

鸡卵清蛋白上游启动子转录因子 II 在人胃癌组织中的表达及临床意义

李增亮¹, 姜宝飞^{1,2}, 李 伟¹, 徐 皓¹, 徐泽宽^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院胃肠外科, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学附属淮安市第一人民医院胃肠外科, 江苏 淮安 223001)

[摘要] 目的:检测鸡卵清蛋白上游启动子转录因子 II (COUP-TF II) 在人胃癌组织中的表达,并探讨其临床意义及其影响胃癌发生、发展的可能分子机制。方法:收集 66 例手术切除的胃癌组织和相对应的癌旁非肿瘤组织标本,采用免疫组织化学法检测标本中 COUP-TF II 和基质金属蛋白酶-2(MMP-2)蛋白的表达,分析 COUP-TF II 与患者临床病理特征及预后之间的关系,以及 COUP-TF II 与其潜在靶基因 MMP-2 的相关性。结果:COUP-TF II 蛋白在胃癌和癌旁组织中的阳性表达率分别为 65.2%(43/66)和 19.7%(13/66),两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。COUP-TF II 蛋白的表达与胃癌的浸润深度、分化程度、淋巴结转移及 TNM 分期密切相关($P < 0.05$),而与患者的性别、年龄、肿瘤大小无关($P > 0.05$)。COUP-TF II 蛋白阳性表达的患者术后平均生存时间比阴性表达者短,分别为(26.8 ± 2.6)个月和(36.4 ± 3.0)个月($\chi^2 = 4.118, P = 0.042$)。MMP-2 蛋白在胃癌和癌旁组织中的阳性表达率分别为 78.8%(52/66)和 34.8%(23/66),两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。COUP-TF II 与 MMP-2 蛋白在胃癌组织中的表达呈正相关($r = 0.310, P = 0.011$)。结论:COUP-TF II 蛋白与胃癌的发生、发展、侵袭、转移以及不良预后密切相关,推测可能是通过调控 MMP-2 的表达而发挥作用。

[关键词] 胃癌;鸡卵清蛋白上游启动转录因子 II;基质金属蛋白酶-2;免疫组织化学

[中图分类号] Q786

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)07-892-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130707

Expression and clinical significance of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II protein in human gastric carcinoma tissues

Li Zengliang¹, Jiang Baofei^{1,2}, Li Wei¹, Xu Hao¹, Xu Zekuan^{1*}

(¹Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of General Surgery, Huai'an First People's Hospital Affiliated to NJMU, Huai'an 223001, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the expression of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II (COUP-TF II) protein in human gastric cancer (GC) tissues, and investigate the potential molecular mechanism of COUP-TF II involved in the development and advancement of GC and its clinical significance. **Methods:** Paired tumorous and adjacent non-tumorous human gastric tissues were obtained from 66 patients with GC who underwent surgical resection. The expressions of COUP-TF II and MMP-2 protein were detected using immunohistochemistry. The relationship between COUP-TF II and the clinicopathologic factors as well as the correlation of COUP-TF II and MMP-2 were analyzed. **Results:** COUP-TF II proteins were positively expressed in 65.2%(43/66) and 19.7%(13/66) of GC tissues and paired non-GC tissues, respectively. The expression of COUP-TF II was significantly correlated with the depth of invasion, differentiated grade, lymph node metastasis and tumor-node-metastasis (TNM) stage ($P < 0.05$). However, the expression of COUP-TF II was not correlated with the gender, age and volume of GC tissues. Patients with positive COUP-TF II expression had lower mean survival time than those with negative COUP-TF II expression (26.8 ± 2.6 months vs 36.4 ± 3.0 months, $\chi^2 = 4.118, P = 0.042$). MMP-2 proteins were positively expressed in 78.8% (52/66) and 34.8% (23/66) of GC tissues and paired non-GC tissues, respectively. Moreover, a positive correlation was found between COUP-TF II and MMP-2 expression in GC tissues. **Conclusion:** COUP-TF II protein has significant value in determining invasion and metastasis of gastric cancer and assessing

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81072031)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xuzekuan@njmu.edu.cn

prognosis in patients with gastric cancer, and MMP-2 may be involved in the above regulation progress.

[Key words] gastric cancer; chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II (COUP-TF II); MMP-2; immunohistochemistry

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(7): 892-896]

胃癌发病率在所有恶性肿瘤中排第 4 位,在每年新增恶性肿瘤病例中占 7.8%,在所有癌症死亡人数中占 9.7%^[1]。随着电子显微胃镜等早期诊断手段的普及,胃癌患者 5 年生存率较前有所提高,但淋巴血管微转移导致的胃癌早期复发以及进展期胃癌对放化疗的耐受仍是当前的难题^[2-3],因此寻找与胃癌发生、转移相关的敏感靶蛋白对探索胃癌分子靶向治疗及判断预后有着重要的现实意义。鸡卵清蛋白上游启动子转录因子(chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor, COUP-TF)尤其是 COUP-TF II,在胚胎发育、神经血管分化中起到重要作用,近来又发现其在数种上皮来源肿瘤中异常表达^[4-7]。Navab 等^[5]证实 COUP-TF II 是通过促进基质金属蛋白酶-2(MMP-2)表达来促进肺癌细胞的侵袭能力。COUP-TF II 在胃癌中的研究尚未见报道,本研究通过收集 66 例胃癌组织以及相对应的癌旁组织,检测标本中 COUP-TF II 和 MMP-2 蛋白的表达情况,分析 COUP-TF II 与胃癌临床病理特征以及预后的关系,分析胃癌中 COUP-TF II 和 MMP-2 蛋白表达的相关性,为对其进行深入研究提供临床理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本

2007 年 3 月~2008 年 3 月在南京医科大学第一附属医院行胃癌手术切除的胃癌组织和相对应的癌旁组织标本 66 对:男性 40 例,女性 26 例;年龄 23~78 岁,平均 54.2 岁。所有患者术前未行放、化疗。TNM 分期按 2010 版美国癌症联合委员会(AJCC)胃癌 TNM 分期标准评定,Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期分别为 11、12、35 例,术后病理检查结果证实为胃腺癌;Ⅳ期 8 例,由胃镜活检病理明确诊断。失访患者 5 例。

1.1.2 主要试剂

兔抗人 COUP-TF II、MMP-2 单克隆抗体均购自美国 CST 公司,抗体稀释浓度分别为 1:150 和 1:250,羊抗兔二抗及 DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色

新鲜标本组织首先经 4% 甲醛溶液固定,常规脱水、浸蜡、包埋,切片厚度约 4 μm ,72 $^{\circ}\text{C}$ 烤片 30 min,非免疫山羊血清代替一抗作为阴性对照,采用第二代 SP 两步法进行免疫染色,具体步骤如下:①二甲苯脱蜡,浓度梯度乙醇水化,自来水浸泡 2 min;②枸橼酸钠缓冲液(0.01 mol/L, pH6.0)预热至沸腾,中档微波修复抗原 3 次,共 15 min;③3% H_2O_2 浸泡 10 min 消除内源性过氧化氢酶,PBS 洗涤,非免疫山羊血清室温封闭 45 min;④一抗工作液 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;⑤37 $^{\circ}\text{C}$ 复温 30 min,PBS 洗涤,二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;⑥DAB 显色 2 min,苏木素衬染,盐酸酒精分化;⑦梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.2 结果判定

由 2 名经验丰富的病理专科医师对切片进行结果判定及半定量评分。COUP-TF II 蛋白棕色表达颗粒定位于细胞核,MMP-2 蛋白棕色表达颗粒定位于胞浆,每张切片任意选取 5 个 400 倍视野,分别计数 100 个癌细胞,染色强度:未染色、淡黄色、棕黄色、棕褐色分别记为 0、1、2、3 分;阳性细胞比例:阴性为 0 分,1%~10%为 1 分,11%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,76%~100%为 4 分。综合以上两者之和进行结果判定:0~1 为阴性,2~3 弱阳性,4~5 为阳性,6~7 为强阳性。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件,不同组织中 COUP-TF II 蛋白阳性表达率与各临床病理参数的关系采用 χ^2 检验,COUP-TF II 与 MMP-2 在胃癌中表达的相关性采用 Spearman 相关分析。生存率用 Kaplan-Meier 法计算,并进行 Log-rank 检验,绘制生存曲线。多因素分析采用 Cox 回归模型。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 COUP-TF II 蛋白在胃癌组织及相对应的癌旁组织中的表达

在中低分化胃癌组织中可见数量众多的

COUP-TF II 蛋白强阳性染色细胞, 在高分化胃癌组织中也可见较多的阳性染色细胞(图 1), 总体阳性率为 65.2%(43/66), 而癌旁组织中大多阴性表达或散在分布阳性染色细胞, 阳性率为 19.7%(13/66), 两者比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 MMP-2 在胃癌组织及相对应的癌旁组织中的表达

在中低分化胃癌组织中可见片状分布的 MMP-2 蛋白强阳性染色细胞, 在高分化胃癌组织中可见散在分布的阳性染色细胞(图 1), 总体阳性率为 78.8%(52/66), 而癌旁组织中 MMP-2 蛋白阳性染色细胞点状分布或阴性表达, 阳性率为 34.8%(23/66), 两者比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

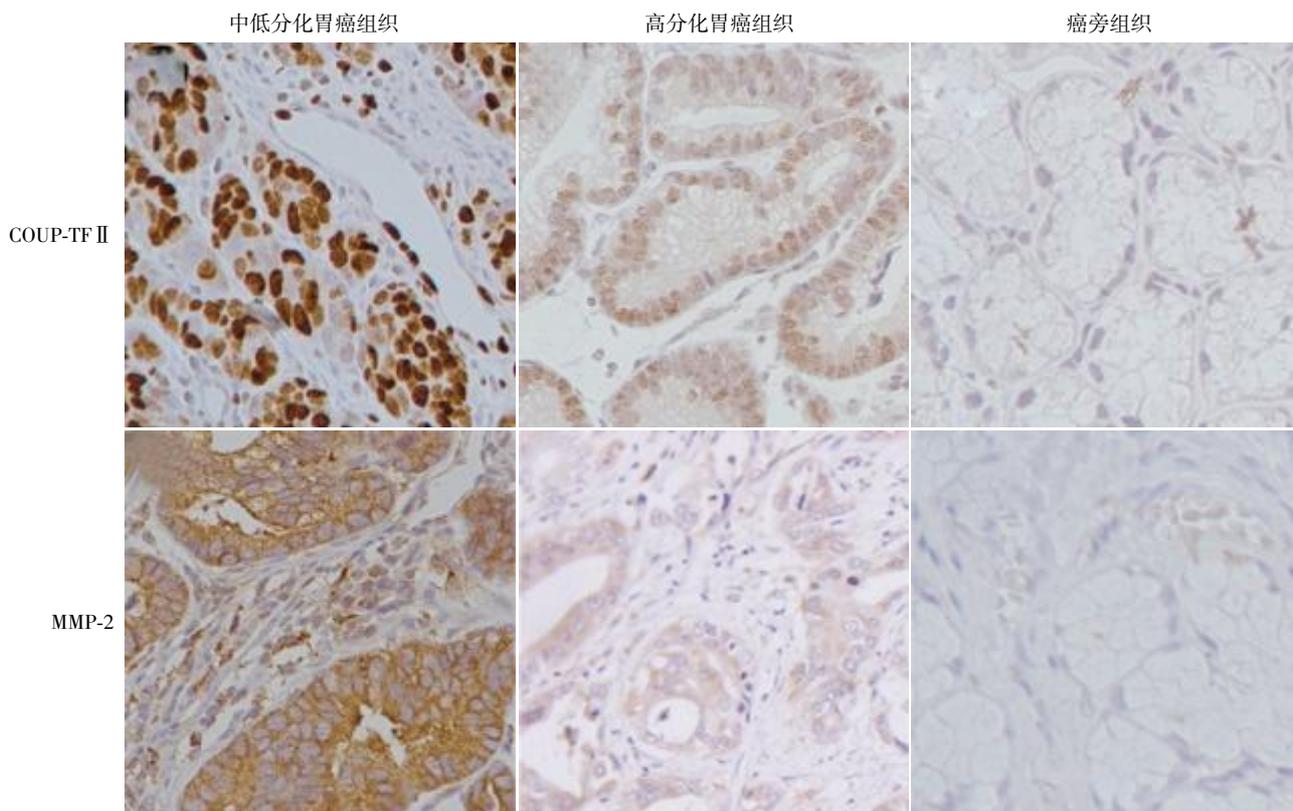


图 1 COUP-TF II、MMP-2 蛋白在胃癌组织阳性表达、癌旁组织阴性表达(免疫组化, ×400)

Figure 1 The expressions of COUP-TF II and MMP-2 proteins in gastric carcinoma tissues and paired non-carcinoma tissues (immunohistochemical method, ×400)

2.3 COUP-TF II 蛋白与胃癌患者临床病理参数之间的关系

浸润深度达到或超过 T3 的胃癌组织中 COUP-TF II 蛋白阳性表达率要高于浸润深度在 T2 期以内的胃癌组织 [72.0%(36/50) vs 43.8%(7/9), $P = 0.04$, 表 1]; COUP-TF II 蛋白在高分化胃癌组织中阳性表达率为 45.5%(10/22), 而在中、低分化胃癌组织中阳性表达率为 75.0%(33/44), 两者相比差异有统计学意义($P = 0.02$, 表 1); 不同淋巴结转移状态的胃癌组织中 COUP-TF II 蛋白的表达也明显不同 ($P = 0.02$ 表 1); 另外, III、IV 期的胃癌组织中 COUP-TF II 蛋白阳性表达率明显高于 I、II 的胃癌组织, 两者相比 74.4%(32/43) vs 47.8%(11/23), 差异有统计学意义($P = 0.03$, 表 1)。

2.4 胃癌患者多因素预后分析

将单因素分析结果有意义的参数经 Cox 模型进行多因素分析, 结果显示, COUP-TF II 表达水平、浸润深度、淋巴结转移状态及 TNM 分期是影响胃癌患者预后的独立危险因素(表 2)。

2.5 COUP-TF II 蛋白与胃癌患者的生存分析

COUP-TF II 蛋白阳性表达的胃癌患者术后平均生存时间是(26.8 ± 2.6)个月, 比 COUP-TF II 蛋白阴性表达的胃癌患者明显缩短, 后者平均生存时间是(36.4 ± 3.0)个月, 两者相比, 差异有统计学意义($\chi^2 = 4.120$, $P = 0.042$, 图 2)。

2.6 胃癌组织中 COUP-TF II 与 MMP-2 表达的相关性

66 例胃癌组织中 COUP-TF II 与 MMP-2 蛋白均

表 1 66 例胃癌组织中 COUP-TF II 蛋白的表达与患者临床病理参数之间的关系

临床病理参数	例数	COUP-TF II 蛋白表达		阳性率 (%)	χ^2 值	P 值
		阳性	阴性			
性别						
男	40	25	15	62.5	0.314	0.57
女	26	18	8	69.2		
年龄(岁)						
< 60	36	25	11	69.4	0.643	0.42
≥60	30	18	12	60.0		
肿瘤大小(cm)						
< 5	35	24	11	68.6	0.384	0.54
≥5	31	19	12	61.3		
浸润深度						
T1、T2	16	7	9	43.8	4.261	0.04
T3、T4	50	36	14	72.0		
分化程度						
高分化	22	10	12	45.5	5.639	0.02
中、低分化	44	33	11	75.0		
淋巴结转移						
N0	9	4	5	44.4	0.02*	
N1	9	3	6	33.3		
N2	23	15	8	65.2		
N3	25	21	4	84.0		
TNM 分期						
I、II	23	11	12	47.8	4.667	0.03
III、IV	43	32	11	74.4		

* :Fisher 确切概率法。

表 2 66 例胃癌患者的多因素预后分析

Table 2 Multivariable analysis of prognostic factors in 66 GC patients

影响因素	B	SE	Wald	Exp(b)	P
COUP-TF II	0.219	0.095	5.348	1.245	0.021
浸润深度	0.785	0.276	8.070	2.193	0.004
分化程度	0.376	0.291	1.674	1.457	0.196
淋巴结转移	0.846	0.312	7.340	2.330	0.007
TNM 分期	0.667	0.313	4.538	1.947	0.033

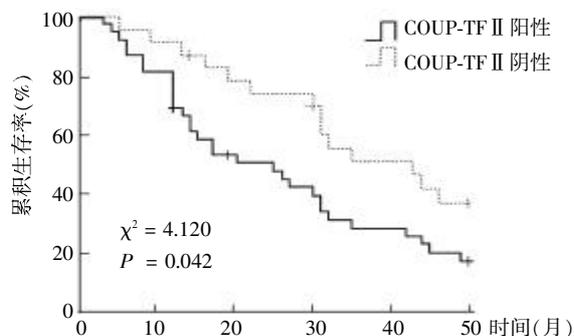


图 2 胃癌组织 COUP-TF II 蛋白表达与患者预后生存分析
Figure 2 Kaplan-Meier plot of overall survival of patients stratified by COUP-TF II protein expression level

为阳性者 38 例,均为阴性者 9 例,COUP-TF II 阳性、MMP-2 阴性者 5 例,COUP-TF II 阴性、MMP-2 阳性者 14 例,COUP-TF II 与 MMP-2 在胃癌组织中的表达呈正相关($r_s = 0.311, P = 0.011$)。

3 讨论

COUP-TFII II 属于类固醇/甲状腺激素受体超家族,属于核受体一类,通过特殊的锌指 DNA 结构域,调控基因表达、细胞凋亡、血管生成、神经、器官分化等^[8-10]。COUP-TF II 是 COUP-TF 家族中对肿瘤影响研究最多的一员,基因芯片技术结合染色质免疫共沉淀结果表明,COUP-TF II 能够通过 SP1 结合形成的反式作用因子激发 NGFI-A、IGF-1 和 Ang-1 基因启动子区的活性^[7],通过这种调节特定基因转录的方式,促进血管生成和淋巴管分化等,COUP-TF II 能够对抗 TGF- β 诱导的生长阻滞屏障,从而发挥促进前列腺癌发生、发展的作用^[4]。

动物实验研究结果表明,COUP-TF II 通过调控肿瘤微环境促进肿瘤血管的生成,干扰 COUP-TF II 的表达导致裸鼠皮下肿瘤细胞移植血管密度明显

降低,伴随肿瘤生长变慢,同时给予外源性的 Ang-1 能够对抗 COUP-TF II 缺失对小鼠血管生长的抑制作用^[7-8]。Navab 等^[5]也证实 COUP-TF II 通过促进肺癌细胞中 MMP-2 的转录和分泌来增强肺癌细胞的侵袭能力。COUP-TF II 在前列腺癌细胞株特别是远处转移来源的前列腺癌细胞株中表达明显升高,60%的前列腺癌组织 COUP-TF II 表达阳性,而 COUP-TF II 在前列腺正常组织中只有 5%的阳性率,并且高表达 COUP-TF II 的患者预后较差^[4],COUP-TF II 不仅与前列腺癌细胞的侵袭、转移密切相关,还是评估患者术后复发风险的重要指标。

目前 COUP-TF II 对胃癌生物学行为影响的研究未见报道,小鼠模型实验验证在胚胎期胃发育阶段,COUP-TF II 在上皮细胞、间质细胞中都高表达,在间质细胞上皮转化过程中扮演重要角色,胚胎发育后期,在终末分化的上皮细胞中 COUP-TF II 蛋白不再表达^[9-11]。然而近来的研究表明,COUP-TF II 在子宫内癌、肺癌、肾上腺癌、结肠腺癌等多种上皮来源肿瘤细胞中存在异常表达^[4-8]。本研究结果首次证明在胃癌组织中 COUP-TF II 也呈现高表达,这种上皮来源肿瘤细胞异位表达胚胎时期高表达的 COUP-TF II 蛋白,预示着肿瘤细胞向胚胎期间质样细胞转化,进一步的分析还发现 COUP-TF II 与胃癌组织的浸润深度、淋巴结转移、分化程度和 TNM 分期密切相关,表明 COUP-TF II 在胃癌的发生、发展和转移中扮演着重要的角色。生存分析结果表明,COUP-TF II 阳性表达的胃癌患者生存率明显低于 COUP-TF II 阴性表达的患者,提示胃癌患者 COUP-TF II 高表达意味着预后不良。本研究还发现 COUP-TF II 与 MMP-2 在胃癌组织中的高表达呈明显的正相关,MMP-2 在胃癌的发生、侵袭和转移中所起的作用已被广泛证实^[12-13],结合 Navab 等^[5]证实的肺癌中 COUP-TF II 通过促进 MMP-2 表达发挥促癌作用的结果,我们推测 COUP-TF II 可能是通过调控 MMP-2 等途径参与胃癌的发生、发展过程。本研究结果对进一步探讨 COUP-TF II 蛋白调节胃癌细胞增殖、侵袭和转移能力的具体分子机制提供了临床依据,也为胃癌的诊断、治疗和评估预后提供新的理论切入点。

[参考文献]

[1] Jemal A,Bray F,Center MM,et al. Global cancer statis-

tics[J]. CA Cancer J Clin,2011,61(2):69-90

- [2] Bray F,Jemal AG,Rey N,et al. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030):a population-based study[J]. Lancet Oncol,2012,13(8):790-801
- [3] 刘平,施伟,王建,等. 1340例胃癌根治术后患者预后的多因素分析[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2011,31(9):1310-1315
- [4] Qin J,Wu SP,Creighton CJ,et al. COUP-TF II inhibits TGF-beta-induced growth barrier to promote prostate tumorigenesis[J]. Nature,2013,493(7431):236-240
- [5] Navab R,Gonzalez-Santos JM,Johnston MR,et al. Expression of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II enhances invasiveness of human lung carcinoma cells[J]. Cancer Res,2004,64(15):5097-5105
- [6] Li XB,Jiao S,Sun H,et al. The orphan nuclear receptor EAR2 is overexpressed in colorectal cancer and it regulates survivability of colon cancer cells[J]. Cancer Lett,2011,309(2):137-144
- [7] Qin J,Chen X,Xie X,et al. COUP-TF II regulates tumor growth and metastasis by modulating tumor angiogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2010,107(8):3687-3692
- [8] Lin FJ,Chen X,Qin J,et al. Direct transcriptional regulation of neuropilin-2 by COUP-TF II modulates multiple steps in murine lymphatic vessel development[J]. J Clin Invest,2010,120(5):1694-1707
- [9] Lee S,Kang J,Yoo J,et al. Prox1 physically and functionally interacts with COUP-TF II to specify lymphatic endothelial cell fate[J]. Blood,2009,113(8):1856-1859
- [10] Suzuki T,Moriya T,Darnel AD,et al. Immunohistochemical distribution of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II in human tissues[J]. Mol Cell Endocrinol,2000,164(1-2):69-75
- [11] Takamoto N,You LR,Moses K,et al. COUP-TF II is essential for radial and anteroposterior patterning of the stomach[J]. Development,2005,132(9):2179-2189
- [12] Ioannidis I,Dimo B,Karameris A,et al. Comparative study of the immunohistochemical expression of metalloproteinases 2,7 and 9 between clearly invasive carcinomas and "in situ" trophoblast invasion[J]. Neoplasma,2010,57(1):20-28
- [13] Shen L,Liu Z,Tu Y,et al. Regulation of MMP-2 expression and activity by beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-8 in AGS gastric cancer cells[J]. Mol Biol Rep,2011,38(3):1541-1550

[收稿日期] 2013-05-20