

# 结合 Trx 与 TXNIP 蛋白表达水平评估影响结直肠癌患者预后的影响因素\*

杨婕琳<sup>1</sup> 彭昭<sup>1</sup> 王晓媛<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的:**探讨硫氧还蛋白(Trx)与硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)蛋白表达水平对结直肠癌(CRC)患者预后的影响,并结合其他因素对患者预后进行评估。**方法:**选择于2018年6月—2020年2月进行手术治疗的158例CRC患者作为研究对象。收集患者的常规检查资料并在术后对切除的肿瘤样本组织的Trx和TXNIP表达水平进行检测,术后进行为期1年的随访。比较2种蛋白表达水平不同的患者的临床资料并分析其1年内的生存情况。比较影响患者预后的临床特征,将有差异的因素纳入Cox多因素回归分析,并将独立危险因素构建CRC患者预后风险预测模型,使用验证集数据对预测模型效能进行评价。**结果:**纳入研究的158例CRC患者88例预后良好,70例预后不良。Trx高表达组与低表达组、TXNIP高表达组与低表达组在临床特征比较上差异均无统计学意义,Trx高表达组患者生存率明显低于低表达组,TXNIP高表达组患者生存率明显高于低表达组。预后良好组与预后不良组患者在TNM分期、T分期、是否存在淋巴结转移、肿瘤分化程度、Trx和TXNIP表达水平的比较上差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。多因素回归分析结果显示患者处于T3~T4分期、出现淋巴结转移、肿瘤高度分化、Trx表达水平升高及TXNIP表达水平降低是CRC患者预后不良的危险因素( $P < 0.05$ )。将上述因素构建用于评估患者预后的Nomogram模型经过一致性系数和校准曲线检验,表明预测值与实际观测值较为一致。**结论:**Trx表达水平上调和TXNIP表达水平下调与CRC患者预后不良有关,影响患者术后生存率,T分期、淋巴结转移和肿瘤分化程度也与患者预后有密切关系。

**[关键词]** 结直肠癌;硫氧还蛋白;硫氧还蛋白相互作用蛋白;预后

**DOI:**10.3969/j.issn.1671-038X.2021.10.05

**[中图分类号]** R735.3 **[文献标志码]** A

## Combining TRX and TXNIP protein expression levels to assess the factors affecting the prognosis of patients with colorectal cancer

YANG Jielin PENG Zhao WANG Xiaoyuan

(Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, 075000, China)

Corresponding author: YANG Jielin, E-mail: yjl71112@163.com

**Abstract Objective:** To explore the effect of thioredoxin(Trx) and (thioredoxin interacting protein, TXNIP) expression levels on the prognosis of patients with colorectal cancer, and to evaluate the prognosis of patients in combination with other factors. **Methods:** One hundred and fifty-eight patients with colorectal cancer who underwent surgical treatment in our hospital from June 2018 to February 2020 were selected as the research objects. The routine examination data of the patients were collected and the Trx and TXNIP protein expression levels of the resected tumor samples were detected after the operation, and a 1-year follow-up was carried out after the operation. Compare the clinical data of two patients with different protein expression levels and analyze their survival within 1 years. Compare the clinical characteristics that affect the prognosis of patients, incorporate the different factors into the Cox multivariate regression analysis, and construct the prognostic risk prediction model for colorectal cancer patients with independent risk factors, and use the validation set data to evaluate the effectiveness of the prediction model. **Results:** Among the 158 patients with colorectal cancer included in the study, 88 had a good prognosis and 70 had a poor prognosis. There was no significant difference in clinical characteristics between patients with high Trx expression group and low expression group, TXNIP high expression group and low expression group( $P > 0.05$ ). The survival rate of patients with high Trx expression was significantly lower than that of the low expression group. The survival rate of patients with TXNIP high expression group was significantly higher than that of the low expression group. There are significant differences in the comparison of TNM staging, T staging, lymph node metastasis, tumor differentiation, Trx and TXNIP expression levels between the good prog-

\*基金项目:2020张家口市级科技计划自筹经费项目(No:2021050D)

<sup>1</sup>河北北方学院附属第一医院消化内科(河北张家口,075000)

通信作者:杨婕琳,E-mail:yjl71112@163.com

nosis group and the poor prognosis group( $P < 0.05$ ). Lymph node metastasis, highly differentiated tumors, elevated Trx expression levels, and decreased TXNIP expression levels are risk factors for poor prognosis in patients with colorectal cancer( $P < 0.05$ ). The Nomogram model constructed by the above factors to evaluate the prognosis of patients was tested by the consistency coefficient and the calibration curve, which showed that the predicted value was more consistent with the actual observation value. **Conclusion:** The up-regulation of Trx expression level and the down-regulation of TXNIP expression level are related to the poor prognosis of patients with colorectal cancer and affect the survival rate of patients after surgery. T stage, lymph node metastasis and tumor differentiation are also closely related to the prognosis of patients.

**Key words** colorectal carcinoma; thioredoxin; thioredoxin interacting protein; prognosis

结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)是全球发病率排名第 3 的恶性肿瘤,全球年发病人数高达 193 万<sup>[1]</sup>。其发病机制与错配修复基因、抑癌基因等多个基因位点有关,同时受到遗传因素、饮食习惯及环境等多种因素共同影响<sup>[2]</sup>。随着治疗手段的进步和治疗药物的研发, CRC 的 5 年生存率逐渐提高,但其仍是导致患者死亡的重大疾病之一。目前的治疗手段以手术切除为主,可联合化疗、分子靶向治疗、免疫治疗等多种综合治疗手段提高患者生存率<sup>[3]</sup>,现有的治疗手段主要针对未出现转移的患者有良好疗效,对出现远端转移患者的生存情况没有太大改善。目前需要尽早对 CRC 患者进行筛查,尽早发现并采取相应治疗手段。多项研究表明氧化应激反应参与多种癌症的发展,其中硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)/硫氧还蛋白相互作用蛋白(thioredoxin interacting protein, TXNIP)系统是人体内主要的抗氧化系统,对于维持细胞氧化还原稳态、介导细胞生长有重要作用<sup>[4-5]</sup>。Trx 具有活性半胱氨酸基团,是细胞内调节氧化还原状态的蛋白酶,其主要功能是使细胞保持还原态<sup>[6]</sup>。相关研究显示在口腔鳞状细胞癌中检测到 Trx 表达水平上升,提示其可能与癌症的进展相关<sup>[7]</sup>。TXNIP 能调控机体的氧化还原反应,根据已有研究报道 TXNIP 与肿瘤的发生、发展有密切联系<sup>[8]</sup>。目前关于 CRC 与氧化应激相关的研究报道较少,本研究旨在分析 CRC 患者样本组织中 Trx 和 TXNIP 表达水平变化,与其他临床特征的关系及其对患者预后的影响。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择 2018 年 6 月—2020 年 2 月于我院行手术治疗的 CRC 患者 158 例作为研究对象,其中男 84 例,女 74 例;年龄 42~69 岁。本研究通过我院伦理委员会审批(No:K2020197),患者及家属均知悉研究并签署知情同意书。

纳入标准:①经病理检查结果确诊为 CRC;② TNM 分期为 II、III 期,肿瘤无远端转移征象;③患者依从性较高,配合随访。

排除标准:①合并其他恶性肿瘤患者;②合并

严重心、肝、肾等功能障碍;③不适合进行手术治疗患者。

### 1.2 资料收集

所有患者入院后行常规检查,术前均行 CT 或 MRI 检查,收集患者的诊断资料,包括肿瘤位置、肿瘤大小、临床分期、肿瘤分化程度、淋巴结转移等。

### 1.3 蛋白表达水平检测

将患者术后取出的组织样本研磨后,放入 EP 管中,提取组织的总蛋白,并测定蛋白总量,以  $\beta$ -actin 作为内参蛋白,采用 Western blot 免疫印迹法检测 Trx 和 TXNIP 蛋白的表达水平,实验操作严格按照试剂盒说明书进行。通过 Image J 软件对检测条带进行定量分析,通过待测蛋白与内参蛋白光密度的比值得到待测蛋白的相对表达量。

分别选取所有患者 Trx 和 TXNIP 表达量的中位数作为临界值,高于该值为高表达,低于该值则为低表达。

### 1.4 随访

自患者手术结束后,以门诊检查、住院复查、电话、微信等方式进行为期 1 年的随访,随访时间为术后 3、6、9、12 个月,随访内容为患者体征、CT 检查结果、生存状况。以患者的死亡或者 1 年随访期结束为随访终点,记录患者术后至随访终点的生存时间,若患者死亡,则记录死亡时间和死亡原因。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 23.0 和 Rstudio 软件对数据进行统计学处理,计数资料以例(%)形式表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,计量资料符合正态分布的以  $\bar{x} \pm s$  形式表示,组间比较采用独立样本  $t$  检验。采用 Kaplan-Meier 法对 Trx 和 TXNIP 不同表达水平的患者进行生存分析,1 年生存率采用 Log-rank 检验。影响患者预后的因素采用 Cox 多因素回归分析,采用 R 软件和程序包,基于多因素分析结果将影响患者预后的独立影响因素构建 Nomogram 模型预测 CRC 患者预后情况,采用 Bootstrap 法,重复抽样 50 次,绘制模型的校准曲线,计算一致性系数(C-index)来检验模型的准确度。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 诊断及治疗情况

158 例 CRC 患者肿瘤位置的分布情况为右半结肠 51 例、左半结肠 74 例、直肠 33 例。94 例患者肿瘤直径 < 5 cm, 64 例患者肿瘤直径 ≥ 5 cm; TNM 分期为 II 期 66 例, III 期 92 例; T 分期为 T1~T2 期 33 例, T3~T4 期 125 例; 93 例患者出现淋巴结转移, 65 例患者无淋巴结转移; 130 例患

者为低、中分化, 28 例患者为高分化。

患者根据 Trx 表达水平分组和 TXNIP 表达水平分组, Trx 高表达组患者与低表达组在年龄、性别、BMI、肿瘤直径、TNM 分期、T 分期、淋巴结转移、分化程度等方面, 差异无统计学意义, TXNIP 高表达组患者与低表达组在上述临床特征比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 Trx 和 TXNIP 不同表达水平患者临床资料比较

临床资料	Trx		$\chi^2$	P	TXNIP		$\chi^2$	P
	高表达 (n=80)	低表达 (n=78)			高表达 (n=73)	低表达 (n=85)		
年龄/岁			0.894	0.345			0.173	0.678
<55	27	32			26	33		
≥55	53	46			47	52		
性别			1.268	0.260			0.490	0.484
男	39	45			41	43		
女	41	33			32	42		
BMI			1.862	0.172			0.118	0.731
<18.5	17	24			18	23		
≥18.5	63	54			55	62		
肿瘤直径/cm			0.267	0.605			0.260	0.610
<5	46	48			45	49		
≥5	34	30			28	36		
TNM 分期			3.056	0.080			0.658	0.417
II 期	28	38			33	33		
III 期	52	40			40	52		
T 分期			0.448	0.504			1.168	0.280
T1~T2	15	18			18	15		
T3~T4	65	60			55	70		
淋巴结转移			1.600	0.206			0.000	0.992
无	29	36			30	35		
有	51	42			43	50		
分化程度			1.384	0.239			0.001	0.979
低、中分化	63	67			60	70		
高分化	17	11			13	15		

2.2 Trx 和 TXNIP 不同表达水平患者的生存分析

分别以 Trx 和 TXNIP 的表达量高低对患者进行分组, 根据患者随访结果进行生存分析, 结果见图 1 和图 2, 经 Log-rank 检验, Trx 高表达患者与低表达患者 1 年的总生存率分别为 28% (22/80)、85% (66/78), TXNIP 高表达患者与低表达患者 1 年的总生存率分别为 79% (58/73)、14% (12/85), 组间比较差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 52.212, 67.936, P < 0.05$ )。

2.3 影响 CRC 患者预后的临床特征比较分析

根据随访结果将患者分为预后良好组和预后

不良组, 比较 2 组患者的临床资料, 结果显示 TNM 分期、T 分期、淋巴结转移、癌分化程度在 2 组患者间存在差异, 预后不良组患者 Trx 表达水平高于预后良好组, TXNIP 表达水平低于预后良好组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

2.4 影响 CRC 患者预后的 Cox 多因素回归分析

将影响患者预后的临床因素有差异的纳入多因素 Cox 回归分析, 结果见图 3, 分析显示 T 分期为 3~4 期、存在淋巴结转移、高分化、Trx 高表达水平为患者预后不良的独立危险因素, TXNIP 高表达水平为保护性因素 ( $P < 0.05$ )。

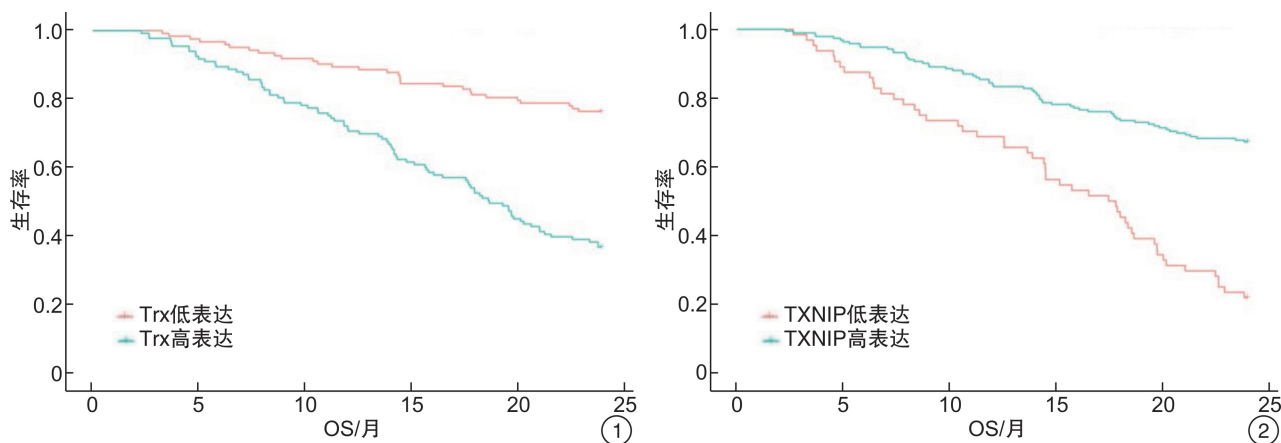


图 1 不同 Trx 表达水平的 CRC 患者生存时间曲线；图 2 不同 TXNIP 表达水平的 CRC 患者生存时间曲线

表 2 影响 CRC 患者预后的临床特征比较分析

例(%),  $\bar{x} \pm s$

临床特征	预后良好组 (n=88)	预后不良组 (n=70)	t/ $\chi^2$	P
年龄/岁	49.35±6.12	50.42±5.95	1.105	0.271
性别			1.476	0.224
男	43(48.86)	41(58.57)		
女	45(51.14)	29(41.43)		
BMI	22.18±2.06	21.54±3.89	1.328	0.186
肿瘤直径/cm	4.67±3.98	5.63±5.52	1.269	0.206
TNM 分期			7.161	0.007
II 期	45(51.14)	21(30.00)		
III 期	43(48.86)	49(70.00)		
T 分期			9.014	0.003
T1~T2	26(29.55)	7(10.00)		
T3~T4	62(70.45)	63(90.00)		
淋巴结转移			12.349	0.000
无	47(53.41)	18(25.71)		
有	41(46.59)	52(74.29)		
分化程度			7.651	0.006
低、中分化	79(89.77)	51(72.86)		
高分化	9(10.23)	19(27.14)		
Trx	0.57±0.08	1.12±0.09	40.608	0.000
TXNIP	1.06±0.13	0.29±0.06	45.805	0.000

2.5 构建 CRC 预后预测模型

以 T 分期、淋巴结是否转移、肿瘤分化程度、Trx 表达水平、TXNIP 表达水平构建 CRC 患者预后风险预测 Nomogram 模型,结果见图 4, T 分期为 3~4 期、患者出现淋巴结转移、肿瘤为高分化, Trx 表达水平升高以及 TXNIP 表达水平降低会提高 CRC 患者预后不良的风险。

2.6 预测模型效能评价

使用 Bootstrap 法对预测模型进行内部验证, CRC 预后风险 Nomogram 预测模型的 C-index 为 0.85。采用检验对验证集数据进行校准度评价,通

过 Nomogram 预测模型预测的结果与实际随访的结果较为一致,校准曲线见图 5。

3 讨论

CRC 发病率居全球癌症发病率第 3 位,在我国的发病率和死亡率也出现上升趋势<sup>[9-10]</sup>。患者可能出现直肠出血、贫血、腹痛等症状,因缺乏特异性症状,大多数患者没有引起重视,进行相应检查,等到出现严重症状时,疾病进展多为晚期。近年来,随着内镜技术的进步和靶向药物的深入研究, CRC 在诊断和治疗方面取得了巨大进展,5 年生存率为 40%~45%<sup>[11]</sup>。活性氧簇(reactive oxygen



species, ROS) 在人体内过量积累,引起氧化应激反应的发生,对机体造成氧化损伤<sup>[12]</sup>。人体内存在多种抗氧化系统来维持机体的氧化还原平衡,清除 ROS。本研究主要选取 TNM 分期为 II、III 期的 CRC 患者分析其预后与氧化应激反应的关系,以期寻找安全、可靠的指标对预后情况进行评估。

症反应等生理功能密切相关<sup>[14]</sup>。根据已有研究表明,在肝癌、肺癌、胰腺癌、宫颈癌、胃癌等组织中均发现 Trx 表达水平上升<sup>[15-17]</sup>。Trx 的过表达与 ROS 的产生,抑制细胞凋亡,促进肿瘤细胞增殖,肿瘤的侵袭转移等相关<sup>[18]</sup>。已有研究报道,CRC 组织中 Trx 高表达水平与患者术后生存率低有关,会促进肿瘤细胞发生远端转移<sup>[19]</sup>。

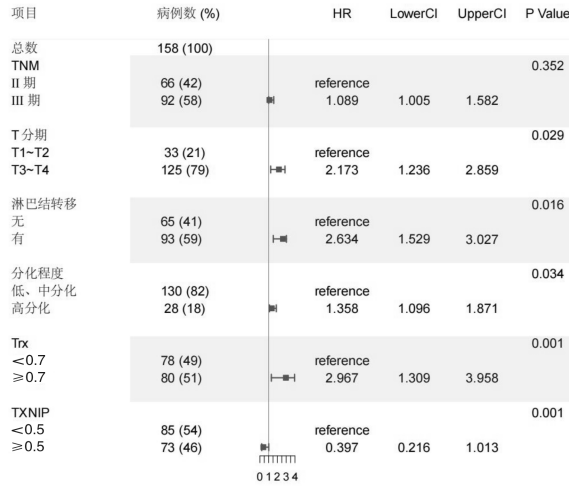


图 3 Cox 多因素回归分析影响及直肠癌患者预后森林图

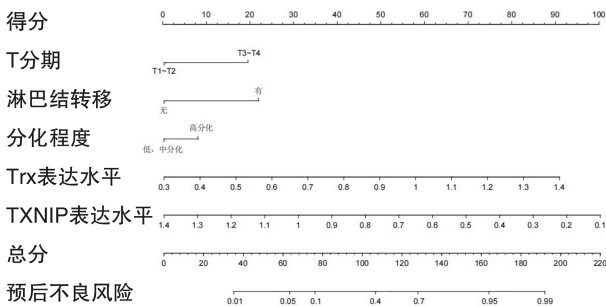


图 4 CRC 预后风险预测 Nomogram 模型

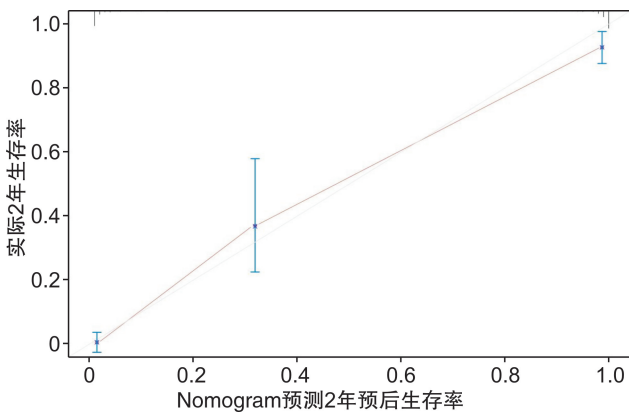


图 5 预测模型校准曲线

Trx 是一种小分子蛋白,主要分布在细胞质中,激活细胞的氧化还原状态<sup>[13]</sup>,研究表明 Trx 的表达上调与促进癌细胞的生长、调节细胞凋亡与炎

TXNIP 是 Trx 的内源性抑制因子,可以与 Trx 的半胱氨酸基团结合,抑制其清除 ROS,阻止细胞增殖,并增加细胞对氧化应激的易感性<sup>[20]</sup>。TXNIP 在多种肿瘤组织中表达水平降低,被认为是潜在的抑癌因子<sup>[21]</sup>。一项研究表明,在甲状腺乳头状癌患者的肿瘤组中 TXNIP 蛋白表达水平低于癌旁组织,提示其低表达可能与甲状腺乳头状癌的发生与发展有关<sup>[22]</sup>。

本研究对纳入研究的患者根据 Trx 和 TXNIP 的表达水平分别进行分组,比较 2 种分组的患者临床特征,2 种分组在患者组间比较,差异无统计学意义,可以对其进行预后生存分析比较。生存曲线分析结果显示,Trx 高表达组患者生存率明显低于低表达组, TXNIP 高表达组患者生存率明显高于低表达组,提示 Trx 和 TXNIP 在肿瘤组织中的表达水平有助于医生对患者预后情况进行预测。本研究结果与已有报道相符,Trx 可能作为抑制 CRC 转移的潜在靶向位点, TXNIP 可能作为预测患者预后情况的抑癌基因。

本研究比较预后良好组和预后不良组患者的临床资料,分析结果显示 TNM 分期、T 分期、是否存在淋巴结转移、肿瘤分化程度、Trx 表达水平和 TXNIP 表达水平在 2 组患者间存在差异,将其纳入多因素回归分析,结果显示 T3~T4 期、存在淋巴结转移、肿瘤高度分化、Trx 相对表达量 > 0.7 为 CRC 患者预后不良的独立危险因素, TXNIP 相对表达量 > 0.5 为保护性因素。TNM 分期在多因素回归分析中并未表现出显著差异,分析其原因可能是本研究选择分期仅为 II、III 期的患者,处于该分期的患者影响其预后情况的可能是不同分期内的细节性临床特征,在以往研究中显示 TNM 分期为影响预后的独立因素,可能是未将影响分期判别的特征分别进行比较。将上述独立影响因素构建 CRC 预后风险预测的 Nomogram 模型,并对其进行效能评价, C-index 和校准曲线结果显示本次构建的 Nomogram 模型对 CRC 患者预后预测结果与实际观测结果一致性较高。

综上所述,Trx 高表达和 TXNIP 低表达是影响 CRC 患者预后的危险因素,可通过检测 Trx 和 TXNIP 的表达,并结合 T 分期、淋巴结转移和肿瘤分化程度对患者预后情况进行预测。

## 参考文献

- [1] Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, et al. Colorectal cancer[J]. *Lancet*, 2019, 394(10207):1467-1480.
- [2] Thanikachalam K, Khan G. Colorectal Cancer and Nutrition[J]. *Nutrients*, 2019, 11(1):164.
- [3] Katona BW, Weiss JM. Chemoprevention of Colorectal Cancer[J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(2):368-388.
- [4] Wen C, Wang H, Wu X, et al. ROS-mediated inactivation of the PI3K/AKT pathway is involved in the anti-gastric cancer effects of thioredoxin reductase-1 inhibitor chaetocin[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(11):809.
- [5] Dunnill CJ, Ibraheem K, Mohamed A, et al. A redox state-dictated signalling pathway deciphers the malignant cell specificity of CD40-mediated apoptosis[J]. *Oncogene*, 2017, 36(18):2515-2528.
- [6] Branco V, Pimentel J, Brito MA, et al. Thioredoxin, Glutathione and Related Molecules in Tumors of the Nervous System[J]. *Curr Med Chem*, 2020, 27(12):1878-1900.
- [7] Qi M, Li L, Lu Y, et al. Proteome profiling to identify peroxiredoxin 1 interacting protein partners in nicotine-associated oral leukoplakia[J]. *Arch Oral Biol*, 2019, 108(12):104537.
- [8] 肖聪, 张懿敏, 孙圣荣. 硫氧还蛋白互作蛋白在乳腺癌中的研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2019, 48(11):5-7, 168.
- [9] Mauri G, Sartore-Bianchi A, Russo AG, et al. Early-onset colorectal cancer in young individuals[J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(2):109-131.
- [10] 李田园. 原发肿瘤部位及 MSI 状态与结直肠癌患者临床病理特征、生存预后的相关性分析[D]. 郑州: 郑州大学, 2018.
- [11] Wong SH, Yu J. Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(11):690-704.
- [12] Zhang Y, Park J, Han SJ, et al. Redox regulation of tumor suppressor PTEN in cell signaling[J]. *Redox Biol*, 2020, 34(5):101553.
- [13] Xu LL, Gao W, Chen ZM, et al. Relationships between diabetic nephropathy and insulin resistance, inflammation, Trx, Txnip, CysC and serum complement levels[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(22):11700-11706.
- [14] Jia JJ, Geng WS, Wang ZQ, et al. The role of thioredoxin system in cancer: strategy for cancer therapy[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2019, 84(3):453-470.
- [15] Mohammadi F, Soltani A, Ghahremanloo A, et al. The thioredoxin system and cancer therapy: a review[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2019, 84(5):925-935.
- [16] Gong D, Li Y, Wang Y, et al. AMPK  $\alpha$ 1 Downregulates ROS Levels Through Regulating Trx Leading to Dysfunction of Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13(1):5967-5977.
- [17] Wang W, Fang D, Zhang H, et al. Sodium Butyrate Selectively Kills Cancer Cells and Inhibits Migration in Colorectal Cancer by Targeting Thioredoxin-1[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13(47):4691-4704.
- [18] Jaganjac M, Milkovic L, Sunjic SB, et al. The NRF2, Thioredoxin, and Glutathione System in Tumorigenesis and Anticancer Therapies[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(11):1151.
- [19] Lin F, Zhang P, Zuo Z, et al. Thioredoxin-1 promotes colorectal cancer invasion and metastasis through crosstalk with S100P[J]. *Cancer Lett*, 2017, 401(36):1-10.
- [20] Alhawiti NM, Al Mahri S, Aziz MA, et al. TXNIP in Metabolic Regulation: Physiological Role and Therapeutic Outlook[J]. *Curr Drug Targets*, 2017, 18(9):1095-1103.
- [21] 莫与琳, 杨亚军, 崔燎. TXNIP 介导的氧化应激在疾病中的作用机制[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(1):16-19.
- [22] 张莉, 朱蕾, 白洁. miR-135a-5p 和 TXNIP 在甲状腺乳头状癌组织中的表达及意义[J]. *中国医师杂志*, 2019, 21(8):1195-1198, 1204.

(收稿日期:2021-04-16)