

Angiomotin like-2 mRNA 在胃癌组织中的定量分析及其临床意义

钱红燕¹, 杨俐萍¹, 赵文静¹, 李 静¹, 董 萱¹, 李 靖¹, 邵晶晶¹, 何 松²

(1. 南通大学附属肿瘤医院肿瘤研究所中心实验室, 江苏 南通 226361; 2. 南通大学附属肿瘤医院, 江苏 南通 226361)

摘要: [目的] 定量分析类血管动蛋白-2 (angiomotin like-2, AMOTL2) mRNA 表达水平的改变与胃癌发生发展的关系及其临床意义。[方法] 免疫组化染色检测 5 对胃癌石蜡切片中 AMOTL2 蛋白的表达; 实时荧光定量 PCR(qPCR)检测 30 对胃癌与癌旁组织及 25 例胃癌患者血浆中 AMOTL2 的表达; 回顾性分析临床病理特征及随访资料, 并结合 AMOTL2 mRNA 表达水平, 用 GraphPad Prism 6.0 软件绘制胃癌患者的 5 年生存曲线。[结果] 免疫组化染色显示 AMOTL2 蛋白在胃癌及其癌旁组织均有表达, 但是癌区的表达明显低于癌旁。qPCR 定量检测结果显示 AMOTL2 mRNA 在胃癌组织中明显低于癌旁组织($P=0.043$); 在胃癌患者血浆中的 AMOTL2 mRNA 水平亦明显低于健康组($P=0.010$)。胃癌组织中 AMOTL2 mRNA 水平与肿瘤直径呈负相关 ($r=-0.569, P=0.001$); 生存随访分析显示至术后 60 个月, AMOTL2 mRNA 低水平组患者术后总生存率明显低于高水平组($P=0.038$)。[结论] AMOTL2 在胃癌组织及血浆中均呈低表达, 其 mRNA 表达水平与肿瘤直径呈负相关, 且胃癌组织中 AMOTL2 低表达组生存率明显低于高表达组, 提示 AMOTL2 可能是一个新的胃癌潜在预后标志物。

关键词: 类血管动蛋白-2; 胃肿瘤; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)02-0081-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.02.B001

Angiomotin Like-2 mRNA Level in Gastric Cancer Tissues and Its Clinical Significance

QIAN Hong-yan, YANG Li-ping, ZHAO Wen-jing, et al.

(Key Laboratory of Cancer Research Center Nantong, Affiliated Tumor Hospital of Nantong University, Nantong 226361, China)

Abstract: [Objective] To quantitatively analyze angiomotin like-2 (AMOTL2) mRNA level that is potentially involved in gastric cancer development and to investigate its clinical significance. [Methods] The expression of AMOTL2 protein in paraffin-embedded tumor tissues from five patients having gastric cancer was detected by immunohistochemical(IHC) staining. AMOTL2 mRNA level from 30 pairs of tumor and peritumoral tissue samples and plasma samples of 25 patients having gastric cancer was tested by real-time fluorescence quantitative PCR(qPCR). The relationship between AMOTL2 mRNA level and clinical pathologic phenotype was analyzed, and survival was analyzed using GraphPad Prism 6.0 software. [Results] IHC analysis showed that AMOTL2 protein was expressed in both tumor and peritumoral tissues, but that the expression level was lower in the tumor tissues than in the peritumoral tissues. In addition, the mRNA level of AMOTL2 was significantly lower in the tumor tissues($P=0.043$) than in peritumoral tissues. Similarly, AMOTL2 mRNA level in the plasma of patients having gastric cancer was significantly lower than that in healthy controls ($P=0.010$). The reduction of AMOTL2 mRNA level was negatively correlated with tumor size increases ($r=-0.569, P=0.001$). Furthermore, survival analysis showed that up to sixty months after surgery, the survival rate in the group of high level of AMOTL2 mRNA was significantly lower than that of low level of AMOTL2 mRNA ($P=0.038$). [Conclusion] AMOTL2 mRNA level is lower in gastric cancer tissues and plasma. And the gene expression pattern of AMOTL2 is associated with the tumor size negatively. Furthermore, the low level of AMOTL2 mRNA in the gastric cancer tissue is disadvantageous to the survival of patients after surgery. AMOTL2 might be a potential biomarker for the prognosis of gastric cancer.

Subject words: angiomotin like-2(AMOTL2); gastric cancer; real-time fluorescence quantitative PCR

基金项目: 南通市科技局前沿与关键技术创新项目(MS22015005); 南通市卫计委青年基金(WQ2015056); 南通市“科教兴卫”工程临床医学中心(创新平台)(通卫科教[2012]9号); 南通市指导性科技计划(HS149071); 南通市科教强卫工程项目(通卫科教[2017]35号)

通讯作者: 杨俐萍, 常务副所长, 中心实验室主任, 教授, 博士; 南通大学附属肿瘤医院肿瘤研究所中心实验室, 江苏省南通市通州区平潮镇通扬北路 30 号(226361), E-mail: liping.yang@ntu.edu.cn

收稿日期: 2017-06-19; **修回日期:** 2017-08-22

胃癌是常见的恶性肿瘤之一。流行病学调查显示,2012年我国男性胃癌发病率和死亡率分别位居同期恶性肿瘤的第2位和第3位,女性胃癌发病率和死亡率分别位居同期恶性肿瘤的第4位和第2位^[1]。近年来随着诊断技术的发展及人们体检意识的增强,胃癌的早期发现率有所提高,但胃癌的发生发展及调节机制仍不清楚。

血管动蛋白(angiomotin, AMOT)家族是一类涉及血管新生及上皮细胞功能的动力蛋白^[2],该家族成员包括 AMOT、angiomotin like-1 (AMOTL1)、angiomotin like-2 (AMOTL2),其中 AMOT 又分为 P130-AMOT 和 P80-AMOT 两种同源异构体。该家族成员在结构上都有保守的卷曲螺旋结构、C-端的 PDZ 结构域及富含谷氨酸的结构域^[3]。AMOTL2 具有调节斑马鱼胚胎节间细胞的迁移,调节血管内皮细胞的迁移、管腔形成等功能^[4,5]。关于 AMOTL2 与肿瘤的关系以及在肿瘤中的作用迄今尚未明确。近年来,有文献报道 AMOTL2 在人肝癌组织中表达下调,导致癌基因 YAP 和 AKT 活性增强,肝肿瘤增大^[6]。类似的结果有,乳腺癌、结肠癌的癌细胞通过抑制癌基因 YAP 来发挥抑癌作用^[7,8]。但值得一提的是,也有文献报道 AMOTL2 在乳腺癌组织中的表达与癌旁组织无差异^[9]。目前国内外尚少见 AMOTL2 与胃癌的相关研究报道。本研究旨在定量检测胃癌组织及血浆中 AMOTL2 mRNA 水平,结合相关临床病例资料以及随访资料,分析 AMOTL2 在胃癌发生发展中的作用及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集南通市肿瘤医院 2014 年 1 月至 2016 年 12 月的 30 例胃癌手术切除标本、25 例胃癌患者血浆及 5 例健康人血浆标本,全部患者术前均未受化疗或放疗。该课题通过南通市肿瘤医院伦理委员会批准,并与患者已签署知情同意书。胃癌中男性 19 例,女性 11 例;年龄 46~80 岁,平均年龄 64 岁;病理类型均为腺癌,并经病理诊断医师确诊;无淋巴结转移 14 例,有淋巴结转移 16 例;无血管侵犯 16 例,有血管侵犯 14 例。

1.2 试剂

Trizol 试剂购自美国 invitrogen 公司;逆转录试

剂盒为 Thermo Scientific Fermentas,货号 K1622;荧光定量 PCR 试剂盒为 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq II,货号 RR820A;引物合成由上海生工生物工程股份有限公司完成;兔抗人 AMOTL2 抗体受瑞典卡洛琳斯卡医学院癌症研究中心 Lars Holmgren 教授馈赠;驴抗兔 Alexa-488 荧光二抗购自 Jackson 公司,货号 715-485-010。免疫组化试剂盒鼠兔通用型购自 Dako 公司,货号 K5007。

1.3 方法

1.3.1 胃癌石蜡切片进行免疫组化染色(IHC)

采用免疫组织化学染色检测 5 对胃癌及其癌旁石蜡标本中 AMOTL2 蛋白的表达。将病理切片行二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,以 3%过氧化氢灭活内源性过氧化酶,以 10mmol/L 枸橼酸盐溶液(pH=6.0)抗原热修复,羊血清工作液封闭阻断非特异性结合位点,37℃孵育 30min,稀释的兔抗人 AMOTL2 抗体 4℃孵育过夜,PBS 冲洗 3 次,生物素标记的二抗,常温孵育 2h,DAB 显色,苏木素复染细胞核,中性树脂封片。

IHC 染色结果判断标准:-:无染色或染色弱,染色范围<5%;+:染色弱,范围 5%~50%;++:染色强,范围 50%~75%;+++ :染色强,范围≥75%。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 检测

采用 TRIZOL 法从组织、血浆中提取总 RNA,紫外分光光度仪检测 RNA 质量和纯度;逆转录总 RNA 得到 cDNA,以 cDNA 为模板进行 qPCR;使用 ABI stepone plus 实时荧光定量 PCR 仪进行 PCR 反应。AMOTL2 上游引物 5'-GTCGGTGCCATCTGTTTTTCG-3',下游引物 5'-GTCTGTAGTCAGCCGAGCAG-3'; GAPDH 上游引物 5'-TCAACGGATTTGGTCGTATTG-3',下游引物 5'-TGGAAGATGGTGATGGGATT-3'。反应体系:取 2μl cDNA 产物加入 18μl ddH₂O,取 2μl 稀释后的 cDNA 加入 10μl SYBR Premix Ex Taq II,上、下游引物各 1μl,ROX Reference Dye 0.4μl,用不含 RNA 酶的水补足 20μl,混匀并短暂离心后进行扩增。每个样本进行 3 个复孔实验,扩增条件为 95℃、10s,然后以 95℃、15s,60℃、20s,72℃、10s 循环 40 次,60℃、15min 后检测信号。反应完成后由软件自动进行基线调整并将获取的数据进行自动分析,之后软件会算出达到阈值的最低循环数比 (Ct 值),实验中对每个标本针对目的基因测量 3 次,对获取的 Ct 值取平均后再采用相对表达量算法对各组

基因 mRNA 表达量进行比较分析。

1.4 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析,采用两独立样本 t 检验,ANOVA 检验,Pearson 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行生存分析。

2 结果

2.1 AMOTL2 蛋白在胃癌组织中的表达

结果显示,在 5 对标本中 AMOTL2 均表达,但是胃癌组织中的 AMOTL2 染色(呈+)弱于癌旁组织(呈+++)(Figure 1A、B)。将组织切片进行 HE 染色,确认癌区与癌旁区以及 AMOTL2 表达的定位。结果表明,AMOTL2 主要分布在癌及癌旁组织中的腺体(Figure 1C、D)。

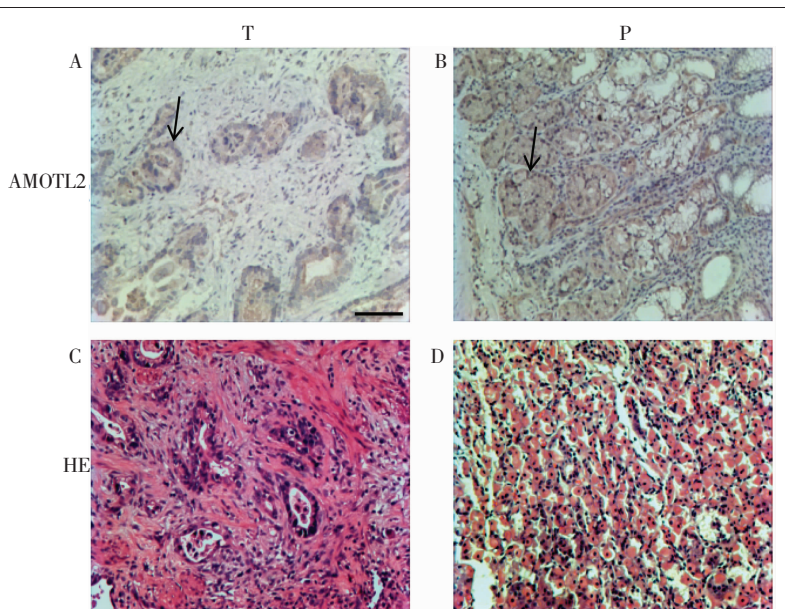
2.2 AMOTL2 mRNA 在胃癌与癌旁组织及胃癌患者血浆中的表达

qPCR 检测显示,在 30 对胃癌及癌旁组织中 AMOTL2 mRNA 水平的相对量均值分别为 0.819 ± 0.128 和 2.608 ± 0.884 ,两组比较差异有统计学意义($t=2.072, P=0.043$)(Figure 2A)。25 例胃癌患者血浆中 AMOTL2 mRNA 的相对量均值为 0.984 ± 0.154 ,而在健康人血浆中其相对量均值为 2.070 ± 0.509 ,两组差异有统计学意义($t=2.685, P=0.012$)(Figure 2B)。胃癌患者血浆中 AMOTL2 mRNA 水平与其在组织中的水平一致,呈低表达状态。

2.3 胃癌组织中 AMOTL2 mRNA 水平与临床病理参数的关系

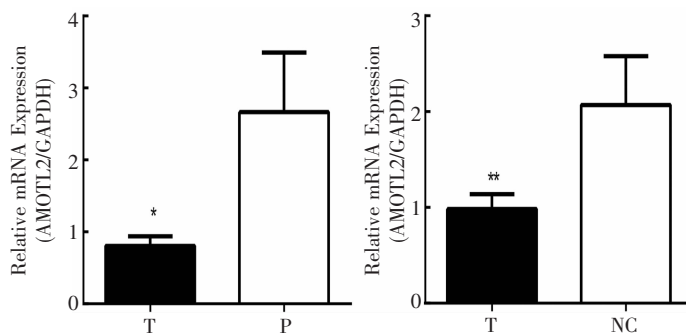
将胃癌组织中 AMOTL2 mRNA 水平与临床病理资料结合分析,发现 AMOTL2 mRNA 相对量与肿瘤大小相关,肿瘤直径 $<5\text{cm}$ 的 16 例胃癌组织中 AMOTL2 相对表达量均值为 1.117 ± 0.183 ,而肿瘤直径 $\geq 5\text{cm}$ 的 14

例胃癌组织中其相对表达量均值为 0.477 ± 0.129 ,两组有显著性差异($t=2.780, P=0.010$)。而在其它参数方面,如年龄、性别、分化、TNM 分期、淋巴结转移、血管侵犯、CEA 等,组间差异均无统计学意义(Table 1)。进一步将 AMOTL2 mRNA 相对量与肿瘤直径进行相关性分析,Pearson 相关性分析显示两者呈负相关($r=-0.569, P=0.001$)(Figure 3)。



(A:Immunohistochemical staining (IHC) of gastric cancer tissues (T) with anti-AMOTL2 antibody. B:IHC staining of the corresponding peritumoral tissues(P) with anti-AMOTL2 antibody. Brown areas indicated positive signal of AMOTL2 protein expression, which appeared mainly in the gastric glandular tissue (pointed by arrowheads in the figures). + expression level in cancer tissues, +++ in peritumoral tissues. C~D:HE staining of the same tissues as ones for IHC to verify the samples and show the structures of gastric glands in cancer (C) and peritumoral tissues (D). The scale bar 50 μm .)

Figure 1 The expression of AMOTL2 in gastric cancer and the corresponding peritumoral tissues(100 $\times$)



(A~B: Average of AMOTL2 mRNA level from 30 gastric cancer tissues (A), and 25 plasma of patients with gastric cancer and 5 normal subjects (B) by qPCR detection. T, cancer tissue or plasma; P, peritumoral tissues; NC, normal subjects. GAPDH, internal reference, $*P<0.05$.)

Figure 2 The level of AMOTL-2 mRNA in gastric cancer and corresponding peritumoral tissues as well as in the plasma of patients with gastric cancer

Table 1 Relationship between AMOTL2 mRNA level and clinicopathological factors ($\bar{x}\pm s$)

Clinicopathological factors	n	AMOTL2 mRNA level	t/F	P
Age(years)			1.073	0.292
<65	16	0.691±0.131		
≥65	14	0.964±0.228		
Gender			0.638	0.529
Male	19	0.756±0.178		
Female	11	0.927±0.169		
Tumor size(cm)			2.780	0.010
<5	16	1.117±0.183		
≥5	14	0.477±0.129		
Pathological stage			0.003	1.000
I ~ II	9	0.819±0.342		
III ~IV	21	0.819±0.117		
T classification			0.581	0.566
T ₁ ~T ₂	3	0.457±0.282		
T ₂ ~T ₃	5	1.009±0.464		
T ₃ ~T ₄	22	0.825±0.138		
N classification			0.168	0.868
N ₀ ~N ₁	8	0.855±0.372		
N ₂ ~N ₃	22	0.806±0.118		
Lymph node metastasis			0.267	0.792
No	14	0.907±0.573		
Yes	16	0.805±0.125		
Vascular invasion			1.701	0.100
Negative	16	0.622±0.198		
Positive	14	1.043±0.138		
CEA(ng/ml)			0.860	0.397
<5	20	0.859±0.149		
≥5	10	0.739±0.249		

2.4 胃癌组织中 AMOTL2 mRNA 水平与患者生存率的关系

根据 30 例胃癌组织中 AMOTL2 mRNA 相对量均值 0.819，将在胃癌组织中 mRNA 相对量高于该值的归为 AMOTL2 高表达组，低于该值的归为低表达组。分别对高、低表达组(各 15 例)进行生存分析，发现至术后 60 个月，低表达组患者术后的生存率明显低于高表达组，其中在 20 个月、40 个月的生存率，低表达组术后为 65%、30%，而高表达组术后为 87%、67%；并且在术后 20 个月到 40 个月间，高表达组生存率下降 23%，而低表达组生存率下降了 54%，两组比较差异有统计学意义($P=0.038$)(Figure 4)。

3 讨 论

胃癌的发展与预后是一个多因素参与的复杂过程，如患者年龄、身心素质、肿瘤的发生部位、TNM

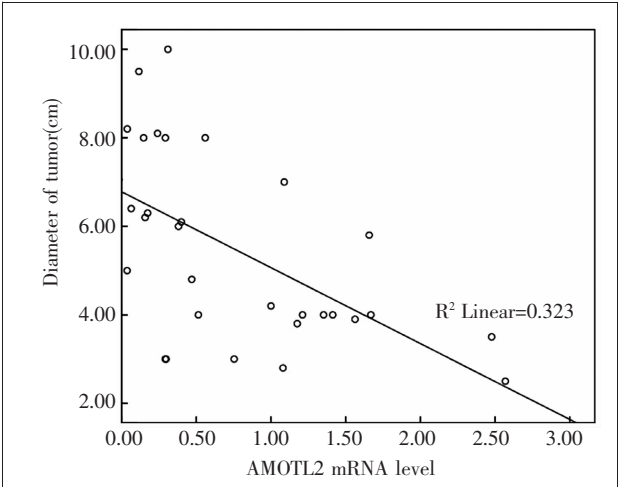


Figure 3 Negative correlation between AMOTL2 mRNA level in gastric cancer and tumor size

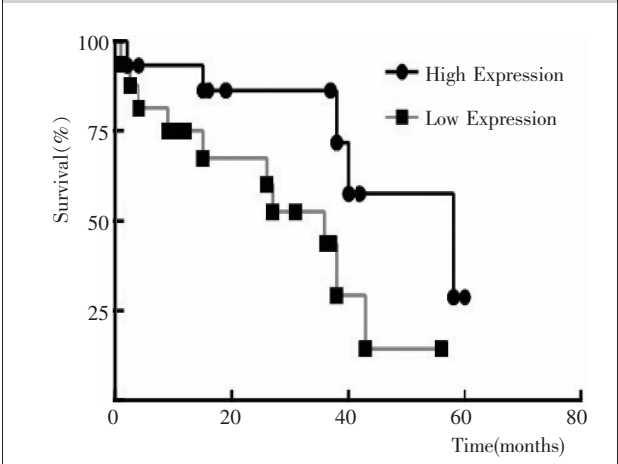


Figure 4 Survival analysis of patients with gastric cancer after surgical operation based on AMOTL2 mRNA level in gastric cancer tissues

分期、淋巴结转移和血管侵犯等。在众多指标中，TNM 分期和局部淋巴结转移是胃癌的主要预后因素。然而，即使具有相同 TNM 分期且接受同样治疗的患者，其临床预后仍有不同。因此，既往基于组织形态病理诊断已不能适应肿瘤患者的临床综合评估，对此，胃癌标志物的研发是一个重要的补充。

目前关于 AMOTL2 的研究报道主要集中于血管生成和肿瘤调节两方面。血管生成方面，AMOTL2 通过 C 端的 PDZ 结构域调节血管内皮细胞功能^[10]。在斑马鱼胚胎模型中将 AMOTL2 敲除，血管内皮细胞的迁移及增殖功能明显受到抑制^[5,11]。然而，关于 AMOTL2 在肿瘤中作用的报道仅限于细胞水平上的研究。在人肺腺癌细胞中，AMOTL2 通过 N 端的 PPXY 结构域与转录共激活子 TAZ 的 WW 结构域

结合,抑制 TAZ 入核从而抑制该细胞表面蛋白的表达^[12]。在乳腺癌细胞中,AMOTL2 泛素化促进 Lats1/2 激酶(大肿瘤抑制激酶)的磷酸化,激活激酶级联反应使 YAP 磷酸化从而抑制其功能^[13]。在肾癌细胞中,AMOTL2 直接与 YAP 蛋白结合滞留在细胞浆中,抑制 YAP 入核,从而抑制其促增殖、抑凋亡功能^[1]。在肝癌细胞中,AMOTL2 通过诱导上皮间充质转化促进原发性肝癌的迁移侵袭能力和血管生成拟态的形成^[14]。最新资料报道,AMOTL2 在人肝癌组织中表达下调,同时癌基因 YAP 和 AKT 活性增强,肝肿瘤块增大^[6]。曾有研究表明 AMOTL2 在乳腺癌组织中的表达与癌旁没有差异^[9]。然而关于 AMOTL2 与相关的肿瘤临床研究尤其是在胃癌方面鲜有报道。本研究发现 AMOTL2 在胃癌组织中的表达水平明显低于其相应的癌旁组织。由于免疫组织化学染色方法的精确性有限,为了更客观地反映 AMOTL2 的表达量与胃癌患者的病情及预后的关系,我们进一步采用了 qPCR 对胃癌患者的组织标本进行 AMOTL2 mRNA 水平分析。qPCR 结果提示,胃癌组织中 AMOTL2 mRNA 水平仅为癌旁组织的 1/3。结合临床病理参数分析,发现胃癌组织中的 AMOTL2 mRNA 水平与肿瘤大小相关,且两者呈负相关性,即随肿瘤直径的增大 AMOTL2 mRNA 水平降低,提示 AMOTL2 与胃癌的发展密切相关,AMOTL2 可能是一个胃癌抑制因子。此外,值得一提的是,在随访生存分析中,发现在术后 60 个月的观察中,AMOTL2 低表达组的胃癌患者术后生存率下降程度比同期高表达组低 22%~37%,提示 AMOTL2 mRNA 水平的降低能反映患者术后预后不良。为了进一步确认 AMOTL2 是否可作为胃癌预后标志物,并且能在临床上定期追踪患者的 AMOTL2 mRNA 水平变化,以及临床实际的可行性和便利性,我们用 qPCR 分析了患者血浆中 AMOTL2 mRNA 水平变化并与健康受试者进行比较,在胃癌患者的血浆中 AMOTL2 mRNA 水平明显低于健康对照组,提示 AMOTL2 mRNA 水平在胃癌患者血浆中的变化趋势与在组织中的水平一致。

综上所述,本研究发现 AMOTL2 在胃癌组织和血浆中呈低表达,并且与肿瘤增长呈负相关,当 AMOTL2 表达降低时,患者生存率下降,提示 AMOTL2 是一个新的胃癌潜在预后标志物。当然,关于确认 AMOTL2 是否为胃癌标志物并应用于临床

检测,以及 AMOTL2 在胃癌中的作用机制还有待于进一步的研究。

(致谢:对瑞典卡洛琳斯卡医学院癌症研究中心 Lars Holmgren 教授馈赠抗体及给予的学术性指导以表感谢。)

参考文献:

- [1] Zuo TT,Zheng RS,Zeng HM,et al. Epidemiology of stomach cancer in China[J].Chin J Clin Oncol,2017,44(1):52-58. [左婷婷,郑荣寿,曾红梅,等.中国胃癌流行病学现状[J].中国肿瘤临床,2017,44(1):52-58.]
- [2] Moleirinho S,Guerrant W,Kissil JL. The angiomotins -- from discovery to function [J]. FEBS Lett,2014,588(16): 2693-2703.
- [3] Bratt A,Wilson WJ,Trojanovsky B,et al. Angiomotin belongs to a novel protein family with conserved coiled-coil and PDZ binding domains[J]. Gene,2002,298(1):69-77.
- [4] Huang HZ,Lu FL,Jia SJ,et al. Amotl2 is essential for cell movements in zebrafish embryo and regulates c-Src translocation [J]. Development (Cambridge,England), 2007,134(5):979-988.
- [5] Aase K,Ernkvist M,Ebarasi L,et al. Angiomotin regulates endothelial cell migration during embryonic angiogenesis [J]. Genes Dev,2007,21(16):2055-2068.
- [6] Han H,Yang B,Wang W. Angiomotin-like 2 interacts with and negatively regulates AKT[J].Oncogene,2017,36 (32):4662-4669.
- [7] Paramasivam M,Sarkeshik A,Yates JR,et al. Angiomotin family proteins are novel activators of the LATS2 kinase tumor suppressor [J]. Mol Biol Cell,2011,22 (19):3725-3733.
- [8] Wang WQ,Huang J,Chen JJ. Angiomotin-like proteins associate with and negatively regulate YAP1 [J]. J Biol Chem,2011,286(6):4364-4370.
- [9] Jiang WG,Watkins G,Douglas-Jones A,et al. Angiomotin and angiomotin like proteins,their expression and correlation with angiogenesis and clinical outcome in human breast cancer[J]. BMC Cancer,2006,6:16.
- [10] Levchenko T,Aase K,Trojanovsky B,et al. Loss of responsiveness to chemotactic factors by deletion of the C-terminal protein interaction site of angiomotin [J]. J Cell Sci,2003,116(Pt 18):3803-3810.
- [11] Wang Y,Li Z,Xu P,et al. Angiomotin-like2 gene (amotl2) is required for migration and proliferation of endothelial cells during angiogenesis [J]. J Biol Chem,2011,286(47): 41095-41104.
- [12] Lucci V,Di Palma T,D'Ambrosio C,et al. AMOTL2 interaction with TAZ causes the inhibition of surfactant proteins expression in lung cells[J]. Gene,2013,529(2):300-306.
- [13] Kim M,Kim M,Park SJ,et al. Role of Angiomotin-like 2 mono-ubiquitination on YAP inhibition [J]. EMBO Rep, 2016,17(1):64-78.
- [14] Yuan HZ,Sun BC,Zhao XL,et al. Amotl2 promotes vasculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Tianjin Medical University,2016,22(4):277-282.[袁华尊,孙保存,赵秀兰,等.Amotl2 促进肝细胞肝癌血管生成拟态及 EMT 形成[J].天津医科大学学报,2016,22(4):277-282.]