

TRIP6 在 120 例胃癌组织中的表达及其临床意义

黄 华,姚 婵,张 青,何 鑫,刘益飞,章建国
(南通大学附属医院,江苏 南通 226001)

摘 要: [目的] 探讨甲状腺激素受体相互作用蛋白 6 (TRIP6) 蛋白在胃癌中的表达及临床意义。 [方法] 采用免疫组化法检测 120 例胃癌组织和相应癌旁组织中 TRIP6 蛋白的表达, 并分析其与临床病理学参数和预后的关系。 [结果] TRIP6 蛋白在胃癌组织中阳性表达率为 70.8% (85/120), 显著高于癌旁组织的 35.0% (42/120) ($P<0.05$)。TRIP6 蛋白表达与胃癌患者的肿瘤大小、肿瘤浸润深度、分化程度、淋巴结转移、远处转移及 TNM 分期密切相关 ($P<0.05$)。Kaplan-Meier 分析显示 TRIP6 表达阳性患者有着更差的预后 (5 年生存率 11.8% vs 45.7%, $P<0.05$)。多因素分析显示, 胃癌患者 TNM 分期、远处转移以及 TRIP6 表达是影响胃癌患者预后的独立危险因素。 [结论] TRIP6 蛋白在胃癌组织中表达上调, 且与胃癌患者不良预后相关, TRIP6 的检测将有助于胃癌的诊断、胃癌患者恶性程度和预后的评估。

关键词: 胃肿瘤; TRIP6; 免疫组化; 预后

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2017)12-1004-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2017.12.A015

Expression of TRIP6 in Gastric Cancer and Its Clinical Significance

HUANG Hua, YAO Chan, ZHANG Qing, et al.

(Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of thyroid receptor interacting protein 6 (TRIP6) in gastric cancer and its clinical significance. [Methods] Immunohistochemical analysis was performed to detect TRIP6 expression in 120 specimens of gastric carcinoma and adjacent cancer tissues. The relations of TRIP6 expression with clinicopathological parameters of gastric cancer and the prognosis of patients were evaluated. [Results] Positive expression rate of TRIP6 in gastric cancer was 70.8% (85/120), which was significantly higher than that in adjacent cancer tissues (35.0%, 42/120) ($P<0.05$). The expression of TRIP6 was correlated with the tumor size, depth of invasion, differentiation grade, lymph node metastasis, distant metastasis and TNM stages ($P<0.05$). Kaplan-Meier analysis showed that 5-year survival rate in TRIP6 positive patients was significantly poorer than that in TRIP6 negative patients (11.8% vs. 45.7%, $P<0.05$). Multivariate analysis showed that TNM stages, distant metastasis and TRIP6 expression were independent risk factors for prognosis of gastric cancer. [Conclusion] TRIP6 protein is up-regulated in gastric cancer tissues and is associated with a poor prognosis of patients. Detection of TRIP6 may be valuable for diagnosis and prognosis of patients with gastric cancer.

Key words: gastric neoplasms; TRIP6; immunohistochemistry; prognosis

胃癌是全球高发恶性肿瘤之一, 是我国最常见的消化道肿瘤, 也是全球癌症死亡的第二大原因, 对我国人民的身体健康造成了严重的危害^[1,2]。甲状腺激素受体相互作用蛋白 6 (thyroid receptor inter-

acting protein 6, TRIP6) 属于 zyxin 家族成员, 作为一种局部黏附分子和调节蛋白, 与多种分子作用相关, 具有调节细胞侵袭、迁移、转录调控以及抗凋亡信号传导等多种功能^[3]。本研究运用免疫组织化学法检测 TRIP6 蛋白在胃癌组织中的表达, 并探讨其表达与胃癌各临床病理参数及预后的关系, 以便为

收稿日期: 2017-09-07; 修回日期: 2017-10-10
通讯作者: 章建国, E-mail: 13815212431@163.com

肿瘤治疗提供新的途径。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2010 年 1 月至 2011 年 12 月在南通大学附属医院手术获得的胃癌标本 120 例, 所有标本均经病理证实为胃腺癌, 临床资料完整, 其中男性 76 例, 女性 44 例, 平均年龄(65 ± 1.5)岁。其中高分化癌 14 例, 中分化癌 61 例, 低分化癌 45 例。TNM 分期: I+II 期 46 例, III+IV 期 74 例; 有淋巴结转移者 79 例, 无淋巴结转移者 41 例。另取相应的癌旁组织作为对照。所有患者术前均未行化疗等抗肿瘤治疗, 术后 66 例患者行化疗, 化疗主要为 ECF 方案。出院后即开始对患者进行随访, 随访截止至 2016 年 12 月, 随访率为 100%。

1.2 主要试剂

鼠抗人 TRIP6 单克隆抗体购自于美国 ABCAM 公司。Envision 二步法试剂盒(PV-9000)和 DAB 酶底物显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 免疫组化方法

本研究的组织标本均经过 4% 中性甲醛固定, 取材后经 Leica 自动脱水机脱水处理, 石蜡包埋, $4\mu\text{m}$ 厚度切片, 70°C 烤片 1h 后经二甲苯脱蜡至水。EDTA (pH9.0) 96°C 抗原修复 20min, PBS 冲洗后滴加鼠抗人单克隆抗体 TRIP6 (1:200), 4°C 过夜, 滴加二抗, DAB 显色, 苏木素衬染, 中性树胶封片。

1.4 结果判定

TRIP6 主要表达于细胞核, 细胞核中出现棕黄色颗粒即为阳性表达。每张切片由两位有经验的病理科医生在显微镜下随机选取 10 个高倍视野, 每个

视野分别计数 100 个细胞, 计算阳性细胞数。按照阳性细胞百分比计分, $<5\%$ 为 0 分, $5\% \sim 25\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 为 2 分, $51\% \sim 75\%$ 为 3 分, $>75\%$ 为 4 分。再依据染色强度进行计分, 无着色或者浅染色为 0 分, 中等染色为 1 分, 深染色为 2 分。两种计分相乘之积作为免疫组化半定量积分, 积分 <2 分者为阴性表达, 积分 ≥ 2 分者为阳性表达。

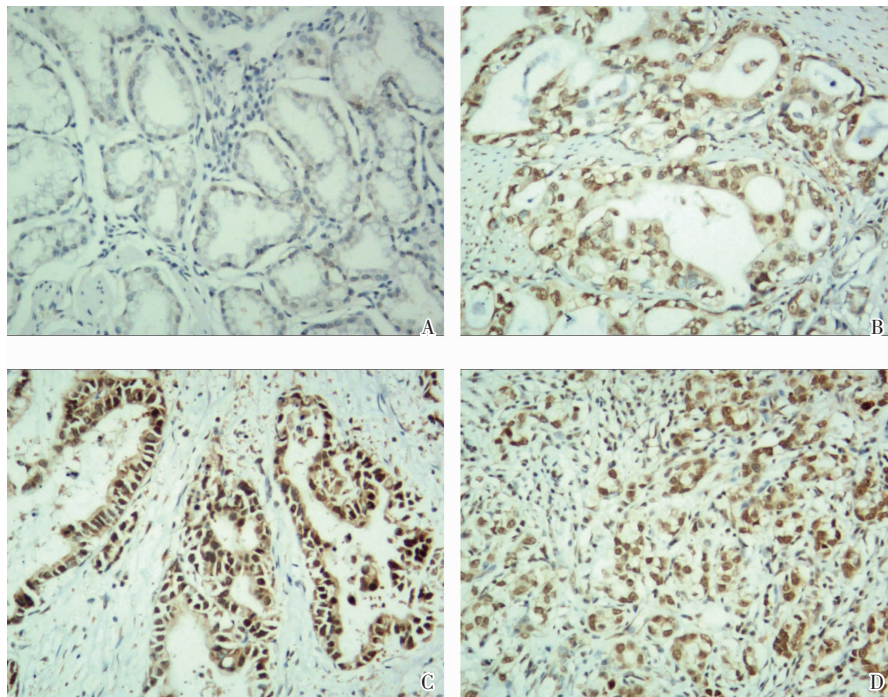
1.5 统计学处理

运用 SPSS19.0 软件进行数据分析, TRIP6 与临床病理学参数之间的关系采用 χ^2 检验, 采用 Kaplan-Meier 法进行生存分析并绘制生存曲线, 将预后可能有关的因素纳入 Cox 风险回归模型进行单因素和多因素分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TRIP6 在胃癌与癌旁组织中表达的比较

TRIP6 阳性表达主要定位于细胞核, 镜下见细胞核中出现棕黄色颗粒 (Figure 1)。TRIP6 在胃癌组织中阳性表达率为 70.8% (85/120), 高于癌旁组织



Note: A: adjacent gastric mucosa; B: well differentiated adenocarcinoma; C: moderately differentiated adenocarcinoma; D: poorly differentiated adenocarcinoma.

Figure 1 Expression of TRIP6 in gastric cancer tissues and adjacent cancer tissues

的 35.0%(42/120), 差异具有统计学意义 ($\chi^2=30.922, P<0.05$)。

2.2 TRIP6 表达水平与胃癌患者临床病理特征的关系

对 120 例胃癌患者不同临床病理特征下 TRIP6 表达的情况进行分析, 结果显示 TRIP6 蛋白的表达与患者性别、年龄、术后化疗与否无关 ($P>0.05$), 而与肿瘤大小、浸润深度、分化程度、淋巴结转移、远处转移以及 TNM 分期有关 ($P<0.05$) (Table 1)。

2.3 TRIP6 表达与胃癌患者预后的关系

TRIP6 阳性表达组 5 年生存率为 11.8%, TRIP6 阴性表达组 5 年生存率为 45.7%, 两组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$) (Figure 2)。单因素分析提示胃癌患者的预后与 TRIP6 表达、肿瘤大小、远处转移以及 TNM 分期有关 ($P<0.05$) (Table 2)。将单因素分析中有统计学意义的因素纳入多因素分析中, 结果显示 TNM 分期、远处转移以及 TRIP6 表达是影响胃癌患者预后的独立危险因素 ($P<0.05$) (Table 3)。

3 讨论

TRIP6 于 1995 年经酵母双杂交筛选时被发现, 是一个 50kDa 大小的 zyxin 家族蛋白^[4], 这一家族还包括 Ajuba、LIMD1、LIM 和 LPP。TRIP6 蛋白 N 端的结构中含有胞核信号传出区域以及 1 个富含脯氨酸的区域, 其 C 端包含有 3 个 LIM 结构域^[5], LIM 结构域中包含两个富含半胱氨酸的锌指结构, 此锌指结构对蛋白—蛋白之间的相互作用有非常重要的影响^[6], TRIP6 的结构特点导致了其具有非常广泛的生物学特性, 能够参与众多蛋白的功能调节。TRIP6 作为一个平台可以募集众多的分子通过调节信号传导, 参与到肌动蛋白细胞骨架重组、细胞迁移、细胞粘附、抗凋亡应答作用及转录调节^[7,8]。Supervillin 蛋白可以通过与 TRIP6 结合从而促进局部的粘附结构和功能的丧失^[9]。TRIP6 与 Endoglin 蛋白联合可以调节肌动蛋白的细胞骨架重组^[10], TRIP6 可以与 CD95 近膜结构域结合, 并且还可以影响 FADD 与死亡结

Table 1 Association of TRIP6 expression with clinicopathological parameters in gastric cancer patients

Clinicopathological parameters	N	TRIP6 expression		χ^2	P
		Positive	Negative		
Gender					
Male	76	55	21	0.236	0.627
Female	44	30	14		
Age(years)					
<60	53	40	13	0.989	0.320
≥60	67	45	22		
Tumor size(cm)					
<5	66	39	27	9.789	0.002
≥5	54	46	8		
Depth of invasion					
T1	11	4	7	8.132	0.017
T2	23	15	8		
T3+T4	86	66	20		
Differentiation					
High	14	4	10	19.591	<0.01
Moderate	61	41	20		
Poor	45	40	5		
Lymph node metastasis					
No	41	19	22	18.082	<0.01
Yes	79	66	13		
Distant metastasis					
No	98	65	33	5.255	0.022
Yes	22	20	2		
TNM stage					
I + II	46	26	20	7.395	0.007
III + IV	74	59	15		
Postoperative chemotherapy					
No	54	38	16	0.899	0.343
Yes	66	41	25		

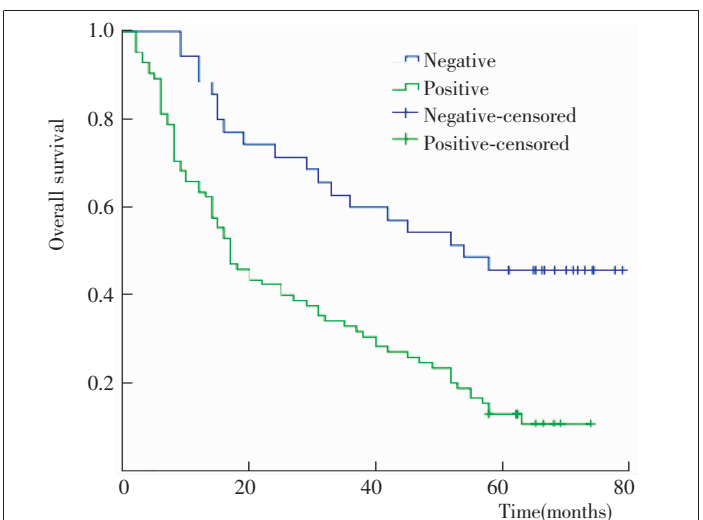


Figure 2 The relationship between expression of TRIP6 in gastric cancer tissues and prognosis of gastric cancer patients

Table 2 Univariate analysis of factors influencing overall survival of gastric cancer patients

Factors	HR	95%CI	P
Age	2.047	0.727~5.763	0.175
Gender	0.664	0.424~1.040	0.074
Depth of invasion	1.442	0.880~2.361	0.146
Lymph node metastasis	2.065	0.975~4.371	0.058
Differentiation	1.476	0.951~2.289	0.082
Chemotherapy	0.491	0.176~1.371	0.174
TNM stage	2.122	1.090~4.132	0.027
Tumor size	0.616	0.385~0.985	0.043
Distant metastasis	2.370	1.321~4.251	0.004
TRIP6 expression	1.921	1.073~3.438	0.028

Table 3 Multivariate analysis of factors influencing overall survival of gastric cancer patients

Factors	HR	95%CI	P
TNM stage	3.774	2.258~6.310	<0.001
Tumor size	0.732	0.458~1.169	0.192
Distant metastasis	3.494	2.004~6.091	<0.001
TRIP6 expression	2.628	1.513~4.563	0.001

构域之间的结合。TRIP6 可以干扰 FADD 的结合、局部粘附和促进侵袭的改变,参与 CD95 信号传递过程,从而在抗凋亡应答作用中起到重要的决定作用,推动细胞的侵袭和迁移^[11]。TRIP6 还参与多种转录因子的相互作用,如甲状腺激素受体 THR- β 、糖皮质激素受体、c-Fos、NF- κ B 亚单位 p65 及 v-Rel 等^[12],可能对转录调节存在着正性或者负性调节。

既往研究显示,TRIP6 在多种肿瘤中均有高表达。Grunewald 等^[13]的研究显示在原发性尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma,ES)中呈显著性高表达,TRIP6 的过表达可能促进 ES 细胞增殖和侵袭的转录特征^[13]。Chin 等^[14]的研究显示 TRIP6 在鼻咽癌中的表达显著高于正常的鼻咽部组织,过表达 TRIP6 可以明显增加鼻咽癌细胞的迁移,敲除 TRIP6 可以抑制鼻咽癌细胞的侵袭转移^[14]。TRIP6 在乳腺癌中的高表达也促进乳腺癌细胞的侵袭^[15],另外敲除 TRIP6 可降低卵巢癌的种植转移以及胶质母细胞瘤的增殖。TRIP6 在肿瘤中的作用也不尽相同,且在胃癌的肿瘤进展中的作用还不明确。

本研究对胃癌组织以及相应癌旁组织中 TRIP6 表达的差异进行研究,旨在更好地阐明 TRIP6 在胃癌发病中所起的作用。本研究显示 TRIP6 的高表达与胃癌患者的肿瘤大小、浸润深度、分化程度、淋巴结转移、远处转移以及 TNM 分期等密切相关 (P <

0.05),而与患者性别、年龄、术后有无化疗等无关 (P >0.05)。对 TRIP6 阴性和阳性不同表达情况下患者总生存分析显示,TRIP6 阳性表达组 5 年生存率低于阴性表达组 (11.8% vs 45.7%),差异有统计学意义 (P <0.05)。对包括 TRIP6 在内的预后可能有关因素进行单因素和多因素分析后显示,胃癌患者 TNM 分期、远处转移以及 TRIP6 表达是影响胃癌患者预后的独立危险因素。说明 TRIP6 在胃癌发生发展中发挥了一定的作用。

综上所述,TRIP6 蛋白在胃癌中的表达异常上调,且其表达水平与胃癌患者不良预后密切相关,提示 TRIP6 蛋白在胃癌发生、发展中可能发挥重要作用,可作为治疗和判定预后的预测因子,但其在胃癌中具体的作用机制有待于在细胞及分子水平作进一步探讨。

参考文献:

- [1] Lin Y,Ueda J,Kikuchi S,et al. Comparative epidemiology of gastric cancer between Japan and China[J]. World J Gastroenterol,2011,17(39):4421-4428.
- [2] Jemal A,Bray F,Center MM,et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin,2011,61(2):69-90.
- [3] Lin VTG,Lin VY,Lai YJ,et al. TRIP6 regulates p27KIP1 to promote tumorigenesis[J]. Mol Cell Biol,2013,33: 1394-1409.
- [4] Murthy KK,Clark K,Fortin Y,et al. ZRP-1, a zyxin-related protein, interacts with the second PDZ domain of the cytosolic protein tyrosine phosphatase hPTP1E[J]. J Biol Chem,1999,274(29):20679-20687.
- [5] Lin FT, Lin VY, Lin VTG,et al. TRIP6 antagonizes the recruitment of A20 and CYLD to TRAF6 to promote the LPA2 receptor-mediated TRAF6 activation[J]. Cell Discov, 2016,2:15048.
- [6] Bach I. The LIM domain:regulation by association[J]. Mech Dev,2000,91(1-2):5-17.
- [7] Chastre E,Abdessamad M,Kruglov A,et al. TRIP6,a novel molecular partner of the MAGI-1 scaffolding molecule, promotes invasiveness[J]. FASEB J,2009,23(3):916-928.
- [8] Shuyu E,Lai YJ,Tsukahara R,et al.Lysophosphatidic acid 2 receptor-mediated supramolecular complex formation regulates its antiapoptotic effect[J]. J Biol Chem,2009, 284(11):14558-14571.
- [9] Takizawa N,Smith TC,Nebl T,et al. Supravillin modulation of focal adhesions involving TRIP6/ZRP-1 [J]. J Cell

- Biol, 2006, 174(3):447-458.
- [10] Sanz-Rodriguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, et al. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins[J]. J Biol Chem, 2004, 279(31):32858-32868.
- [11] Steller EJA, Borel Rinkes IHM, Kranenburg O. How CD95 stimulates invasion[J]. Cell Cycle, 2011, 10:3857-3862.
- [12] Handschick K, Beuerlein K, Jurida L, et al. Cyclin-dependent kinase 6 is a chromatin-bound cofactor for NF- κ B-dependent gene expression[J]. Mol Cell, 2014, 53(2):193-208.
- [13] Grunewald TG, Willier S, Janik D, et al. The Zyxin-related protein thyroid receptor interacting protein 6 (TRIP6) is overexpressed in Ewing's sarcoma and promotes migration, invasion and cell growth[J]. Biol Cell, 2013, 105(11):535-547.
- [14] Chin D, Boyle GM, Williams RM, et al. Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer [J]. Int J Cancer, 2005, 113(5):789-797.
- [15] Glondou-Lassis M, Dromard M, Lacroix-Triki M, et al. PT-PL1/PTPN13 regulates breast cancer cell aggressiveness through direct inactivation of Src kinase[J]. Cancer Res, 2010, 70(12):5116-5126.

凡临床试验都应在中国临床试验注册中心注册

全球临床试验注册制度由世界各国政府共同决定由 WHO 领导建立。临床试验注册具有伦理和科学的双重意义,目的是为了尊重和珍惜所有试验参与者的贡献,他们的贡献用于改善全社会的医疗保健,因此,任何临床试验都与公众利益相关。公开临床试验的信息,并将其置于公众监督之下是试验研究者的义务和道德责任。临床试验注册不仅能确保追溯每个临床试验的结果,公开在研试验或试验结果信息还有助于减少不必要的重复研究。

中国临床试验注册中心(Chinese Clinical Trial Register, ChiCTR)为国家卫生计生委(原卫生部)下属的国家临床试验注册中心,是世界卫生组织国际临床试验注册协作网一级注册机构(World Health Organization International Clinical Trial Registration Platform Primary Register, WHO ICTRP Primary Register),由中国循证医学中心和四川大学华西医院等于 2005 年 7 月 25 日正式成立并运行。

ChiCTR 的宗旨是联合中国和全球的临床医师、临床流行病学家、统计学家、流行病学家和医疗卫生管理者,严格科学地管理中国临床试验信息,提高其质量,为广大医务工作者、医疗卫生服务消费者和政府卫生政策制定者提供可靠的临床试验证据,让医疗卫生资源更好地服务于中国人民和全人类的健康事业。

所有在人体实施的试验均属于临床试验,都应该先注册后实施。凡已注册临床试验都会被授予 WHO ICTRP 全球统一的唯一注册号。

我国众多医学期刊已和中国临床试验注册中心共同建立了临床试验报告发表机制,正在分步实施优先发表、直到只发表具有全球性唯一的注册号的临床试验报告。

ChiCTR 接受中国地区及全球的临床试验注册申请,还接受获得 WHO ICTRP 认证的二级注册机构输送的注册资料,并向 WHO ICTRP 中央数据库输送注册信息供全球检索。除注册临床试验外,ChiCTR 以中国循证医学中心、循证医学教育部网上合作研究中心、中国 Cochrane 中心、英国 Cochrane 中心、四川大学华西医院国际临床流行病学网华西资源与培训中心为人才和技术支持平台,负责指导临床试验设计、中心随机、论文写作、教育培训,推动提高我国临床试验的质量。

通过 ChiCTR 检索入口网址 www.chictr.org,公众可方便地查询已注册临床试验信息,并与 WHO 全球检索入口链接,可方便地查询全球已注册临床试验。