

胃癌组织中跨膜丝氨酸蛋白酶 4 的表达 及其与上皮间质转化的关系

孙思柏¹ 吴继锋^{1,2}

摘要 目的 探讨跨膜丝氨酸蛋白酶 4 (TMPRSS4) 在人胃癌组织中的表达与临床病理特征之间的关系及对判断患者预后的意义, 进一步研究其与上皮间质转化 (EMT) 的关系。方法 采用免疫组织化学方法 (SABC 法) 同时检测 100 例胃腺癌标本及其癌旁组织中 TMPRSS4、波形蛋白 (Vimentin)、上皮型钙黏蛋白 (E-cadherin) 的表达。结果 在胃癌组织中 TMPRSS4、E-cadherin、Vimentin 的阳性率分别为 47%、45%、37%, 其癌旁组织阳性率分别为 9%、30%、4%。

3 种蛋白在肿瘤组织和对应癌旁组织中的表达率之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。TMPRSS4 蛋白的表达与胃癌患者淋巴结转移、TNM 分期有关 ($P < 0.05$), 而与患者的性别、年龄、肿瘤组织大小、分化程度、浸润深度无显著相关性 ($P > 0.05$)。TMPRSS4 蛋白表达阳性患者的 5 年生存率显著低于其阴性表达的患者。TMPRSS4 与 E-cadherin 蛋白表达呈负相关 ($r_s = -0.207, P = 0.038$), 与 Vimentin 蛋白表达呈正相关 ($r_s = 0.233, P = 0.020$)。结论 TMPRSS4 蛋白在人胃癌组织中的表达与肿瘤的生物学特性密切相关, 并对预测肿瘤的侵袭转移有一定的参考价值。TMPRSS4 可能通过降低 E-cadherin 的表达诱导 EMT 的发生来促进胃癌细胞的侵袭和转移。

2013-12-19 接收

基金项目: 安徽省高校省级自然科学研究重点项目 (编号: KJ2012A159); 国家临床重点专科建设项目经费资助

作者单位: ¹安徽医科大学基础医学院病理学教研室, 合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院病理科, 合肥 230022

作者简介: 孙思柏, 男, 硕士研究生;

吴继锋, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: aydwj@163.com

关键词 胃肿瘤; 丝氨酸蛋白酶 4; 上皮间质转化; 免疫组织化学

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)03-0358-05

Expression and clinical significance of MIF and VEGF in bladder urothelial carcinoma

Zhang Jun, Wu Kui, Xiao Jun, et al

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

Abstract Objective To investigate the expression and clinical significance of macrophage migration inhibitor factor (MIF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in bladder transitional cell carcinoma (BTCC). **Methods** RT-qPCR and immunohistochemical method were employed to detect the expression of MIF and VEGF in BTCC and normal bladder tissues. Then, we analyzed the relationship between the MIF and VEGF expression and various clinicopathologic parameters according to the immunohistochemical results. **Results** The results of RT-qPCR revealed that both MIF mRNA and VEGF mRNA were higher in BTCC tissues than those in normal bladder tissues ($P < 0.05$), and higher in invasive BTCC than those in non-invasive BTCC tissues ($P < 0.05$). The immunohistochemical results indicated that the MIF and VEGF expressions were increased in BTCC tissues; 53/75 (70.6%) and 46/75 (61.3%) cancer tissues showed MIF and VEGF positive, obviously higher than those in normal bladder tissues ($P < 0.05$). Besides, we also found that the high level of MIF and VEGF were positively correlated with lymph node metastasis, recurrent, pathological grade and clinical stage. However, there were no significant correlations between their expression and other clinicopathologic parameters, such as gender, age, tumor size and multiple tumorigenesis in BTCC patients. **Conclusion** MIF and VEGF overexpressions may play an important role in the occurrence and progression of BTCC. MIF may also have an effect on the VEGF expression.

Key words RT-qPCR; macrophage migration inhibitory factor; bladder urothelial carcinoma; vascular endothelial growth factor; lymph node metastasis; microvascular density

胃癌的发病机制尚不明确,其病死率居高不下的主要原因是胃癌细胞的侵袭和转移^[1]。跨膜丝氨酸蛋白酶 4(TMPRSS4)是 Wallrapp et al^[2]在胰腺癌中发现,并进一步发现其表达与胰腺癌细胞株的转移潜能呈正相关,从而猜测其与肿瘤的侵袭有关。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞失去细胞间的黏附力、基底部的极性以及特异性蛋白的表达从而使其获得运动性、梭形细胞样改变和表达间质细胞特异性蛋白的过程,这是细胞表型的改变而并非是细胞类型的改变^[3]。Jung et al^[4]发现高表达的 TMPRSS4 可以诱导 E-钙黏蛋白(E-cadherin)介导的细胞间的黏附力缺失,导致 EMT 的发生,其中包括形态学的改变、肌动蛋白的重组和间质细胞特异性蛋白表达的上调,从而增加肿瘤细胞的侵袭和转移。该研究主要通过免疫组织化学法检测胃癌组织中 TMPRSS4 的表达,分析其与临床病理参数间的相关性,并探讨其对判断患者预后的意义;进一步探讨 TMPRSS4 的表达与 EMT 相关蛋白 E-cadherin、波形蛋白(Vimentin)之间的关系。从而推测 TMPRSS4 可能通过诱导 EMT 从而发生肿瘤侵袭和转移的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 收集 2003 年 1 月~2005 年 12 月安徽医科大学第一附属医院普外科胃癌手术切除标本 100 例,其中男 64 例,女 36 例,年龄 29~76(60.32±11.65)岁;分化程度:高分化 6 例,中分化 38 例,低分化 56 例;肿瘤大小分级: $\phi < 5$ cm 者 45 例, $\phi \geq 5$ cm 者 55 例;浸润深度分级:未浸润至浆膜者 15 例,浸润至浆膜者 85 例。患者均为初治病例,术前未经任何化疗及放疗,术后均经病理医师证实为胃癌。取对应癌旁组织进行自身对照,肿瘤组织及癌旁组织经 4% 福尔马林浸泡固定并经石蜡包埋,连续 3 μ m 切片。所有患者临床资料完整,并对全部患者进行随访,随访截止日期为 2010 年 12 月。

1.1.2 主要试剂 兔抗人 TMPRSS4(11283-1-AP)一抗购于美国 Protein Tech 公司;鼠抗人 Vimentin(ZM-0260)一抗、鼠抗人 E-cadherin(ZM-0092)一抗、二抗试剂盒、DAB 显色液均购于北京中杉金桥公司;常规免疫组化试剂、冰箱等由安徽医科大学病理实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化染色 对所有切片进行免疫组化染色,方法采用免疫组化 SABC 法,所有步骤按照说明书进行。石蜡切片经过脱蜡水化后, TMPRSS4 及 E-cadherin 一抗采用抗原高压热修复, Vimentin 一抗采用抗原微波热修复,过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,山羊血清封闭后滴加一抗。其中 Vimentin 及 E-cadherin 稀释浓度均为 1:100, TMPRSS4 的稀释浓度为 1:50。然后放入冰箱 4℃ 过夜,滴加二抗,滴加 abc 复合物, DAB 显色,苏木精复染。用阳性组织切片作为阳性对照,用 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 结果判定 TMPRSS4 蛋白在胃癌组织中主要定位于细胞膜上,少量定位于胞质内, E-cadherin 蛋白在胃癌组织中主要定位于细胞膜和(或)细胞质内。以上两种蛋白皆以细胞质和(或)细胞膜内出现棕色或棕褐色为阳性; Vimentin 以细胞质出现棕黄色或棕色为阳性。采用半定量积分法判断阳性结果^[5],阳性细胞染色强度评分如下:无染色或基本无色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;阳性细胞所占比例评分:每例随机选择 5 个高倍镜($\times 400$)视野下观确定阳性细胞数,计算阳性细胞所占胃腺上皮细胞的百分率,取平均数,其中细胞阳性率 $< 10\%$ 为 0 分, $10\% \sim 25\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 为 2 分, $51\% \sim 75\%$ 为 3 分, $> 75\%$ 为 3 分。两者相乘,乘积 ≤ 3 分记为阴性, > 3 分记为阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。采用 χ^2 检验分析 TMPRSS4 的表达与临床病理特征之间的关系,采用 Spearman 等级相关分析来检验 TMPRSS4 与 Vimentin 及 E-cadherin 之间的相关性,单因素生存分析采用 Log-Rank 检验并用 Kaplan-Meier 法计算生存率。

2 结果

2.1 TMPRSS4、Vimentin 及 E-cadherin 在胃癌组织中的表达 100 例胃癌组织及癌旁正常组织免疫组化结果显示: TMPRSS4 和 E-cadherin 蛋白以细胞质和(或)细胞膜内出现棕色或棕褐色为阳性,其中 E-cadherin 在癌旁组织中的染色程度深,而在癌组织中染色程度较弱。Vimentin 以细胞质出现棕黄色或棕色为阳性,见图 1。100 例胃癌组织中 TMPRSS4、Vimentin 及 E-cadherin 的阳性率分别为 47%、37%、45%,其对应癌旁组织中的阳性率分别

为9%、4%、30%。肿瘤组织中的表达与癌旁组织差异有统计学意义($P < 0.05$) ,见表1。

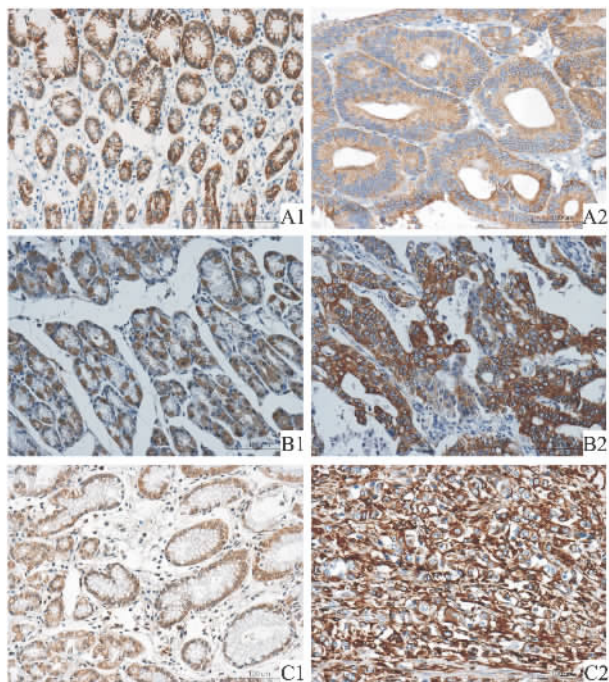


图1 胃癌及癌旁正常组织中 TMPRSS4、Vimentin、E-cadherin 蛋白的表达 SABC ×200

A: E-cadherin; B: TMPRSS4; C: Vimentin; 1: 癌旁组织; 2: 胃癌组织

表1 TMPRSS4、Vimentin、E-cadherin 在胃癌及癌旁组织中的阳性表达[n(%)]

组别	TMPRSS4 阳性	Vimentin 阳性	E-cadherin 阳性
胃癌组织	47(47)	37(37)	45(45)
癌旁组织	9(9)	4(4)	30(30)

2.2 TMPRSS4 的表达与临床病理特征之间的关系 TMPRSS4 的表达与胃癌患者的 TNM 分期和淋巴结转移相关($P < 0.05$) ,而与患者的年龄、性别、肿瘤组织的大小、分化程度及浸润深度无显著相关($P > 0.05$) ,见表2。

2.3 TMPRSS4 的表达与 Vimentin 及 E-cadherin 之间的关系 100 例胃癌组织中 Vimentin 及 E-cadherin 之间存在密切相关性。其中 TMPRSS4 与 Vimentin 呈正相关性($r_s = 0.233$, $P = 0.020$) ; TMPRSS4 与 E-cadherin 呈负相关性($r_s = -0.207$, $P = 0.038$) ,见表3。

2.4 TMPRSS4 的表达与胃癌患者预后的关系 TMPRSS4 阳性患者术后5年生存率明显低于阴性患者($\chi^2 = 15.175$, $P < 0.05$) ,见图2。

表2 TMPRSS4 的表达与胃癌临床病理参数的关系

临床病理参数	n	TMPRSS4		χ^2 值	P 值
		阳性	阴性		
性别					
男	64	28	36	0.754	0.385
女	36	19	17		
年龄(岁)					
<60	43	20	23	0.007	0.932
≥60	57	27	30		
肿瘤大小(cm)					
<5	45	17	28	2.793	0.071
≥5	55	30	25		
分化程度					
中、高分化	44	17	27	2.206	0.099
低分化	56	30	26		
浸润深度					
未至浆膜	15	5	13	2.802	0.094
至浆膜	85	42	43		
淋巴结转移					
有	63	35	28	5.003	0.025
无	37	12	25		
TNM 分期					
I + II	39	13	26	4.794	0.029
III + IV	61	34	27		

表3 胃癌组织中 TMPRSS4 的表达与 Vimentin、E-cadherin 之间的关系

TMPRSS4	Vimentin		E-cadherin	
	阳性	阴性	阳性	阴性
阳性	23	24	12	35
阴性	14	39	33	20

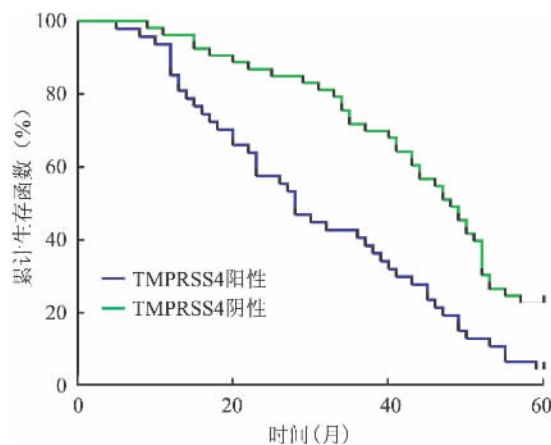


图2 TMPRSS4 阳性组与阴性组胃癌患者的 K-M 生存曲线

3 讨论

肿瘤细胞的侵袭性在肿瘤的转移过程中起着重要的作用。肿瘤细胞的侵袭是一种复杂的多相过程,包含3个步骤:细胞外基质黏附力的改变;降解细胞外基质蛋白,使肿瘤细胞从原发灶中迁移出来;

肿瘤细胞直接从肿块的缝隙中迁移^[6]。蛋白水解酶的失调是肿瘤发生转移的一个标志性事件,这其中丝氨酸蛋白酶是主要的蛋白水解酶之一,在肿瘤的侵袭和转移中发挥着重要的作用^[7]。研究^[8]表明蛋白水解酶可以促进基底细胞膜和 ECM 的降解以及组织的重组。所以水解酶可能涉及肿瘤发生发展的所有阶段,包括肿瘤的生长、侵袭、转移、血管发生和患者的存活时间。

丝氨酸蛋白酶家族的大部分成员一种是分泌型蛋白酶,即蛋白合成后就迅速转移至胞外;一种在胞质细胞器内贮存等待调节信号的刺激分泌释放。最近,II 型跨膜丝氨酸蛋白酶(type II transmembrane serine proteases, TTSP) 被认定为丝氨酸家族的新亚型,其成员都拥有蛋白水解区域、跨膜区域、短的胞质区域和可变长度的调节结构区域^[9]。Wallrapp et al^[2]通过对比胰腺癌和正常胰腺组织发现 TMPRSS4 这一新的 TTSP 家族的成员,通过研究发现 TMPRSS4 在胰腺癌中的表达远高于正常的胰腺组织,并且与胰腺癌细胞株转移潜能呈正相关,猜测其与肿瘤的侵袭转移有关。但是目前 TMPRSS4 在肿瘤中的生物学功能尚不明确。近期研究^[2, 4, 10-12]显示 TMPRSS4 可在胰腺癌、甲状腺癌、肺癌、乳腺癌、结直肠癌和胃癌中表达。本实验通过免疫组化发现其在胃癌组织中的表达明显高于其对应癌旁组织。Nguyen et al^[11]通过实时定量 RT-PCR、免疫组织化学法和免疫印迹法来检测肺非小细胞癌(non small cell lung cancer, NSCLC) 和正常肺组织以及 NSCLC 细胞株 COS-1 的 mRNA 和蛋白表达水平。发现 TMPRSS4 在 NSCLC 中的 mRNA 和蛋白表达显著高于正常肺组织,但是在 COS-1 中 TMPRSS4 的 mRNA 呈高水平表达却没有检测到对应的蛋白高表达,而经过缺氧环境培养的 COS-1 细胞株却能增加 TMPRSS4 的蛋白表达。说明肺癌组织中的缺氧环境可能增强 TMPRSS4 的蛋白表达,而其 mRNA 的高水平并不一定能代表其蛋白也高表达。Luo et al^[12]研究发现 TMPRSS4 在胃癌中的表达与患者的淋巴结转移和 TNM 分期有关,其在胃癌组织中的表达明显高于其对应癌旁组织,说明 TMPRSS4 与胃癌癌细胞的侵袭和转移有关,其阳性患者的五年生存率低于其阴性患者。与本实验的结论相同。此外 Luo et al^[12]还发现 TMPRSS4 的表达与胃癌患者肿块大小和浸润深度有关,并通过多元统计分析认为 TMPRSS4 可以独立作为胃癌预后的判断指标。本实验

由于标本数量有限,未发现上述结论。

EMT 是指上皮细胞受到各种刺激,失去了细胞极性,其表型向间质细胞表型转化的复杂过程^[13]。EMT 的研究重点在于其在恶性肿瘤演进过程中的作用。目前认为 EMT 的发生可以促进肿瘤细胞的侵袭与转移。在 EMT 的过程中,细胞的表型发生变化,与表型相关分子量也会随之改变。其中最主要的改变是 E-cadherin 的减少甚至丢失,这不仅被认为是癌细胞失去上皮表型的标志,也被认为是促进肿瘤转移的最主要表现。而主要由角蛋白构成的细胞骨架逐步转变为由 Vimentin 为主构成的细胞骨架,此外还常常出现间质表型分子数量的增加,如 N-cadherin、 α -平滑肌动蛋白(smooth muscle actin, SMA) 等^[14]。TMPRSS4 的生物学功能和在肿瘤中的潜在机制还没探究清楚,但是其在上皮细胞来源的肿瘤的侵袭和转移中发挥的作用已经得到肯定。目前关于其与肿瘤细胞侵袭转移的相关研究集中于其在 EMT 中的发生机制上。Jung et al^[4]首次在结肠癌中发现高表达的 TMPRSS4 可以诱导 E-cadherin 蛋白表达的缺失从而导致 EMT 的发生,其中包括形态学的改变和肌钙蛋白的重组。Kim et al^[15]发现 TMPRSS4 可以经由整合蛋白 $\alpha 5$ 的上调来激活黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK) 信号途径和细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK) 导致 EMT 和肿瘤侵袭的发生。本实验也表明 TMPRSS4 在胃癌中的表达与 E-cadherin 的表达呈负相关,而与 Vimentin 的表达呈正相关。该结果提示 TMPRSS4 可能通过诱导 EMT 的发生引起肿瘤细胞的转移,从而影响患者的生存时间。

综上所述, TMPRSS4 可在胃癌组织中表达并与 EMT 之间存在密切关联, TMPRSS4 可能通过诱导 EMT 促进胃癌组织的侵袭和转移。联合检测 3 种蛋白可以帮助判断胃癌的恶性程度及预后。但是关于 TMPRSS4 诱导 EMT 的发生机制尚不清楚,为此仍需进一步确定其相关分子机制从而提高胃癌的治疗效果,改善预后。

参考文献

- [1] Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China[J]. World J Gastroenterol 2006, 12(1): 17-20.
- [2] Wallrapp C, Hahnel S, Mütler-Pillasch F, et al. A novel trans-membrane serine protease (TMPRSS3) overexpressed in pancreatic cancer [J]. Cancer Res 2000, 60(10): 2602-6.
- [3] Tsuji T, Ibaragi S, Hu G F. Epithelial-mesenchymal transition and

- cell cooperativity in metastasis [J]. *Cancer Res* ,2009 ,69 (18) : 7135 -9.
- [4] Jung H , Lee K P , Park S J , et al. TMPRSS4 promotes invasion , migration and metastasis of human tumor cells by facilitating an epithelial-mesenchymal transition [J]. *Oncogene* ,2008 ,27 (18) : 2635 -47.
- [5] 许良中 , 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准 [J]. *中国癌症杂志* ,1996 ,6(2) : 229 -31.
- [6] Stetler-stevenson W G. The role of matrix metalloproteinases in tumor invasion , metastasis , and angiogenesis [J]. *Surg Oncol Clin N Am* ,2001 ,10(2) : 383 -92.
- [7] Duffy M J. Proteases as prognostic markers in cancer [J]. *Clin Cancer Res* ,1996 ,2(16) : 613 -8.
- [8] List K , Bugge T H , Szabo R. Matrilysin: potent proteolysis on the cell surface [J]. *Mol Med* 2006 ,12(1 -3) : 1 -7.
- [9] Hooper J D , Clements J A , Quigley J P , et al. Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes [J]. *J Biol Chem* 2001 ,276(2) : 857 -60.
- [10] Kebebew E , Peng M , Reiff E , et al. ECM1 and TMPRSS4 are diagnostic markers of malignant thyroid neoplasms and improve the accuracy of fine needle aspiration biopsy [J]. *Ann Surg* ,2005 ,242(3) : 353 -61.
- [11] Nguyen T H , Weber W , Havari E , et al. Expression of TMPRSS4 in non-small cell lung cancer and its modulation by hypoxia [J]. *Int J Oncol* 2012 ,41(3) : 829 -38.
- [12] Luo Z Y , Wang Y Y , Zhao Z S , et al. The expression of TMPRSS4 and Erk1 correlates with metastasis and poor prognosis in Chinese patients with gastric cancer [J]. *PLoS One* 2013 ,8(7) : e70311.
- [13] Thiery J P , Acloque H , Huang R Y , et al. Epithelial-mesenchymal transition in development and disease [J]. *Cell* 2009 ,139(5) : 871 -90.
- [14] Kalluri R , Weinberg R A. The basics of Epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Clin Invest* 2009 ,119(6) : 1420 -8.
- [15] Kim S , Kang H Y , Nam E H , et al. TMPRSS4 induces invasion and epithelial-mesenchymal transition through upregulation of integrin $\alpha 5$ and its signaling pathways [J]. *Carcinogenesis* ,2010 ,31 (4) : 597 -606.

Expression and correlation of TMPRSS4 and epithelial-mesenchymal transition in gastric carcinoma

Sun Sibai¹ , Wu Jifeng^{1,2}

(¹ Dept of Pathology , College of Basic Medicine of Anhui Medical University Hefei 230032;

² Dept of Pathology , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the relationship between the expressions of TMPRSS4 and clinical pathological parameters in gastric carcinoma. To explore its significance in judging the prognosis of patients. To analyze the expression of TMPRSS4 in the epithelial-mesenchymal transition. **Methods** The expressions of TMPRSS4 , E-cadherin and Vimentin were detected by immunohistochemistry (SABC) in 100 cases of gastric carcinoma specimens and corresponding adjacent normal tissue. **Results** In gastric carcinoma , TMPRSS4 , E-cadherin and Vimentin positive rate was 47% , 45% , 37% . In adjacent tissues , their positive rate was 9% , 30% , 4% . The differences between tumor tissues and adjacent tissues had statistical significance ($P < 0.05$) . High expression of TMPRSS4 correlated significantly with lymph node metastases and TNM stage ($P < 0.05$) , but not with gender , age , size , tumor histological type , depth of invasion ($P > 0.05$) . The 5-year survival rate of patients with high TMPRSS4 expression was significantly lower than that in patients with low expression. The high TMPRSS4 expression was significantly correlated in gastric carcinoma accompanied by low expression of E-cadherin ($r_s = -0.207$, $P = 0.038$) and high Vimentin expression ($r_s = 0.233$, $P = 0.020$) . **Conclusion** The expression of TMPRSS4 is closely related to the biological characteristics in gastric carcinoma , detection the expression of TMPRSS4 is valuable in predicting tumor prognosis , invasion and metastasis. TMPRSS4 may promote invasion , metastasis of human gastric carcinoma through epithelial-mesenchymal transition by reduce the expression of E-cadherin.

Key words gastric carcinoma; TMPRSS4; epithelial-mesenchymal transition; immunohistochemistry