

应用组织芯片技术检测结直肠癌中MRP1/CD9的表达

季润元^{1*}, 史恩溢², 王永实¹, 李小宁², 赵玉芳³

(¹淮阴卫生高等职业技术学校病理教研室, 江苏 淮安 223300; ²苏州卫生职业技术学院病理教研室, 江苏 苏州 215009; ³淮安市肿瘤医院病理科, 江苏 淮安 223200)

[摘要] **目的:**探讨结直肠癌组织中运动相关蛋白-1(MRP1/CD9)的表达及其与肿瘤转移的关系。**方法:**应用组织芯片和免疫组织化学技术检测244例结直肠癌组织中MRP1/CD9的蛋白表达。**结果:**MRP1/CD9在结直肠癌组织中阳性率为77.9%,其表达与患者的性别、年龄、浸润深度无关,而与肿瘤的分化程度、Dukes分期、淋巴结转移有关;其中高-中分化组表达高于低分化组;Dukes A+B期表达高于C+D组;无淋巴结转移组表达高于有淋巴结转移组,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。二元Logistic回归前进法显示:分化程度最先进入方程,是影响MRP1/CD9表达最显著因素。MRP1/CD9表达在单因素时和Dukes分期负相关,但在多因素时被掩盖。**结论:**MRP1/CD9在结直肠癌组织中的表达缺失与肿瘤的转移密切相关,有望成为判断结直肠癌预后的新标志。

[关键词] 结直肠癌; MRP1/CD9; 转移; 组织芯片; 免疫组织化学

[中图分类号] R735.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)08-1066-04

Detecting of MRP1/CD9 in colorectal carcinoma using tissue microarrays

Ji Run-yuan^{1*}, Shi En-yi², Wang Yong-shi¹, Li Xiao-ning², Zhao Yu-fang³

(¹Department of Pathology, Huaiyin Advanced Vocational and Technical Hygien School, Huaian 223300;

²Department of Pathology, Suzhou Health College, Suzhou 215009; ³Department of Pathology, Cancer Hospital of Huaian City, Huaian 223200, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of MRP1/CD9 as well as their correlations with the metastasis of colorectal carcinoma. **Methods:** Tissue microarray and immunohistochemistry were used to detect the expression of MRP1/CD9 in 244 cases of colorectal carcinoma. **Results:** The positive rate of MRP1/CD9 expression was 77.9% in colorectal carcinoma. The expression of MRP1/CD9 had no relationship with the patients' sex, age, and the depth of infiltration, but it had relationships with the differentiated degree, Dukes stages, and lymphnode metastasis. The expression of MRP1/CD9 was higher in colorectal carcinomas with moderate or high differentiation than that in the ones with poor differentiation. The expression of MRP1/CD9 was higher in colorectal carcinomas with Dukes A+B stages than that in the ones with Dukes C+D stages. The expression of MRP1/CD9 was higher in colorectal carcinomas without lymphnode metastasis than that in the ones with lymphnode metastasis. Above all had the significant meaning ($P < 0.05$). Forward stepwise binary logistic regression reveals: differentiation, which went into the equation first, is the significant factor of MRP1/CD9 expression. The expression of MRP1/CD9 was negatively related to Dukes stages in monofactorial analysis, but disappearing in multifactorial analysis. **Conclusion:** The loss expression of MRP1/CD9 are closed correlated with the metastasis of colorectal carcinoma, and this marker has hopes to become a new target to evaluate the tumor prognosis.

[Key words] colorectal carcinoma; MRP1/CD9; metastasis; tissue microarray; immunohistochemistry

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(8): 1066-1069]

组织芯片(tissue microarray, TMA)是生物芯片的一个重要组成部分,属于新型生物高科技技术。

它将几十、几百种不同个体的组织标本按预定序列排列在石蜡等载体上,进行形态学观察或分子生物学实验,是一种新型高通量、多样本的研究工具。组织芯片技术可与传统的病理形态、组织化学、免疫组织化学、原位杂交、荧光核酸原位杂交及原位PCR

[基金项目] 江苏省卫生厅医学科技发展基金(J201116)

*通讯作者, E-mail: christ7777@163.com

等技术相结合,对特定基因和蛋白质进行定性或半定量的研究。移动相关蛋白-1(motility related protein-1,MRP1)属于四跨膜蛋白超家族(TM4SF)成员,具有抑制细胞移动的功能,与肿瘤的浸润和转移密切相关^[1]。本研究通过组织芯片技术,应用免疫组织化学方法,探讨结直肠癌组织中此蛋白的表达情况及其与临床病理参数之间的关系,以期为结直肠癌的治疗找到新的分子靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

收集江苏省淮安市肿瘤医院2005~2010年结直肠癌手术切除标本244例。男127例,女117例。所有样本切片均经组织病理学证实。病理分型均为腺癌,其中高分化36例,中分化163例,低分化45例。Dukes分期:A期13例、B期134例、C期74例、D期23例。所有患者均无肠癌家族史,术前均未接受过放化疗。

MRP1/CD9单克隆抗体购自美国Thermo公司,MaxVision试剂盒、DAB酶底物显色试剂盒等试剂购自福州迈新公司。

1.2 方法

1.2.1 组织芯片构建

所有病例的肿瘤组织标本均经10%中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,4 μm连续切片。依据HE切片确定具有代表性的病变部位,应用组织芯片构建仪,以专利技术(专利号200920350099.2)制备组织芯片。主要步骤如下:用构建仪在选取的组织蜡块中穿取组织,直径1.5 mm。应用自有的组织芯片制备系统(包括组织芯片包埋底模、组织芯片胶、组织芯片阵列模、一次性加取样针及其配套使用的针芯和针帽、定位冷却器以及植芯器等组成部分)依次按序操作,成功制成含有244例结直肠癌的组织芯片蜡块,每个病例均含有2个原发灶肿瘤组织。用德国LEICA石蜡切片进行连续切片,厚度为4 μm。

1.2.2 免疫组织化学染色

采用MaxVision法,抗MRP1/CD9抗体工作浓度为1:50。结直肠癌组织芯片常规脱蜡水化后,1 mmol/L EDTA (pH8.0)水浴修复20 min,加一抗4℃冰箱过夜,第2天切片恢复室温后,加MaxVision二抗温箱培育30 min,DAB显色,苏木精衬染。以PBS代替一抗作阴性对照。

1.2.3 结果判定

MRP1/CD9免疫组化阳性产物呈棕褐色颗粒

状位于肿瘤细胞膜,以阳性细胞数>25%为阳性(+),肿瘤细胞膜全部不着色或阳性细胞数<25%为阴性(-)。结直肠癌组织2个点阵中有1个染色阳性即判断为此病例阳性,2个点阵中无1个染色阳性即判断为此病例阴性。

1.3 统计学方法

应用SPSS17.0软件作统计处理,MRP1/CD9蛋白的表达与临床病理参数之间的单因素分析采用 χ^2 检验;多因素分析采用二元Logistic回归前进法。以 $\alpha = 0.05$ 作为检验标准。

2 结果

2.1 结直肠癌组织芯片

488个组织点阵排列整齐,HE、免疫组化染色均匀,无掉片、脱片、扭曲和重叠现象。244例结直肠癌中190例阳性(图1),阳性率为77.9%。

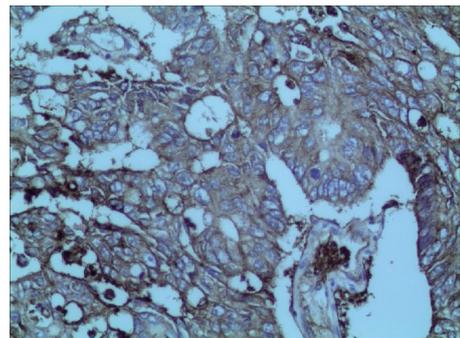


图1 MRP1/CD9在结直肠癌中阳性表达(MaxVision,×100)
Figure 1 The positive expression of MRP1/CD9 in colorectal carcinoma(MaxVision,×100)

2.2 单因素分析

MRP1/CD9蛋白的表达与患者的年龄、性别、浸润深度均无关($P > 0.05$),而与肿瘤的分化程度、Dukes分期、淋巴结转移有关。中高分化组MRP1/CD9蛋白的阳性表达率显著高于低分化组($P < 0.01$);Dukes分期A+B组MRP1/CD9蛋白的阳性表达率高于C+D组($P < 0.05$);无淋巴结转移组MRP1/CD9蛋白的阳性表达率高于有淋巴结转移组($P < 0.05$,表1)。

2.3 多因素分析

将年龄<60岁、男性、高分化、淋巴结无转移、Dukes分期A+B期赋值“0”,年龄≥60岁、女性、中低分化、淋巴结有转移、Dukes分期C+D期赋值“1”进行二元logistic回归前进法分析。结果表明只有分化程度、淋巴结转移和MRP1/CD9表达显著相关。分化程度最先进入方程、其次为淋巴结转移。分化程度是影响MRP1/

CD9 表达最显著因素。MRP1/CD9 表达在单因素时和 Dukes 分期负相关,但在多因素时被掩盖(表 2)。

表 1 MRP1/CD9 在结直肠癌组织中的表达与临床病理特征的关系

Table 1 The relationships between the expression of MRP1/CD9 and their clinicopathological characteristic in colorectal carcinoma

临床病理特征	n	阳性[n(%)]	χ^2 值	P 值
性别				
男	127	104(81.9)	2.485	> 0.05
女	117	86(73.5)		
年龄(岁)				
< 60	96	75(78.1)	0.006	> 0.05
≥60	148	115(77.7)		
分化程度				
中/高	199	163(81.9)	10.223	< 0.01
低	45	27(60.0)		
浸润深度				
浆膜内	60	46(76.7)	0.067	> 0.05
浆膜外	184	144(78.3)		
Dukes 分期				
A + B	147	121(82.3)	4.238	< 0.05
C + D	97	69(71.1)		
淋巴结转移				
无	147	122(83.0)	5.634	< 0.05
有	97	68(70.1)		

表 2 二元 logistic 回归方程中的变量

Table 2 The variable in equation of binary logistic regression

		B	SE	Wald	df	P 值	Exp (B)
步骤 1	分化程度	1.105	0.356	9.648	1	0.002	3.019
	常量	0.405	0.304	1.776	1	0.183	1.500
步骤 2	分化程度	1.035	0.361	8.237	1	0.004	2.815
	淋巴结转移	-0.655	0.319	4.219	1	0.040	0.520
	常量	0.751	0.354	4.507	1	0.034	2.119

移有关。其中高-中分化组显著高于低分化组,说明分化越差、恶性程度越高的结直肠癌细胞,发生 MRP1/CD9 蛋白表达缺失的越多。结直肠癌 Dukes A 期为癌肿局限于肠壁内;B 期为癌肿穿透肠壁侵入浆膜或(及)浆膜外,但无淋巴结转移;C、D 期则是癌肿已有淋巴结转移或远处转移。在本组研究中,Dukes 分期 A+B 组 MRP1/CD9 的表达高于 C+D 组,提示结直肠癌发生淋巴结转移或远处转移与 MRP1/CD9 蛋白表达缺失相关。本研究无淋巴结转移组 MRP1/CD9 蛋白的表达高于有淋巴结转移组,也进一步验证了上述这种关联性。本研究结果与在食管癌中的研究相似^[9]。多因素分析显示只有分化程度、淋巴结转移和 MRP1/CD9 表达显著相

3 讨论

MRP1/CD9 是由 Miyake 等^[2]发现的一种能被鼠单克隆抗体 M31-15 识别且能抑制细胞运动的糖蛋白,属于 TM4SF。TM4SF 家族有多个成员,其中 MRP1/CD9、ME491/CD63、KAI1/CD82、CD151 和 CD81,与细胞的运动、增殖及肿瘤细胞的转移相关。目前,MRP1/CD9 是 TM4SF 中研究较多的成员之一,它在许多实体肿瘤细胞株中都有表达,但功能并不完全清楚^[3]。Ikeyama 等^[1]将 MRP1/CD9 的 cDNA 转染到肿瘤细胞中,结果发现肿瘤细胞经转染后其运动和生长能力都受到抑制。MRP1/CD9 这种抑制肿瘤细胞增殖的作用在许多实体肿瘤的研究中也得到了证实。Setoguchi 等^[4]用免疫组织化学方法检测结肠癌患者 MRP1/CD9 的表达,发现 MRP1/CD9 表达阳性患者的生存率明显高于表达阴性患者,提示 MRP1/CD9 对肿瘤有抑制转移的作用。关于 MRP1/CD9 抑制肿瘤细胞转移的作用在其他实体肿瘤,如胃癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、头颈部肿瘤、食管癌的研究中也有所报道^[4-9]。

本研究显示结直肠癌中 MRP1/CD9 蛋白的表达与患者的性别、年龄、肿瘤浸润深度均无关($P > 0.05$),而与肿瘤的分化程度、Dukes 分期、淋巴结转

关。分化程度是影响 MRP1/CD9 表达最显著因素,其次为淋巴结转移。在单因素分析时 MRP1/CD9 表达和 Dukes 分期负相关,但在多因素分析时被掩盖。

MRP1/CD9 抑制肿瘤转移的机制并未完全阐明,现在认为此蛋白可能与 TM4SF 其他成员 ME491/CD63、KAI1/CD82 等彼此交联,并与整合素形成复合体,从而调节整合素的黏附功能,影响整合素介导的肿瘤转移。也有研究指出,MRP1/CD9 和 KAI1/CD82 一样,可能部分通过诱导肿瘤细胞凋亡及抑制肿瘤细胞的运动来抑制肿瘤恶性潜能,并且 MRP1/CD9 和 KAI1/CD82 适度的甲基化可增强这一诱导作用。MRP1/CD9 对肿瘤细胞转移的抑制作用是通过多种途径实现的,并需要其他蛋白质的参

与,确切机制尚待进一步研究。

组织芯片以其高通量、大样本、实验条件一致以及快速的优点,在肿瘤研究中的应用渐趋广泛。本研究使用自主研发的技术制备了结直肠癌组织芯片,实验结果稳定可靠。国内外对 MRP1/CD9 在膀胱癌、肺癌、肝癌、食管癌等多种恶性肿瘤中的表达研究已有文献报道,但均未见到有关 MRP1/CD9 在大样本结直肠癌中表达的研究报道。本研究与其他恶性肿瘤的研究结果相似,提示 MRP1/CD9 的表达缺失与肿瘤的转移密切相关。对 MRP1/CD9 与肿瘤相关性的深入研究,将有助于进一步揭示肿瘤的浸润和转移机制,找到抑制肿瘤转移的靶点或预测肿瘤患者预后的指标。

[参考文献]

- [1] Powner D, Kopp PM, Monkley SJ, et al. Tetraspanin CD9 in cell migration [J]. *Biochem Soc Trans*, 2011, 39(2): 563-567
- [2] Miyake M, Koyama M, Seno M, et al. Identification of the motility-related protein (MRP1), recognized by monoclonal antibody M31-15, which inhibits cell motility [J]. *J Exp Med*, 1991, 174(6): 1347-1354
- [3] Woegerbauer M, Thurnher D, Houben, et al. Expression of the tetraspanins CD9, CD37, CD63, and CD151 in Merkel cell carcinoma; strong evidence for a posttranscriptional fine-tuning of CD9 gene expression [J]. *Mod Pathol*, 2010, 23(5): 751-762
- [4] Setoguchi T, Kikuchi H, Yamamoto M, et al. Microarray analysis identifies versican and CD9 as potent prognostic markers in gastric gastrointestinal stromal tumors [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(4): 883-889
- [5] Romanska HM, Berditchevski F. Tetraspanins in human epithelial malignancies [J]. *J Pathol*, 2011, 223(1): 4-14
- [6] Fan J, Zhu GZ, Niles RM. Expression and function of CD9 in melanoma cells [J]. *Mol Carcinog*, 2010, 49(1): 85-93
- [7] Chen Z, Gu S, Trojanowicz B, et al. Down-regulation of TM4SF is associated with the metastatic potential of gastric carcinoma TM4SF members in gastric carcinoma [J]. *World J Surg Oncol*, 2011, 9: 43-51
- [8] Soyuer S, Soyuer I, Unal D, et al. Prognostic significance of CD9 expression in locally advanced gastric cancer treated with surgery and adjuvant chemoradiotherapy [J]. *Pathol Res Pract*, 2010, 206(9): 607-610
- [9] 季润元, 束晓明, 张徐宁, 等. 食管癌组织 KAI1/CD82、MRP1/CD9 的表达及其病理临床联系 [J]. *江苏医药*, 2010, 36(13): 1498-1501

[收稿日期] 2012-03-31