



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.260188
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.260188
China Journal of General Surgery, 2026, 35(4):817-829.

· 基础研究 ·

CLSTN3在结直肠癌中的促癌作用及其与淀粉样前体蛋白的相互作用研究

裴谦¹, 胡文丽¹, 裴雷², 陶一明¹

(1. 中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008; 2. 中南大学湘雅二医院 普通外科, 湖南 长沙 410011)

摘要

背景与目的: CLSTN3是近年来新发现的结直肠癌(CRC)候选生物标志物,但其在CRC中的表达特征、临床意义及作用机制尚不明确。本研究探讨CLSTN3在CRC中的表达、预后价值及其与淀粉样前体蛋白(APP)的相互作用关系。

方法: 收集313例CRC石蜡组织及17例新鲜组织标本,采用免疫组织化学及Western blot检测CLSTN3和APP表达,并分析其与临床病理特征及预后的关系。构建CLSTN3过表达HCT8细胞和CLSTN3敲减HCT116细胞模型,通过CCK-8实验及裸鼠皮下成瘤实验评估CLSTN3对CRC细胞增殖能力的影响。利用GeneMANIA数据库预测CLSTN3相关互作分子,并采用免疫共沉淀验证CLSTN3与APP的相互作用。

结果: CLSTN3在CRC组织及细胞系中的表达均明显高于正常组织及正常结肠细胞(均 $P<0.05$)。免疫组化结果显示,CLSTN3在CRC组织中的阳性表达率明显高于癌旁组织(68.7% vs. 27.2%)。CLSTN3高表达与TNM分期、肿瘤坏死及神经管侵犯密切相关(均 $P<0.05$)。Kaplan-Meier生存分析显示,CLSTN3高表达患者的总体生存(OS)及无病生存(DFS)均明显降低(均 $P<0.001$)。多因素Cox分析表明,CLSTN3高表达是CRC患者OS及DFS的独立危险因素。体外及体内实验结果显示,CLSTN3过表达可显著促进CRC细胞增殖及移植瘤生长,而CLSTN3敲减则明显抑制肿瘤生长。生物信息学分析提示APP可能是CLSTN3的重要互作分子。免疫共沉淀证实CLSTN3与APP在CRC细胞中存在直接相互作用。Western blot结果显示,CRC组织中CLSTN3与APP表达呈正相关($r=0.604$, $P=0.012$),且二者在伴肿瘤坏死组织中的表达水平更高。

结论: CLSTN3在CRC中异常高表达,并通过促进肿瘤细胞生长参与CRC进展。CLSTN3高表达提示不良预后,其可能通过与APP相互作用发挥促癌效应。CLSTN3有望成为CRC新的预后标志物及潜在治疗靶点。

关键词

结直肠肿瘤; CLSTN3; 淀粉样前体蛋白; 预后

中图分类号: R735.3

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81372630); 湖南省自然科学基金资助项目(2023JJ40977, 2022JJ30776)。

收稿日期: 2026-04-01; **修订日期:** 2026-04-23。

作者简介: 裴谦,中南大学湘雅医院主治医师,主要从事普通外科肿瘤临床与基础方面的研究(胡文丽为共同第一作者)。

通信作者: 裴雷, Email: peilei@csu.edu.cn; 陶一明, Email: yimingtao@csu.edu.cn

Oncogenic role of CLSTN3 in colorectal cancer and its interaction with amyloid precursor protein

PEI Qian¹, HU Wenli¹, PEI Lei², TAO Yiming¹

(1. Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2. Department of General Surgery, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract

Background and Aims: CLSTN3 has recently been identified as a potential biomarker for colorectal cancer (CRC); however, its expression pattern, clinical significance, and underlying mechanisms in CRC remain unclear. This study aimed to investigate the biological role and prognostic value of CLSTN3 and its interaction with amyloid precursor protein (APP) in CRC.

Methods: A total of 313 paraffin-embedded CRC specimens and 17 fresh CRC tissue samples were collected. Immunohistochemistry and Western blot analyses were performed to evaluate the expression of CLSTN3 and APP and their associations with clinicopathological characteristics and prognosis. HCT8 cells with CLSTN3 overexpression and HCT116 cells with CLSTN3 knockdown were established. Cell proliferation was assessed using CCK-8 assays and nude mouse xenograft experiments. Potential interacting molecules of CLSTN3 were predicted using the GeneMANIA database, and the interaction between CLSTN3 and APP was validated by co-immunoprecipitation assays.

Results: CLSTN3 expression was significantly increased in CRC tissues and cell lines compared with normal controls (all $P < 0.05$). Immunohistochemistry demonstrated that the positive expression rate of CLSTN3 was markedly higher in CRC tissues than in adjacent tissues (68.7% vs. 27.2%). High CLSTN3 expression was significantly associated with TNM stage, tumor necrosis, and neurovascular invasion (all $P < 0.05$). Kaplan-Meier analysis showed that patients with high CLSTN3 expression had significantly worse overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) (both $P < 0.001$). Multivariate Cox regression analysis identified CLSTN3 overexpression as an independent prognostic factor for both OS and DFS in CRC patients. Functional experiments demonstrated that CLSTN3 overexpression significantly promoted CRC cell proliferation and tumor growth in vivo, whereas CLSTN3 knockdown inhibited tumor growth. Bioinformatics analysis suggested APP as a key interacting molecule of CLSTN3. Co-immunoprecipitation assays confirmed a direct interaction between CLSTN3 and APP in CRC cells. Western blot analysis further showed a positive correlation between CLSTN3 and APP expression in CRC tissues ($r = 0.604$, $P = 0.012$), and both proteins were more highly expressed in tumors with necrosis.

Conclusion: CLSTN3 is aberrantly upregulated in CRC and promotes tumor progression by enhancing cancer cell growth. High CLSTN3 expression predicts poor prognosis and may exert oncogenic effects through interaction with APP. CLSTN3 may serve as a novel prognostic biomarker and potential therapeutic target for CRC.

Key words

Colorectal Neoplasms; CLSTN3; Amyloid Precursor Protein; Prognosis

CLC number: R735.3

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是全球癌症相关死亡的第二大致死原因^[1]。尽管在筛查和治疗方面取得了进展, 但由于高转移和复发率以及

对治疗药物的耐药性, CRC 患者的总体生存 (overall survival, OS) 率仍然较低^[2], 凸显出迫切需要新的早期预警标志物和治疗靶点。

钙结合蛋白家族(calsynenins, CLSTN)是一类跨膜胞内转运蛋白,属于细胞黏附分子钙黏素(cadherin)超家族,包括三个成员:CLSTN1、CLSTN2和CLSTN3^[3]。研究发现CLSTN与多种人类疾病的关联,CLSTN1参与调控胃癌细胞迁移和侵袭转移^[4]。长链非编码的CLSTN2通过PI3K/Akt信号通路破坏氧化还原平衡,促进骨肉瘤进展^[5]。肿瘤血清蛋白组学筛查发现CLSTN3蛋白是CRC新的候选标志物和治疗靶点^[6]。迄今为止,CLSTN3在CRC中的作用和机制尚未被研究。

本研究旨在通过检测CLSTN3在CRC组织及细胞系中的表达水平;通过体外细胞实验和裸鼠体内成瘤实验评估CLSTN3对CRC细胞生长能力的影响;利用GeneMANIA数据库预测与CLSTN3相互作用的潜在分子,并通过免疫共沉淀及临床组织样本相关性分析进行验证。结果表明,CLSTN3是CRC的不良预后标志物,其表达上调可促进CRC细胞生长。此外,本研究证实淀粉样前体蛋白(APP)是CLSTN3的关键互作蛋白,为理解CLSTN3的促癌功能提供了新的分子依据。

1 材料与方法

1.1 临床样本

癌与癌旁配对CRC石蜡组织样本共313例,来源于2019—2020年间于中南大学湘雅医院普通外科行手术切除的CRC患者。男185例,女128例;右半结肠癌69例,左半结肠癌88例,直肠癌156例。临床随访主要通过门诊、实地和户籍系统查询等方式完成,随访截止日期为2025年12月31日,无失访病例。癌与癌旁配对CRC新鲜组织样本共17例,来源于2024—2025年于中南大学湘雅医院普通外科行手术切除的CRC患者,其中男13例,女4例;右半结肠癌2例,左半结肠癌3例,直肠癌12例。本课题研究内容已通过中南大学湘雅医院医学伦理委员会审批备案(批件编号:2022020062)。

1.2 免疫组化检测CLSTN3在CRC组织中的表达

石蜡切片置入60℃烤箱,烤片24h。用二甲苯脱蜡,一系列梯度酒精水化,然后EDTA抗原修复液微波炉进行抗原修复10min, PBS缓冲液洗涤。用3%过氧化氢抑制内源性过氧化物酶活性。切片在4℃下在封闭缓冲液中与一抗孵育过夜。

其中CLSTN3抗体(Proteinch公司,货号13302-1-AP)的工作浓度为1:500。免疫组化染色强度按文献^[7]计算H评分:H评分=1×%弱染色+2×%中度染色+3×%强染色,以H评分中位值98.63界定CLSTN3染色强度的高低表达。

1.3 细胞培养与质粒转染

正常人类结肠细胞NCM460和CRC细胞系(HCT8、LoVo、SW620、SW480和HCT116)购自中国科学院上海细胞所。细胞采用含10%胎牛血清和1%青链霉素双抗的1640培养基,置于37℃,5%CO₂的培养箱中进行培养。HCT8细胞转染分为两组:转染空载体的对照组(HCT8-CTRL组)和CLSTN3过表达载体组(HCT8-CLSTN3组)。HCT116细胞转染分为两组:转染空载体的对照组(HCT116-CTRL组)和CLSTN3小RNA干扰质粒组(HCT116-sh-CLSTN3组)。过表达质粒和小RNA干扰质粒由上海吉凯生物技术有限公司构建,转染效率通过荧光定量PCR和Western blot检测进行验证。

1.4 Western blot检测CLSTN3和APP蛋白表达

收集CRC组织和CRC细胞系,使用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的总蛋白抽提试剂盒(中国杭州Beyotime公司)裂解。使用BCA试剂盒(中国杭州Beyotime公司)测定蛋白浓度。50μg蛋白与上样缓冲液1:1等体积比例混合后变性。10%的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳。蛋白质通过湿转法转移到PVDF膜上。用封闭缓冲液稀释的目标蛋白一抗孵育过夜。CLSTN3抗体(Proteinch公司,货号13302-1-AP)的工作浓度为1:500。APP抗体(Proteinch公司,货号25524-1-AP)的工作浓度为1:500。β-actin抗体(abcam公司,货号ab8227)的工作浓度为1:500。

1.5 CCK-8法检测细胞生长

CCK-8试剂盒购自中国杭州Beyotime公司。对数生长期的HCT8和HCT116细胞经胰蛋白酶消化,计数后制成1~5×10⁴个细胞/mL的细胞悬液。分别取100μL至96孔培养板,每种细胞每块板接种3个同样的孔作为复孔,分别在0、24、48、72h后,按1:10体积比混合CCK-8和无血清必需基本培养基,每孔100μL加入待测孔中,在37℃,5%CO₂培养箱中孵育1h;用酶标仪测定450nm波长吸光度。记录每块板的数值。

1.6 BALB/c裸鼠皮下肿瘤形成实验

将4~6周龄的雄性BALB/c裸鼠分为：HCT8-CTRL组（ $n=5$ ）、HCT8-CLSTN3组（ $n=5$ ）、HCT116-CTRL组（ $n=5$ ）和HCT116-sh-CLSTN3组（ $n=5$ ）。将 2×10^6 个细胞混合含20% Matrigel（美国BD公司），随后皮下注射至每只小鼠的右侧腹股沟。每周测量肿瘤生长情况，并按公式（长度 $\times$ 宽度 $^2/2$ ）计算肿瘤体积。4周后对所有小鼠进行安乐死，并使用电子天平测定肿瘤质量。

1.7 免疫共沉淀验证CLSTN3和APP相互作用

HCT8或HCT116细胞转染质粒48 h后，收集细胞并加入裂解缓冲液[50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1% Nonidet P-40, 1 mmol/L EDTA, 8% 甘油, $1 \times$ 蛋白酶抑制剂混合物（MCE）及1 mmol/L DTT（Amresco公司）]。将裂解液于4℃以12 000 r/min离心20 min。收集含蛋白质上清液，加入APP抗体（工作浓度为1:500）或CLSTN3抗体（工作浓度为1:500）孵育1 h，再与Protein G/Protein A Sepharose 磁珠（Santa Cruz公司）在4℃下孵育18 h。将洗脱的蛋白置于 $1 \times$ SDS上样缓冲液中煮沸，经SDS-PAGE电泳分离，通过Western blot进行检测分析。实验重复进行3次。

1.8 生物信息学分析

利用GTEX（Genotype-Tissue Expression）数据库^[8]（www.gtexportal.org/home/index.html）分析CLSTN3 mRNA在正常结肠组织中表达水平。GEPIA数据库^[9]（<http://gepia.cancer-pku.cn>）分析CLSTN3 mRNA在CRC组织中表达水平。GeneMANIA数据库

（<http://genemania.org>）^[10]预测CLSTN3相互作用分子网络。

1.9 统计学处理

定量资料采用均值 $\pm$ 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，半定量计数资料组间比较采用Fisher精确概率法分析，Log-rank检验及Kaplan-Meier生存分析不同CLSTN3蛋白表达患者生存情况。单因素和多因素COX回归分析CRC患者预后影响因素，用GraphPad Prism Version 9.02软件分析制图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CLSTN3蛋白表达及其与CRC临床病理特征的关系

GTEX数据库分析发现，CLSTN3 mRNA在正常结肠组织中表达水平较低（图1A）；GEPIA数据库分析发现，CLSTN3 mRNA在结肠癌和直肠癌组织中表达水平高于正常结肠组织（图1B）。免疫组化方法检测313例石蜡组织样本CLSTN3的蛋白表达，在癌旁组织阳性表达率为27.2%（85/313），在癌组织阳性表达率为68.7%（215/313），CLSTN3染色主要定位细胞浆和细胞膜（图1C）。根据CLSTN3免疫组化评分中位值分为高表达组和低表达组，分析CLSTN3表达与临床病理特征的关系，结果显示，CLSTN3高表达与TNM分期、肿瘤坏死和神经脉管侵犯明显有关（ $P=0.001$ 、 $P<0.001$ 、 $P=0.028$ ）（表1）。

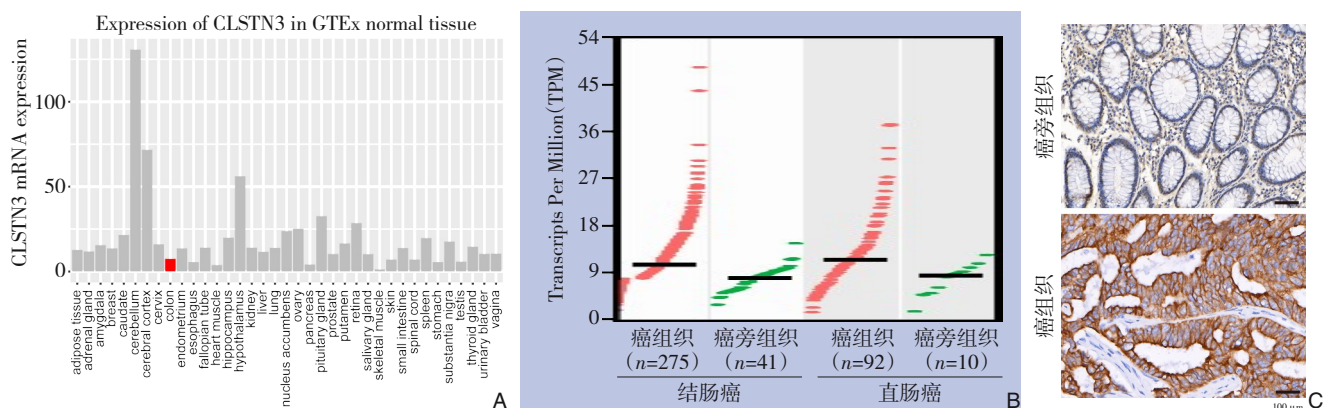


图1 癌与癌旁组织CLSTN3的表达 A: GTEx数据库CLSTN3 mRNA在正常结肠组织中表达水平; B: GEPIA数据库CLSTN3 mRNA在结肠癌和直肠癌组织中表达水平; C: 免疫组化检测临床样本中CLSTN3蛋白表达

Figure 1 Expression of CLSTN3 in colorectal cancer and adjacent tissues A: CLSTN3 mRNA expression in normal colon tissues from the GTEx database; B: CLSTN3 mRNA expression in colon adenocarcinoma and rectal adenocarcinoma tissues from the GEPIA database; C: Immunohistochemical staining of CLSTN3 in clinical specimens

表1 CLSTN3表达与CRC患者临床病理特征的关系[n (%)]

Table 1 Relationship between CLSTN3 expression and clinicopathologic characteristics in CRC patients [n (%)]

临床病理特征	低表达(n=190)	高表达(n=123)	P	临床病理特征	低表达(n=190)	高表达(n=123)	P
性别				TNM分期			
男	117(61.5)	68(55.3)	0.269	I	26(13.6)	9(7.31)	0.001
女	73(38.5)	55(44.7)		II	91(47.8)	40(32.5)	
年龄(岁)				III	73(38.6)	74(60.19)	
<60	71(37.4)	57(46.3)	0.115	病理类型			
≥60	119(62.6)	66(53.7)		分化好的管状腺癌	150(78.9)	91(73.9)	0.587
手术方式				分化差的管状腺癌	17(8.94)	13(10.5)	
开腹手术	63(33.2)	38(30.8)	0.676	含黏液成分腺癌 ¹⁾	23(12.16)	19(15.6)	
腹腔镜手术	127(66.8)	85(69.2)		肿瘤坏死			
肿瘤部位				有	176(92.6)	96(78.0)	0.000
右半结肠	44(23.1)	25(20.3)	0.416	无	14(7.4)	27(22.0)	
左半结肠	57(30.0)	31(25.2)		NVI			
直肠	89(46.9)	67(54.5)		有	34(17.8)	35(28.4)	0.028
术前肠梗阻				无	156(82.2)	88(71.6)	
有	12(6.31)	10(8.13)	0.540	血清CEA(ng/mL)			
无	178(93.69)	113(91.87)		<5	131(68.9)	86(69.9)	0.856
T分期				≥5	59(31.1)	37(30.1)	
T1~2	36(18.9)	17(13.8)	0.238	错配修复蛋白状态			
T3~4	154(81.1)	106(86.2)		pMMR	175(92.1)	110(89.4)	0.418
N分期				dMMR	15(8.9)	13(10.6)	
N0	117(61.5)	49(39.8)	0.000				
N1	55(28.9)	48(39.0)					
N2	18(9.60)	26(21.2)					

注:1)含黏液成分腺癌包括黏液腺癌、印戒细胞癌、管状腺癌合并黏液腺癌或印戒细胞癌
Note: 1) Adenocarcinomas with mucinous components include mucinous adenocarcinoma, signet-ring cell carcinoma, and tubular adenocarcinoma with a mucinous or signet-ring cell component

2.2 CRC患者不良预后危险因素分析

Kaplan-Meier生存分析所示,CLSTN3高表达组整体生存(OS)率与无病生存(DFS)率均低于CLSTN3低表达组(均 $P<0.001$)(图2)。OS相关单因素分析结果显示,T分期、N分期、TNM分期、病理类型、肿瘤坏死、神经脉管侵犯、血清CEA水平、CLSTN3表达与OS明显有关(均 $P<0.05$);将这些风险因子纳入多因素分析,结果显示,N分

期、病理类型、CLSTN3表达是OS的独立影响因素(均 $P<0.05$)(表2)。DFS相关单因素分析显示,手术方式、T分期、N分期、TNM分期、病理类型、肿瘤坏死、血清CEA水平、CLSTN3表达与DFS明显有关(均 $P<0.05$);将这些风险因子纳入多因素分析,结果显示,手术方式、T分期、N分期、血清CEA水平、CLSTN3表达是DFS的独立影响因素(均 $P<0.05$)(表3)。

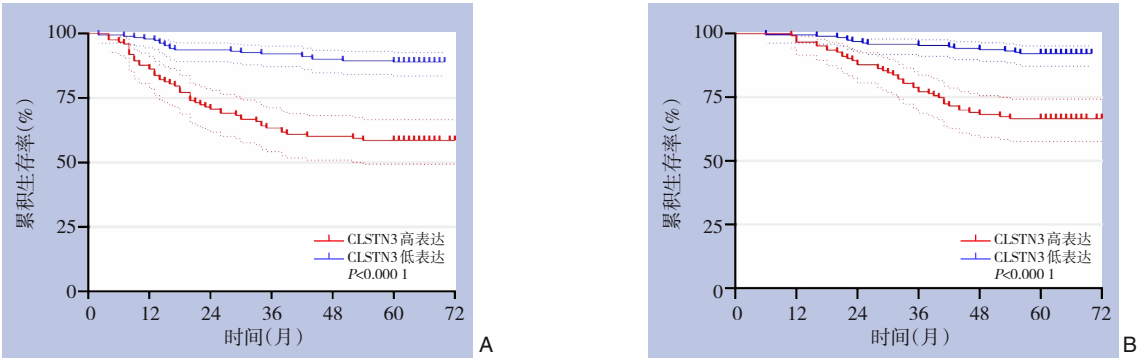


图2 CRC患者的Kaplan-Meier生存曲线 A: OS; B: DFS

Figure 2 Kaplan-Meier survival curves of patients with colorectal cancer A: OS; B: DFS

表2 CRC患者根治术后OS的Cox回归分析
Table 2 Cox regression analysis of OS after curative resection in CRC patients

特征	单因素分析		多因素分析	
	HR(95% CI)	P	HR(95% CI)	P
性别				
男 vs. 女	1.154(0.672~1.983)	0.603	—	—
年龄(岁)				
≥60 vs. <60	1.530(0.873~2.680)	0.137	—	—
手术方式				
开腹 vs. 腹腔镜	1.402(0.820~2.398)	0.216	—	—
肿瘤部位				
右半结肠 vs. 左半结肠	1.272(0.606~2.668)		—	
直肠 vs. 左半结肠	1.108(0.583~2.105)	0.815	—	—
右半结肠 vs. 直肠	1.148(0.604~2.180)		—	
术前肠梗阻				
有 vs. 无	2.046(0.927~4.517)	0.077	—	—
T分期				
T3~4 vs. T1~2	3.945(1.233~12.624)	0.021	—	0.154
N分期				
N2 vs. N0	7.106(3.584~14.087)		4.062(1.849~8.921)	
N2 vs. N1	2.726(1.395~5.328)	<0.001	2.033(0.980~4.219)	0.002
N1 vs. N0	2.607(1.422~4.780)		1.998(1.068~3.737)	
TNM分期				
III vs. I	5.871(1.421~24.260)			
III vs. II	3.516(1.851~6.681)	<0.001	—	0.425
II vs. I	1.670(0.374~7.460)			
病理类型				
含黏液成分腺癌 vs. 分化好的管状腺癌	3.371(1.849~6.147)		2.345(1.258~4.371)	
分化差的管状腺癌 vs. 分化好的管状腺癌	2.189(1.009~4.751)	<0.001	1.161(0.518~2.600)	0.025
含黏液成分腺癌 vs. 分化差的管状腺癌	1.540(0.659~3.599)		2.020(0.849~4.808)	
肿瘤坏死				
有 vs. 无	3.767(2.128~6.666)	<0.001	—	0.194
神经脉管侵犯				
有 vs. 无	2.066(1.188~3.594)	0.010	—	0.753
血清CEA(ng/mL)				
≥5 vs. <5	1.946(1.149~3.296)	0.013	—	0.103
错配修复蛋白状态				
pMMR vs. dMMR	1.243(0.533~2.898)	0.615	—	—
CLSTN3表达				
高 vs. 低	4.952(2.724~8.903)	<0.001	3.833(2.073~7.086)	<0.001

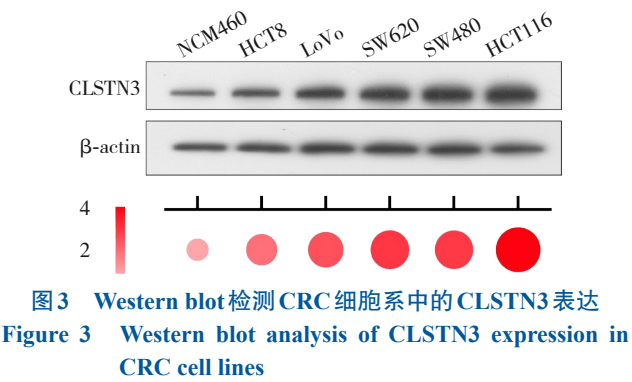
表 3 CRC 患者根治术后 DFS 的 Cox 回归分析

Table 3 Cox regression analysis of DFS after curative resection in CRC patients

特征	单因素分析		多因素分析	
	HR(95% CI)	P	HR(95% CI)	P
性别				
男 vs. 女	1.123(0.704~1.791)	0.626	—	—
年龄(岁)				
≥60 vs. <60	1.177(0.730~1.896)	0.504	—	—
手术方式				
开腹 vs. 腹腔镜	1.910(1.201~3.037)	0.006	3.573(2.117~6.029)	<0.001
肿瘤部位				
右半结肠 vs. 左半结肠	1.440(0.762~2.723)		—	
直肠 vs. 左半结肠	1.043(0.589~1.847)	0.436	—	—
右半结肠 vs. 直肠	1.380(0.795~2.398)		—	
术前肠梗阻				
有 vs. 无	1.510(0.692~3.293)	0.300	—	—
T分期				
T3~4 vs. T1~2	5.313(1.672~16.880)	0.005	8.440(1.142~62.388)	0.037
N分期				
N2 vs. N0	5.778(3.193~10.457)		5.309(2.686~10.491)	
N2 vs. N1	2.444(1.407~4.246)	<0.001	2.449(1.334~4.496)	<0.001
N1 vs. N0	2.364(1.342~4.164)		2.167(1.221~3.848)	
TNM分期				
III vs. I	7.456(1.815~30.632)		—	
III vs. II	2.772(1.636~4.696)	<0.001	—	0.225
II vs. I	2.690(0.627~11.549)		—	
病理类型				
含黏液成分腺癌 vs. 分化好的管状腺癌	2.479(1.420~4.326)		—	
分化差的管状腺癌 vs. 分化好的管状腺癌	1.726(0.845~3.526)	0.004	—	0.178
含黏液成分腺癌 vs. 分化差的管状腺癌	1.436(0.640~3.223)		—	
肿瘤坏死				
有 vs. 无	2.802(1.642~4.781)	0.001	—	0.383
神经脉管侵犯				
有 vs. 无	1.642(0.988~2.730)	0.056	—	—
血清CEA(ng/mL)				
≥5 vs. <5	2.248(1.415~3.572)	0.001	2.086(1.296~3.358)	0.002
错配修复蛋白状态				
pMMR vs. dMMR	1.130(0.518~2.465)	0.758	—	—
CLSTN3表达				
高 vs. 低	4.594(2.761~7.643)	<0.001	4.946(2.888~8.470)	<0.001

2.3 CLSTN3表达对CRC细胞体外生长的影响

相比正常结肠细胞NCM460，CLSTN3蛋白在CRC细胞系（HCT8、LoVo、SW620、SW480和HCT116）明显升高（图3）。Western blot检测了CLSTN3过表达HCT8细胞和CLSTN3敲减HCT116细胞（图4A-B）。CCK-8法检测体外细胞生长情况，发现CLSTN3过表达促进CRC细胞系HCT8生长，相反CLSTN3敲减抑制CRC细胞系HCT116生长（图4C-D）。



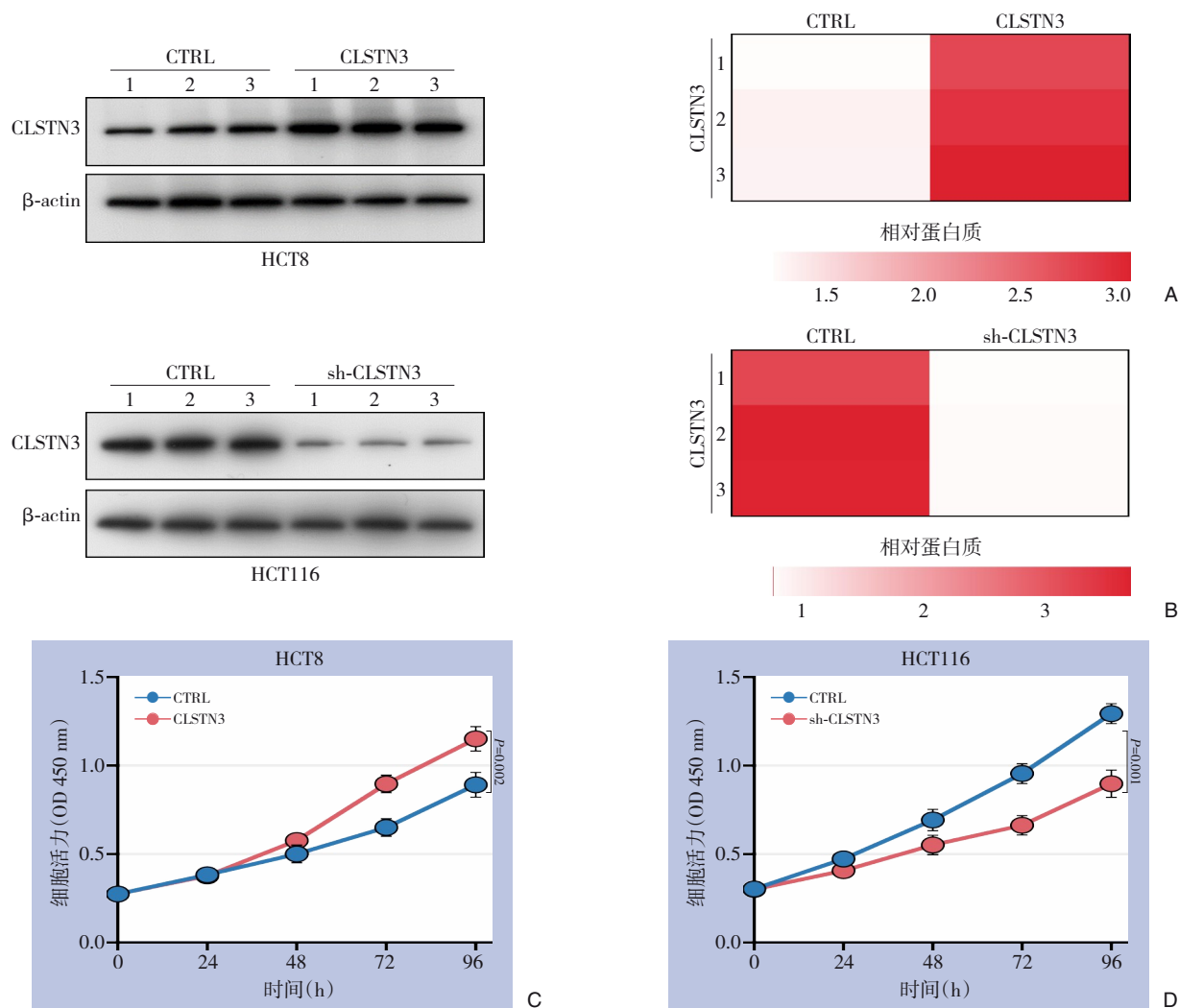


图4 CLSTN3表达对CRC细胞生长的影响 A: HCT8细胞CLSTN3过表达及验证; B: HCT116细胞CLSTN3表达敲减及验证; C: CCK-8检测HCT8细胞生长; D: CCK-8检测HCT116细胞生长

Figure 4 Effects of CLSTN3 expression on colorectal cancer cell growth A: Establishment and validation of CLSTN3-overexpressing HCT8 cells; B: Establishment and validation of CLSTN3-knockdown HCT116 cells; C: CCK-8 assay of HCT8 cell proliferation; D: CCK-8 assay of HCT116 cell proliferation

2.4 体内实验分析CLSTN3表达对CRC肿瘤生长的影响

体内实验使用裸鼠皮下移植瘤模型进行, 每组5只。分别皮下注射稳定过表达CLSTN3的HCT8细胞及其转染空载体的对照HCT8细胞, 结果显示, CLSTN3过表达组的移植瘤质量明显大于对照组 [(0.388 ± 0.031) g vs. (0.194 ± 0.077) g, $P=0.036$]。而CLSTN3敲减HCT116组的移植瘤质量明显小于对照组 [(0.158 ± 0.024) g vs. (0.502 ± 0.031) g, $P=0.003$] (图5)。

2.5 CLSTN3与APP相互作用关系在CRC细胞系中的验证

利用 Genemania 数据库预测了CLSTN3相互作用分子, 包括共表达生理性相互作用、表达共定位、基因相互作用等 (图6A)。表达共定位分子包括SCNN1D、APP、APOE、EPB41L1和CLSTN1 (图6B)。基因相互调控作用分子包括CDIPT、APP、PHYHIP、EPB41L1和CLSTN2 (图6C)。其中APP与CLSTN3之间的相互作用最为紧密, 既有两者表达共定位的关系, 也有基因相互调控作用的关系。通过免疫共沉淀分析发现, CRC细胞中存在CLSTN3与APP之间的直接相互结合 (图7)。

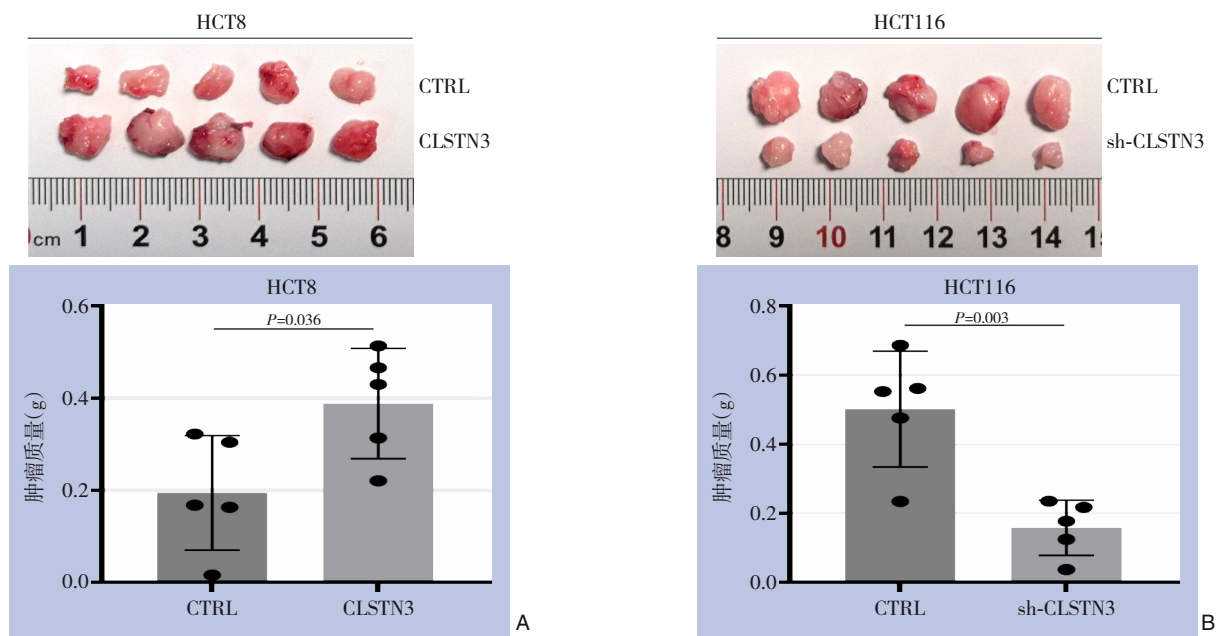


图5 体内CLSTN3表达调节CRC细胞生长 A: CLSTN3过表达HCT8细胞组; B: CLSTN3表达敲减HCT116细胞组
Figure 5 Effects of CLSTN3 expression on CRC growth in vivo A: Group of xenograft model of CLSTN3-overexpressing HCT8 cells; B: Group of xenograft model of CLSTN3-knockdown HCT116 cells

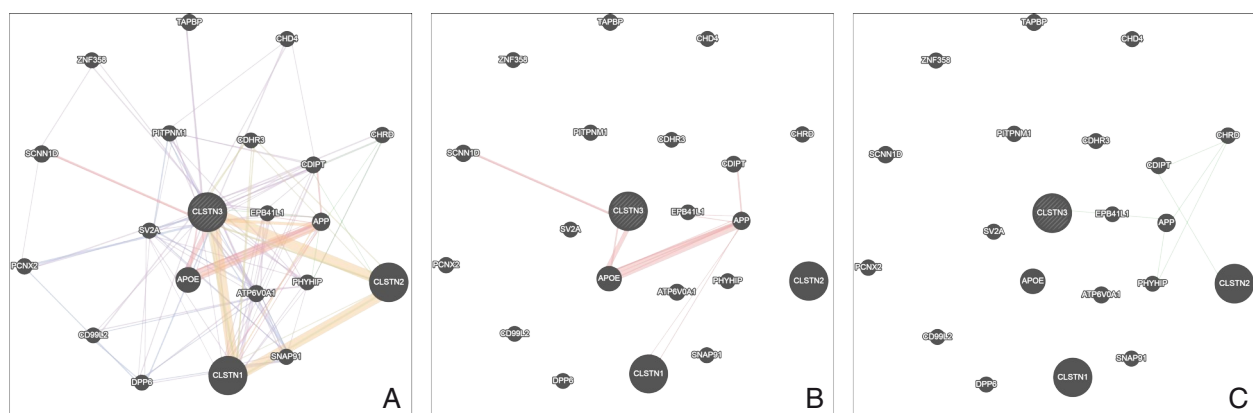


图6 CLSTN3相互作用分子预测 A: 分子相互作用网络; B: 表达共定位; C: 基因相互作用
Figure 6 Prediction of CLSTN3-interacting molecules A: Molecular interaction network; B: Co-expression/co-localization network; C: Genetic interaction network

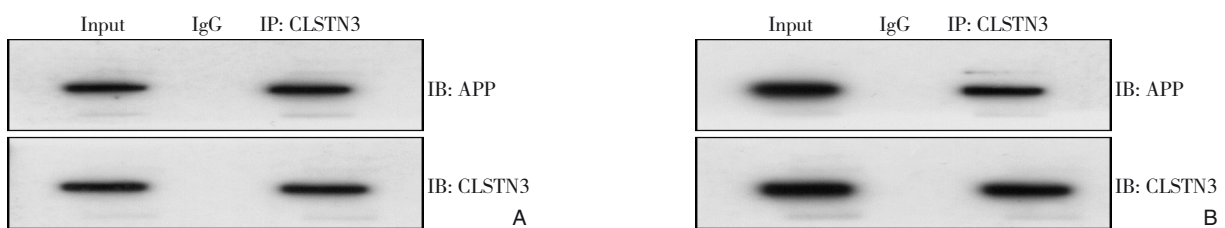


图7 免疫共沉淀检测CLSTN3和APP在CRC细胞中互作关系 A: HCT8细胞; B: HCT116细胞
Figure 7 Co-immunoprecipitation analysis of the interaction between CLSTN3 and APP in CRC cells A: HCT8 cells; B: HCT116 cells

2.6 CLSTN3与APP相互作用关系在CRC组织中的验证

基于CLSTN3与APP在CRC细胞中的表达特征,接下来用CRC组织标本验证了CLSTN3与APP之间的直接相互作用关系,通过Western blot分析了癌与癌旁配对CRC新鲜组织样本中CLSTN3与APP蛋白表达水平,结果显示,CLSTN3与APP蛋

白在癌组织高于癌旁组织(图8A)。相关性分析结果显示,CLSTN3与APP之间的表达呈正相关($r=0.604$, $P=0.012$)(图8B)。将17例癌与癌旁配对CRC新鲜组织样本分为有肿瘤坏死($n=12$)和无肿瘤坏死($n=5$)两组,CLSTN3与APP在有肿瘤坏死组中表达均高于无肿瘤坏死组($P<0.05$)(图8C)。

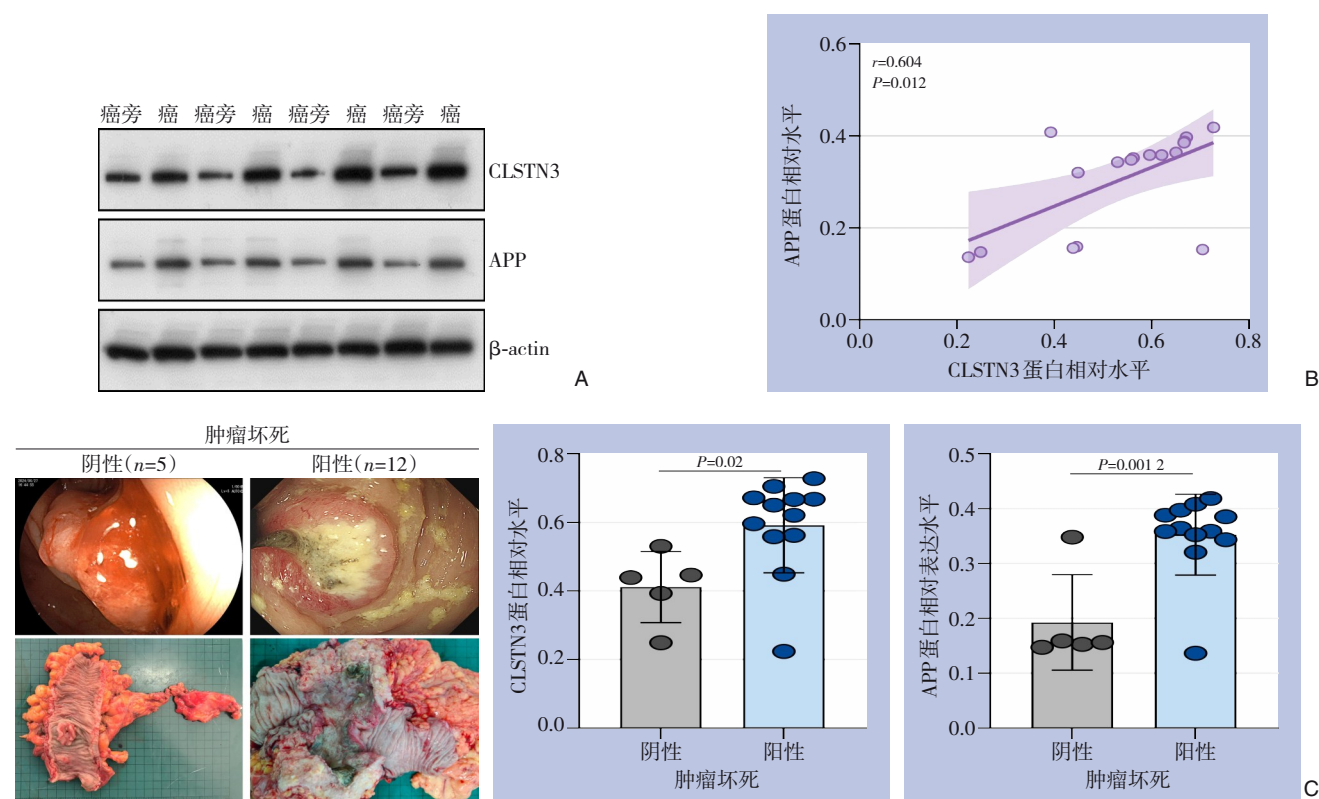


图8 CLSTN3与APP在CRC组织中的表达
APP表达比较

A: Western blot分析; B: 相关性分析; C: 有无肿瘤坏死标本CLSTN3与

Figure 8 Expression and correlation of CLSTN3 and APP in CRC tissues A: Western blot analysis; B: Correlation analysis between CLSTN3 and APP expression; C: Comparison of CLSTN3 and APP expression between tumors with and without necrosis

3 讨论

尽管肿瘤血清蛋白组学研究发现CLSTN3蛋白是CRC新的候选标志物和治疗靶点,目前为止,CLSTN3在CRC组织中的表达及临床意义尚不清楚,CLSTN3在CRC细胞中的作用机制也未有研究。本研究构建了一个“临床标本验证→体内外功能实验→分子网络预测→细胞和临床标本验证”的研究思路,聚焦于CLSTN3表达促进CRC肿瘤生长的功能。获得以下新的发现:(1)明确CLSTN3蛋白表达上调参与CRC发生发展。(2)CLSTN3与TNM

分期、肿瘤坏死和神经脉管侵犯等重要临床病理特征相关。CLSTN3表达上调直接影响CRC临床不良预后。(3)CLSTN3促进CRC细胞生长的功能。(4)CLSTN3与APP在CRC中存在相互作用关系。总体而言,CLSTN3在CRC中扮演着促进肿瘤生长的角色。

肿瘤快速生长通常发生肿瘤坏死病理表型。本研究发现,CLSTN3与APP在CRC组织样本中表达呈正相关,而且CLSTN3与APP在有肿瘤坏死组中表达均高于无肿瘤坏死组。近年来,肿瘤坏死在CRC中的预后价值逐渐受到关注。目前的研究

证实了肿瘤坏死是CRC的独立预后因素^[11]。肿瘤坏死对早期CRC患者的独立预后作用。肿瘤坏死病理学有望帮助从早期CRC患者中识别高风险亚组,这些患者可能会从严格的随访和辅助治疗中受益^[12]。研究者普遍认识到,肿瘤坏死的许多过程涉及严重缺氧、炎症反应、免疫细胞浸润和血管生成^[13-15]。CLSTN3与寡糖转移酶(OST)亚基DDOST结合,抑制其与催化亚基STT3A的相互作用并破坏OST复合物的组装,从而减少TLR4的N-糖基化和膜转运。此外,CLSTN3还抑制其他TLR的膜转运和激活,包括TLR3、TLR7和TLR9^[16]。CLSTN3介导不可控炎症可能参与CRC发生发展。CLSTN3是一种跨膜蛋白,最近被发现参与脂质能量代谢。CLSTN3表达促进脂肪细胞脂解,并促进脂肪酸的氧化^[17]。CLSTN3还可以与白色脂肪组织中的APP相互作用,并增加APP在线粒体中的积累,从而损害脂肪组织的线粒体功能并促进肥胖^[18]。CLSTN3是否通过脂质代谢参与CRC肿瘤生长是本研究未探讨的问题,也是本研究存在的局限性之一。

CLSTN3在CRC中异常高表达,可能通过多重机制驱动肿瘤恶性进展。在结构上,CLSTN3与APP相似,共享胞外钙黏蛋白样结构域及胞内保守的磷酸化结合基序^[19],并可经 γ -分泌酶剪切产生胞内结构域(CLSTN3-ICD),后者可能作为转录共调节因子参与促癌信号转导^[20-21]。在功能上,CLSTN3可能通过激活PI3K/Akt及MAPK/ERK通路促进细胞增殖与克隆形成;同时,通过上调N-cadherin、Vimentin等间质标志物并下调E-cadherin,诱导上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),从而增强肿瘤细胞的侵袭与转移能力^[22]。此外,CLSTN3与APP可能在胞膜发生共定位,从而整合促存活、EMT及转移相关信号网络。综上,上述多重机制部分解释了本研究的发现,CLSTN3高表达与CRC晚期TNM分期显著相关,且是其独立的不良预后因素。

膜蛋白APP是调控阿尔茨海默病的关键分泌蛋白。近年来,APP在肿瘤细胞生长中的关键作用逐渐受到关注^[23]。研究^[24]表明,APP参与人结肠癌细胞在体内外的生长。在CRC发生肝转移的早期复发患者中APP表达水平通常上调了2倍以上^[25]。和阿尔茨海默病相比较,APP在CRC中的作用机制可能有所不同。主要通过以下几种方式驱动肿

瘤进展:(1)释放胞内域:激活致癌通路,是最核心的机制^[26]。APP可以被肿瘤细胞中高表达的酶(如 γ -分泌酶)切割,释放APP-ICD的片段。这个片段会进入细胞核,作为转录共激活因子,直接启动MYB、MYC等强效促癌基因的转录,从而驱动细胞无限增殖^[27]。(2)促进细胞干性与化疗耐药:通过激活Wnt/ β -catenin等干性维持通路,让肿瘤细胞“干性”更强,这不仅是肿瘤复发和转移的根源,也是导致对5-FU、奥沙利铂等一线化疗药物耐药的重要原因^[28]。(3)重塑免疫微环境:肿瘤细胞分泌的APP可裂解为sAPP α 和sAPP β 等片段,这些片段在肿瘤微环境中充当信号分子,会抑制CD8⁺T细胞的浸润与杀伤功能,帮助肿瘤实现免疫逃逸^[29]。(4)代谢重编程:APP还能通过与线粒体蛋白相互作用,增强肿瘤细胞的有氧糖酵解,为快速增殖提供充足的能量和生物合成原料^[30]。CLSTN3与APP在CRC细胞系和肿瘤组织的共表达,但是CLSTN3是否作为APP下游的信号传导分子参与促进CRC肿瘤生长尚不清楚。也是本研究局限性之二。

综上所述,本研究首次分析了CLSTN3在CRC中的临床意义、促增殖作用及其与APP的相互作用关系,提示CLSTN3在CRC进展中可能发挥关键驱动作用。然而,本研究仅证实CLSTN3与APP存在相互作用关系,但尚未进一步阐明其下游信号通路及功能依赖性机制,后续仍需通过回复实验及通路阻断实验进一步验证。

作者贡献声明:裴谦、胡文丽为共同完成临床标本收集检测、生物信息学分析、体内体外实验、撰写全文;裴雷负责设计实验方案,文稿修订。陶一明负责提出科学问题并选题,文稿修订。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Siegel RL, Kratzer TB, Giaquinto AN, et al. Cancer statistics, 2025[J]. CA Cancer J Clin, 2025, 75(1): 10-45. doi: 10.3322/caac.21871.
- [2] Yang L, Yang JL, Kleppe A, et al. Personalizing adjuvant therapy for patients with colorectal cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2024, 21(1):67-79. doi:10.1038/s41571-023-00834-2.
- [3] Mori K, Koebis M, Nakao K, et al. Loss of calyntenin paralogs

- disrupts interneuron stability and mouse behavior[J]. *Mol Brain*, 2022, 15(1):23. doi:10.1186/s13041-022-00909-8.
- [4] Li C, Yin Y, Tao R, et al. ESRP1-driven alternative splicing of CLSTN1 inhibits the metastasis of gastric cancer[J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9:464. doi:10.1038/s41420-023-01757-8.
- [5] Lin H, Wei X, Ye J, et al. Lnc-CLSTN2-1: 1 promotes osteosarcoma progression by disrupting redox balance through PI3K/AKT signaling pathway[J]. *J Cancer*, 2024, 15(5): 1287-1298. doi:10.7150/jca.91579.
- [6] Sun J, Zhao J, Jiang F, et al. Identification of novel protein biomarkers and drug targets for colorectal cancer by integrating human plasma proteome with genome[J]. *Genome Med*, 2023, 15(1):75. doi:10.1186/s13073-023-01229-9.
- [7] Abdou AG, Sakr S, Elwahed MM, et al. Immunohistochemical assessment of ezrin and moesin in colorectal carcinoma[J]. *Ultrastruct Pathol*, 2016, 40(4): 181-188. doi: 10.3109/01913123.2016.1155683.
- [8] Nieuwenhuis TO, Yang SY, Verma RX, et al. Consistent RNA sequencing contamination in GTEx and other data sets[J]. *Nat Commun*, 2020, 11:1933. doi:10.1038/s41467-020-15821-9.
- [9] 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-W102. doi: 10.1093/nar/gkx247.
- [10] Franz M, Rodriguez H, Lopes C, et al. GeneMANIA update 2018[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(W1):W60-W64. doi:10.1093/nar/gky311.
- [11] Kastinen M, Sirniö P, Elomaa H, et al. Establishing criteria for tumor necrosis as prognostic indicator in colorectal cancer[J]. *Am J Surg Pathol*, 2024, 48(10): 1284-1292. doi: 10.1097/pas.0000000000002286.
- [12] Dong S, Xu J, Li M, et al. Tumor necrosis serves as an important pathological characteristic of stage I-II colon cancer[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2024, 67(4): 794-800. doi: 10.4103/ijpm.ijpm_483_23.
- [13] Zhang X, Chen LR. The recent progress of the mechanism and regulation of tumor necrosis in colorectal cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(2): 453-463. doi: 10.1007/s00432-015-1997-z.
- [14] Kastinen M, Sirniö P, Elomaa H, et al. Immunological and prognostic significance of tumour necrosis in colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2023, 128(12):2218-2226. doi:10.1038/s41416-023-02258-2.
- [15] Paarnio K, Väyrynen JP, Väyrynen SA, et al. TLR2 and TLR4 in colorectal cancer: relationship to tumor necrosis and markers of systemic inflammation[J]. *Neoplasma*, 2022, 69(6):1418-1424. doi: 10.4149/neo_2022_220509n498.
- [16] Duan J, Zhang S, Wang B, et al. Calsyntenin-3 suppresses inflammation *via* inhibition of TLR N-glycosylation and membrane localization[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2026, 123(12): e2528269123. doi:10.1073/pnas.2528269123.
- [17] Qian K, Tol MJ, Wu J, et al. CLSTN3 β enforces adipocyte multilocularity to facilitate lipid utilization[J]. *Nature*, 2023, 613(7942):160-168. doi:10.1038/s41586-022-05507-1.
- [18] Bai N, Lu X, Jin L, et al. CLSTN3 gene variant associates with obesity risk and contributes to dysfunction in white adipose tissue[J]. *Mol Metab*, 2022, 63: 101531. doi: 10.1016/j.molmet.2022.101531.
- [19] Vetrivel KS, Cheng H, Kim SH, et al. Spatial segregation of γ -secretase and substrates in Distinct Membrane Domains[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(27):25892-25900. doi:10.1074/jbc.M503570200.
- [20] Kazanjian A, Noah T, Brown D, et al. Atonal Homolog 1 Is Required for Growth and Differentiation Effects of Notch/ γ -Secretase Inhibitors on Normal and Cancerous Intestinal Epithelial Cells[J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(3): 918-928. doi: 10.1053/j.gastro.2010.05.081.
- [21] Mouillet-Richard S, Martin-Lannerée S, Le Corre D, et al. A proof of concept for targeting the PrPC - Amyloid β peptide interaction in basal prostate cancer and mesenchymal colon cancer[J]. *Oncogene*, 2022, 41(38):4397-4404. doi:10.1038/s41388-022-02430-7.
- [22] Arcaroli JJ, Powell RW, Varella-Garcia M, et al. ALDH⁺ tumor-initiating cells exhibiting gain in NOTCH1 gene copy number have enhanced regrowth sensitivity to a γ -secretase inhibitor and irinotecan in colorectal cancer[J]. *Mol Oncol*, 2012, 6(3):370-381. doi:10.1016/j.molonc.2012.03.004.
- [23] Miyata S, Koshikawa N, Higashi S, et al. Expression of trypsin in human cancer cell lines and cancer tissues and its tight binding to soluble form of Alzheimer amyloid precursor protein in culture[J]. *J Biochem*, 1999, 125(6): 1067-1076. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022388.
- [24] Meng JY, Kataoka H, Itoh H, et al. Amyloid β protein precursor is involved in the growth of human colon carcinoma cell *in vitro* and *in vivo*[J]. *Int J Cancer*, 2001, 92(1):31-39. doi:10.1002/1097-0215(200102)9999:9999::aid-ijc1155>3.3.co;2-8.
- [25] Wong GYM, Li J, McKay M, et al. Proteogenomic characterization of early intrahepatic recurrence after curative-intent treatment of colorectal liver metastases[J]. *J Proteome Res*, 2024, 23(10):4523-4537. doi:10.1021/acs.jproteome.4c00440.
- [26] Danish Rizvi SM, Hussain T, Subaiea GM, et al. Therapeutic targeting of amyloid precursor protein and its processing enzymes for breast cancer treatment[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2018, 19(9): 841-849. doi:10.2174/1389203718666170828123924.

- [27] García-Valdeavero OM, González-Flores E, Ortiz R, et al. Tumour Jagged1 expression as a prognostic marker of bevacizumab response and modulation of 5-fluorouracil efficacy through γ -secretase inhibition in colorectal cancer[J]. Gastroenterol Rep (Oxf), 2026, 14:goag012. doi:10.1093/gastro/goag012.
- [28] Akiyoshi T, Nakamura M, Yanai K, et al. γ -secretase inhibitors enhance taxane-induced mitotic arrest and apoptosis in colon cancer cells[J]. Gastroenterology, 2008, 134(1): 131-144. doi: 10.1053/j.gastro.2007.10.008.
- [29] Wei W, Zhang Y. PSEN1 is associated with colon cancer development via potential influences on PD-L1 nuclear translocation and tumor-immune interactions[J]. Front Immunol, 2022, 13:927474. doi:10.3389/fimmu.2022.927474.
- [30] Zhang D, Zhou C, Li Y, et al. Amyloid precursor protein is overexpressed in bladder cancer and contributes to the malignant bladder cancer cell behaviors[J]. Int J Urol, 2018, 25(9):808-816. doi:10.1111/iju.13726.
- (本文编辑 宋涛)
- 本文引用格式:**裴谦, 胡文丽, 裴雷, 等. CLSTN3在结直肠癌中的促癌作用及其与淀粉样前体蛋白的相互作用研究[J]. 中国普通外科杂志, 2026, 35(4):817-829. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.260188
- Cite this article as:** Pei Q, Hu WL, Pei L, et al. Oncogenic role of CLSTN3 in colorectal cancer and its interaction with amyloid precursor protein[J]. Chin J Gen Surg, 2026, 35(4): 817-829. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.260188

本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计研究设计: 应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计 (分为前瞻性、回顾性或横断面调查研究); 实验设计 (应交代具体的设计类型, 如自身配对设计、成组设计、交叉设计、正交设计等); 临床试验设计 (应交代属于第几期临床试验, 采用了何种盲法措施等)。主要做法应围绕四个基本原则 (随机、对照、重复、均衡) 概要说明, 尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2. 资料的表达与描述: 用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料, 用 $M (IQR)$ 表达呈偏态分布的定量资料; 用统计表时, 要合理安排纵横标目, 并将数据的含义表达清楚; 用统计图时, 所用统计图的类型应与资料性质相匹配, 并使数轴上刻度值的标法符合数学原则; 用相对数时, 分母不宜小于 20, 要注意区分百分率与百分比。

3. 统计分析方法的选择: 对于定量资料, 应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析; 对于定性资料, 应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备条件, 以分析为目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析, 应结合专业知识和散布图, 选用合适的回归类型, 不应盲目套用简单直线回归分析, 对具有重复实验数据的回归分析资料, 不应简单化处理; 对于多因素、多指标资料, 要在一元分析的基础上, 尽可能运用多元统计分析方法, 以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达: 当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$) 时, 应说明对比组之间的差异有统计学意义, 而不应说对比组之间具有显著性 (或非常显著性) 的差别; 应写明所用统计分析方法的具体名称 (如: 成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等), 统计量的具体值 (如 $t=3.45$, $\chi^2=4.68$, $F=6.79$ 等) 应尽可能给出具体的 P 值 (如 $P=0.0238$); 当涉及总体参数 (如总体均数、总体率等) 时, 在给出显著性检验结果的同时, 再给出 95% 置信区间。

中国普通外科杂志编辑部