

跨膜丝氨酸蛋白酶 4 在胃癌组织中的表达及其临床意义

左宁, 何新阳, 朱海, 朱海星, 金荣, 陈志强, 刘成业

摘要 目的 探索跨膜丝氨酸蛋白酶 4 (TMPRSS 4) 在胃癌组织中的表达情况及与胃癌病理学特征的关系, 以及明确 TMPRSS 4 表达与胃癌临床预后的关系。方法 使用 RT-qPCR 技术和免疫组化检测 TMPRSS 4 在 115 例胃癌组织样本(胃癌及癌旁组织)中的表达情况; 分析 TMPRSS 4 表达水平与胃癌病理学特征和预后的关系。结果 RT-qPCR 结果提示胃癌组织中的 TMPRSS 4 mRNA 水平显著高于其在匹配癌旁组织中的表达水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。免疫组化结果显示 TMPRSS 4 在胃癌组织中的表达比在良性组织高 (56.5% vs 19.5%, $P < 0.001$)。TMPRSS 4 的过度表达与胃肿瘤的分化程度、淋巴道转移及 TNM 分期肿瘤显著相关 ($P < 0.01$)。TMPRSS 4 是影响胃癌总体生存率及无病生存率的独立因素。结论 TMPRSS 4 高表达与胃癌患者相关临床病理特征及患者的预后密切相关, TMPRSS 4 有可能作为一个常规的胃癌的生物标志物, 在一定程度上预测肿瘤的侵袭转移。

关键词 丝氨酸蛋白酶 4; 胃癌; 预后; PCR; 免疫组化

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)10-1521-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.023

胃癌是世界上最常见的消化道恶性肿瘤之一^[1-2]。然而, 由于早期胃癌症状缺乏特异性, 很难做到早期诊断和早期治疗。在国内, 绝大多数胃癌在确诊时已为进展期胃癌, 总体治疗效果不佳, 预后差。到目前为止, 胃癌患者的全身辅助治疗由预后因素引导, 包括肿瘤淋巴结转移 (tumor node metastasis, TNM) 分期、病理类型与癌胚抗原 (carcino-embryonic antigen, CEA)。但这些指标不能准确预测预后。所以, 还需要找到一些新的指标对这些患者的治疗和预后因素的预测进行优化。跨膜丝氨酸蛋白酶 4 (transmembrane protease, serine 4, TMPRSS 4) 是一种定位于细胞膜表面新型的 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶^[3-4], 高度表达在胰腺癌、乳腺癌、肺癌和甲状

腺癌组织中^[5-6]。然而, 目前在人类的癌症组织细胞中 TMPRSS 4 的生物学功能仍然不甚明确。该研究旨在探索 TMPRSS4 表达胃癌的进展的关系, 以及与胃癌临床预后的关系之间的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2014 年 7 月 ~ 2015 年 2 月 41 例胃癌患者冰冻组织标本, 取胃癌组织及癌旁正常组织 (距肿块距离 > 5 cm) 进行 PCR 检测。选取 2010 年 7 月 1 日 ~ 2012 年 7 月 1 日在安徽省立医院病理确诊为胃癌并接受胃癌根治性切除术的患者 115 例, 取对应癌旁组织进行自身对照, 肿瘤组织及癌旁组织经 4% 福尔马林浸泡固定、石蜡包埋, 进行免疫组化实验。胃癌患者包括男 62 例, 女 53 例; 年龄 38 ~ 82 岁, 中位年龄 55 岁。所有患者术前未接受新辅助放化疗。研究中总生存期 (overall survival, OS) 定义为手术日期和死亡日期之间的时间间隔。无病生存期 (disease-free survival, DFS) 时间定为手术日期和复发的日期之间的时间间隔。本研究经安徽医科大学附属安徽省立医院伦理委员会批准, 操作流程符合赫尔辛基宣言 1964 及其以后的修正案的原则。

1.2 主要试剂与仪器 TRIzol (美国 Invitrogen 公司); PCR 引物 (上海 Generay 公司); cDNA 合成试剂盒 (加拿大 Fermentas 公司); Tprofessional Thermo-cycler PCR 仪 (美国 Biometra 公司); 荧光定量 PCR 试剂盒 (德国 Thermo 公司, PIKOREAL 96); 免疫组化染色试剂盒、一抗兔抗人 TMPRSS 4 (美国圣克鲁斯公司); 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)。

1.3 RT-qPCR 检测 按照产品使用说明书, 对快速冷冻的胃癌组织和癌旁组织用 TRIzol 试剂处理, 提取组织总 RNA。选取 A_{260}/A_{280} 的紫外吸收度比值在 1.8 ~ 2.0 的提取样本进行实验。RT-qPCR 分别以 RNA 及其低聚物作为模板和引物, 用 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA 的第一链。随后, 取出 cDNA 作为荧光定量的模板, 分析扩增曲线、熔解曲线以及相对表达量。热循环参数如下: 预变性 95 °C、10

2017-05-03 接收

基金项目: 安徽省卫生厅医学科研课题 (编号: 13zc011)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院普外科, 合肥 230001

作者简介: 左宁, 男, 硕士研究生;

何新阳, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

hxy2333@126.com

min 其次是循环 35 次的解链温度 94 °C、1 min,退火温度 64 °C;延伸温度 72 °C、1 min。基因表达的定量分析以 GAPDH 的表达做对照。人类 TMPRSS 4 特异引物: 顺向 5'端引物: 5'-CACACATCATCT-TCTCGGTGACTTC-3'; 反向 3'端引物: 5'-CAGGT-CAGCATCCAGTACGACAA-3'; 引物长度: 463 bp。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 TMPRSS 4 表达水平。

1.4 免疫组织化学染色及其评价 组织切片(2 μm 厚)在二甲苯进行脱蜡和乙醇梯度置换后,放置在 120 °C 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中 15 min。先后用 0.3% 的 H₂O₂ 室温下孵育 10 min 阻断内源性过氧化物酶,非免疫性山羊血清室温孵育 15 min 以阻断非特异性免疫反应。随后,切片以免抗人 TMPRSS 4 初级抗体 4 °C 孵育过夜。用 PBS 洗涤后切片,用辣根过氧化物酶标记二抗孵育 30 min。最后,在切片上滴加新鲜配制的 DAB 溶液,显微镜下观察结果。根据标本的染色强度和分布对其表达水平半定量分析。阳性细胞百分率按如下标准进行评分: 0 (无阳性的肿瘤细胞) 1(<15% 阳性的肿瘤细胞), 2(15% ~ 50% 阳性的肿瘤细胞) 3(>50% 阳性肿瘤细胞)。在细胞质中,染色强度分级如下: 0(无染色) 1(弱阳性) 2(中度染色) 3(强阳性)。染色强度评分和阳性染色率用来定义 TMPRSS 4 的表达水平: 0 ~ 2 分为低表达; 3 ~ 6 分为高表达。据此将选取的胃癌患者分为两组。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析。运用独立样本 *t* 检验分析 TMPRSS 4 基因在胃癌组织和相应的癌旁组织的 mRNA 表达水平差异。采用 χ^2 检验分析 TMPRSS 4 的表达与胃癌患者临床病理特征的关系; 使用 Kaplan-Meier 曲线分析 TMPRSS 4 的异常表达与胃癌患者 OS 的关系。运用单因素分析及 Cox 回归进入多因素分析模型明确变量间的相关关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TMPRSS 4 在胃癌和癌旁组织中的基因表达

运用 RT-PCR 技术检测 TMPRSS 4 基因在胃癌组织和相应的癌旁组织的 mRNA 表达水平。研究显示 TMPRSS 4 基因的 mRNA 水平在胃癌组织中明显高于相匹配的癌旁组织,表达水平分别是 (0.86 ± 0.31) 、 (0.41 ± 0.15) , 差异有统计学意义($t = 15.329, P < 0.01$)。见图 1。

2.2 TMPRSS 4 蛋白在胃癌组织和癌旁组织中的表达 运用免疫组织检测 TMPRSS 4 蛋白在癌组织

和癌旁组织中的表达水平。TMPRSS 4 在胃癌组织中的阳性率为 56.5% (65/115), 在癌旁组织中的阳性率为 19.5% (8/41), 差异有统计学意义($\chi^2 = 18.758, P < 0.001$)。见图 2。

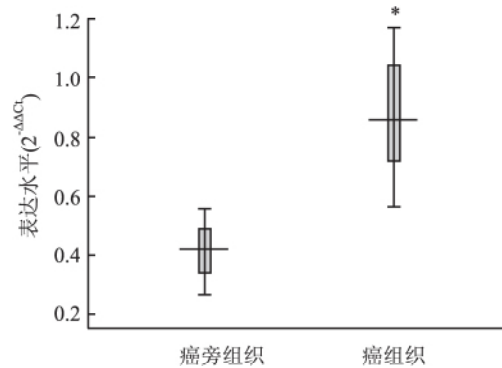


图 1 TMPRSS 4 基因表达水平分布与癌旁组织比较: * $P < 0.05$

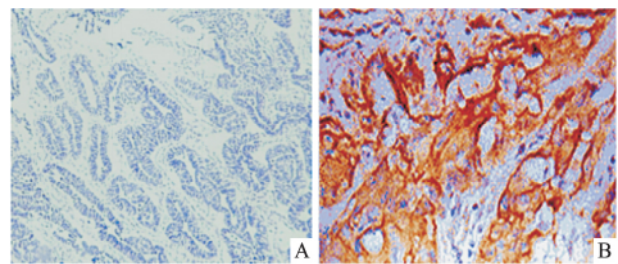


图 2 TMPRSS 4 在胃癌组织和癌旁组织的表达 SP × 400
A: 癌旁组织中的阴性表达; B: 胃癌组织中的阳性表达

2.3 TMPRSS 4 蛋白表达水平与胃癌病理学特征

免疫组化方法检测 115 例胃癌患者癌组织中 TMPRSS 4 蛋白表达水平,并分析其与胃癌病理学特征,包括年龄、性别、肿瘤分级、肿瘤大小、淋巴结转移节点。本研究结果表明, TMPRSS 4 蛋白的高表达与肿瘤分化、淋巴结转移和 TNM 分期相关($P = 0.020, P < 0.001, P = 0.026$), 但与患者的年龄、性别、肿瘤大小、血清 CEA 水平差异无统计学意义。见表 1。

2.4 TMPRSS 4 蛋白表达水平与胃癌患者预后的关系

通过绘制以 TMPRSS 4 表达水平为因变量的 Kaplan-Meier 生存曲线(图 3)。结果显示: 高表达 TMPRSS 4 患者与低表达相比有一个较短的 OS($P < 0.05$)。本研究表明, TMPRSS 4 高表达患者的生存时间显著短于低表达组($\chi^2 = 30.196, P < 0.05$)。采用单因素分析, 结果显示淋巴结转移、TNM 分期、TMPRSS 4 的表达与 OS 相关($P < 0.001$), 而患者年龄、性别等与 OS 无明显相关(表 2)。此外, Cox 多

因素分析显示,淋巴结转移、TNM 分期、TMPRSS 4 表达异常可作为胃癌患者 DFS 独立预测因素(表 3)。

表 1 TMPRSS 4 在胃癌组织中的表达与胃癌患者临床病理学特征的关系

| 项目 | TMPRSS 4 | | χ^2 值 | P 值 |
|--------|----------|--------|------------|-------|
| | 高表达(n) | 低表达(n) | | |
| 年龄(岁) | | | 0.761 | 0.783 |
| ≤50 | 27 | 37 | | |
| >50 | 28 | 23 | | |
| 性别 | | | 0.104 | 0.951 |
| 男 | 31 | 33 | | |
| 女 | 25 | 26 | | |
| 分化程度 | | | 6.494 | 0.039 |
| 高 | 1 | 8 | | |
| 中 | 12 | 15 | | |
| 低 | 34 | 27 | | |
| TNM 分期 | | | 13.815 | 0.003 |
| I | 2 | 7 | | |
| II | 13 | 18 | | |
| III | 31 | 21 | | |
| IV | 9 | 14 | | |
| 淋巴结转移数 | | | 8.128 | 0.017 |
| N1 | 2 | 11 | | |
| N2 | 17 | 23 | | |
| N3 | 36 | 26 | | |

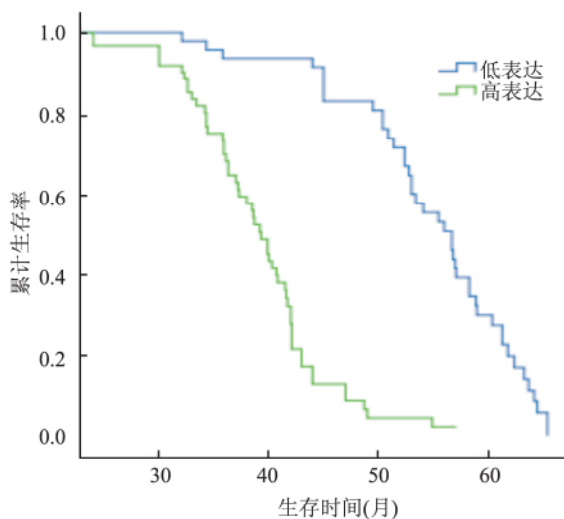


图 3 TMPRSS 4 表达与胃癌患者预后生存曲线

3 讨论

TMPRSS 4 是由 Wallrapp et al^[6] 于 2000 年在胰腺癌中发现的一种属于一个膜型丝氨酸蛋白酶家族(MT-SP)的 II 型跨膜蛋白丝氨酸蛋白。TMPRSS 4 最开始被误认为是蛋白酶 TMPRSS 3,后来因为被发

表 2 单因素分析淋巴结转移、TNM 分期、TMPRSS 4 的表达与 OS 相关性

| 变量 | 参数估计 | 标准误 | 标准化回归指数 | t 值 | P 值 |
|----------|---------|-------|---------|--------|-------|
| TMPRSS 4 | -61.981 | 2.255 | - | 0.000 | 0.000 |
| 病理分期 | -3.288 | 0.884 | -0.300 | -3.718 | 0.000 |
| 淋巴结转移 | -4.317 | 0.833 | -0.418 | -5.184 | 0.000 |
| 年龄 | 0.126 | 0.096 | 0.112 | -1.321 | 0.195 |
| 性别 | -0.018 | 0.013 | 0.110 | -1.397 | 0.171 |

表 3 Cox 多因素分析胃癌患者 DFS 的独立预测因子

| 项目 | 参数估计 | SE 值 | Wald 值 | df | P 值 | RR(95% CI) |
|----------|--------|-------|--------|----|-------|----------------------|
| TMPRSS 4 | 2.403 | 0.322 | 55.628 | 1 | 0.009 | 11.657(5.880~20.793) |
| TNM 分期 | -3.250 | 0.994 | 10.721 | 1 | 0.001 | 0.390(0.835~1.404) |
| 淋巴结 | 0.071 | 0.030 | 5.698 | 1 | 0.018 | 1.075(0.863~10.339) |

现其基因是位于染色体的 11 q 23.3 位置,包含 4 个结构域:一个短的 N-末端胞质结构域、一个信号锚、一个单不饱和低密度脂蛋白受体结构域、催化蛋白酶结构域和一组清道夫受体域^[7],具有介导一种类似胰蛋白酶的活性的功能,因而被命名为 TMPRSS。

TMPRSS 4 在胰腺癌中表达显著上调并已建议为甲状腺恶性肿瘤的诊断标志物^[8]。Jia et al^[9] 发现在原发性肝细胞癌下调 TMPRSS 4 可以降低这些癌细胞的转移能力。Larzabal et al^[10] 发现 TMPRSS 4 在非小细胞肺癌中过度表达,并且其高表达鳞癌不良预后相关。Liang et al^[11] 运用免疫组化分析乳腺癌组织中 TMPRSS 4 的表达与临床病理参数的相关性,证明 TMPRSS 4 可能在乳腺癌进展中发挥重要作用。同样,在本研究中也显示在胃癌组织中 TMPRSS 4 表达显著高于正常胃组织。TMPRSS 4 的高表达与肿瘤分化程度、高 TNM 分期和淋巴结转移密切相关。TMPRSS 4 表达、肿瘤分化程度、淋巴结转移、高 TNM 分期与患者的 OS 和 DFS 相关。多因素 Cox 回归分析显示,TMPRSS 4 可作为胃癌的独立预后因子,这表明高或低的 TMPRSS 4 的表达可以预测胃癌患者预后不良。研究人员发现 TMPRSS 4 在 EMT 过程中的重要作用^[12],高表达 TMPRSS 4 可能通过下调 E-cadherin 的表达导致肿瘤的侵袭、迁移、转移和黏附等生物学行为^[13]。

综上所述,本研究数据表明 TMPRSS 4 表达在胃癌组织中比在良性组织中较高。TMPRSS 4 与患者的预后相关。所以本研究建议 TMPRSS 4 作为一个常规的胃癌的生物标志物,其分子机制仍需进一步研究。

(感谢所有参与本研究与临床工作者、专家和

捐助者。本研究论文作者在此申明: 本文无任何涉及此论文的版权利益冲突。

参考文献

- [1] 黎军, 熊建萍. 胃癌分子靶向治疗研究新进展[J]. 中国肿瘤临床, 2015, 42(23): 1118-23.
- [2] Shridhar R, Almhanna K, Hoffe S E, et al. Increased survival associated with surgery and radiation therapy in metastatic gastric cancer: a Surveillance, Epidemiology, and End Results database analysis[J]. *Cancer*, 2013, 119(3): 1636-42.
- [3] Ohler A, Becker-Pauly C. TMPRSS 4 is a type II transmembrane serine protease involved in cancer and viral infections[J]. *Biol Chem*, 2012, 393(9): 907-14.
- [4] 孙思栢, 吴继峰. 胃癌组织中跨膜丝氨酸蛋白酶 4 的表达及其与上皮转化的关系[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(3): 358-62.
- [5] Liang B, Wu M, Bu Y, et al. Prognostic value of TMPRSS 4 expression in patients with breast cancer[J]. *Med Oncol*, 2013, 30(2): 497-503.
- [6] Wallrapp C, Hähnel S, Müller-Pillasch F, et al. A novel transmembrane serine protease (TMPRSS3) overexpressed in pancreatic cancer[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(10): 2602-6.
- [7] Szabo R, Bugge T H. Type II transmembrane serine proteases in development and disease[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(6-7): 1297-316.
- [8] Kebebew E, Peng M, Reiff E, et al. ECM1 and TMPRSS 4 are diagnostic markers of malignant thyroid neoplasms and improve the accuracy of fine needle aspiration biopsy[J]. *Ann Surg*, 2012, 242(3): 353-61.
- [9] Jia J B, Wang W Q, Sun H C, et al. A novel tripeptide, tyrosine-leucine, inhibits irradiation-induced invasiveness and metastasis of hepatocellular carcinoma in nude mice[J]. *Invest New Drugs*, 2011, 29(5): 861-72.
- [10] Larzabal L, Nguewa P A, Pio R, et al. Overexpression of TMPRSS 4 in non-small cell lung cancer is associated with poor prognosis in patients with squamous histology[J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(10): 1608-14.
- [11] Liang B, Wu M, Bu Y F, et al. Prognostic value of TMPRSS 4 expression in patients with breast cancer[J]. *Med Oncol*, 2013, 30(2): 497.
- [12] De Craene B, Bex G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(2): 97-110.
- [13] Dai W, Zhou Q, Xu Z, et al. Expression of TMPRSS 4 in patients with salivary adenoid cystic carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognosis[J]. *Med Oncol*, 2013, 30(4): 749.

The expressed of TMPRSS 4 in gastric cancer tissues and its clinical significance

Zuo Ning, Zhu Haixing, Zhu Hai, et al.

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

Abstract Objective To investigate the relationship between the expression of transmembrane serine protease 4 (TMPRSS 4) and the clinicopathological features of gastric cancer (GC), and to clarify the relationship between TMPRSS 4 expression and the prognosis of GC. **Methods** RT-qPCR and immunohistochemical methods were used to detect the expression of TMPRSS 4 in 115 cases of GC, and the relationship between the expression level of TMPRSS 4 in tumor tissue and the clinicopathological characteristics of GC was studied. In addition, the impact of TMPRSS 4 expression on the survival of GC was also analyzed. **Results** RT-qPCR results revealed that TMPRSS 4 mRNA was higher in gastric cancer tissues than those in normal gastric tissues ($P < 0.05$). The immunohistochemical results also indicated that the expression of TMPRSS 4 in gastric cancer tissues was higher than in benign tissue (56.5% vs 19.5%, $P < 0.001$). In addition, TMPRSS 4 was also found positively correlated with gastric cancer differentiation, lymph node metastasis and high TNM staging of tumor ($P < 0.01$). TMPRSS 4 was an independent factor that affects the overall survival rate and disease-free survival rate of gastric cancer patients. **Conclusion** High expression of TMPRSS 4 is closely related to the clinicopathological features of patients with gastric cancer and the prognosis of patients. TMPRSS 4 may be a biomarker of routine gastric cancer and can predict tumor invasion and metastasis to a certain extent.

Key words transmembrane serine protease 4; gastric cancer; prognostic factor; PCR; immunohistochemistry