

食管癌中TAZ蛋白的表达及其临床意义

朱亚宁¹, 吴健¹, 孙苏安¹, 于亮^{2*}

¹南京医科大学附属淮安第一医院病理科, ²血液科, 江苏 淮安 223300

[摘要] 目的:研究食管癌及癌旁组织中PDZ结合域的转录共刺激因子(transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, TAZ)蛋白的表达,并探讨其临床意义。方法:采用免疫组化SP法检测123例食管癌及对应癌旁组织中TAZ蛋白的表达,并对其与临床特征的关系作相关统计分析。结果:TAZ蛋白在食管癌组织中的阳性表达率明显高于对应癌旁组织(60.2% vs. 18.7%, $P < 0.001$),且其阳性表达与患者临床分期晚、肿瘤分化程度低、总生存期短相关(P 均 < 0.05);COX比例多因素风险模型分析显示,TAZ阳性表达是食管癌预后的独立影响因素($P=0.031$)。结论:TAZ蛋白在食管癌组织中表达升高,是食管癌预后的独立影响因素,TAZ蛋白有望成为食管癌诊断和预后判断的一个新指标。

[关键词] 食管癌;TAZ;免疫组化

[中图分类号] R735.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)04-497-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20180414

食管癌是一种常见的恶性肿瘤,5年生存率较低,位列全球癌症死因的第6位^[1-2]。食管癌预后不佳的主要因素是肿瘤的高增殖和侵袭力,因此找到肿瘤增殖、侵袭相关基因是其研究热点之一。Hippo肿瘤抑制信号肽通过具有PDZ结合域的转录共刺激因子/Yes相关蛋白(transcriptional co-activator with PDZ-binding motif/ Yes-associated protein, TAZ/YAP)的磷酸化和在细胞浆中的集聚,精确地调控细胞的增生和凋亡^[3]。TAZ作为Hippo信号通路下游的一个调控靶点,已在多种肿瘤中发现并表达上调,起着促进肿瘤发生发展、抑制凋亡、抵抗化疗、促进肿瘤转移等作用^[4-5],其分子调控机制目前尚不完全清楚。目前Hippo肿瘤通路在食管癌发展侵袭中的作用报道较少,深入研究TAZ在食管癌的表达情况及其可能作用机制,有助于为食管癌早期诊断和预后判断寻找新的生物标志物。本实验通过分析TAZ蛋白在食管癌及癌旁组织中的表达情况及其临床病理意义,旨在探讨Hippo通路在食管癌发生发展中的作用,及其对食管癌患者生存预后的影响,为食管癌的诊断和预后判断提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

收集淮安市第一人民医院病理科2010年6月—

[基金项目] 淮安市产学研国际合作项目(HAC2014016)

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

2012年1月食管癌手术石蜡标本123例,每例均有相应癌旁组织。癌旁组织定义为距肿瘤组织5 cm以上的正常食管黏膜组织。患者手术前均未接受任何放疗。无癌旁对照组织及术前接受过放疗者作为剔除标准。所有入组者都签有知情同意书。TAZ兔抗人多克隆抗体购于美国Abcam公司,二抗及DAB试剂盒购于北京中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化SP法检测TAZ蛋白的表达

所有石蜡标本4 μ m连续切片,65 $^{\circ}$ C烤片2 h,常规脱蜡后,柠檬酸盐缓冲液高温高压抗原修复15 min, H_2O_2 溶液阻断内源性过氧化物酶10 min, 1:100滴加TAZ抗体,4 $^{\circ}$ C冰箱孵育过夜。二抗及DAB试剂盒按说明书进行使用,苏木素复染,盐酸乙醇分化,氨水返蓝,透明,中性树脂胶封固。用已知阳性表达的人胎盘组织做阳性对照,用PBS代替一抗作阴性对照。

结果判读:由两名经验丰富的病理科医师采用双盲法进行显微镜下阅片,每张切片随机选5个高倍视野,每个视野计数100个细胞,观察免疫组化染色的情况进行综合评分。TAZ蛋白阳性表达定位于细胞核和胞质,将细胞核或胞质内出现棕黄色颗粒的细胞视为阳性细胞。其结果判定以阳性细胞比例和染色强度共同评价^[6]。按阳性细胞占整个瘤细胞的百分比评分:阳性细胞数0%~5%为0分,>5%~25%为1分,>25%~50%为2分,>50%~75%为3分,>75%

为4分;根据染色强度评分:无着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。两项得分相乘: ≤ 2 分为阴性, > 2 分为阳性。

1.2.2 生存期随访

对123例食管癌病例进行电话随访,随访截止日期为2016年8月30日。主要观察指标为总生存期(overall survival, OS),定义为从确诊之日起至随访终点或死亡的时间。失访、随访截止仍存活或死于其他疾病视为截尾值。

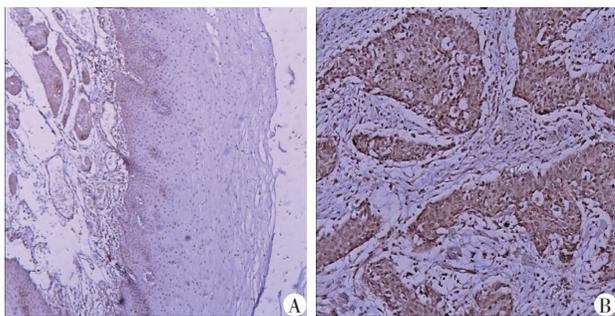
1.3 统计学方法

应用SPSS 19.0软件进行数据分析。组间率比较采用 χ^2 检验和Fisher精确法。应用Kaplan-Meier生存曲线对TAZ表达在内的各变量与生存时间的关系进行单因素分析,Log-rank检验分析生存曲线的差异,采用COX比例风险模型进行多因素分析。 $P \leq 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 食管癌组织及癌旁组织中TAZ蛋白的表达

TAZ蛋白的阳性表达主要定位于细胞浆和细胞核,123例食管癌组织和癌旁组织中TAZ蛋白阳性病例数分别为74例和23例,癌组织的阳性率(60.2%)明显高于癌旁组织(18.7%),两组差异具有统计学意义($\chi^2=44.271, P < 0.001$,图1)。



A:TAZ在食管癌癌旁组织中有少量表达,主要位于基层层;B:TAZ在食管癌中呈阳性表达。

图1 TAZ蛋白的表达(DAB,×50)

2.2 TAZ蛋白的表达与食管癌临床病理特征的关系

123例食管癌患者中TAZ蛋白的表达水平在不同性别、不同年龄、不同肿瘤直径、淋巴结转移与否组别间差异无统计学意义(表1)。但低分化肿瘤中TAZ的阳性率为82%,高+中分化肿瘤中为57%,I+II期肿瘤中TAZ的阳性率为53%,III+IV期肿瘤中为76%,肿瘤分化程度越低,临床分期越晚,TAZ表达水平越高,且各组别间的表达水平差异均具有统计学意义(P 均 < 0.05 ,表1)。

表1 TAZ蛋白表达与食管癌临床病理特征的关系

临床病理参数	n	TAZ阳性[n(%)]	χ^2 值	P值
性别			2.554	0.110
男	83	54(65)		
女	40	20(50)		
年龄(岁)			0.345	0.557
≤ 60	44	28(64)		
> 60	79	46(58)		
肿瘤直径(cm)			0.488	0.485
≤ 3	58	33(57)		
> 3	65	41(63)		
分化程度			4.053	0.044
低	17	14(82)		
高+中	106	60(57)		
临床分期			5.314	0.021
I+II	86	46(53)		
III+IV	37	28(76)		
淋巴结转移			0.148	0.700
无	88	52(59)		
有	35	22(63)		

2.3 随访

随访123例食管癌患者,有5例失访,失访率为4.1%。74例食管癌TAZ蛋白阳性表达患者中,55例死亡,生存率为25.7%,中位生存时间为26(2~73)个月;49例TAZ蛋白阴性表达患者中27例死亡,生存率为44.9%,中位生存时间为55(1~70)个月。

2.4 生存分析

单因素分析TAZ表达与生存时间的关系发现,两组食管癌患者的生存曲线均随着时间递增而从1~0逐渐呈阶梯状下降。开始TAZ阴性组位于阳性组之下,两组间距较小,但随着时间推移,阴性组生存曲线超越阳性组,位于其之上,两组生存曲线间距较大,且无交叉,表明TAZ阴性组的生存率高于阳性组。最终结果显示,TAZ阴性组5年累计生存率高于阳性组,差异具有统计学意义($\chi^2=7.645, P=0.006$,图2)。其他各变量单因素分析结果显示,临床分期晚(HR=1.542, 95% CI: 1.479~1.895, $P=0.045$)、淋巴结转移(HR=1.759, 95% CI: 1.270~2.127, $P=0.036$)的患者总体生存率较差,而患者性别、年龄、肿瘤直径、分化程度对其预后无显著影响(表2)。

为了消除各混杂因素对食管癌患者预后的影响,将单因素分析有统计学意义的变量(临床分期、淋巴结转移情况、TAZ表达)及对预后可能有影响的变量(肿瘤分化程度)纳入COX比例风险模型进行

多因素分析。结果显示,只有临床分期和TAZ表达是食管癌预后的独立影响因子(HR=1.267,95%CI:1.029~1.560,P=0.026和HR=1.405,95%CI:1.089~1.813,P=0.009),即临床分期晚、TAZ阳性的患者生存期短。

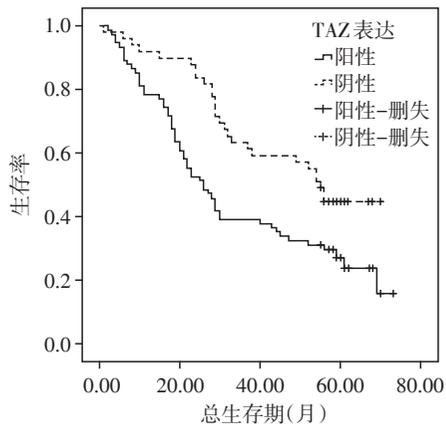


图2 食管癌患TAZ阳性组和阴性组的OS曲线

表2 123例食管癌患者总生存期单因素分析

临床病理参数	HR	95%CI	P值
性别(女 vs. 男)	1.455	0.911~2.324	0.117
年龄(>60岁 vs. ≤60岁)	1.205	0.747~1.942	0.444
肿瘤直径(>3 cm vs. ≤3 cm)	0.781	0.542~1.479	0.278
分化程度(高+中 vs. 低)	1.371	0.756~2.488	0.299
临床分期(Ⅲ+Ⅳ vs. Ⅰ+Ⅱ)	1.542	1.479~1.895	0.045
淋巴结转移(有 vs. 无)	1.759	1.270~2.127	0.036
TAZ表达(阳性 vs. 阴性)	1.889	1.168~3.055	0.006

3 讨论

TAZ也称为含ww域转录调控因子(WWTR1),2000年作为14-3-3蛋白的结合蛋白而被发现^[7]。14-3-3蛋白是一种具有7个同源体的蛋白家族,能够结合特定基序磷酸化的丝氨酸位点,可与细胞内不同磷酸化蛋白发生结合,参与细胞信号转导过程,如细胞分化、细胞周期调控、细胞凋亡等。已有研究表明TAZ在多种肿瘤中有过表达现象^[8-9]。在乳腺癌方面,TAZ可以维持干细胞的自我更新,促进乳腺癌的形成^[10],TAZ和转录因子中的TEAD家族结合后,激活肿瘤基因Cyr61和CTGF,从而引起抗肿瘤药紫杉醇 taxol的耐受性^[11]。在肺癌方面^[12],TAZ的转导可以促进支气管上皮细胞的增生,导致非小细胞型肺癌的发生,同时TAZ高表达的肺癌患者生存期更短,而沉默TAZ后,细胞增生受到抑制,细胞周期循环终止。

本实验通过免疫组化方法,检测123例食管癌

和癌旁组织中TAZ蛋白的表达水平,发现TAZ在食管癌组织中的阳性表达率为60.2%,明显高于癌旁正常食管黏膜组织(18.7%, $P < 0.001$)。并且TAZ在癌旁正常食管黏膜中的表达,主要位于基底层细胞的细胞核,而基底层也是食管癌干细胞的发源地,表明TAZ可能参与了干细胞的自我更新,促进了食管癌的发生发展。而结合患者的临床病理参数分析发现,TAZ蛋白的表达与肿瘤的分化程度($P=0.044$)、临床分期有关($P=0.021$),而与患者性别、年龄、肿瘤直径、淋巴结转移情况无关。即肿瘤分化程度较低、分期越晚,TAZ的表达率越高,提示TAZ可能促进了食管癌发展侵袭。但是却与淋巴结转移情况无明显相关性,一方面可能因为影响食管癌淋巴结转移的因素较多,TAZ作用甚微,另一方面也可能是本研究的样本量较少,没有达到预期结果。预后分析发现,TAZ阳性表达者较阴性表达者的5年生存率低,生存时间短。COX比例风险模型多因素分析发现,TAZ及肿瘤分期是食管癌患者预后的独立影响因子。

本研究食管癌病例中大部分为鳞状细胞癌,但是西方国家以腺癌为主,所以TAZ蛋白在食管鳞癌中的表达情况及临床意义罕见报道。仅有日本学者认为其同源蛋白YAP在食管鳞癌中过表达并且和食管癌患者的预后差相关^[13]。虽然YAP和TAZ为同源蛋白,但他们在不同组织中对Hippo通路的调节作用可能不同。研究发现分别敲除YAP和TAZ后可引起小鼠肾脏的不同表型,敲除YAP后导致小鼠肾脏的发育不良,而TAZ的单独缺失,却会导致多囊肾的产生^[14]。而我们发现,在食管鳞癌中,TAZ和YAP一样,在食管癌组织中都存在过表达现象,并且高表达的患者预后都比较差。

近些年研究发现,TAZ是Hippo肿瘤抑制通路中的关键调节因子,正常情况下Hippo通路激活使得TAZ磷酸化从而抑制它对细胞的调控。当Hippo通路受到抑制时,TAZ过表达,过多未被磷酸化的TAZ进入胞核,与多种因子结合后能够增强细胞的增殖力,导致上皮间质转化促进细胞侵袭^[15-16]。

[参考文献]

[1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. Int J Cancer, 2010, 127(12):2893-2917

[2] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4):225-249

(下转第504页)

- tory arrest: a change of paradigm? [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2012, 41(1): 185-191
- [5] Ko T, Higashitani M, Sato A, et al. Impact of acute kidney injury on early to long-term outcomes in patients who underwent surgery for type a acute aortic dissection [J]. *Am J Cardiol*, 2015, 116(3): 463-468
- [6] Kawahito K, Adachi H, Murata S, et al. Coronary malperfusion due to type A aortic dissection: mechanism and surgical management [J]. *Ann Thorac Surg*, 2003, 76(5): 1471-1476; discussion 1476
- [7] Mori Y, Sato N, Kobayashi Y, et al. Acute kidney injury during aortic arch surgery under deep hypothermic circulatory arrest [J]. *J Anesth*, 2011, 25(6): 799-804
- [8] Schoenrath F, Laber R, Maralushaj M, et al. Survival, neurologic injury, and kidney function after surgery for acute type a aortic dissection [J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2016, 64(2): 100-107
- [9] Wu HB, Ma WG, Zhao HL, et al. Risk factors for continuous renal replacement therapy after surgical repair of type A aortic dissection [J]. *J Thorac Dis*, 2017, 9(4, SI): 1126-1132
- [10] Liu N, Zhang W, Ma WG, et al. Risk factors for hypoxemia following surgical repair of acute type A aortic dissection [J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2017, 24(2): 251-256
- [11] Nakajima T, Kawazoe K, Izumoto H, et al. Risk factors for hypoxemia after surgery for acute type A aortic dissection [J]. *Surg Today*, 2006, 36(8): 680-685
- [12] Xu JR, Zhu JM, Jiang J, et al. Risk factors for long-term mortality and progressive chronic kidney disease associated with acute kidney injury after cardiac surgery [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(45): e2025
- [13] Ruel M, Chan V, Boodhwani M, et al. How detrimental is reexploration for bleeding after cardiac surgery? [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2017, 154(3): 927-934
- [收稿日期] 2017-09-14

(上接第499页)

- [3] Yu FX, Guan KL. The hippo pathway: regulators and regulations [J]. *Genes Dev*, 2013, 27(4): 355-371
- [4] Yuen HF, McCrudden CM, Huang YH, et al. TAZ expression as a prognostic indicator in colorectal cancer [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54211
- [5] Zhao D, Zhi X, Zhou Z, et al. TAZ antagonizes the WWP1-mediated KLF5 degradation and promotes breast cell proliferation and tumorigenesis [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(1): 59-67
- [6] Xie M, Zhang L, He CS, et al. Prognostic significance of TAZ expression in resected non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(5): 799-807
- [7] Kanai F, Marignani PA, Sarbassova D, et al. TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins [J]. *EMBO J*, 2000, 19(24): 6778-6791
- [8] Zhou Z, Hao Y, Liu N, et al. TAZ is a novel oncogene in non-small cell lung cancer [J]. *Oncogene*, 2011, 30(18): 2181-2186
- [9] Pan D. The hippo signaling pathway in development and cancer [J]. *Dev Cell*, 2010, 19(4): 491-505
- [10] Cordenonsi M, Zanconato F, Azzolin L, et al. The hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells [J]. *Cell*, 2011, 147(4): 759-772
- [11] Lai D, Ho KC, Hao Y, et al. Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional targets Cyr61 and CTGF [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(7): 2728-2738
- [12] Noguchi S, Saito A, Horie M, et al. An integrative analysis of the tumorigenic role of TAZ in human non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(17): 4660-4672
- [13] Muramatsu T, Imoto I, Matsui T, et al. YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(3): 389-398
- [14] Reginensi A, Scott RP, Gregorieff AA, et al. Yap- and Cdc42-dependent nephrogenesis and morphogenesis during mouse kidney development [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(3): e1003380
- [15] Lei QY, Zhang H, Zhao B, et al. TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(7): 2426-2436
- [16] Li ZW, Wang YL, Zhu YM, et al. The hippo transducer TAZ promotes epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell maintenance in oral cancer [J]. *Mol Oncol*, 2015, 9(6): 1091-1105
- [收稿日期] 2017-02-08