

食管鳞状细胞癌中血管生成素样蛋白 2 的表达及其临床意义

程 亮,于 裕,张 颖*

(江苏省中医院、南京中医药大学附属医院胸外科,江苏 南京 210029)

[摘 要] 目的:探讨血管生成素样蛋白 2(angiotensin-like protein2, ANGPTL2)在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell cancer,ESCC)组织中的表达及其临床意义。方法:采用免疫组化检测 ESCC 组织中 ANGPTL2 的表达水平;通过酶联免疫吸附法检测食管癌患者和健康对照人群血清中 ANGPTL2 浓度。结果:与癌旁组织相比,ESCC 组织中 ANGPTL2 的表达明显升高($P < 0.001$);与健康对照人群相比,食管癌患者血清中 ANGPTL2 浓度明显升高。通过分析临床数据发现高表达的 ANGPTL2 与肿瘤体积、淋巴结转移、TNM 分期紧密相关。血清 ANGPTL2 浓度也与淋巴结转移、TNM 分期等呈正相关。结论:ANGPTL2 在 ESCC 的增殖和侵袭过程中有重要作用。血清 ANGPTL2 可以作为诊断 ESCC 潜在有效的血清标志物。

[关键词] 食管鳞状细胞癌;血管生成素样蛋白 2;增殖;侵袭

[中图分类号] R735.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)11-1398-04

doi:10.7655/NYDXBNS20171105

Angiotensin-like protein 2 acts as a novel biomarker for diagnosis in patients with esophageal cancer

Cheng Liang, Yu Yu, Zhang Ying*

(Department of Cardiothoracic Surgery, the Affiliated Hospital of NUTCM, Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] Objective: To detect the expression level of angiotensin-like protein2(ANGPTL2) in esophageal squamous cell cancer (ESCC) tissues and investigate the clinical value for diagnosis. Methods: Immunohistochemistry (IHC) was used to determine the relative ANGPTL2 expression levels in ESCC tissues, and enzyme-linked immunosorbent assays were used to measure the levels of ANGPTL2. Results: Compared with controls, ANGPTL2 expression levels were significantly up-regulated in ESCC tissues and serum ($P < 0.001$). Higher expression level of ANGPTL2 was found associated with larger tumor size, more lymph node metastasis and TNM stage. ELISA assay showed that serum ANGPTL2 was significantly elevated in ESCC patients and positively associated with high T-stage, high TNM stage and lymph node metastasis. Conclusion: ANGPTL2 plays a crucial role in proliferation and invasion of ESCC. Serum ANGPTL2 has potential value for early detection of ESCC.

[Key words] esophageal squamous cell cancer; angiotensin-like protein 2; proliferation; invasion

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(11): 1398-1401

在全球癌症相关死亡中,食管癌是第 6 大主要原因^[1]。它主要包括两个组织学类型:食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell cancer,ESCC)和食管腺癌(esophageal adenocarcinoma,EAD)。在我国,ESCC 最为常见,约占 90%以上^[2]。虽然食管癌的诊断和治疗取得了巨大进展,但其 5 年生存率仍然较低^[3]。早期食管癌经手术治疗后有着较高的远期存

活率,因此探索其内在分子机制并寻找新的肿瘤标志物以达到早期发现、早期诊断有着巨大的社会和经济效益^[4]。

恶性肿瘤的发生是多种因素共同作用的结果,慢性炎症在恶性肿瘤的发生、发展中起着重要作用^[5]。血管生成素样蛋白 2(angiotensin-like protein 2, ANGPTL2)是一种分泌型糖蛋白,已被证实参与慢性炎症的调节^[6-7],并与肿瘤的发生、侵袭和转移密切相关^[8-9]。然而,ANGPTL2 与食管癌的关系目前研究还比较少,本研究旨在初步探索 ANGPTL2 与

[基金项目] 江苏省六大人才高峰项目(2016-WSW-015)

*通信作者(Corresponding author),E-mail: arron1978@sina.com

ESCC 的关系,并为食管癌的诊断和治疗提供一个新的潜在靶标。

1 对象和方法

1.1 对象

选取 2014—2016 年在南京中医药大学附属医院接受手术治疗的 40 例 ESCC 患者,其中男 33 例,女 7 例;年龄 51~70 岁,中位年龄 64 岁。手术中留取新鲜肿瘤组织标本,同时留取相应的癌旁组织,存放于-80℃超低温冰箱中保存待检,所有 ESCC 患者术前均留取血清标本。另外选择同期健康体检者 20 例为对照组并留取其血清,其中男 16 例,女 4 例;年龄 50~68 岁,中位年龄 62 岁。两组入选者都签署了知情同意书。两组年龄、性别差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。所有患者手术标本均由同一名有经验的病理医生检查并确诊,按照 NCCN 食管癌 TNM 分期标准进行分期。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化测定

所有切除标本均用 10%福尔马林固定,石蜡包埋后用苏木精和伊红(haematoxylin and eosin,HE)染色。首先将石蜡包埋组织切片(3 μm)。然后将切片用二甲苯脱蜡,接着在梯度浓度的乙醇中再水化。随后置于 10℃10 mmol/L 柠檬酸缓冲液(pH6.0)中,再移入高压灭菌锅中 121℃持续预处理 10 min。使用 1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)加入 10%健康山羊血清(Vector Laboratories,美国)阻断非特异性结合位点。4℃条件下,在含有 1%小牛血清蛋白的 PBS 中将切片与小鼠抗 ANGPTL2 单克隆抗体(1:100, R&D 公司,美国)孵育 16 h。用 PBS 洗涤后,在切片上加载与过氧化物酶共轭聚合物偶联的二抗 30 min。抗体的检测使用 Dako's HRP Envision kit (Dako 公司,丹麦)。

ANGPTL2 表达评分定义如下。按染色强度计分:0 分,无染色;1 分,轻、中度染色;2 分,重度染色。按阳性细胞的程度计分:0 分($\leq 10\%$);1 分($>10\%$)。最后将二者得分相乘以评估每种情况下的表达。0 和 1 分被归类为低表达,2 分被归类为高表达。

1.2.2 血清样本测定

在手术前获得患者血液样品。2 500 r/min 离心 10 min 留取血清标本,并储存在-80℃超低温冰箱中。所有血清标本均使用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒(ABL 公司,日本),根据试剂盒说明书测定 ANGPTL2 浓

度。所有标本均一式两份检测,取二者的平均值用于统计分析。

1.3 统计学方法

计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。使用 JMP 10.0 软件包(SAS Institute,美国)进行统计分析。使用 Mann-Whitney U 非参检验法比较临床病理学参数和血清 ANGPTL2 水平二者之间的关系。组织中 ANGPTL2 的表达水平与临床参数之间的比较使用 χ^2 检验。采用受试者操作特征(receiver operator characteristic,ROC)曲线分析确定血清 ANGPTL2 诊断 ESCC 的灵敏度、特异性以及曲线下面积(area under curve,AUC)。 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ANGPTL2 在 ESCC 组织中高表达

免疫组化分析显示,ESCC 组织中 ANGPTL2 高表达的有 22(22/40)例,癌旁组织均为低表达(40/40),经 Fisher 确切概率法比较,二者差异有统计学意义($P<0.01$,表 1)。

表 1 ANGPTL2 在 ESCC 组织和癌旁组织中的表达关系
Table 1 Comparison of ANGPTL2 expression in ESCC and adjacent tissues(n)

组别	ANGPTL2	
	高表达	低表达
ESCC 组织	22	18
癌旁组织	0	40

进一步研究发现,ESCC 组的 ANGPTL2 高表达与肿瘤大小、肿瘤 T 分期、淋巴结转移以及 TNM 分期密切相关,而与年龄、性别等因素无关(表 2)。

2.2 ESCC 患者血清 ANGPTL2 浓度升高

ESCC 患者血清中的 ANGPTL2 浓度为(3 171±1 024) pg/mL,显著高于对照组的(1 800±874) pg/mL,差异有统计学意义($P<0.001$)。ESCC 患者血清标本中的 ANGPTL2 浓度情况与组织中的表达情况类似,血清 ANGPTL2 也与 T 分期、淋巴结转移和 TNM 分期相关,但是与肿瘤大小无显著关系(表 3)。

2.3 ROC 曲线分析

ROC 曲线分析显示,在最佳截点(2 559 pg/mL)时,ANGPTL2 的血清水平具有 84.37%的敏感性和 82.61%的特异性,AUC 为 0.865(95%CI:0.746~0.942,图 1)。进一步分析还发现,血清 ANGPTL2 浓度还可以更好地将 TNM 分期早的和分期较晚的患者区分开来,AUC 为 0.920(95%CI:0.890~0.950),灵敏度为 91.00%,特异性为 86.00%(图 2)。

表 2 组织中 ANGPTL2 表达与临床病理参数之间的关系
Table 2 The relationship between the expression of ANGPTL2 in ESCC and clinical factors (n)

临床病理参数	例数	ANGPTL2		χ^2 值	P 值
		高表达	低表达		
年龄(岁)				0.404	0.525
<60	20	12	8		
≥60	20	10	10		
性别				0.519	0.471
男	35	20	15		
女	5	2	3		
肿瘤大小(cm)				8.310	0.004
≤2	11	2	9		
>2	29	20	9		
T 分期				6.061	0.014
1~2	25	10	15		
3	15	12	3		
淋巴结转移				4.310	0.038
是	16	12	4		
否	24	10	14		
吸烟史				1.616	0.204
是	20	13	7		
否	20	9	11		
TNM 分期				5.389	0.020
I~II	31	14	17		
III	9	8	1		

表 3 血清 ANGPTL2 浓度与临床病理参数之间的关系
Table 3 The relationship between serum ANGPTL2 in ESCC and clinical factors ($\bar{x} \pm s$)

临床病理参数	例数	ANGPTL2 (pg/mL)	P 值
年龄(岁)			0.790
<60	20	3 346 ± 1 091	
≥60	20	3 031 ± 1 001	
性别			0.430
男	35	3 276 ± 1 213	
女	5	2 923 ± 792	
肿瘤大小(cm)			0.760
≤2	11	3 029 ± 998	
>2	29	3 273 ± 1 011	
T 分期			0.002
1/2	25	2 671 ± 997	
3	15	3 761 ± 1 019	
淋巴结转移			0.030
是	16	3 908 ± 791	
否	24	2 577 ± 1 123	
吸烟史			0.080
是	20	3 409 ± 1 314	
否	20	2 999 ± 1 013	
TNM 分期			<0.001
I~II	31	2 512 ± 1 023	
III	9	3 973 ± 921	

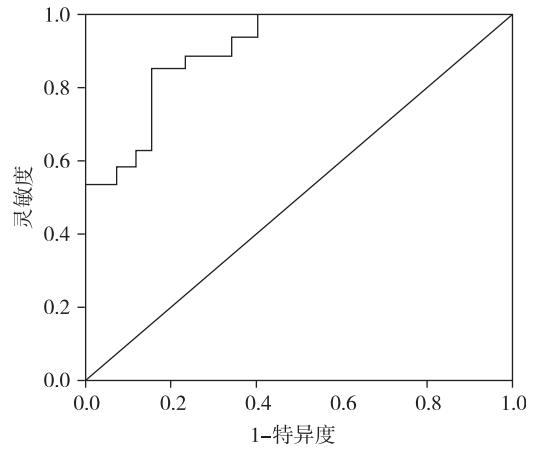


图 1 诊断 ESCC 时的 ROC 曲线

Figure 1 The ROC curve for diagnosing ESCC

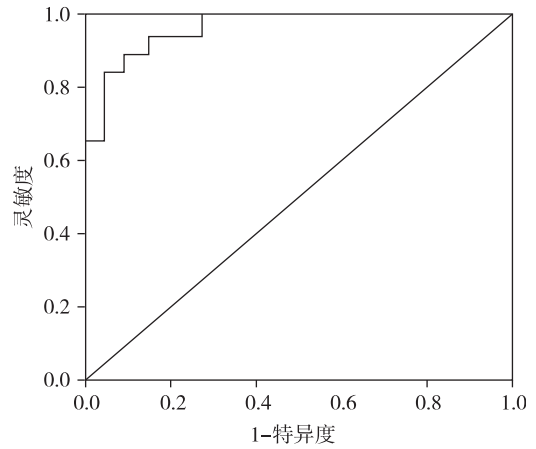


图 2 区分早晚期 ESCC 时的 ROC 曲线

Figure 2 The ROC curve for discriminating early and advanced ESCC

3 讨论

ANGPTL2 是属于血管生成素样蛋白家族的一种分泌性细胞外基质蛋白,含有 493 个氨基酸,其基因定位于人类染色体 9q34。已有研究表明,ANGPTL2 在介导慢性炎症和促进肿瘤细胞运动、侵袭方面扮演着重要角色^[9]。

目前已证实,多种肿瘤与 ANGPTL2 密切相关,例如在胃癌、结直肠癌、肝癌和前列腺癌中,ANGPTL2 均呈高表达,并且其表达强度和淋巴结转移、远处转移、TNM 分期等呈正相关^[10-13],本研究也得到了相似结果。在 ESCC 组织中,ANGPTL2 表达显著高于癌旁组织($P < 0.001$)。进一步分析发现,较大直径的肿瘤 ANGPTL2 表达强度较高($P = 0.004$); T 分期高的肿瘤 ANGPTL2 表达也增高($P = 0.014$); 同样,有淋巴结转移($P = 0.038$)或 TNM 分期高($P = 0.020$)的 ESCC 组织中 ANGPTL2 表达均增高。这些结果提示 ANGPTL2 的表达也可以反映 ESCC 浸润、

侵袭的程度。

获得高敏感度和特异度的血清肿瘤标志物,对于肿瘤包括 ESCC 的早期诊断、早期治疗有着巨大的临床价值。随着肿瘤的生长,ANGPTL2 不断分泌进入循环系统。已有研究证实,在肺癌、结直肠癌、胃癌等恶性肿瘤中,患者的血清 ANGPTL2 浓度是一种有效标志物,可以有效反映出肿瘤的侵袭和转移,对肿瘤的诊断、预后、复发判断有较高的临床价值^[10-14]。本研究结果显示,ESCC 血清 ANGPTL2 浓度显著高于对照组($P<0.001$)。并且 ANGPTL2 浓度与 T 分期、淋巴结转移和 TNM 分期呈正相关,差异有统计学意义。虽然肿瘤体积越大,ANGPTL2 浓度相对较高,但是血清 ANGPTL2 浓度和肿瘤大小无明显统计学相关性,这可能的解释是肿瘤的侵袭、浸润和转移是增加 ANGPTL2 分泌的主要因素。Ide 等^[15]研究结果显示,ANGPTL2 对 ESCC 的诊断敏感性和特异性分别为 85.90%、68.14%,AUC 为 0.913。本研究通过 ROC 曲线分析发现,选择截点(2 559 pg/mL)时,ANGPTL2 具有 84.37%的敏感性和 82.61%的特异性,AUC 为 0.865(95%CI:0.746~0.942)。进一步分析还发现,血清 ANGPTL2 浓度还可以更好地将 TNM 分期早和分期较晚的患者区分开来,AUC 为 0.920(95%CI: 0.890~0.950),灵敏度为 91.00%,特异度为 86.00%。

本研究结果显示,ANGPTL2 在 ESCC 组织中高表达,可以作为潜在的治疗靶标;同时血清 ANGPTL2 浓度对于 ESCC 的诊断有一定临床价值。本研究局限在于研究样本量较小,患者术后随访时间较短,没有分析 ANGPTL2 对于 ESCC 预后的价值。下一步要继续扩大样本量,并进一步探索和更深入地讨论 ANGPTL2 在 ESCC 发病过程中的具体作用途径和分子机制。

[参考文献]

[1] Siegel RL, Jemal A. Cancer statistics [J]. JAMA,2013, 310(9): 982
[2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132
[3] Demeester SR. Epidemiology and biology of esophageal cancer[J]. Gastrointest Cancer Res, 2009, 3 (2 Suppl): S2-S5
[4] 马 腾,赵 晔,邵永丰. LncRNA-HOTTIP 对食管鳞癌

细胞增殖和侵袭的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2016, 36(8): 947-951

[5] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer[J]. Cell, 2010, 140: 883-899
[6] Okada T, Tsukano H, Endo M, et al. Synovial cell-derived angiopoietin-like protein 2 contributes to synovial chronic inflammation in rheumatoid arthritis[J]. Am J Pathol, 2010, 176(5): 2309-2319
[7] Ogata A, Endo M, Aoi J, et al. The role of angiopoietin-like protein 2 in pathogenesis of dermatomyositis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 418(3): 494-499
[8] Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, et al. Angiopoietin-like protein 2 is an important facilitator of inflammatory carcinogenesis and metastasis[J]. Cancer Res, 2011, 71(24): 7502-7512
[9] Endo M, Nakano M, Kadomatsu TA, et al. Tumor cell-derived angiopoietin-like protein ANGPTL2 is a critical driver of metastasis[J]. Cancer Res, 2012, 72 (7):1784-1794
[10] Toiyama Y, Tanaka K, Kitajima T, et al. Elevated serum angiopoietin-like protein 2 correlates with the metastatic properties of colorectal cancer: a serum biomarker for early diagnosis and recurrence[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(23): 6175-6186
[11] Gao L, Ge C, Fang T, et al. ANGPTL2 promotes tumor metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2015, 30(2): 396-404
[12] Sato R, Yamasaki M, Hirai K, et al. Angiopoietin-like protein 2 induces androgen-independent and malignant behavior in human prostate cancer cells [J]. Oncol Rep, 2015, 33(1): 58-66
[13] Sasaki H, Suzuki A, Shitara M, et al. Angiopoietin-like protein ANGPTL2 gene expression is correlated with lymph node metastasis in lung cancer[J]. Oncol Lett, 2012, 4(6): 1325-1328
[14] Chen Y, Jiang H, Zhu L, et al. Diagnostic and prognostic value of serum angiopoietin-Like protein 2 in patients with non-small cell lung cancer[J]. Clin Lab, 2017, 63(1): 59-65
[15] Ide S, Toiyama Y, Shimura T, et al. Angiopoietin-like protein 2 acts as a novel biomarker for diagnosis and prognosis in patients with esophageal cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2015, 22(8): 2585-2592

[收稿日期] 2017-04-19