

LETM1 在胃癌中的表达及其与预后的相关性分析

陈乐乐, 张开光, 叶超, 陈思, 曹一凡, 张云凤

摘要 目的 观察亮氨酸拉链 EFhand 结构域跨膜蛋白 1 (LETM1) 在胃癌中的表达情况, 判断其对胃癌患者预后的价值。方法 应用免疫组化法检测 114 例胃癌及癌旁正常组织中 LETM1 的表达, 通过电话随访获取患者的预后信息, 分析 LETM1 与胃癌患者临床病理特征及总体生存率之间的关系。结果 胃癌及癌旁正常组织中 LETM1 的阳性表达率分别为 59.65% 和 15.78% ($P < 0.05$), 且与肿瘤的分化程度 ($P = 0.030$)、临床 TNM 分期 ($P = 0.003$) 及淋巴结转移 ($P = 0.033$) 密切相关。预后结果分析显示, LETM1 高表达的胃癌患者的 3 年总体生存率明显低于阴性表达者 ($\chi^2 = 6.097$, $P < 0.05$)。LETM1 的表达水平、临床 TNM 分期、病理分化程度以及是否淋巴结转移均是胃癌患者预后的独立影响因素, LETM1 表达水平高、临床分期晚、分化程度差、淋巴结转移阳性均可导致患者预后不良。结论 LETM1 的异常表达与胃癌的发生发展密切相关, 可将其作为判断临床预后的新型生物标志物。

关键词 胃癌; LETM1; 预后; 生存率

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)09-1430-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.09.020

中国是胃癌高发国家, 近年来发病率和死亡率呈一定的上升趋势, 严重威胁着人类的生存健康^[1]。目前已知的生物标志物对胃癌患者的预后诊断价值都不太理想, 因此寻找新型胃癌相关的生物标志物对胃癌的预后判断非常重要。LETM1 作为一种线粒体内膜蛋白参与调节恶性肿瘤的进展, 引起了国内外学者的广泛关注。目前研究已经证实 LETM1 与结肠癌^[2]、食管癌^[3]、膀胱癌^[4]等多种肿瘤的发生密切相关, 但其在胃癌组织中的表达水平及作用机制还尚不明确, 因此, 该研究的目的是通过检测 LETM1 在胃癌组织水平中的表达情况, 分析其对诊断胃癌患者预后的预测价值, 为胃癌的预后诊

断提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集安徽省立医院 2012 年 7 月 ~ 2015 年 12 月收治入院并行手术治疗的胃癌患者的临床病理资料, 通过电话的方式进行随访, 最终有 114 例胃癌患者纳入本次研究, 患者术前均未行放化疗治疗。所有标本均来自于本院病理科标本库, 由病理科医师重新阅片, 收集其对应的胃癌组织蜡块。

1.2 受检组织 LETM1 的检测 鼠抗 LETM1 单克隆抗体购于美国 Abnova 公司; 免疫组化试剂盒、DAB 显色剂购于上海 Gene Tech 公司。鼠抗人 LETM1 单克隆抗体按 1:300 稀释, 免疫组织化学染色采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法 (streptavidin-peroxidase, SP) 进行处理, 并严格按试剂盒说明书进行操作。最后由两名对临床病理信息不知情的病理科医师对免疫组化结果进行评估。按照阳性细胞所占百分比并参考着色强度进行分级, 无明显阳性细胞或染色较浅为(-); 阳性细胞数 < 25%, 颗粒棕黄色为(+); 阳性细胞数 25% ~ 50%, 颗粒棕黄色为(++); 阳性细胞数 > 50%, 颗粒深棕色为(+++)。将 LETM1 染色(-)及(+)纳入低表达组, LETM1 染色为(++)及(+++)纳入高表达组。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行数据分析, 组间比较选用 χ^2 或 Fisher 确切概率法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。利用 Kaplan-Meier 法进行生存分析, 组间差异比较应用 Log-Rank, 通过多因素回归分析确定 LETM1 是否为影响胃癌患者的独立预后因素。

2 结果

2.1 患者一般情况 114 例胃癌患者中, 男 63 例, 女 51 例; 手术时年龄 ≥ 60 岁 72 例, < 60 岁 42 例。肿瘤 > 5 cm 46 例, ≤ 5 cm 68 例。术后病理诊断证实: I、II 期患者 48 例, III、IV 期患者 66 例。高、中分化 53 例, 低分化 61 例。淋巴结转移阳性及阴性

2019-05-31 接收

基金项目: 2016 年安徽省科技攻关课题(编号: 1604a0802075)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院消化内科, 合肥 230001

作者简介: 陈乐乐, 男, 硕士研究生;

张开光, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zhangkaiguang0097@163.com

患者分别为 56 例和 58 例。

2.2 胃癌组织中 LETM1 的表达 免疫组化结果显示, LETM1 的表达定位在胃癌细胞线粒体内, 阳性表达呈棕褐色, 胃癌组织阳性表达率为 59.65% (68/114), 癌旁正常组织为 12.28% (14/114), 两者相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 1。

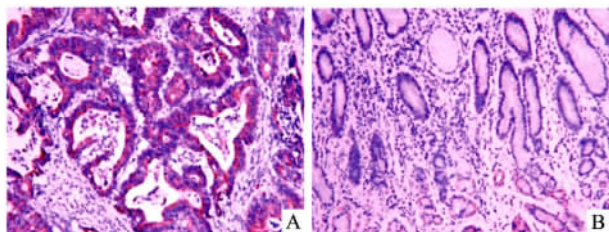


图 1 LETM1 在同一患者胃癌组织和癌旁正常组织中的表达情况 ×200

A: LETM1 在胃癌组织中的表达; B: LETM1 在癌旁正常组织中的表达

2.3 LETM1 表达与临床病理特征的关系

LETM1 与胃癌患者分化程度有关, 低分化胃癌 LETM1 阳性表达率较高、中分化表达高, 分别为 71.70% 和 51.50%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。LETM1 与临床 TNM 分期有关, Ⅲ ~ Ⅳ期 LETM1 阳性表达率较 I、II 期高, 分别为 71.21% 和 43.75%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。LETM1 与是否发生淋巴结转移有关, 淋巴结转移阳性的患者 LETM1 阳性表达率较无淋巴结转移者高, 分别为 69.64% 和 50.00%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。LETM1

与患者的年龄、性别及肿瘤大小无关, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.4 生存分析 通过电话随访, 最终有 114 例胃癌患者纳入本次研究, 随访时间为 5 ~ 64 个月, 中位随访时间为 33 个月。到随访时间截止, 共有 65 例患者存活, 49 例死亡。统计结果发现 114 例患者中, LETM1 蛋白高表达共 68 例, 3 年总体生存率为 53.2%; LETM1 低表达共 46 例, 3 年总体生存率为 80.5%, 上述两者指标比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6.097, P < 0.05$)。见图 2。

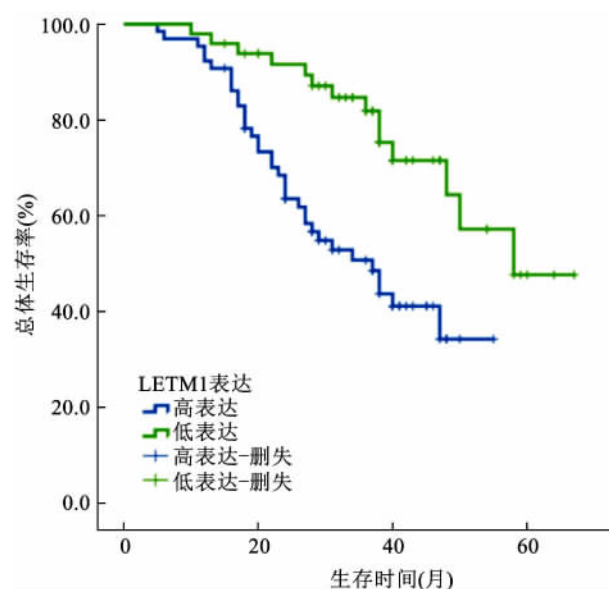


图 2 不同 LETM1 表达的生存曲线比较

表 1 LETM1 与胃癌患者临床病理特征的关系 [n(%)]

临床病理因素	n	LETM1 高表达(%)	LETM1 低表达(%)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)					
≥60	72	46(63.89)	26(36.11)	1.460	0.227
<60	42	22(52.39)	20(47.61)		
性别					
男	63	37(58.73)	26(41.27)	0.049	0.824
女	51	31(60.78)	20(39.22)		
肿瘤大小(cm)					
>5	46	29(63.04)	17(36.96)	0.369	0.543
≤5	68	39(57.35)	29(42.65)		
TNM 分期					
I ~ II	48	21(43.75)	27(56.25)	8.707	0.003
III ~ IV	66	47(71.21)	19(28.79)		
分化程度					
高、中分化	68	35(51.50)	33(48.50)	4.683	0.030
低分化	46	33(71.70)	13(28.30)		
淋巴结转移					
阳性	56	39(69.64)	17(30.36)	4.567	0.033
阴性	58	29(50.00)	29(50.00)		

表2 胃癌术后预后的单因素 Cox 分析

临床病理因素	赋值	n	3 年累计总体生存率(%)	HR 值	95% CI	P 值
性别						
女	0	51	66.0	0.77	0.44 ~ 1.37	>0.05
男	1	63	62.9			
年龄(岁)						
>60	1	72	60.8	1.55	0.83 ~ 2.87	>0.05
≤60	2	42	69.8			
LETM1 表达						
高表达	1	68	53.2	0.47	0.25 ~ 0.87	<0.05
低表达	2	46	80.5			
淋巴转移						
阳性	1	56	44.9	0.38	0.21 ~ 0.69	<0.05
阴性	2	58	80.4			
临床分期						
I ~ II	1	48	81.8	2.43	1.31 ~ 4.49	<0.05
III ~ IV	2	66	51.5			
分化程度						
高、中分化	1	53	76.9	1.98	1.09 ~ 3.58	<0.05
低分化	2	61	51.9			
肿瘤大小(cm)						
≥5	1	46	51.0	0.52	0.29 ~ 0.91	<0.05
<5	2	68	73.3			

表3 影响患者预后的多因素 Cox 分析

临床病理因素	B	SE	Wald	Exp(B)	95.0% CI	P 值
LETM1 高表达	0.722	0.338	4.575	2.059	1.062 ~ 3.990	<0.05
淋巴转移阳性	0.660	0.329	4.035	1.935	1.016 ~ 3.686	<0.05
临床分期 I ~ II	-0.773	0.341	5.14	0.462	0.237 ~ 0.901	<0.05
分化程度高、中分化	-1.023	0.330	9.596	0.360	0.188 ~ 0.687	<0.05
肿瘤大小 ≥5 cm	0.305	0.307	0.983	1.356	0.743 ~ 2.475	>0.05

2.5 胃癌患者的预后因素分析 单因素分析结果显示: LETM1 蛋白表达水平、临床分期、分化程度、淋巴转移及肿瘤大小是影响胃癌患者预后的相关因素($P < 0.05$); 性别、年龄对胃癌患者预后无明显影响($P > 0.05$), 见表2。

进一步 COX 多因素回归分析显示, LETM1 表达是影响胃癌预后的独立影响因素, 是否发生淋巴转移、肿瘤分化程度及临床 TNM 分期亦是影响预后的独立影响因素($P < 0.05$)。LETM1 表达高、临床分期晚、分化程度差、淋巴转移阳性均可导致患者预后不良。见表3。

3 讨论

LETM1 是一种极为保守的线粒体内膜蛋白, 参与线粒体基本代谢反应的调节^[4], 其改变可导致线粒体结构和功能明显受损, 引发膜的通透性增加、活性氧过多释放及自噬作用的激活, 导致细胞的破坏^[5-7]。同时其作为线粒体内膜蛋白还参与调节肿

瘤的进展, 有文献报道 LETM1 可通过抑制线粒体的生成诱导 Hela 细胞坏死, 此外, 还通过免疫组化法对多种肿瘤组织进行染色处理, 发现 LETM1 在肺癌、卵巢癌等多种肿瘤中呈高表达^[8], 但其是否参与调控胃癌的进展目前还尚不明确。

本研究揭示了 LETM1 的表达水平与胃癌之间的关系, 结果显示胃癌组织中 LETM1 呈现出棕褐色颗粒样深染, 阳性表达强, 而在癌旁正常组织仅呈浅淡染色, 表达明显较低或几乎无表达。经比较分析胃癌组织及癌旁正常组织的阳性表达率分别为 59.65% 和 12.28%, 说明 LETM1 在两者组织中存在差异性表达。但本次实验有少许切缘正常的癌旁正常组织也呈高表达, 通过与其他癌旁组织的对比联合临床资料的分析, 推测这些呈强染色的癌旁正常组织很可能在早期就出现转移现象, 但由于术中快速病检的时间限制以及传统的生物标志物对一些细小的微转移而不易有效察觉。进一步的研究分析显示: 与病理分化程度高、临床 I ~ II 期和淋巴转移

移阴性的胃癌患者相比,病理分化程度低、临床Ⅲ~Ⅳ期和伴有淋巴结转移胃癌患者的 LETM1 阳性细胞数明显升高,这些结果表明 LETM1 在胃癌的发生发展中具有重要的作用。

Chen et al^[9] 研究发现 LETM1 阳性表达与头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)的临床分期及病理程度分级密切相关,临床分期越晚、病理分化越低时 LETM1 表达阳性率越高,提示 LETM1 表达升高是 HNSCC 恶性程度增高、侵袭性增强、预后不良的表现。三阴性乳腺癌中 LETM1 过表达患者的 10 年总生存期和无病生存期均明显低于 LETM1 低表达的患者^[10]。本次研究结果显示,LETM1 高表达组的胃癌患者术后 3 年总体生存率明显低于低表达组,且 LETM1 高表达组中位生存期与低表达组相比明显缩短,说明 LETM1 高表达常提示术后预后不良,与在其他恶性肿瘤的研究结果高度一致,表明检测 LETM1 表达对判断胃癌预后也具有特定的参考意义。多因素回归分析提示 LETM1 表达上调可作为影响患者预后的独立危险因素,这进一步说明 LETM1 和胃癌预后之间存在一定的联系,对评估和判断胃癌患者的预后具有一定的指导意义。

LETM1 可激活多种信号通路参与癌症的转移和浸润。肾癌细胞株中,抑制 LETM1 表达可引起 β -连环蛋白、周期蛋白 D1 和 c-Myc 下调,进而导致细胞增殖、迁移和侵袭显著降低^[11]。最近一项研究^[12]显示 LETM1 与 ESCC 中 Cyclin D1 和 pAkt 的表达呈正相关,表明 LETM1 可能通过改变 PI3K/Akt 信号传导及细胞周期对肿瘤细胞进行调节。目前 LETM1 对胃癌细胞的调节机制尚不明确,仍需细胞功能实验予以验证。

本研究初步探讨了 LETM1 在胃癌中的表达,并通过对患者预后的随访研究得出了有意义的临床结果。然而本研究也有不足之处,一方面,由于临床资料有限,本次纳入研究的患者病理组织学类型均为腺癌,并未对其他少见类型的肿瘤分类纳入本次研究,所以研究结果并不能代表所有的胃癌组织类型。另一方面,受客观原因的限制,本研究仅采用免疫组化半定量的方法对 114 例胃癌患者的 LETM1 表达水平进行了评估,方法相对而言较为粗略,并不能完全代表 LETM1 的真实表达水平。但目前的初步研究结果仍支持进行进一步的细胞功能实验判断其对

胃癌细胞生物行为的影响,从而更好的探究 LETM1 与胃癌的关系。

综上,LETM1 蛋白在胃癌组织中的表达率较高,阳性表达常提示预后不良,可将其作为判断胃癌患者预后有价值的分子生物学指标。

参考文献

- [1] Chen W Q, Zheng R S, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115–32.
- [2] 高爱花,金永民,孙红,等. LETM1 蛋白在结肠癌组织中的表达及临床意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 22(5): 718–23.
- [3] Huang B, Zhang J, Zhang X, et al. Suppression of LETM1 by siRNA inhibits cell proliferation and invasion of bladder cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(5): 2935–40.
- [4] Yang Z, Ni W, Cui C, et al. Identification of LETM1 as a marker of cancer stem-like cells and predictor of poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Hum Pathol*, 2018, 81: 148–56.
- [5] Jiang D, Zhao L, Clish C B, et al. Letm, the mitochondrial $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter, is essential for normal glucose metabolism and alters brain function in Wolf-Hirschhorn syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2013, 110(24): E2249–54.
- [6] Doonan P J, Chandramoorthy H C, Hoffman N E, et al. LETM1-dependent mitochondrial Ca^{2+} flux modulates cellular bioenergetics and proliferation [J]. *FASEB J*, 2014, 28(11): 4936–49.
- [7] Stefanatos R, Sanz A. The role of mitochondrial ROS in the aging brain [J]. *FEBS Lett*, 2018, 592(5): 743–58.
- [8] Piao L, Li Y, Kim S J, et al. Association of LETM1 and MRPL36 contributes to the regulation of mitochondrial ATP production and necrotic cell death [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(8): 3397–3404.
- [9] Chen L, Yang Y, Liu S, et al. High expression of leucine zipper- EF-hand containing transmembrane protein 1 predicts poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 850316.
- [10] Chen L, Yang Y, Liu S, et al. High expression of leucine zipper- EF-hand containing transmembrane protein 1 predicts poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 850316.
- [11] Wang C A, Liu Q, Chen Y, et al. Clinical implication of leucine zipper/EF hand-containing transmembrane-1 overexpression in the prognosis of triple-negative breast cancer [J]. *Exp Mol Pathol*, 2015, 98(2): 254–9.
- [12] Xu J, Huang B, Li S, et al. Knockdown of LETM1 inhibits proliferation and metastasis of human renal cell carcinoma cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5): 6377–82.

合肥市包河区成年人群碘营养状况与甲状腺疾病调查分析

赵德伟, 陈婷婷, 徐雁秋, 惠灿灿, 金秀兰, 王佑民

摘要 **目的** 了解合肥市包河区成年人碘营养状况和甲状腺疾病患病情况。**方法** 选取2 628例18岁以上常住居民, 采集一次性晨尿5 ml测定尿碘(UI), 以UI水平将调查对象进行分组;空腹静脉血测定促甲状腺激素(TSH)、游离甲状腺素(FT4)、游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)、甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)、甲状腺球蛋白抗体(TGAb)水平。**结果** ①总人群尿碘中位数(MUI)为209.67 $\mu\text{g/L}$, 城区居民UI水平与农村比较差异无统计学意义, 女性的UI水平低于男性, 碘缺乏(ID)组291例(11.07%), 碘足量组941例(35.81%), 碘超足量组687例(26.14%), 碘过量组709例(26.98%), ID组的女性占比高;②总人群TSH中位数为

2.63 $\mu\text{IU/ml}$;调查人群中甲状腺功能亢进占0.53%, 亚临床甲状腺功能亢进占0.38%, 甲状腺功能减退占0.84%, 亚临床甲状腺功能减退(亚甲减)占19.25%, 甲状腺异常者以亚甲减多见;甲状腺功能亢进组UI水平高于其他组;③TPOAb抗体阳性组及TGAb阳性组UI水平高于TPOAb抗体阴性组及TGAb阴性组, 差异有统计学意义;单抗体阳性组UI水平高于双抗体阳性组, 差异有统计学意义;④多因素Logistic回归分析结果显示TPOAb阳性是甲状腺疾病危险因素。**结论** 合肥市包河区人群平均碘营养处于超足量水平, 城乡居民碘营养状态基本相当, 甲状腺功能异常以亚甲减多见。

关键词 碘; 甲状腺功能; 成人

中图分类号 R 581

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)09-1434-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.09.021

2019-05-25 接收

基金项目: 公益性行业科研专项基金(编号: 201402005)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院内分泌科, 合肥 230022

作者简介: 赵德伟, 男, 硕士研究生;

王佑民, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: 971359183@qq.com

碘作为合成甲状腺激素的重要原料, 升高或者降低都会导致甲状腺疾病的发生。1995年我国开

Expression of LETM1 in gastric cancer and its correlation with prognosis

Chen Lele, Zhang Kaiguang, Ye Chao, et al

(Dept of Gastroenterology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract **Objective** To observe the expression of leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 (LETM1) in gastric cancer and evaluate its prognostic value of patients with gastric cancer. **Methods** The expression of LETM1 in 114 cases of gastric cancer and corresponding adjacent normal tissues was detected by immunohistochemical method. The patient's clinical survival prognosis information was obtained by telephone follow-up. And the relationship between LETM1 and clinicopathological features and overall survival rate of gastric cancer patients were analyzed. **Results** The positive rates of LETM1 in gastric cancer and its adjacent normal tissues were 59.65% (68/114) and 15.78% (14/114), respectively ($P < 0.05$), which were closely related to the differentiation degree ($P = 0.030$), clinical TNM stage ($P = 0.003$) and lymph node metastases ($P = 0.033$) of tumor. The prognostic result analysis showed that the 3-year overall survival rate of gastric cancer patients with high LETM1 expression was significantly lower than that of patients with negative LETM1 expression ($\chi^2 = 6.097, P < 0.05$). The expression level of LETM1, clinical TNM stage, pathological differentiation and lymph node metastasis are independent prognostic factors, and the high expression level of LETM1, deeper extent of infiltration, higher differentiation degree, and positive lymph node metastasis could lead to poor prognosis in patients. **Conclusion** The abnormal expression of LETM1 is closely related to the occurrence and development of gastric cancer, which can be used as a new biomarker for early diagnosis and clinical prognosis of gastric cancer.

Key words gastric cancer; LETM1; prognosis; survival rate