 0.21 ± 1.79 ($P<0.05$), $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 为 0.84 ± 1.09 (0.03-6.63), 肿瘤组织 PER2 基因 mRNA 表达水平明显低于正常组织的比例为 40%, PER2 基因 mRNA 表达在肿瘤组织与正常组织间无显著性差异的比例为 55%。

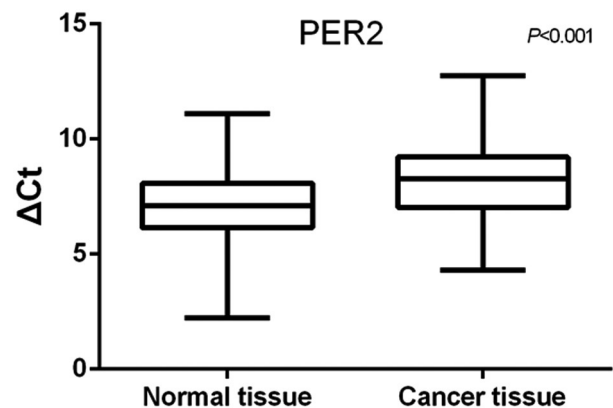


图 1 结肠癌组织及邻近正常结肠组织 PER2 mRNA 表达的比较
Fig.1 Comparison of PER2 mRNA expression(ΔC_t) in tumor and adjacent normal tissues by real-time PCR

Normal tissue; 正常组织; Cancer tissue; 肿瘤组织

PER2 蛋白在正常组织中免疫组织化学染色呈现阳性(图 2A)。在缺失抗 PER2 抗体的切片中, PER2 染色呈阴性。203 例结肠癌患者的癌组织(图 2B)和局部淋巴结转移标本(图 2D)中也可观察到 PER2 蛋白的阳性染色。后续研究中, 弱阳性和强阳性染色均被视为阳性染色。如表 1 所示, 正常和肿瘤组织的 PER2 表达分布有显著差异($P<0.001$), 与正常组织相比, 无论患者有无局部淋巴结转移, 更高比例的肿瘤组织 PER2 蛋白染色为阴性(8.4% vs. 0.5%, $P<0.001$)。无局部淋巴结转移和有转移的患者间相比, PER2 表达在肿瘤组织中有显著差异($P=0.045$), 而其在正常组织中无显著性差异($P=0.347$)(表 1)。

2.2 结肠癌 PER2 低表达与临床病理资料的相关性

在 203 名入组患者中, 17 名(其中 4 名男性, 13 名女性)罹患 PER2 阴性肿瘤。PER2 表达在年龄、性别、T 分期、N 分期、脉管浸润、肿瘤分化、复发和转移等方面无显著差异。然而, 在肿瘤位置、M 分期和 AJCC 分期等方面, PER2 表达存在显著差异。与 PER2 阳性患者相比, 更高比例的 PER2 阴性患者为 M1 分期, 即存在远处转移, 更高比例的 PER2 阴性患者 AJCC 分期为 IV 期。但是, 与 PER2 阳性患者相比, PER2 阴性患者的死亡率并未显著升高($P=0.673$, 表 2)。

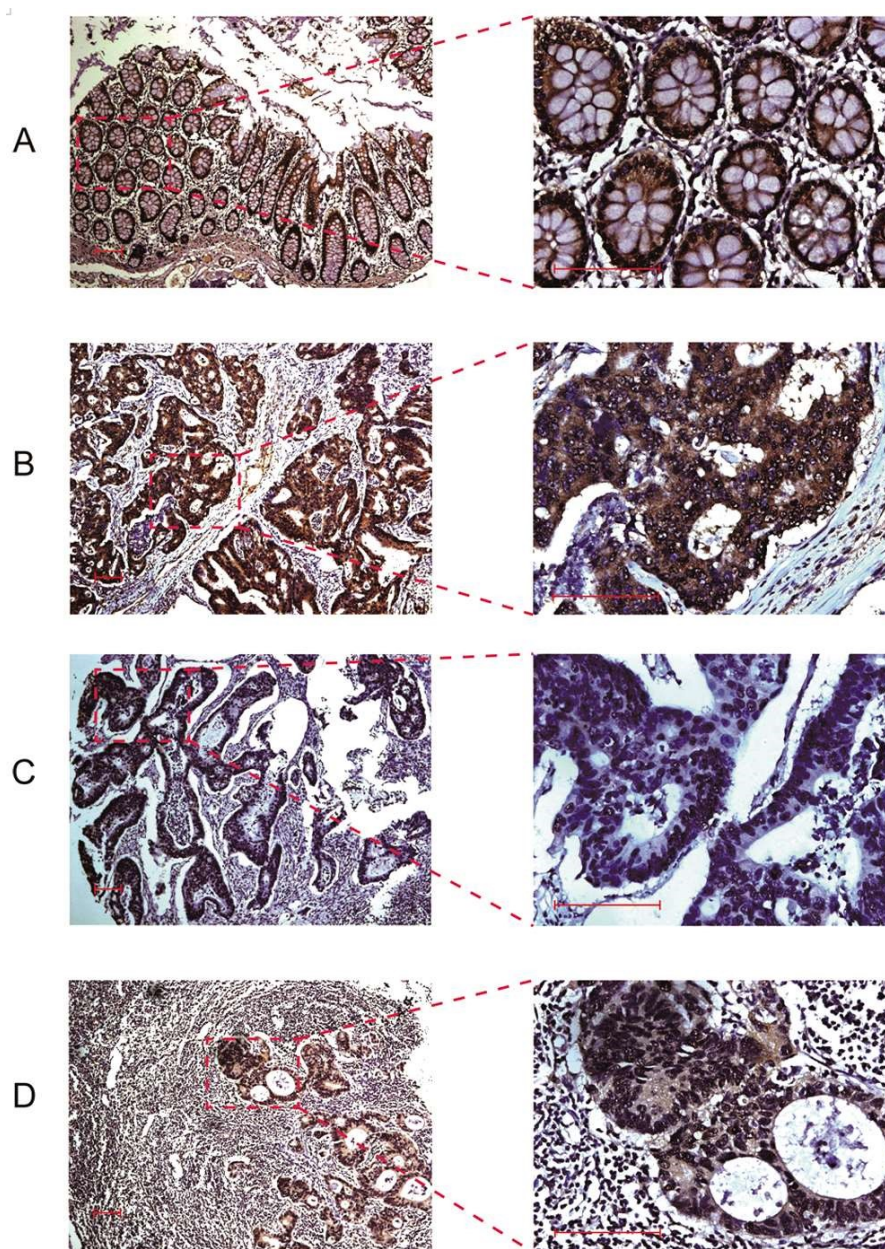


图 2 正常组织、肿瘤组织和淋巴结的 PER2 蛋白染色

Fig.2 PER2 protein staining in normal tissue, tumor tissue and lymph nodes

A: 正常组织呈阳性染色; B: 肿瘤组织呈阳性染色; C: 肿瘤组织呈阴性染色; D: 转移淋巴结呈阳性染色

A: positive staining in normal tissues; B: positive staining in tumor tissue; C: negative staining in tumor tissue; D: positive staining in metastatic lymph node

标尺 = 100 μm; 左图: SP× 100; 右图: SP× 400

表 1 PER2 在正常组织和肿瘤组织的表达

Table 1 Expression of PER2 in normal tissue and tumor tissue

Expression of PER2	Normal tissue	Tumor tissue	<i>P</i> ^a
All subjects			<0.001
No. of subjects	203	203	
Negative	1(0.5%)	17(8.4%)	
Positive	202(99.5%)	186(91.6%)	
Subjects without metastasis			<0.001
No. of subjects	108	108	
Negative	1(0.9%)	13(12.0%)	
Positive	107(99.1%)	95(88.0%)	

Subjects with metastasis			<0.001
No. of subjects	95	95	
Negative	0(0%)	4(4.2%)	
Positive	95(100%)	91(95.8%)	
<i>P</i> ^b	0.347	0.045	

Note: ^aComparison between normal tissue and tumor tissue; *P* values derived from the McNemar's test; ^bComparison between metastatic and nonmetastatic subjects in normal tissue and tumor tissue, respectively; *P* values derived from Pearson χ^2 test or Fisher's exact test.

表 2 结直肠癌组织 PER2 表达与患者临床病理特征的相关性

Table 2 Associations between PER2 expression and clinical characteristics of colon cancer patients

Variable	PER2 expression, n(%)		<i>P</i>
	Negative(n=17)	Positive(n=186)	
Age			0.911
<65y	7(41.2)	74(39.8)	
≥ 65y	10(58.8)	112(60.2)	
Gender			0.101
Male	4(23.5)	82(44.1)	
Female	13(76.5)	104(55.9)	
Tumor location			0.021*
Right colon	4(23.5)	80(43.0)	
Transverse colon	5(29.4)	14(7.5)	
Left colon	1(5.9)	19(10.2)	
Sigmoid colon	7(41.2)	73(39.2)	
T category			0.211
T1	0(0)	8(4.3)	
T2	3(17.6)	20(10.8)	
T3	3(17.6)	73(39.2)	
T4	11(64.7)	85(45.7)	
N category			0.121
N0	13(76.5)	95(51.1)	
N1	2(11.8)	59(31.7)	
N2	2(11.8)	32(17.2)	
M category			0.026*
M0	13(76.5)	172(92.5)	
M1	4(23.5)	14(7.5)	
Vessel invasion			0.241
No	17(100)	172(92.5)	
Yes	0(0)	14(7.5)	
Differentiation			0.206
Well	7(41.2)	92(49.5)	
Moderate	5(29.4)	69(37.1)	
Poor	5(29.4)	25(13.4)	
AJCC stage			0.011*
I	3(17.6)	21(11.3)	
II	9(52.9)	72(38.7)	
III	1(5.9)	79(42.5)	
IV	4(23.5)	14(7.5)	
Recurrence and metastasis			0.583
No	10(66.7)	107(59.4)	
Yes	5(33.3)	73(40.6)	
Patient survival			0.673
No	7(41.2)	67(36.0)	
Yes	10(58.8)	119(64.0)	

Note: *P* values derived from Pearson χ^2 test or Fisher's exact test.*Represented the difference was significant.

2.3 PER2 表达与结肠癌患者生存的相关性

应用 Kaplan-Meier 生存曲线分析 OS 和 DFS。PER2 阴性肿瘤患者的一年、三年、五年的总生存率分别为 88%、77%、71%，而 PER2 阳性肿瘤患者的一年、三年、五年的总生存率分

别为 98%、84%、67%。PER2 阳性患者和阴性患者的总生存时间均数(月)分别为 69.7 ± 2.0 、 63.9 ± 6.9 ，两者比较无显著性差异($P=0.053$)。PER2 阳性患者和阴性患者的无病生存时间均数(月)分别为 63.9 ± 2.4 、 65.9 ± 6.9 ，两者间亦无显著性差异($P=0.523$)。

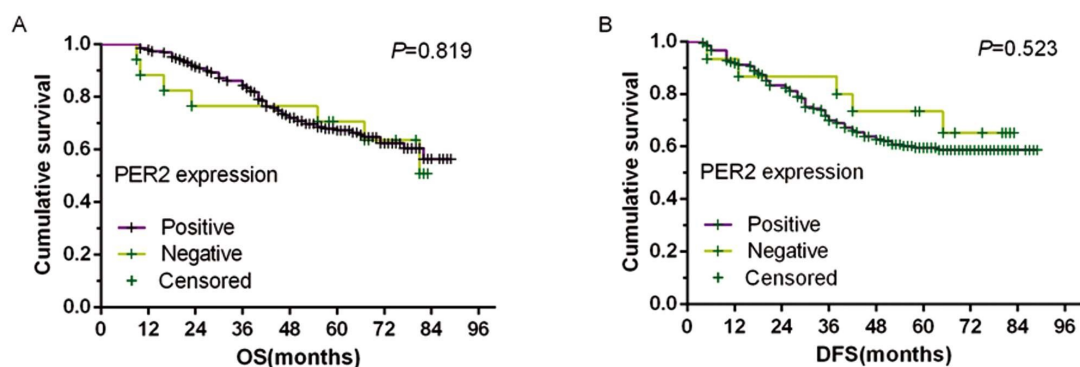


图 3 PER2 表达与结直肠癌患者生存时间的相关性

Fig. 3 Correlation between PER2 expression and survival time of colorectal cancer patients

A 为 OS, B 为 DFS; Cumulative survival: 累积生存率; Positive: 阳性; Negative: 阴性; Censored: 删失个案

Cox 回归模型揭示了影响患者生存时间的其他因素(表 3 和表 4)。单因素分析显示 OS 和 DFS 与 N 分期、M 分期、脉管浸润、肿瘤分化及 AJCC 分期等有显著相关性(均 $P<0.05$)，然而 PER2 表达与患者生存时间无显著相关性。多因素分析显示

OS 仅仅与肿瘤分化($P=0.002$)、AJCC 分期($P=0.006$)有显著相关性，而 DFS 与 N 分期($P<0.001$)、M 分期($P=0.002$)及肿瘤分化($P=0.019$)有显著相关性。

表 3 Cox 回归分析研究结直肠癌临床特征和 OS 的相关性

Table 3 Association between clinical characteristics of colorectal cancer and OS by Cox regression model analysis

Variable	OS			
	Univariate		Multivariate	
	HR(95%CI)	P	HR(95%CI)	P
PER2 expression				
Positive vs. negative	0.913(0.418-1.995)	0.820		
Age				
≥ 65y vs. <65y	0.963(0.606-1.533)	0.875		
Gender				
Male vs. female	0.745(0.463-1.197)	0.223		
Tumor location				
Transverse vs. right	0.799(0.331-1.929)	0.618		
Left vs. right	0.959(0.420-2.189)	0.920		
Sigmoid vs. right	1.064(0.643-1.761)	0.808		
T category				
T2 vs. T1	0.303(0.043-2.150)	0.232		
T3 vs. T1	0.949(0.220-4.090)	0.944		
T4 vs. T1	2.812(0.684-11.551)	0.152		
N category				
N1 vs. N0	4.021(2.177-7.427)	<0.001	1.631(0.361-7.372)	0.525
N2 vs. N0	14.070(7.537-26.266)	<0.001	3.748(0.844-16.643)	0.082
M category				
M1 vs. M0	14.741(8.148-26.668)	<0.001		
Vessel invasion				
Yes vs. no	4.677(2.545-8.595)	<0.001		

Differentiation				
Moderate vs. well	2.368(1.342-4.178)	0.003	1.747(0.970-3.148)	0.063
Poor vs. well	7.499(4.112-13.678)	<0.001	2.972(1.470-6.009)	0.002
AJCC stage				
II vs. I	2.076(0.468-9.205)	0.336	1.911(0.430-8.488)	0.395
III vs. I	9.512(2.292-39.469)	0.002	3.905(0.521-29.268)	0.185
IV vs. I	72.117(16.172-321.605)	<0.001	19.641(2.347-164.401)	0.006

Note: HR: hazard ratio; CI: confidence interval.

表 4 Cox 回归分析研究结直肠癌的临床特征和 DFS 的相关性

Table 4 Association between clinical characteristics of colorectal cancer and DFS by Cox regression model analysis

Variable	DFS			
	Univariate		Multivariate	
	HR(95%CI)	P	HR(95%CI)	P
PER2 expression				
Positive vs. negative	1.339(0.541-3.316)	0.527		
Age				
≥ 65y vs. <65y	0.982(0.624-1.546)	0.938		
Gender				
Male vs. female	0.881(0.561-1.383)	0.581		
Tumor location				
Transverse vs. right	0.826(0.334-1.984)	0.669		
Left vs. right	0.912(0.401-2.076)	0.826		
Sigmoid vs. right	1.176(0.722-1.915)	0.516		
T category				
T2 vs. T1	0.483(0.081-2.891)	0.425		
T3 vs. T1	1.258(0.297-5.337)	0.756		
T4 vs. T1	2.961(0.720-12.175)	0.132		
N category				
N1 vs. N0	2.725(1.569-4.732)	<0.001	2.492(1.426-4.354)	0.001
N2 vs. N0	10.224(5.781-18.085)	<0.001	6.699(3.588-12.510)	<0.001
M category				
M1 vs. M0	9.931(4.914-20.071)	<0.001	3.501(1.597-7.673)	0.002
Vessel invasion				
Yes vs. no	4.116(2.155-7.862)	<0.001		
Differentiation				
Moderate vs. well	2.264(1.345-3.785)	0.002	1.763(1.039-2.993)	0.036
Poor vs. well	4.867(2.641-8.970)	<0.001	2.322(1.148-4.698)	0.019
AJCC stage				
II vs. I	2.067(0.614-6.956)	0.241		
III vs. I	6.690(2.074-21.577)	0.001		
IV vs. I	37.180(9.947-138.971)	<0.001		

Note: HR: hazard ratio; CI: confidence interval.

3 讨论

昼夜节律普遍存在于人体的生理过程之中,控制着机体的各种生理功能,并在生长发育和癌症中起着重要的作用^[10,11]。已

有研究证实食欲、睡眠周期、食物吸收与代谢、个人行为、激素调节、微生物与肠道的交互作用以及上皮屏障功能等均受到昼夜节律的影响^[12]。位于下丘脑视交叉上核的哺乳动物主生物钟协调着日常行为和生理节律的同步,使生物体以预期的方式更

好地适应外部环境。该主生物钟接收各种各样的信号并受其影响,目前研究确认的信号主要是光和食物。然而,事实上,昼夜节律周期并非仅仅是前述两种信号作用的产物,而是由内源性生物钟产生的,生物钟机制几乎存在于所有类型的细胞和组织中^[13-15]。在细胞层级,每个细胞受其自己独立的生物钟节律控制;在组织层级,下丘脑视交叉上核的这些细胞昼夜节律生物钟形成了区域性的振荡器,彼此进一步相互结合,为组织产生单一指令的节律^[16]。生物钟由一组核心生物钟基因构成,包括 PER、CRY、CLOCK 和 BMAL1 等基因,组成了一个以近似 24 小时为周期进行震荡的转录-翻译反馈环^[17]。尽管位于视交叉上核的主生物钟主导着全身节律^[16],但外周组织也表达核心生物钟转录因子 CLOCK 和 BMAL1,它们负责调节包括 Period (PER) 和 Cryptochrome (CRY) 在内等生物钟基因的表达^[18]。BMAL1 和 CLOCK 形成复合物进而调控 PER1、PER2、PER3 以及 CRY1 和 CRY2 等基因的表达。PER 和 CRY 形成异质二聚体,经磷酸化后进入细胞核,并在细胞核内通过阻断 BMAL1/CLOCK 复合体的活性来抑制自身的转录,从而调节以近似 24 小时为周期的包括能量代谢在内的自身节律^[19,20]。PER2 基因是生物钟基因的重要组成部分,其蛋白产物主要表达于视交叉上核和边缘系统,包括杏仁核、纹状体核和海马,通过整合光信号和促肾上腺皮质激素释放因子应激相关神经递质进行节律性的表达,从而调节下丘脑-垂体-肾上腺轴的兴奋性和昼夜节律,最终导致靶器官产生昼夜节律性^[9]。关于 PER2 基因在肿瘤中的研究情况,有学者研究发现 PER2 表达缺失与口腔鳞状细胞癌的发生和发展密切相关,并认为 PER2 可能是提示口腔鳞状细胞癌预后的一个重要的生物标志物^[21]。PER2 突变解除了对肝癌相关基因及蛋白质表达的控制,主要表现为细胞增殖不受控制、基因组不稳定和肿瘤促炎作用以及肝癌发生倍加速等,并认为从肝癌发生到进展,生物钟基因 PER2 始终是肿瘤的抑制因子^[22]。

本研究结果显示 PER2 基因的转录产物 mRNA 和翻译产物 PER2 蛋白在结直肠癌患者肿瘤组织的表达均较正常组织减少,这与 Mazzocchi G^[23]等和 Wang Y^[24]等的研究结果一致。由此,我们推测作为生命的物质基础及生理活动的主要承担者,其可能参与了结直肠癌的发生及发展。此外,PER2 阴性的结直肠癌患者中,有远处转移、AJCC 分期为 IV 期的比例更高。有学者研究发现 PER2 mRNA 和蛋白质表达降低与更深的肿瘤侵袭程度、有淋巴结转移、更晚的 TNM 分期以及更高的 Ki67 阳性细胞比例显著相关^[24]。这与我们的研究结果基本一致,PER2 基因缺失或突变会可能促进肿瘤的形成和进展^[25]。有学者研究证实 PER2 在 K562 白血病细胞中过表达,导致 c-Myc 和 cyclin B1 基因表达下调,并抑制前述细胞增殖及进而诱导其凋亡^[26]。我们未来可以提供在结肠癌细胞过表达 PER2 基因,以进一步验证其在结肠癌细胞系中是否有类似的抑制结肠癌细胞增殖及促进结肠癌细胞凋亡的作用。还有研究表明 APC 基因突变的鼠中,PER2 基因的缺失与其结肠、小肠息肉形成增多有相关性^[27],而肠息肉可能为结直肠癌的癌前病变。因此,PER2 基因可能有潜在的抑癌作用。

关于 PER2 基因参与结直肠癌形成发展的具体机制,有动物实验研究显示 β -连环蛋白(β -catenin)诱导了 PER2 基因突

变及抑制了其表达^[28],而 PER2 基因突变使得肠壁组织 β -连环蛋白水平升高并能促进结肠息肉(癌前病变)形成^[29]。此外,还有研究显示生物钟基因通过调控肿瘤细胞的铁代谢来影响其增殖^[30]。本研究结果显示 PER2 的表达程度和结直肠癌患者的预后无明确相关性。Mazzocchi G^[23]等的研究于本研究相似,PER2 低表达的结直肠癌患者的生存率下降无统计学意义。然而,Oshima T^[31]等的研究发现 PER2 基因高表达的结直肠癌患者预后明显好于低表达的患者,推测结直肠癌患者往往存在多基因改变,其预后亦受多因素影响。有学者指出在评判基因(PER2 等)表达与疾病诊断及判断预后的相关性时,应充分考虑原发肿瘤的分期^[32]。本研究也存在一些不足,如 PER2 阴性病例组样本量偏小,有待将来更大样本量的研究加以验证,并进一步探讨 PER2 基因参与结直肠癌发生发展的具体机制。

综上所述,本研究表明 PER2 基因在结直肠癌患者低表达,PER2 基因对于结直肠癌患者的 AJCC 分期评价以及了解患者有无远处转移有一定的参考价值。

参考文献 (References)

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J].CA: a cancer journal for clinicians, 2016, 66(1): 7-30
- [2] 陈万青,李贺,孙可欣,等. 2014 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J].中华肿瘤杂志, 2018, 40(1): 5-13
- [3] Sung J J, Lau J Y, Goh K L, et al. Increasing incidence of colorectal cancer in Asia: implications for screening [J]. The Lancet Oncology, 2005, 6(11): 871-876
- [4] Guerra J, Pinto C, Pinto D, et al. POLE somatic mutations in advanced colorectal cancer[J]. Cancer medicine, 2017, 6(12): 2966-2971
- [5] Zhu L, Yu J, Zhang W, et al. Research progress on the central mechanism underlying regulation of visceral biological rhythm by per2 (Review)[J]. Molecular medicine reports, 2014, 10(5): 2241-2248
- [6] Das V, Kc R, Li X, et al. Pharmacological targeting of the mammalian clock reveals a novel analgesic for osteoarthritis-induced pain [J]. Gene, 2018, 655: 1-12
- [7] Jagannath A, Taylor L, Wakaf Z, et al. The genetics of circadian rhythms, sleep and health [J]. Human molecular genetics, 2017, 26 (R2): R128-R138
- [8] Haus E L, Smolensky M H. Shift work and cancer risk: potential mechanistic roles of circadian disruption, light at night, and sleep deprivation[J]. Sleep medicine reviews, 2013, 17(4): 273-284
- [9] Karantanos T, Theodoropoulos G, Pektasides D, et al. Clock genes: their role in colorectal cancer [J]. World journal of gastroenterology, 2014, 20(8): 1986-1992
- [10] McQueen C M, Schmitt E E, Sarkar T R, et al. PER2 regulation of mammary gland development [J]. Development (Cambridge, England), 2018, 145(6)
- [11] Vaughn A R, Clark A K, Sivamani R K, et al. Circadian rhythm in atopic dermatitis-Pathophysiology and implications for chronotherapy [J]. Pediatric dermatology, 2018, 35(1): 152-157
- [12] Davis B T 4th, Voigt R M, Shaikh M, et al. Circadian Mechanisms in Alcohol Use Disorder and Tissue Injury [J]. Alcoholism, clinical and experimental research, 2018, 42(4): 668-677
- [13] Liu F, Chang H C. Physiological links of circadian clock and biological clock of aging[J]. Protein & cell, 2017, 8(7): 477-488

- [14] Yamaguchi M, Uemura H, Arisawa K, et al. Association between brain-muscle-ARNT-like protein-2 (BMAL2) gene polymorphism and type 2 diabetes mellitus in obese Japanese individuals: A cross-sectional analysis of the Japan Multi-institutional Collaborative Cohort Study [J]. Diabetes research and clinical practice, 2015, 110 (3): 301-308
- [15] Crnko S, Cour M, Van Laake L W, et al. Vasculature on the clock: Circadian rhythm and vascular dysfunction[J]. Vascular pharmacology, 2018, 108: 1-7
- [16] Honma S. The mammalian circadian system: a hierarchical multi-oscillator structure for generating circadian rhythm [J]. The journal of physiological sciences: JPS, 2018, 68(3): 207-219
- [17] Caba M, Gonzalez-Mariscal G, Meza E. Circadian Rhythms and Clock Genes in Reproduction: Insights From Behavior and the Female Rabbit's Brain[J]. Frontiers in endocrinology, 2018, 9: 106
- [18] Ishii T, Warabi E, Mann G E. Circadian control of p75 neurotrophin receptor leads to alternate activation of Nrf2 and c-Rel to reset energy metabolism in astrocytes via brain-derived neurotrophic factor [J]. Free radical biology & medicine, 2018, 119: 34-44
- [19] Kalsbeek A, La Fleur S, Fliers E. Circadian control of glucose metabolism[J]. Molecular metabolism, 2014, 3(4): 372-383
- [20] Sundar I K, Yao H, Sellix M T, et al. Circadian molecular clock in lung pathophysiology[J]. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology, 2015, 309(10): L1056-1075
- [21] Xiong H, Yang Y, Yang K, et al. Loss of the clock gene PER2 is associated with cancer development and altered expression of important tumor-related genes in oral cancer [J]. International journal of oncology, 2018, 52(1): 279-287
- [22] Mteyrek A, Filipski E, Guettier C, et al. Clock gene Per2 as a controller of liver carcinogenesis [J]. Oncotarget, 2016, 7 (52): 85832-85847
- [23] Mazzocchi G, Panza A, Valvano M R, et al. Clock gene expression levels and relationship with clinical and pathological features in colorectal cancer patients[J]. Chronobiology international, 2011, 28(10): 841-851
- [24] Wang Y, Hua L, Lu C, et al. Expression of circadian clock gene human Period2 (hPer2) in human colorectal carcinoma[J]. World journal of surgical oncology, 2011, 9: 166
- [25] Sotak M, Polidarova L, Ergang P, et al. An association between clock genes and clock-controlled cell cycle genes in murine colorectal tumors[J]. International journal of cancer, 2013, 132(5): 1032-1041
- [26] Sun C M, Huang S F, Zeng J M, et al. Per2 inhibits k562 leukemia cell growth in vitro and in vivo through cell cycle arrest and apoptosis induction [J]. Pathology oncology research: POR, 2010, 16 (3): 403-411
- [27] Wood P A, Yang X, Taber A, et al. Period 2 mutation accelerates ApcMin/+ tumorigenesis [J]. Molecular cancer research: MCR, 2008, 6(11): 1786-1793
- [28] Yang X, Wood P A, Ansell C M, et al. Beta-catenin induces beta-TrCP-mediated PER2 degradation altering circadian clock gene expression in intestinal mucosa of ApcMin/+ mice [J]. Journal of biochemistry, 2009, 145(3): 289-297
- [29] Wood P A, Yang X, Hrushesky W J. Clock genes and cancer[J]. Integrative cancer therapies, 2009, 8(4): 303-308
- [30] Okazaki F, Matsunaga N, Okazaki H, et al. Circadian Clock in a Mouse Colon Tumor Regulates Intracellular Iron Levels to Promote Tumor Progression[J]. The Journal of biological chemistry, 2016, 291 (13): 7017-7028
- [31] Oshima T, Takenoshita S, Akaike M, et al. Expression of circadian genes correlates with liver metastasis and outcomes in colorectal cancer[J]. Oncology reports, 2011, 25(5): 1439-1446
- [32] Storcelova M, Vician M, Reis R, et al. Expression of cell cycle regulatory factors hus1, gadd45a, rb1, cdkn2a and mre11a correlates with expression of clock gene per2 in human colorectal carcinoma tissue [J]. Molecular biology reports, 2013, 40(11): 6351-6361

(上接第 2686 页)

- [27] Feng Y, Xiong Y, Qiao T, et al. Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy [J]. Cancer Med, 2018, 7(12): 6124-6136
- [28] Vernieri C, Casola S, Foiani M, et al. Targeting Cancer Metabolism: Dietary and Pharmacologic Interventions [J]. Cancer Discov, 2016, 6 (12): 1315-1333
- [29] Liu Q, Harvey CT, Geng H, et al. Malate dehydrogenase 2 confers docetaxel resistance via regulations of JNK signaling and oxidative metabolism[J]. Prostate, 2013, 73(10): 1028-1037
- [30] Abrego J, Gunda V, Vernucci E, et al. GOT1-mediated anaplerotic glutamine metabolism regulates chronic acidosis stress in pancreatic cancer cells[J]. Cancer Lett, 2017, 400: 37-46