

ZIP4 蛋白在胃癌中的表达及其临床意义

徐志远, 程向东, 杜义安, 黄 灵

(浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022)

摘 要: [目的] 研究 ZIP4 蛋白在胃癌中的表达并分析其临床意义。[方法] 免疫组化检测 70 例手术切除胃癌组织及相应癌旁组织标本中 ZIP4 的表达, 并分析其与患者临床病理特征及预后的关系。[结果] 胃癌及癌旁组织中 ZIP4 阳性表达率分别为 52.9%(37/70) 及 92.9%(65/70)。与癌旁组织相比, 68.6%(48/70) 病人的胃癌组织中 ZIP4 表达明显下降; ZIP4 的表达水平与患者的性别、年龄、肿瘤大小、部位、浸润深度、淋巴结转移均无相关性 ($P>0.05$), 而与肿瘤的 Lauren's 分型、TNM 分期明显有关 ($P<0.05$); 单因素及多因素分析均显示, 肿瘤侵犯深度、淋巴结转移、Lauren's 分型、TNM 分期及 ZIP4 表达水平是影响胃癌预后的独立危险因素 ($P<0.05$), ZIP4 低表达组患者 5 年生存率明显降低。[结论] ZIP4 表达水平与胃癌 Lauren's 分型、临床分期及预后密切相关, 可作为判断胃癌生物学行为和预后的重要参考指标。

关键词: 胃肿瘤; ZIP4; 预后; 免疫组织化学

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)06-0476-04

Expression of ZIP4 Protein in Gastric Cancer and Its Clinical Significance

XU Zhi-yuan, CHENG Xiang-dong, DU Yi-an, et al.

(Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of ZIP4 protein in gastric cancer and its clinical significance. [Methods] Expressions of ZIP4 protein in cancer tissues and cancer adjacent tissues were detected immunohistochemically in 70 cases with gastric cancer, and their relationships with clinicopathological features and prognosis were analyzed. [Results] The positive rates of ZIP4 expression in gastric cancer tissues and cancer adjacent tissues were 52.9%(37/70) and 92.9%(65/70) respectively. Lower expression of ZIP4 in gastric cancer tissue than that in cancer adjacent tissues was found in 68.6%(48/70) of patients. Expression of ZIP4 did not correlate to age, gender, tumor size, location, invasive depth or lymph nodes metastasis ($P>0.05$), but correlated to the Lauren's type and TNM staging ($P<0.05$). Both univariate or multivariate analysis revealed that invasive depth, lymph nodes metastasis, Lauren's type, TNM stage and ZIP4 expression were independent predictors of prognosis ($P<0.05$). Patients with lower ZIP4 expression resulted worse 5-year survival. [Conclusion] Expression of ZIP4 in gastric cancer relates to the Lauren's type, clinical stage and prognosis, and it might be useful to evaluate the biological behavior and prognosis for gastric cancer.

Subject words: gastric neoplasms; ZIP4; prognosis; immunohistochemistry

我国是胃癌高发地区之一, 且中晚期胃癌(进展期胃癌) 占很大的比例, 所以我国的胃癌死亡率较高, 约占同期世界胃癌死亡人数的 40%。目前, 胃癌的发病机制尚不明确, 而传统治疗方法包括化疗、放疗等疗效有限, 只有深入了解胃癌生物学分子机制并从中寻找有效靶点, 才能从根本上达到提高胃癌疗效的目的。研究表明, ZIP4 表达异常与许多肿瘤

的发生、发展相关, 本文将研究 ZIP4 蛋白在胃癌中的表达并进一步分析其临床意义。

1 资料与方法

1.1 资 料

病例选择标准: ①均接受标准的 D2+根治术; ②术后病理均证实为胃腺癌; ③手术前后均未接受任何抗肿瘤治疗; ④临床病理及术后随访资料完整。按此标准, 入选 2006 年 1 月~2011 年 12 月在浙江省肿瘤医院手术切除的 70 例胃癌患者, 其中男性 41

基金项目: 浙江省自然科学基金(LY12H16029, LY13H160027);

浙江省中医药重点研究计划(2012ZZ002)。

通讯作者: 程向东, 主任医师, 教授, 博士; 浙江省肿瘤医院腹部肿瘤外科, 浙江省杭州市半山桥广济路 38 号(310022); E-mail: chengxd516@126.com。

收稿日期: 2013-03-27; **修回日期:** 2013-05-06

例,女性 29 例,年龄 42~84 岁(中位年龄 65.5 岁)。收集完整临床病理资料,调取石蜡包埋的癌和癌旁组织标本做病理切片及免疫组化检测。

1.2 试剂和仪器

鼠抗人 ZIP4 抗体购自英国 Abcam 公司,试剂盒选用即用型免疫组化二步法 Elivision™ 染色试剂盒(福州迈新生物技术开发公司)

仪器:石蜡切片机(SHANDON AS325);显微镜(OLYMPUS BX40);电热恒温干燥箱(56℃~65℃,上海跃进医疗器械一厂);微波炉(WHIRLPOOL vIP202S)。

1.3 方法

免疫组化按 SP 法标准步骤进行。抗原修复采用抗原热修复方法:将枸橼酸溶液在微波炉加热至沸腾,将组织切片放入,调整火力,使溶液温度控制在 95℃左右,20min 后取出修复盒使其在室温中自然冷却,PBS 漂洗 3 次;一抗浓度:用 PBS 配置鼠抗人工作液 ZIP4 工作液(1:100);免疫组化结果判断标准:随机选取连续 10 个高倍镜(400×),数取 ZIP4 核染阳性细胞所占比例来判断目的蛋白的表达强弱:整张切片无 1 个阳性细胞(-);阳性细胞数<10%(+);阳性细胞数 10%~50%(++);阳性细胞数>50%(+++)。根据 ZIP4 在胃癌与癌旁组织间表达差异将胃癌组织分为 ZIP4 低表达(胃癌组织低于癌旁组织)及正常/高表达组(胃癌组织等于或高于癌旁组织)。

1.4 术后随访

术后采用门诊、信件、电话相结合的方式对患者

进行随访。末次随访时间为 2012 年 12 月。中位随访期为 42.5(3~78)个月。

1.5 统计学处理

两组间分类数据的比较应用卡方检验。生存数据先进行单因素分析,采用 Kaplan-Meier 法来描绘生存曲线,用 Log-Rank 法检验有无统计学意义。有统计学意义的因素再纳入 COX 回归模型进行多因素分析。所有统计分析均采用 SPSS 10.0 统计软件包和 GraphPad Prism 5.0 软件进行, $P<0.05$ 为结果有统计学意义。

2 结果

2.1 ZIP4 在胃癌组织标本中的表达

用免疫组化的方法检测 70 对胃癌及癌旁组织标本中 ZIP4 表达情况,结果显示 ZIP4 主要染色于细胞核,68.6%(48/70) 患者的胃癌组织中 ZIP4 的表达水平明显低于癌旁组织(Figure 1)。胃癌及癌旁组织中 ZIP4 阳性表达率分别为 52.9%(37/70)及 92.9%(65/70)。

2.2 ZIP4 的表达水平与临床病理因素的关系分析

ZIP4 的表达水平在胃癌不同 Lauren's 分型、TNM 分期差异有统计学意义($P<0.05$,Table 1)。在 ZIP4 低表达的胃癌患者中,弥漫型及Ⅲ/Ⅳ期肿瘤所占的比例均明显升高。

2.3 ZIP4 表达与患者预后的关系

单因素分析显示,肿瘤侵犯深度、淋巴结转移、

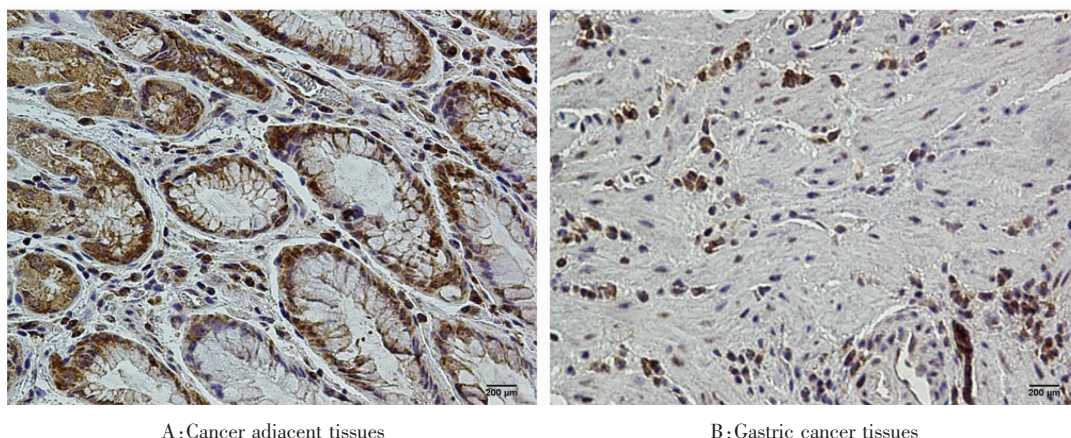


Figure 1 Expressions of ZIP4 in gastric cancer and cancer adjacent tissues

Lauren’s 分型、TNM 分期以及 ZIP4 表达水平等临床病理因素与胃癌患者术后生存有关(Table 2)。将单因素分析中有统计学意义的变量纳入 Cox 回归行多因素分析,结果显示肿瘤侵犯深度、淋巴结转移、Lauren’s 分型、TNM 分期以及 ZIP4 低表达是影响患者预后的独立危险因素(Table 3)。有、无 ZIP4 低表达的患者 5 年生存率分别为 27% 及 62% ($P=0.045$, Figure 2)。

Clinicopathological variables	Expression level of ZIP4		P
	Low	Normal/high	
Number of cases	48	22	
Age(years)			
≤ 50	19	7	0.533
> 50	29	15	
Gender			
Male	27	14	0.560
Female	21	8	
HP status			
Positive	41	17	0.619
Negative	7	5	
Tumor size(cm)			
< 3	26	13	0.700
≥ 3	22	9	
Location			
Antrum	27	11	0.826
Body	11	5	
Cardia	10	6	
Invasive depth			
T _{1/2}	14	9	0.332
T _{3/4}	34	13	
Lymph node metastasis			
Yes	36	14	0.329
No	12	8	
TNM stage			
I / II	11	15	<0.001
III / IV	37	7	
Lauren type			
Intestinal	30	19	0.043
Diffuse	18	3	
Serum CEA(ng/ml)*			
< 5	30	13	0.786
≥ 5	18	9	
Serum CA199 (U/ml) [△]			
< 37	34	15	0.822
≥ 37	14	7	

*:Normal range of CEA 0~5ng/ml; △:Normal range of CA199 0~37U/ml.

3 讨 论

锌(Zn)是人体中一种重要的微量元素,是构成机体多种酶的必需组分。ZIP4 蛋白由 *SLC39A4* 基因编码,是Zn 离子转运体 ZIP 超家族的一员,它负责摄取外界的锌离子进入细胞质,它对于肠道细胞摄取食物中的锌离子进入细胞膜有重要的作用^[1]。Zn 缺乏可引起人体一系列紊乱及病理变化,如广泛的

Table 2 Univariate analysis of the factors influencing survival of gastric cancer patients		
Clinicopathological variables	5-year survival(%)	P
Age(years)		
≤ 50	34	0.341
> 50	42	
Gender		
Male	41	0.702
Female	35	
HP status		
Positive	40	0.625
Negative	38	
Tumor size(cm)		
< 3	41	0.566
≥ 3	38	
Location		
Antrum	42	0.402
Body	47	
Cardia	28	
Invasive depth		
T _{1/2}	73	0.002
T _{3/4}	28	
Lymph node metastasis		
Yes	93	<0.001
No	25	
TNM stage		
I / II	82	<0.001
III / IV	14	
Lauren type		
Intestinal	75	0.004
Diffuse	31	
Serum CEA(ng/ml)		
< 5	47	0.920
≥ 5	42	
Serum CA199 (U/ml)		
< 37	50	0.756
≥ 37	37	
ZIP4 expression		
Low	27	0.008
Normal/high	62	

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

Clinicopathological variables	HR	95%CI*	P
Invasive depth	1.544	0.879~2.616	0.121
Lymph node metastasis	0.325	0.170~0.750	0.037
TNM stage	3.609	1.944~13.795	0.006
Lauren type	1.534	1.189~3.017	0.025
ZIP4 expression	0.413	0.174~0.980	0.045

*: Confidence intervals.

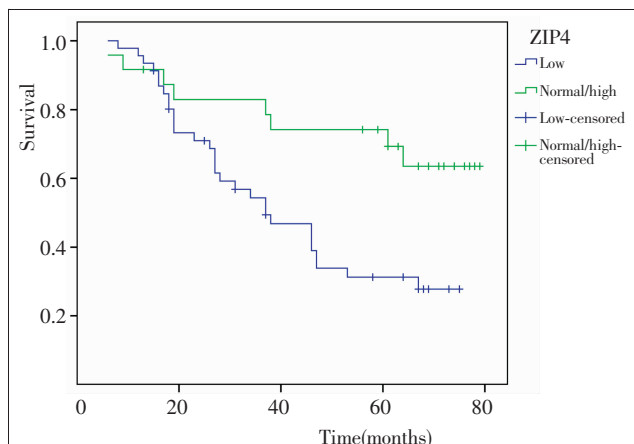


Figure 2 Survival curves of patients with gastric cancer

免疫功能损害等。人们关注 ZIP4 蛋白的功能就是从 ZIP4 与一些免疫系统的疾病开始的。在对人类基因缺陷遗传病肠病性肢端皮炎(acrodermatitis enteropathica, AE)的研究中发现, ZIP4 编码基因的缺失或突变是 AE 的主要致病原因^[2]。ZIP4 表达下降时细胞摄入 Zn 离子的能力下降。而 Zn 离子缺乏是胃癌发生的重要原因^[3], 因此, 研究 ZIP4 蛋白在胃癌中的表达及其生物学功能具有重要的意义。

近年来研究发现 ZIP4 蛋白在许多肿瘤中发挥着重要的功能。Li 等^[4]通过免疫组化的方法检测了 ZIP4 蛋白在胰腺癌中的表达, 结果发现 94% 的癌组织表现为 ZIP4 高表达。Weaver 等^[5]做了一个关于 ZIP4 的 Meta 分析, 提取了 Oncomine 及 Geo 基因芯片数据库中的资料进行汇总分析, 结果提示 ZIP4 在肝癌、胰腺癌、黑色素瘤、胃癌等肿瘤中表达明显异常, 且与多种肿瘤的恶性程度、临床分期等相关。然而, ZIP4 蛋白的作用具有组织特异性, 它的表达水平在不同肿瘤中是不一致的。如前列腺癌组织中 ZIP4 的表达就是明显降低的, 主要表现为抑癌基因的功能^[6]。另外, 体外试验研究也证明 ZIP4 的功能具有组织特异性, 如 ZIP4 高表达能加快胰腺癌细胞

MIA PaCa-2 的生长速度, 而抑制 ZIP4 的表达不仅能减慢该细胞的生长, 而且能抑制裸鼠皮下移植瘤的生长速度^[7]。同时, 抑制 ZIP4 的表达能通过诱导细胞凋亡、G₀/G₁ 期周期阻滞进而减慢肝癌细胞的生长^[5]。然而, ZIP4 在调控前列腺癌细胞生长中的作用恰恰相反, 转染 ZIP4 的过表达质粒能明显抑制前列腺癌细胞的生长, 而敲除 ZIP4 表达却能诱导肿瘤细胞的增殖与转移。在本研究中我们通过免疫组化比较了胃癌及癌旁组织中 ZIP4 的表达情况, 结果也发现 68.6% 的胃癌组织中 ZIP4 表达下降, 提示 ZIP4 在胃癌中可能发挥抑癌基因的功能。

ZIP4 表达水平与患者预后的关系目前研究较少。本研究提示 ZIP4 表达水平与肿瘤 Lauren's 分型、临床分期相关。在胃癌组织中 ZIP4 表达降低的患者中, 弥漫型及 III/IV 期肿瘤所占的比例明显均升高。而 Lauren's 分型、临床分期都是影响胃癌患者预后的重要因素, 据此我们推测 ZIP4 表达下降可能影响患者生存率。为此, 本研究通过单因素及多因素 COX 回归模型等方法分析了 ZIP4 低表达与患者预后的关系, 结果提示 ZIP4 低表达是影响患者预后的独立危险因素。

综上所述, ZIP4 蛋白在胃癌组织中表达明显降低, ZIP4 表达水平与胃癌 Lauren's 分型、临床分期及预后密切相关, 可作为判断胃癌生物学行为和预后的重要参考指标。

参考文献:

- [1] Gupta SK, Singh SP, Shukla VK. Copper, zinc, and Cu/Zn ratio in carcinoma of the gallbladder [J]. J Surg Oncol, 2005, 91: 204-208.
- [2] Geiser J, Venken KJ, De Lisle RC, et al. A mouse model of acrodermatitis enteropathica: loss of intestine zinc transporter ZIP4 (Slc39a4) disrupts the stem cell niche and intestine integrity[J]. PLoS Genet, 2012, 8(6): e1002766.
- [3] Ji JH, Shin DG, Kwon Y, et al. Clinical correlation between gastric cancer type and serum selenium and Zinc levels[J]. J Gastric Cancer, 2012, 12(4): 217-222.
- [4] Li M, Zhang Y, Liu Z, et al. Aberrant expression of zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) significantly contributes to human pancreatic cancer pathogenesis and progression[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(47): 18636-18641.
- [5] Weaver BP, Zhang Y, Hiscox S, et al. Zip4 (Slc39a4) expression is activated in hepatocellular carcinomas and functions to repress apoptosis, enhance cell cycle and increase migration[J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13158.
- [6] Chen QG, Zhang Z, Yang Q, et al. The role of zinc transporter ZIP4 in prostate carcinoma[J]. Urol Oncol, 2012, 30(6): 906-911.
- [7] Li M, Zhang Y, Bharadwaj U, et al. Down-regulation of ZIP4 by RNA interference inhibits pancreatic cancer growth and increases the survival of nude mice with pancreatic cancer xenografts[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(19): 5993-6001.