

FGFR-1、CyclinD1 在胃癌中的表达及其意义

邓 敏¹,解瑞飞²,王 惠¹

(1. 杭州市富阳区第一人民医院,浙江 杭州 311400;

2. 杭州市肿瘤医院,浙江 杭州 310002)

摘 要: [目的] 探讨成纤维生长因子受体-1(FGFR-1)及细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)在胃癌组织中的表达及其临床意义。[方法] 应用免疫组织化学 S-P 法检测 70 例胃癌(24 例腺癌,21 例黏液腺癌,25 例印戒细胞癌)组织中 FGFR-1、CyclinD1 蛋白水平的表达。[结果] 胃癌中 FGFR-1 蛋白的阳性率为 61.4%(43/70),明显高于癌旁组织的 37.5%(15/40)($P<0.05$);FGFR-1 在浸润深度超过肌层 2/3 病例中阳性率为 79.5%(31/39),浸润深度未达到肌层 2/3 病例中阳性率为 38.7%(12/31)($P<0.05$);伴区域淋巴结转移病例阳性率为 69.4%(34/49),无区域淋巴结转移病例阳性率为 42.9%(9/21)($P<0.05$)。胃癌中 CyclinD1 蛋白的阳性率为 64.3%(45/70),明显高于癌旁组织的 25.0%(10/40)($P<0.05$);CyclinD1 在浸润深度超过肌层 2/3 病例中阳性率为 79.5%(31/39),浸润深度未达到肌层 2/3 病例中阳性率为 45.2%(14/31)($P<0.05$);伴区域淋巴结转移病例阳性率为 73.5%(36/49),无区域淋巴结转移病例阳性率为 42.9%(9/21)($P<0.05$)。[结论] FGFR-1 在胃癌中表达上调,与胃癌的浸润和转移密切相关,其可能通过上调 CyclinD1 的表达而发挥作用。

主题词: 成纤维生长因子受体-1;细胞周期蛋白 D1;胃肿瘤;免疫组化;酪氨酸激酶

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)03-0205-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.03.B009

Expression of FGFR-1 and CyclinD1 in Gastric Cancer and its Clinical Significance

DENG Min¹, XIE Rui-fei², WANG Hui¹

(1. First People's Hospital of Fuyang District, Hangzhou 311400, China;

2. Hangzhou Cancer Hospital, Hangzhou 310002, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of FGFR-1 and CyclinD1 in gastric cancer and its clinical significance. [Methods] The expression of FGFR-1 and CyclinD1 protein in 70 cases of gastric cancer, including 24 cases of adenocarcinoma, 21 cases of mucinous adenocarcinoma and 25 cases of ring cell carcinoma were examined by S-P immunohistochemistry. [Results] The overall positive rate of FGFR-1 in gastric cancer was 61.4%(43/70), which was significantly higher than that in adjacent gastric tissues($P<0.05$). The positive rate of FGFR-1 in gastric cancer infiltrating over 2/3 muscular layer and less 2/3 muscular layer was 79.5%(31/39) and 38.7%(12/31), respectively($P<0.05$). The positive rate of FGFR-1 in gastric cancer with or without regional lymph nodes metastasis was 69.4%(34/49) and 42.9%(9/21), respectively ($P<0.05$). The overall positive rate of cyclinD1 in gastric cancer tissue was 64.3%(45/70), which was significantly higher than that in adjacent tissues($P<0.05$). The positive rate of CyclinD1 in gastric cancer infiltrating over 2/3 muscular layer and less 2/3 muscular layer was 79.5%(31/39) and 45.2%(14/31), respectively ($P<0.05$). The positive rate of CyclinD1 in the patients with or without regional lymph nodes metastasis was 73.5%(36/49) and 42.9%(9/21), respectively ($P<0.05$). [Conclusion] The FGFR-1 is over expressed in gastric cancer, and closely related to gastric parietal penetration and regional lymph nodes metastasis. The over-expression of FGFR may be associated with up-regulating the expression of CyclinD1.

Subject words: FGFR-1; CyclinD1; gastric neoplasms; immunohistochemistry; tyrosine kinase

研究显示,世界范围内胃癌的发病率占癌症总

基金项目: 浙江省省级公益性技术应用研究计划项目(2015C33268);
富阳市科技发展计划项目(2011SF004)

通讯作者: 邓敏,主治医师,硕士;杭州市富阳区第一人民医院病理科,
浙江省杭州市富阳区北环路 429 号(311400);E-mail:
demdem@163.com

收稿日期: 2016-10-26; **修回日期:** 2017-01-23

新发病例的 8%,胃癌患者死亡人数占癌症患者总死亡人数的 10%^[1],胃癌总的生存率仍然不甚理想。因此,了解胃癌的发生机制,探究新的针对性治疗方法具有重要意义。

成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth fac-

tor receptor, FGFR) 由糖蛋白的胞外免疫球蛋白(Ig)样结构域、疏水跨膜区和含有酪氨酸激酶结构域的细胞质部分组成。FGFR 家族通过高亲和力配体-成纤维细胞生长因子(FGFs)来调节信号。FGFR 酪氨酸激酶与 FGF2 结合后能够激活下游信号通路,如: FRS2 α 、PI3K/AKT、ERK1/2 等^[2]。

在许多癌症中过表达 CyclinD1 导致基因重排、基因扩增,或简单地增加转录发生。细胞周期蛋白(Cyclin)对细胞周期进行正调控,与细胞生长、发育及肿瘤的发生关系极其密切。已有研究表明:在乳腺癌、肺癌、前列腺癌等均发现 CyclinD1、FGFR-1 的表达增加^[3-7]。体外实验研究表明:CyclinD1 过度表达有助于通过 pRb/E2 信号通路上调 FGFR-1 从而促进恶性肿瘤的形成,表明这两种蛋白之间存在相互作用^[8,9]。然而,目前 FGFR-1 在胃癌的表达情况,其高表达如何促进肿瘤细胞增殖,及其与 CyclinD1 的关系国内尚少见报道。本文采用免疫组织化学技术,对 70 例胃癌组织中 CyclinD1 和 FGFR-1 蛋白表达进行研究。

1 资料与方法

1.1 病例资料

收集我院 2010 年 1 月至 2016 年 4 月 70 例胃癌手术切除标本,全部患者术前均未接受化学治疗或放射治疗。其中男性 43 例,女性 27 例;年龄 23~76 岁,平均年龄 47.9 $\pm$ 7.8 岁;病理类型:腺癌 24 例、黏液腺癌 21 例、印戒细胞癌 25 例;组织学分级:Ⅰ级 19 例、Ⅱ级 39 例、Ⅲ级 12 例;癌细胞浸润深度:超过肌层 2/3 39 例,未超过肌层 2/3 31 例;有区域淋巴结转移 49 例,无区域淋巴结转移 21 例。正常组织 40 例(距癌组织边缘 10cm 以上,经病理确诊为正常组织)。

1.2 实验仪器和试剂

主要仪器:莱卡 DM-3000 显微镜;莱卡切片机 RM2235;莱卡全自动脱水机 ASP300S;莱卡石蜡包埋机 EG1150;恒温培养箱。

主要试剂:FGFR-1、CyclinD1 免疫组化试剂盒均购自武汉博士德

生物工程有限公司。

1.3 方法

组织切片厚度为 4 μ m,常规脱蜡。分别采用免疫组化 S-P 法检测 FGFR-1、CyclinD1 蛋白的表达,免疫组化染色具体操作方法参照文献^[10-12],并严格按照试剂盒说明进行。切片进行抗原修复后 PBS 漂洗、血清封闭,按操作说明依次滴加一抗、二抗,DAB 显色,脱水、透明、封片、镜检。用已知阳性片作阳性对照,用磷酸盐缓冲液分别代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定

FGFR-1 阳性表达定位于细胞膜或细胞质,CyclinD1 免疫组化阳性表达定位于细胞核,综合染色强度和阳性肿瘤细胞的百分比进行分级^[13]。将染色强度分为:无着色为 0 分,浅黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分。将阳性肿瘤细胞的百分比分为:<10%为 0 分,10%~50%为 1 分,50%~75%为 2 分,>75%为 3 分。两项相加后分阴性(-)和阳性(+):0~1 分为(-),2 分以上为(+)

1.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 对数据进行统计学分析,计数资料采用 χ^2 检验和 Fisher 确切概率法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CyclinD1、FGFR-1 蛋白的表达

CyclinD1 蛋白在 70 例胃癌中有 45 例呈阳性表达,癌旁组织中 10 例呈阳性表达、胃癌组、癌旁组阳性率分别为 64.3%(45/70)、25.0%(10/40),差异有统计学意义($P<0.01$)(Figure 1, Table 1)。

FGFR-1 蛋白在 70 例胃癌中有 43 例呈阳性表达,癌旁组织中 15 例呈阳性表达,胃癌组、癌旁组阳性率分别为 61.4%(43/70)、37.5%(15/40),差异有统计学意义($P=0.02$)(Figure 2, Table 1)。

2.2 CyclinD1、FGFR-1 表达与胃癌临床病理的关系

CyclinD1、FGFR-1 表达与胃癌病理类型、组织

Table 1 Expressions of CyclinD1, FGFR-1 proteins in gastric cancer

Groups	N	CyclinD1				FGFR-1			
		Negative	Positive	χ^2	P	Negative	Positive	χ^2	P
Gastric cancer	70	25	45	15.71	<0.01	27	43	5.85	0.02
Adjacent tissues	40	30	10			25	15		

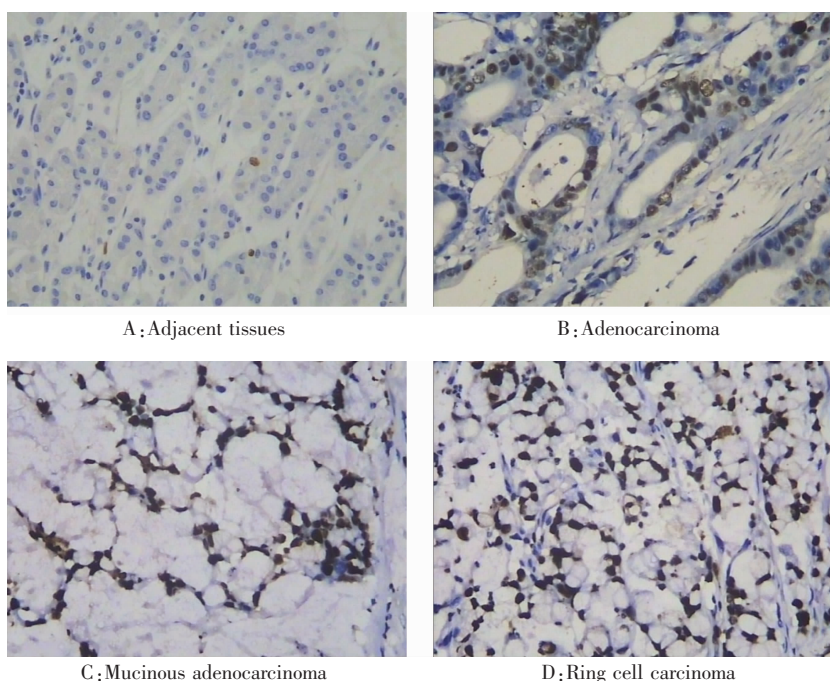


Figure 1 The expression of CyclinD1 proteins in different gastric tissues (EN Vision $\times 200$)

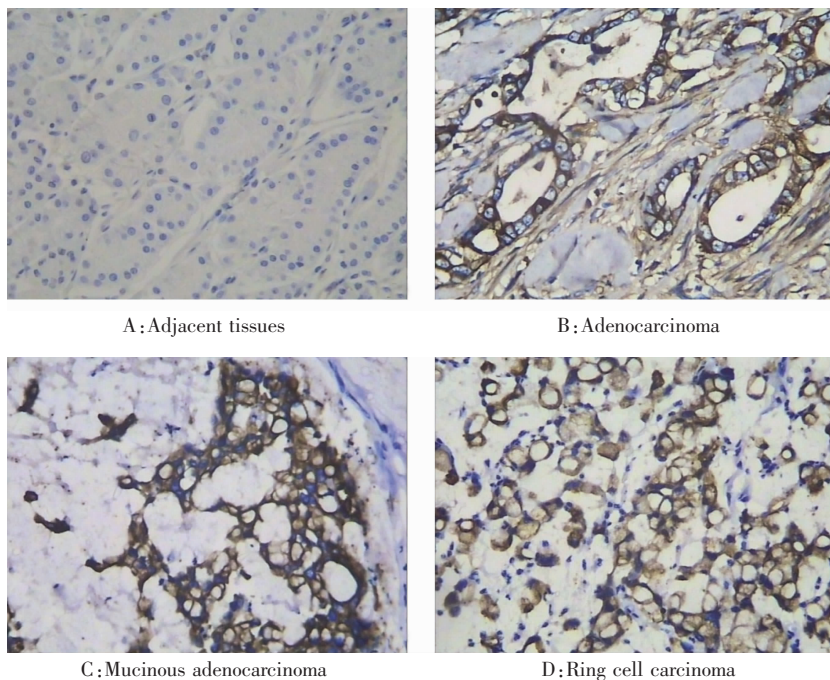


Figure 2 The expression of FGFR-1 proteins in different gastric tissues (EN Vision $\times 200$)

学分级、年龄、性别、肿瘤大小无明显相关性 ($P > 0.05$), 与胃癌的浸润深度和淋巴结转移密切关系 ($P < 0.05$) (Table 2)。

课题组进一步研究 FGFR-1 与胃癌临床病理特征的关系发现, FGFR-1 阳性率与胃癌病理类型、组织学分级、年龄、性别、肿瘤大小无明显关系 ($P > 0.05$), 与胃

3 讨论

成纤维细胞生长因子 1 型受体 (FGFR-1) 和成纤维细胞生长因子 2 型受体 (FGFR-2) 均为受体型酪氨酸激酶。受体酪氨酸激酶主要分布于细胞膜表面。在细胞表面受体酪氨酸激酶呈单二聚体形式, 在受体内的蛋白具有酪氨酸激酶活性。当成纤维细胞生长因子与特异的受体酪氨酸激酶结合后, 会形成稳定的二聚体, 随后其下游信号通路的受体自身磷酸化和活化 (Ornitz and Itoh, 2001), 导致细胞增殖调节发生紊乱, 激活细胞内多种信号通路, 从而导致肿瘤的发生^[14]。文献报道 FGFR-1 与多种恶性肿瘤的发生、发展密切相关。本研究发现, 胃癌组织中 FGFR-1 蛋白的表达明显增高, 显著性高于癌旁组织 ($P < 0.05$), 与本课题组研究结果一致^[15]。Oki 等^[16]通过在胃癌组织标本中的检测, 发现 FGFR-1 蛋白和 mRNA 表达一致上调, 分别为 50% (12/24), 61% (37/61)。研究者提出 FGFR-1 的异常表达与恶性肿瘤的发生密切相关, 但胃癌中 FGFR-1 的研究较少, FGFR-1 与胃癌具体关系尚不完全清楚。本课题

Table 2 Relationship of CyclinD1,FGFR-1 expression with clinicopathologic features of gastric cancer

Clinicopathological characteristics	N	CyclinD1				FGFR-1			
		Negative	Positive	χ^2	P	Negative	Positive	χ^2	P
Histological type									
Adenocarcinoma	24	10	14			12	12		
Mucinous adenocarcinoma	21	9	12	2.33	0.31	7	14	2.02	0.36
Ring cell carcinoma	25	6	19			8	17		
Histological grade									
I	19	7	12			8	11		
II	39	14	25	0.04	0.98	16	23	1.13	0.57
III	12	4	8			3	9		
Depth of infiltration									
<2/3	31	17	14			19	12		
$\geq 2/3$	39	8	31	8.86	<0.01	8	31	12.10	<0.01
Lymph node metastasis									
Yes	49	13	36			15	34		
No	21	12	9	6.00	0.01	12	9	4.37	0.04
Age(years)									
<40	20	7	13			8	12		
≥ 40	50	18	32	0.006	0.94	19	31	0.03	0.88
Gender									
Male	42	15	27			17	25		
Female	28	10	18	0.00	1.00	10	18	0.16	0.69
Tumor size(cm)									
<5	25	9	16			9	16		
≥ 5	45	16	29	0.001	1.00	18	27	0.11	0.74

癌的浸润深度和淋巴结转移密切相关($P<0.05$)。

CyclinD1 基因又名 CCND1、PRAD1、Bcl-1, 本身即原癌基因, 根据肿瘤遗传学大量研究结果显示: 在许多癌症中 CyclinD1 过表达导致基因重排, 基因扩增, 或简单地增加转录发生。在胃癌组织中 CyclinD1 蛋白的表达增强, 显著高于癌旁组织($P<0.05$)。本组研究 CyclinD1 与胃癌临床病理特征的关系发现, CyclinD1 阳性率与胃癌病理类型、组织学分级、年龄、性别、肿瘤大小无明显相关性($P>0.05$), 与胃癌的浸润深度和淋巴结转移有密切关系 ($P<0.05$)。Bartkova 等^[17]发现, CyclinD1 在转移癌中的扩增明显高于原发癌。Nakamra 等^[18]指出伴随转移的肿瘤组织中 CyclinD1 表达显著增高的患者预后不良。本研究与国外研究结论一致。然而 CyclinD1 以何种方式促进肿瘤的发生、发展及恶性转化尚待研究。Tashiro 等^[19]指出: 体内 FGFR-1 表达的增加, 促使 CyclinD1 过表达的肿瘤细胞增殖和侵袭活性增强。并首次提出 CyclinD1/pRB/E2F 通路参与调节 FGFR-1 的表达。我们的研究发现在胃癌中 CyclinD1 蛋白的表达与 FGFR-1 的表达水平呈一致性, 从而

证实 FGFR-1 介导的信号可能通过 CyclinD1 的促进肿瘤的形成^[6,20], CyclinD1、FGFR-1 过度表达可作为早期诊断及判断胃癌预后的重要指标。

综上所述, FGFR-1 介导的信号通过 CyclinD1 的调节连接于细胞周期的机制表明, FGFR-1 过度表达可作为早期诊断与判断胃癌预后的重要指标。受体酪氨酸激酶靶向抑制剂的研究(RTK)是目前对肿瘤治疗的研究热点; 许多抑制剂药物, 包括 EGFR 和 VEGFR 抑制剂均已用于临床^[21,22]。胃癌的发生与受体酪氨酸激酶的基因扩增、突变和重排密切相关, 受体酪氨酸激酶抑制剂可能是胃癌治疗的新方向。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(1):69-90.
- [2] Katoh M, Katoh M. FGF signaling network in the gastrointestinal tract (review) [J]. Int J Oncol, 2006, 29(1):163-168.
- [3] Wen D, Li S, Ji F, Cao H, et al. miR-133b acts as a tumor suppressor and negatively regulates FGFR1 in gastric cancer[J]. Tumour Biol, 2013, 34(2):793-803.

- [4] Kohler LH, Mireskandari M, Knösel T, et al. FGFR1 expression and gene copy numbers in human lung cancer[J]. *Virchows Arch*, 2012, 461(1):49–57.
- [5] Kwek S, Roy RH, Climent J, et al. Co-amplified genes at 8p12 and 11q13 in breast tumors cooperate with two major pathways in oncogenesis [J]. *Oncogene*, 2009, 28(17): 1892–1903.
- [6] Reis-Filho JS, Savage K, Lambros MB, et al. Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridisation analysis [J]. *Mod Pathol*, 2006, 19(7): 999–1009.
- [7] Marampon F, Gravina G, Ju X, et al. Cyclin D1 silencing suppresses tumorigenicity, impairs DNA double strand break repair and thus radiosensitizes androgen-independent prostate cancer cells to DNA damage[J]. *Oncotarget*, 2015, 7(5):5383–5400.
- [8] Kwek SS, Roy R, Zhou H, et al. Co-amplified genes at 8p12 and 11q13 in breast tumors cooperate with two major pathways in oncogenesis [J]. *Oncogene*, 2009, 28(28): 1892–1903.
- [9] Koziczak M, Holbro T, Hynes NE. Blocking of FGFR signaling inhibits breast cancer cell proliferation through downregulation of D-type cyclins [J]. *Oncogene*, 2004, 23(20):3501–3508.
- [10] Guo JL, Zheng SJ, Zheng SP, et al. Study on the anti-angiogenesis mechanism induced by a A943/FGFR1 protein vaccine in a mouse Meth A fibrosarcomamodeI[J]. *Journal of Hainan Medical College*, 2009, 15(15):403–406. [郭峻莉, 郑少江, 郑少萍, 等. Ag43/FGFR1 嵌合蛋白疫苗抗小鼠纤维肉瘤血管生成的实验研究 [J]. 海南医学院学报, 2009, 15(15):403–406.]
- [11] Zheng SJ, Wu HM. Study on LRP expression in NSCLC and its clinical correlation [J]. *Journal of Hainan Medical College*, 2004, 10(2):78–81. [郑少江, 吴焕明. LRP 在非小细胞肺癌中的表达及其临床相关性研究[J]. 海南医学院学报, 2004, 10(2):78–81.]
- [12] Dulić V, Kaufmann WK, Wilson SJ, et al. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest [J]. *Cell*, 1994, 76(6):1013–1023.
- [13] Koziczak M, Holbro T, Hynes NE. Blocking of FGFR signaling inhibits breast cancer cell proliferation through downregulation of D-type cyclins [J]. *Oncogene*, 2004, 23(20):3501–3508.
- [14] Turner N, Pearson A, Sharpe R, et al. FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(5): 2085–2094.
- [15] Deng M, Xie RF, Wang H. Expression and clinical significance of FGFR-1, CyclinD-1 in breast carcinoma[J]. *China Modern Doctor*, 2016, 54(4):1–4. [邓敏, 解瑞飞, 王惠. FGFR-1、cyclinD1 在乳腺癌中的表达及其临床意义[J]. 中国现代医生, 2016, 5(4):1–4.]
- [16] Oki M, Yamamoto H, Taniguchi H, et al. Overexpression of the receptor tyrosine kinase EphA4 in human gastric cancers[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(37):5650–5656.
- [17] Bartkova J, Lukas J, Muller H, et al. Abnormal patterns of D-type cyclin expression and G1 regulation in human head and neck cancer[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(4):949.
- [18] Nakamura M, Konishi N, Hiass Y, et al. Frequent alterations of cell-cycle regulation in astrocytic tumors as detected by molecular genetic and immunohistochemical analyses [J]. *Brain Tumor Pathol*, 2009, 15(2):83
- [19] Tashiro E, Tsuchiya A, Imoto A, et al. Functions of cyclinD1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(5):629–635.
- [20] Koziczak M, Holbro T, Hynes N, et al. Blocking of FGFR signaling inhibits breast cancer cell proliferation through downregulation of D-type cyclins [J]. *Oncogene*, 2004, 23(20):3501–3508.
- [21] Zamecnikova A. Novel approaches to the development of tyrosine kinase inhibitors and their role in the fight against cancer[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2014, 9(1):77–92.
- [22] Judson I, Scurr M, Gardner K, et al. Phase II study of cediranib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors or soft-tissue sarcoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(13):3603–3612.