

# 双肾上腺素样激酶 1 在结直肠恶性肿瘤发病中的研究进展

陶河清 综述 丁士刚\* 审校

(北京大学第三医院消化科, 北京 100191)

文献标识: A 文章编号: 1009-6604(2018)09-0846-03

doi: 10.3969/j.issn.1009-6604.2018.09.020

结直肠肿瘤作为常见的消化道恶性肿瘤,其早期发现和治疗可有效改善患者预后。内镜技术的发展使得多数结直肠肿瘤在早期即可得到诊断及治疗,然而受限于内镜预约时间长、患者体验差以及对术者资质的要求等,我国很多地区难以大规模开展内镜下结直肠肿瘤的筛查。肿瘤标志物尤其是肿瘤血清学标志物所具有的创伤小、便于开展大规模筛查的优势对于早期发现结直肠肿瘤有着重要意义。

双肾上腺素样激酶 1 (double cortin-like kinase 1, DCLK1) 最初被认为是微管相关蛋白基因家族成员,在神经系统的发育、神经细胞的迁移以及外向生长过程中起着重要作用<sup>[1]</sup>。DCLK1 编码的蛋白在细胞中存在 2 种形式: DCLK1-L 和 DCLK1-S。DCLK1-L 蛋白存在 2 个 N 端结构域和一个 C 端结构域, DCLK1-S 只有一个 C 端结构域。N 端结构域中氨基酸序列和 double cortin 有 70% 的同源性,后者被证实神经起源过程中起重要作用;而位于 C 端的酪氨酸/丝氨酸激酶区则与钙离子依赖的蛋白激酶 (calmodulin-dependent protein kinase 1, CaMK1) 高度相似<sup>[2]</sup>, 因此也有部分研究将 DCLK1 称为 DCAMKL-1。

然而近年来越来越多的研究者开始关注 DCLK1 在结直肠肿瘤起源中的意义,最初的研究显示 DCLK1<sup>+</sup> 细胞多能性基因、促存活基因的表达明显较多,且表现出较强的自我更新能力<sup>[3]</sup>, 悬浮培养基培养单个肠道 DCLK1 阳性成熟细胞诱导其形成球状体,将后者注射入裸鼠体内形成结节,分析显示结节内 DCLK1 阳性细胞可表达原有组织早期分

化标志,并可分化为原有组织的不同细胞<sup>[4]</sup>; 这些实验提示肠组织中 DCLK1 阳性细胞具有干细胞或祖细胞的潜能。然而 DCLK1 作为肿瘤干细胞标志和结直肠恶性肿瘤发病之间的关系是十分复杂的。本文主要对 DCLK1 在结直肠恶性肿瘤发生发展中的作用进行综述。

## 1 DCLK1 在结直肠癌细胞中的生物学作用

DCLK1 和结直肠肿瘤的关系最初是作为肠隐窝丛细胞的特异性分化抗原而被人熟知的。生理状态下丛细胞寿命较长并且处于静止状态,即使 APC 基因突变也不会导致这些静止期细胞向肿瘤细胞发展,但在突变基础上的炎症刺激或组织损伤即可激活丛细胞并促发结肠癌<sup>[4]</sup>, 这表明 DCLK1<sup>+</sup> 的丛细胞对于结肠癌的发生具有重要意义。Nakanishi 等<sup>[5]</sup> 研究显示, DCLK1 的表达可促进 *Apc*<sup>Min/+</sup> 小鼠体内腺瘤增生,使用他莫昔芬和白喉毒素毒杀 DCLK1<sup>+</sup> 细胞抑制肿瘤增长的同时不影响正常肠组织,提示 DCLK1 可能是肿瘤干细胞而非正常干细胞的标志。DCLK1<sup>+</sup> 细胞在健康人结肠组织中很少被检测到,而其在结肠癌患者的健康结肠黏膜或处于早期病变的黏膜中却呈现出高表达状态,表明肿瘤起源的早期阶段即可存在 DCLK1 的高表达<sup>[6]</sup>。miRNA-137 可以在 mRNA 水平与 DCLK1 结合抑制后者表达,使用表达抗 miRNA-137 的慢病毒与人原始结肠细胞共培养,实验组 DCLK1 的表达水平明显升高且类器官体积显著增大<sup>[7]</sup>。DCLK1<sup>+</sup> 的 *Apc* 突变小鼠体内  $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin)、Notch 和 NF $\kappa$ B

\* 通讯作者, E-mail: dingshigang222@163.com

促存活信号表达相比于 DCLK1<sup>-</sup> 小鼠明显较高,抑制 Notch 和 RELA 可以降低结肠癌细胞增殖速率,敲除 DCLK1 则可引起 Notch、RELA 和 MAPK 下降,更有效地抑制癌细胞增殖和迁移<sup>[8]</sup>。协同使用姜黄素和可以靶向于 DCLK1 引起 DCLK1<sup>+</sup> 细胞凋亡的 DCLK1-siRNA 治疗对前者耐药的结肠肿瘤时,其肿瘤体积缩小优于任何单一成分<sup>[9]</sup>。这些研究证实 DCLK1 在结肠肿瘤发生和促存活过程中发挥着重要的上游调控作用,靶向作用于上游的 DCLK1 可以在整个细胞存活通路上抑制肿瘤细胞的生物学行为,这为结肠癌的治疗提供思路。

DCLK1 启动子在人类结直肠癌中多呈现为高度甲基化的状态,而在正常黏膜组织中则不表现为甲基化,甲基化状态和 DCLK1 的表达负相关<sup>[10]</sup>,这与先前在人类结肠癌中观察到 DCLK1 高表达的结果不符<sup>[11]</sup>。进一步研究显示在人类结肠癌细胞中 DCLK1 基因的 5' (α) 启动子被沉默而通过 NF-κB 结合位点启动了第 5 内含子启动子 [intron 5 (β)-promoter] 并促进其所编码的 DCLK1-S 型表达,进一步分析显示正常的结肠细胞主要表达 L 型,而人类结肠癌细胞则主要表达 S 型<sup>[12]</sup>。相比于表达 S 型人类结肠癌细胞,L 型侵袭能力更弱<sup>[13]</sup>,人胃癌中的研究也支持上述结果,正常组织和肠化生区域中均可见到 S 型和 L 型,而晚期胃癌中 L 型消失<sup>[14]</sup>,这意味着可能 DCLK1-S 型才是结肠癌发生和发展中起着决定作用的成分。FOXD3 转录因子可抑制多种肿瘤的发生,多数肿瘤组织中 FOXD3 基因为沉默状态,其沉默导致 EGFR-Ras-Raf-MEK-ERK 信号通路的激活<sup>[15]</sup>。正常结肠黏膜中 FOXD3 和第 5 内含子启动子结合并抑制后者表达,而在结肠癌组织中 FOXD3 的沉默使其失去对 DCLK1-S 的抑制,敲除正常结肠组织中 FOXD3 也会导致 DCLK1 高表达,但表达水平较低不足以导致肿瘤发生<sup>[16]</sup>。这些研究提示 DCLK1 促结肠癌发生的机制并不是线性的,可能是一个网络结构。

## 2 局部肿瘤组织与外周血中 DCLK1 的表达

DCLK1 在结直肠癌组织中表达升高,并且其升高与肿瘤较差的病理分级及临床分期相关。Mirzaei 等<sup>[17]</sup>选择 58 例结直肠癌以 β 肌动蛋白作为内参,2<sup>-ΔCt</sup>法配合实时定量 PCR 对 DCLK1 进行相对定量测定,显示癌组织 DCLK1 mRNA 表达水平约是交界区组织的 3.28 倍 ( $P < 0.001$ ),肿瘤分化越差,其表达水平越高 ( $P = 0.022$ ),Ⅲ、Ⅳ期患者比 I、Ⅱ期患

者也同样升高 ( $P = 0.015$ )。ELISA 方法检测 DCLK1 蛋白并通过组织化学评分 (histochemistry score, H-score) 来区分 DCLK1 的高表达和低表达,结果显示 83.3% 的低分化肿瘤、53.8% 的中分化肿瘤、37.5% 的高分化肿瘤表现为 DCLK1 蛋白高表达 ( $P = 0.023$ ),72.3% 的Ⅲ、Ⅳ期肿瘤组织和 27.3% 的 I、Ⅱ期肿瘤组织中 DCLK1 蛋白也明显高表达 ( $P = 0.014$ )。

结直肠癌组织中高表达的 DCLK1 预示着不良预后。Gao 等<sup>[18]</sup>对 101 个新鲜结直肠癌标本的研究证实,利用染色指数来区分 DCLK1 蛋白在组织中的表达程度显示合并淋巴结转移的患者其组织内 DCLK1 蛋白高表达者明显高于无转移者 ( $P = 0.000$ ),提示 DCLK1 在肿瘤淋巴结转移中可能发挥着重要作用。推测其原因可能是 DCLK1 的高表达抑制 E 粘连素表达的同时促进间充质标志物 ZEB1 的表达,进而激活上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT),促进肿瘤突破基底膜组织,局部浸润侵入脉管系统,在脉管系统内游走播散,转移至新病灶。利用小样本生存率估计 (Kaplan-Meier 分析) DCLK1 水平和总存活数 (overall survival, OS) 之间关系,结果显示 DCLK1 高表达患者 5 年生存率低于低表达者 ( $P = 0.016$ ),多变量 COX 回归分析提示 DCLK1 水平是结直肠癌患者的独立预后影响因素<sup>[18]</sup>。除了病理证实的结直肠癌中 DCLK1 表达增加之外,乐安君等<sup>[19]</sup>的研究显示在癌前病变结直肠管状绒毛状腺瘤组织中 DCLK1 高表达率也高达 45.7%,但目前尚无研究证实癌前组织内高表达的 DCLK1 和预后的关系。

结直肠癌患者外周血单核细胞内可以检测到 DCLK1 蛋白。由于其含量相对较高,因此相比于邻位连接技术 (proximity ligation assay) 和免疫 PCR (immune-PCR) 两种敏感度较高的检测手段,ELISA 方法检测血浆 DCLK1 蛋白的可操作性更强<sup>[20]</sup>。

Mirzaei 等<sup>[20]</sup>利用 ELISA 方法检测,结果显示实验组外周血单核细胞内的 DCLK1 蛋白含量为对照组的 1.74 倍 ( $P = 0.001$ )。绘制受试者工作曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC 曲线) 描述血浆中 DCLK1 水平对于结直肠癌的诊断价值,显示曲线下面积 (area under the curve, AUC) 为 0.766 (95% CI: 0.680 ~ 0.852,  $P < 0.001$ )。以 227 pg/ml 为阈值 (cut-off value) 时,其对结直肠癌的预测特异度和敏感度均达到 72.4%,进一步分析显示血浆 DCLK1 高水平预示肿瘤分期增加和淋巴结侵袭

( $P=0.02, P=0.01$ )。王敏等<sup>[21]</sup>涉及 78 例的研究也同样证实了这一点。将血浆中 DCLK1 表达水平作为诊断指标,其 AUC 为 0.771(95%  $CI$ :0.688 ~ 0.841,  $P<0.001$ )。将阈值定为 1.723 ng/ml 时,敏感度和特异度分别为 67.95%、97.92%;而同一实验条件下,以 CEA 作为诊断指标的 AUC 为 0.679(95%  $CI$ :0.590 ~ 0.759,  $P=0.0002$ )。值得一提的是,该研究继续证实了 CEA 的水平和结肠癌的病理分期并无明显相关性( $P>0.05$ ),而高水平的 DCLK1 则与较差的病理分期相关( $P=0.003$ )。而二者联合检测显示 AUC 为 0.823(95%  $CI$ :0.745 ~ 0.886,  $P<0.0001$ ),且敏感度和特异度达到 75.64% 和 95.74%。

3 小结

DCLK1 作为结直肠肿瘤相关标志物,在肿瘤发生、发展和远处转移过程中起着重要作用,其在组织中的表达水平也很大程度上影响着肿瘤的预后分析。当前有部分研究证实结直肠肿瘤患者血浆中 DCLK1 水平升高,且其作为肿瘤血清学标志物的预测价值在小样本的人群内得到验证,但尚需要进一步更大样本的随机对照研究论证其能否得到大规模的推广。

参考文献

1 Fu X, Brown KJ, Yap CC, et al. Doublecortin (Dex) family proteins regulate filamentous actin structure in developing neurons. J Neurosci, 2013, 33(2): 709 – 721.

2 Patel O, Dai W, Mentzel M, et al. Biochemical and structural insights into doublecortin-like kinase domain 1. Structure, 2016, 24(9): 1550 – 1561.

3 Chandrakesan P, May R, Qu D, et al. Dclk1 + small intestinal epithelial tuft cells display the hallmarks of quiescence and self-renewal. Oncotarget, 2015, 6(31): 30876 – 30886.

4 Westphalen CB, Asfaha S, Hayakawa Y, et al. Long-lived intestinal tuft cells serve as colon cancer-initiating cells. J Clin Invest, 2014, 124(3): 1283 – 1295.

5 Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, et al. Dclk1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. Nat Genet, 2013, 45(1): 98 – 103.

6 Hirata Y, Sezaki T, Hagiwara T, et al. Su2004 enhanced expression of doublecortin-like kinase 1 (DCLK1) in the background mucosa of colon cancer. Gastroenterology, 2015, 148(4 Suppl 1): S – 572.

7 Sakaguchi M, Hisamori S, Oshima N, et al. miR-137 regulates the

tumorigenicity of colon cancer stem cells through the inhibition of DCLK1. Mol Cancer Res, 2016, 14(4): 354 – 362.

8 Chandrakesan P, Yao J, Qu D, et al. Dclk1, a tumor stem cell marker, regulates pro-survival signaling and self-renewal of intestinal tumor cells. Mol Cancer, 2017, 16(1): 30.

9 Kantara C, O'Connell M, Sarkar S, et al. Curcumin promotes autophagic survival of a subset of colon cancer stem cells, which are ablated by DCLK1-siRNA. Cancer Res, 2014, 74(9): 2487 – 2498.

10 Vedeld HM, Skotheim RI, Lothe RA, et al. The recently suggested intestinal cancer stem cell marker DCLK1 is an epigenetic biomarker for colorectal cancer. Epigenetics, 2014, 9(3): 346 – 350.

11 Gagliardi G, Goswami M, Passera R, et al. DCLK1 immunoreactivity in colorectal neoplasia. Clin Exp Gastroenterol, 2012, 5: 35 – 42.

12 O'Connell MR, Sarkar S, Luthra GK, et al. Epigenetic changes and alternate promoter usage by human colon cancers for expressing DCLK1-isoforms: Clinical Implications. Sci Rep, 2015, 5: 14983.

13 O'Connell MR SS, Ward D, et al. Short (S) isoform of cancer-stem-cell marker, DCLK1, is critically required for maintaining proliferative/tumorigenic potential of human colon cancer cells (hCCCs) independent of DCLK1-L isoform. Gastroenterology, 2016, 150: S605.

14 Hyekyung E, Hwang SY, Lee K, et al. Altered expression and localization of DCLK1 isoforms in gastric carcinogenesis. Gastroenterology, 2015, 148(4): S – 565.

15 Li K, Guo Q, Yang J, et al. FOXD3 is a tumor suppressor of colon cancer by inhibiting EGFR-Ras-Raf-MEK-ERK signal pathway. Oncotarget, 2017, 8(3): 5048 – 5056.

16 Sarkar S, O'Connell MR, Okugawa Y, et al. FOXD3 regulates CSC marker, DCLK1-S, and invasive potential: prognostic implications in colon cancer. Mol Cancer Res, 2017, 15(12): 1678 – 1691.

17 Mirzaei A, Tavosoidana G, Rad AA, et al. A new insight into cancer stem cell markers: Could local and circulating cancer stem cell markers correlate in colorectal cancer? Tumour Biol, 2016, 37(2): 2405 – 2414.

18 Gao T, Wang M, Xu L, et al. DCLK1 is up-regulated and associated with metastasis and prognosis in colorectal cancer. J Cancer Res Clin Oncol, 2016, 142(10): 2131 – 2140.

19 乐安君, 朱海杭, 俞文秀, 等. DCLK1 在结直肠癌、结直肠腺瘤中的表达及临床研究. 中国医师杂志, 2016, 18(3): 406 – 409.

20 Mirzaei A, Madjd Z, Kadijani AA, et al. Evaluation of circulating cellular DCLK1 protein, as the most promising colorectal cancer stem cell marker, using immunoassay based methods. Cancer Biomark, 2016, 17(3): 301 – 311.

21 王敏, 徐伶玲, 蒋玉良, 等. 结直肠癌患者血浆中 DCLK1 的表达及意义. 肿瘤, 2015, 35(5): 572 – 578.

(收稿日期: 2018 – 03 – 24)

(修回日期: 2018 – 06 – 13)

(责任编辑: 王惠群)