

ERp29 在结直肠癌中的表达及其临床意义

檀祝利^{1,2}, 余海², 丁西平¹

摘要 目的 研究结直肠癌中内质网蛋白 29 (ERp29) 的表达情况及临床意义。方法 对 62 例结直肠癌患者病理组织切片, 行 ERp29 免疫组化染色, 统计分析癌组织及癌旁组织 ERp29 表达情况, 并比较不同 ERp29 表达水平的结直肠癌患者, 其临床及病理特征差异有无统计学意义。结果 62 例癌组织中 ERp29 表达阳性 24 (38.7%) 例, 阴性 38 (61.3%) 例, 癌旁组织阳性 58 (93.5%) 例, 阴性 4 (6.5%) 例, 癌组织 ERp29 阳性组与阴性组之间, 肿瘤的 TNM 分期以及淋巴结转移情况差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 结直肠癌组织中 ERp29 的表达水平低于癌旁组织, ERp29 的表达情况可为评估肿瘤转移倾向及预后提供一定参考价值。

关键词 结直肠癌; ERp29; 内质网; 转移

中图分类号 R 574.62

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0123-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.026

结直肠癌是常见的恶性肿瘤之一, 根据我国 2012 年统计数据, 全国恶性肿瘤病例中, 结直肠癌发病率位列第四, 死亡率位列第五^[1]。结直肠癌起病隐匿, 患者早期多无明显临床症状, 但肠道的血管及淋巴管分布较丰富, 肿瘤易侵犯脉管系统出现浸润和转移, 最终导致患者错失手术时机, 预后差。结直肠癌的发生和发展是多因素、多基因共同作用的结果, 尽管经过多年大量的临床及基础研究, 但其内在的发病机制仍未彻底阐明, 还需要进一步探索。

内质网蛋白 29 (endoplasmic Reticulum protein 29, ERp29), 是近年来发现的特殊内质网蛋白, 其分子量为 29 ku, 各种组织均可表达。新近研究^[2]表明, ERp29 可发挥抑癌基因作用, ERp29 的缺失或者突变可以导致人类肿瘤的快速生长。到目前为止, ERp29 在结直肠癌发生、发展中的作用尚未完全

明确, 故研究 ERp29 在结直肠癌中的表达及其作用机制, 对于分析 ERp29 在结直肠癌的发生发展中的作用, 以及针对 ERp29 途径的靶向性治疗具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 组织标本 收集安徽省铜陵市人民医院结直肠癌手术切除标本共 62 例, 每例标本均选择癌组织及其对应的癌旁正常组织蜡块进行切片并予 ERp29 免疫组化染色。所有患者术前未接受放疗、化疗或其他抗肿瘤治疗。调阅对应病历记录患者性别、年龄、肿瘤大小、分化程度、T 分期、肿瘤 TNM 分期、淋巴结转移等情况。

1.2 免疫组化法 全部结肠组织标本均经过中性福尔马林固定, 常规石蜡包埋, 石蜡切片 (Leica RM2135, 厚度 4 μm), 常规脱蜡至水。将切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 予微波炉 (美的 W7022J) 加热至沸腾后断电, 间隔 5 min 后重复 1 次, 冷却至室温, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 加 3% 过氧化氢室温静置 10 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 滴加正常山羊血清封闭液室温下封闭 30 min, 滴加 1:200 稀释后的 ERp29 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司) 50 μl /片, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 第 2 天取出室温下复温 10 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 滴加辣根过氧化物酶标记二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, DAB 染色 5~10 min, 在 BX51 型显微镜 (日本奥林巴斯) 下观察把握染色程度, 自来水冲洗 10~15 min, 苏木精复染, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封片, 烤片, 显微镜拍照, 读片, 记录染色结果, 阴性对照用 PBS 代替一抗。

1.3 结果判定 ERp29 免疫组织化学染色的判定以胞质中出现棕黄色颗粒为表达阳性, 并用以下标准评价表达程度: 着色强度评分: 0 分, 无染色; 1 分, 轻度染色; 2 分, 中度染色; 3 分, 重度染色。阳性细胞计数百分比评分: 0 分, 阳性细胞 $< 5\%$; 1 分, 阳性细胞 $5\% \sim 25\%$; 2 分, 阳性细胞 $26\% \sim 50\%$; 3 分, 阳性细胞 $51\% \sim 75\%$; 4 分, 阳性细胞 $> 75\%$ 。

2017-09-19 接收

基金项目: 2016 年安徽省公益性技术应用研究联动计划项目 (编号: 1604f0804018); 铜陵市卫计委科研项目 (编号: 卫科研 201503)

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属省立医院消化内科, 合肥 230001

² 安徽医科大学铜陵临床学院消化内科, 铜陵 244000

作者简介: 檀祝利, 女, 硕士研究生;

丁西平, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: bladehall@163.com

评分结果为着色强度评分与阳性细胞百分比评分乘积,0~2分判定为阴性,2分以上为阳性(2~4分为弱阳性,5~8分为中等阳性,9~12分为强阳性)。免疫组化结果判定过程中由两位高年资病理医师分别评分,最后取平均得分记录并统计。

1.4 统计学处理 所有数据在 SPSS 22.0 版软件下进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。比较结直肠癌肿瘤组织和癌旁组织间 ERp29 免疫组化染色评分是否存在显著性差异时,采用配对 t 检验法进行统计分析。比较结直肠癌肿瘤组织和癌旁组织间 ERp29 染色强度是否存在统计学差异时,采用配对样本的 Wilcoxon 秩和检验法进行统计分析。比较结直肠癌肿瘤组织中 ERp29 表达阳性或阴性病例间,临床资料及病理特征是否存在差异显著性时,采用 Pearson χ^2 检验进行统计分析,当某一项理论频数存在 $1 < \text{理论频数} T \leq 5$ 的情况时,采用连续校正的 χ^2 检验进行统计分析,当某一项理论频数存在理论频数 $T \leq 1$ 时,采用 Fisher 精确检验法进行统计分析。

2 结果

2.1 ERp29 在结直肠癌组织中的表达 共搜集 62 例结直肠癌组织标本,每例标本中癌组织及癌旁组织均行 ERp29 免疫组化染色,癌组织中棕黄色染色强度及范围明显低于癌旁组织(图 1)。读片评分后统计数据,癌组织组评分均值 0.93,标准差 1.01,癌旁组织组评分均值 4.032,标准差 2.044,62 对数据进行配对 t 检验,差异有统计学意义($t = 12.87, P < 0.0001$),癌组织 ERp29 表达阳性 24(38.70%) 例,

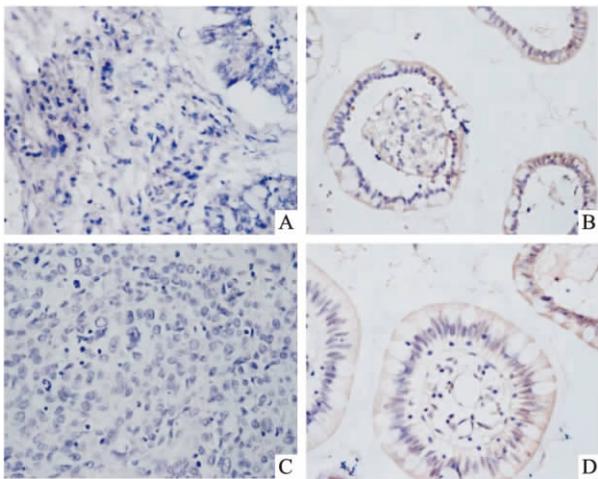


图 1 结直肠癌组织与癌旁组织 ERp29 的表达 SP×400

A、C: ERp29 在结直肠癌组织中的表达; B、D: ERp29 在癌旁组织中的表达

癌旁组织 58(93.50%) 例(图 2)。对癌组织及癌旁组织 ERp29 不同表达强度构成比进行对比分析,无染色癌组织 23 例(37.10%),癌旁组织 5 例(8.06%);轻度染色癌组织 30 例(48.39%),癌旁组织 11 例(17.74%);中度染色癌组织 8 例(12.90%),癌旁组织 27 例(43.55%);重度染色癌组织 1 例(1.61%),癌旁组织 19 例(30.65%),癌组织中 ERp29 蛋白染色强度与对应癌旁组织中 ERp29 蛋白染色强度差异有统计学意义($Z = -6.82, P < 0.0001$) (图 3)。

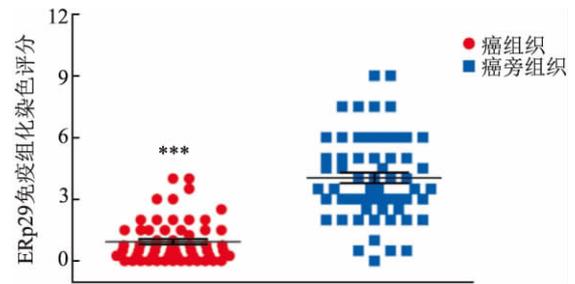


图 2 结直肠癌组织与癌旁组织 ERp29 表达差异统计与癌旁组织比较: *** $P < 0.0001$

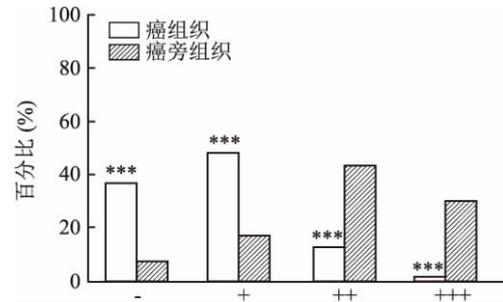


图 3 结直肠癌组织与癌旁组织 ERp29 不同表达强度构成比比较 -、+、++、+++ : 无、轻度、中度、重度染色; 与癌旁组织比较: *** $P < 0.0001$

2.2 结直肠癌 ERp29 表达与临床及病理特征关系

62 例癌组织中 ERp29 表达阳性 24(38.70%) 例,阴性 38(61.30%) 例,分为阳性组和阴性组,再依据性别、年龄、肿瘤直径、分化程度、T 分期、TNM 分期和淋巴结转移情况判断是否存在差异(表 1),采用 χ^2 检验方法进行统计分析,其中不同 ERp29 表达水平时,肿瘤的 TNM 分期以及淋巴结转移情况差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

所有的真核细胞中均存在内质网,其是一种复杂的膜系统,由广泛联结的膜性管道结构、囊或池构

表1 结直肠癌 ERp29 表达与临床及病理特征的关系

项目	n	ERp29 表达		χ^2 值	P 值
		阳性	阴性		
性别				0.04	0.84
男性	32	12	20		
女性	30	12	18		
年龄(岁)				0.84	0.36
≥ 60	38	13	25		
< 60	24	11	13		
肿瘤直径(cm)				1.05	0.31
≥ 5	36	12	24		
< 5	26	12	14		
分化程度				3.03	0.08
中低	44	14	30		
高	18	10	8		
T 分期				0.49	0.48
T1、T2	37	13	24		
T3、T4	25	11	14		
TNM 分期				12.80*	<0.05
I、II	11	10 [#]	1		
III、IV	51	14	37		
淋巴结转移				49.97	<0.05
有	39	2	37		
无	23	22	1		

注: * 为校正 χ^2 值; # 为 $1 \leq$ 理论频数 ≤ 5

成,可把不同的分子运输到细胞内的不同位置或细胞表面^[3-4]。内质网内含有大量具有蛋白合成和促成熟的分子伴侣,其中含有硫氧还蛋白结构域的蛋白二硫键异构酶样蛋白质,具有氧化还原、异构酶及分子伴侣功能。ERp29 可以使双半胱氨酸模体结构的活性中心失活,从而失去氧化还原活性^[5]。ERp29 在哺乳动物组织中分布广泛且表达丰富,其有 N 端和 C 端两个结构域,N 端结构域参与二聚化作用^[5],C 端结构域与底物结合以及分泌相关^[6]。ERp29 的蛋白分泌功能已经在细胞水平进行了充分研究^[7]。在非折叠蛋白质反应和将已合成的分泌蛋白从内质网转运至高尔基体的过程中,ERp29 均参与其中并扮演着重要角色^[8]。已有相关研究报告 ERp29 在肿瘤中可以起到抑制性作用,并在动物实验中验证了 ERp29 的抑癌作用,在胰腺导管腺癌^[9]、乳腺癌、肺癌及胆囊癌中显示肿瘤组织中 ERp29 的表达水平与肿瘤的进展呈负相关性^[10]。但相关研究^[11-13]显示,ERp29 可能与肿瘤的发生发展呈正相关性,即 ERp29 可能发挥着促癌作用。因此,ERp29 到底是发挥促癌作用还是抑癌作用尚存在一定的争议^[14],不同状态、不同环境、不同组织类型的肿瘤中 ERp29 的表达或许会有较大差异,因此本研究重点探讨结直肠癌患者中 ERp29 表达与临床特征的关系,以期对结直肠癌机制进一步深入研

究提供基础。

本研究中,针对 62 对结直肠癌患者的癌组织及癌旁组织均进行了 ERp29 免疫组化染色,显示癌组织中 ERp29 的表达阳性率为 38.7%,癌旁组织表达阳性率为 93.5%,癌组织中 ERp29 的表达水平明显低于相应癌旁组织,提示 ERp29 可能具有抑癌作用。进一步分析 24 例癌组织中 ERp29 阳性的病例发现,其染色强度多为轻度染色,而 58 例癌旁组织中 ERp29 阳性的病例多为中度和重度染色,这进一步说明,ERp29 表达水平的高低与肿瘤的某种恶性表型呈负相关性。随后根据 ERp29 表达水平,将 62 例患者分为 ERp29 阳性组和阴性组,两组间年龄、性别、肿瘤 ϕ 、分化程度、T 分期的构成比差异无统计学意义,ERp29 阴性组的 TNM 分期 III 期及 IV 期的构成比要高于阳性组,阴性组淋巴结转移阳性的构成比要高于阳性组。通过初步探讨 ERp29 表达与临床及病理特征的关系显示,ERp29 可能与肿瘤分期和淋巴结转移存在相关性,当 ERp29 表达下降时,肿瘤转移侵袭的能力可能会增强,但其间相互调控关系及内在机制尚需进一步深入研究。

近期关于胰腺导管腺癌的研究^[9]显示,ERp29 表达水平下降时,胰腺导管腺癌患者肿瘤分期更晚,出现淋巴结浸润和转移的比率更高,预后更差,本研究结果与之类似。当内质网功能稳态被打破后,常导致 DNA 损伤或氧化应激状态,易导致肿瘤发生,ERp29 在其中起着一定的作用,但其机制尚未明确^[2]。其他相关研究^[15]显示,当 ERp29 表达水平升高时,间质上皮化水平也随之显著,上皮标志物如 E-cadherin、CK-19 表达增加,间质标志物如波形蛋白和纤维连接蛋白表达水平下降。而上皮间质化水平增加是肿瘤侵袭转移能力增强的重要标志,ERp29 水平增高 MET 水平随之增高则可逆转 EMT 效应,抑制肿瘤细胞转移侵袭的能力,所以,ERp29 可能是通过影响 EMT 效应来改变肿瘤细胞恶性表型,其具体内在机制尚需进一步研究。

综上所述,本研究显示结直肠癌患者癌组织中 ERp29 的表达水平低于癌旁组织,ERp29 表达水平越低,肿瘤 TNM 分期可能越晚,更易于发生转移,ERp29 的表达水平高低可为评估肿瘤转移倾向及预后情况提供一定参考价值。

参考文献

- [1] 陈万青,郑荣寿,张思维,等. 2012 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中国肿瘤, 2016,25(1):1-8.

- [2] Zhang D, Richardson D R. Endoplasmic reticulum protein 29 (erp29): An emerging role in cancer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011,43(1): 33–6.
- [3] Braakman I, Bulleid N J. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum [J]. *Annu Rev Biochem*, 2011,80(1): 71–99.
- [4] Schonthal A H. Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress signaling in cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013,85(5): 653–66.
- [5] Barak N N, Neumann P, Sevana M, et al. Crystal structure and functional analysis of the protein disulfide isomerase-related protein erp29 [J]. *J Mol Biol*, 2009,385(5): 1630–42.
- [6] Rainey-Barger E K, Mkrchian S, Tsai B. The c-terminal domain of erp29 mediates polyomavirus binding, unfolding, and infection [J]. *J Virol*, 2009,83(3): 1483–91.
- [7] Baryshev M, Sargsyan E, Mkrchian S. Erp29 is an essential endoplasmic reticulum factor regulating secretion of thyroglobulin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006,340(2): 617–24.
- [8] Mkrchian S, Sandalova T. Erp29, an unusual redox-inactive member of the thioredoxin family [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006,8(3-4): 325–37.
- [9] Zhang K, Yao H, Yang Z, et al. Comparison of ilk and erp29 expressions in benign and malignant pancreatic lesions and their clinicopathological significances in pancreatic ductal adenocarcinomas [J]. *Clin Transl Oncol*, 2016,18(4): 352–9.
- [10] Bambang I F, Xu S, Zhou J, et al. Overexpression of endoplasmic reticulum protein 29 regulates mesenchymal-epithelial transition and suppresses xenograft tumor growth of invasive breast cancer cells [J]. *Lab Invest*, 2009,89(11): 1229–42.
- [11] Deng Y J, Tang N, Liu C, et al. Clic4, erp29, and smac/diablo derived from metastatic cancer stem-like cells stratify prognostic risks of colorectal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2014,20(14): 3809–17.
- [12] Chen S, Zhao Y, Zhang Y, et al. Fucoidan induces cancer cell apoptosis by modulating the endoplasmic reticulum stress cascades [J]. *PLoS One*, 2014,9(9): e108157.
- [13] Fan N J, Gao J L, Liu Y, et al. Label-free quantitative mass spectrometry reveals a panel of differentially expressed proteins in colorectal cancer [J]. *Biomed Res Int*, 2015,2015: 365068.
- [14] Chen S, Zhang D. Friend or foe: Endoplasmic reticulum protein 29 (erp29) in epithelial cancer [J]. *Febs Open Bio*, 2016,5(1): 91–8.
- [15] Bambang I F, Lee Y K, Richardson D R, et al. Endoplasmic reticulum protein 29 regulates epithelial cell integrity during the mesenchymal-epithelial transition in breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 2013,32(10): 1240–51.

Expression and clinical significance of ERp29 in colorectal cancer

Tan Zhuli^{1,2}, Yu Hai², Ding Xiping¹

(¹*Dept of Gastroenterology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;*

²*Dept of Gastroenterology, Tongling Clinical College of Anhui Medical University, Tongling 244000)*

Abstract Objective To investigate the expression and clinical significance of endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29) in colorectal cancer. **Methods** Paraffin-embedded sections from 62 cases of colorectal cancer tissues were obtained and used for immunohistochemical staining of ERp29. The clinical and pathological data of various levels of ERp29 in patients with colorectal cancer were analyzed to determine if there was a significant difference. **Results** The expression of ERp29 in 62 cases of colorectal cancer tissues, 24 (38.7%) cases were positive and 38 (61.3%) cases were negative. The expression of ERp29 in 62 cases of adjacent tissues, 58 (93.5%) cases were positive and 4 (6.5%) cases were negative. There was a significant difference in TNM classification and lymph node metastasis between ERp29 positive group and ERp29 negative group ($P < 0.05$). **Conclusion** Colorectal cancer tissues have significantly lower levels of ERp29 than adjacent tissues. ERp29 may be helpful to evaluate the metastatic proclivity and prognosis of colorectal cancer.

Key words colorectal cancer; ERp29; endoplasmic reticulum; metastasis