

跨膜丝氨酸蛋白酶 4 在胆囊癌中的表达及意义

王晓磊,段文飞,杨海舰,邢燕来,李楷威,周斌杰

(河南大学第一附属医院,河南 开封 475001)

摘要:[目的] 探讨跨膜丝氨酸蛋白酶 4 (TMPRSS4)在胆囊癌中的表达及与预后的关系。[方法] 应用免疫组织化学方法检测 TMPRSS4 在 67 例胆囊癌组织中的表达,分析其与临床病理特征及预后的关系。[结果] 胆囊癌组中 TMPRSS4 的表达高于癌旁非肿瘤组织 (56.72% vs 14.93%, $P<0.01$);TMPRSS4 在 TNM 分期 III+IV 期、有淋巴结转移组中的表达明显高于 TNM 分期 I+II 期 ($P=0.014$)、无淋巴结转移组 ($P=0.029$);其表达与性别、年龄、组织学分级、合并胆结石和组织学类型无关 ($P>0.05$)。TMPRSS4 阳性表达组的 3 年生存率明显低于阴性表达者 ($P=0.009$)。[结论] MPRSS4 在胆囊癌中高表达,检测 TMPRSS4 的表达有助于判断患者预后。

关键词:跨膜丝氨酸蛋白酶 4;胆囊肿瘤;预后

中图分类号:R735.3 文献标识码:A 文章编号:1671-170X(2019)10-0887-03

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2019.10.B007

Expression of TMPRSS4 in Gallbladder Cancer and Its Significance

WANG Xiao-lei, DUAN Wen-fei, YANG Hai-jian, XING Yan-lai, LI Kai-wei, ZHOU Bin-jie

(The First Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng 475001, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of TMPRSS4 in gallbladder cancer tissues and its relationship with cancer prognosis. [Methods] The expression of TMPRSS4 in 67 samples of gallbladder cancer tissues and corresponding pericancerous tissues were detected by immunohistochemistry method. The relationship between TMPRSS4 expression and clinicopathological characteristics as well as prognosis of patients was evaluated. [Results] The expression of TMPRSS4 in gallbladder cancer tissue was significantly higher than that in corresponding pericancerous tissues (56.72% vs 14.93%, $P<0.01$). The TMPRSS4 expression in patients with TNM III+IV stage and lymph node metastasis was significantly higher than that in patients with TNM I+II stage ($P=0.014$) and free-lymph node metastasis ($P=0.029$). The expression of TMPRSS4 was not correlated with gender, age, histological grade, histological types and complicating cholelithiasis ($P>0.05$). The 3-years survival of the patients with positive expression of TMPRSS4 was significant lower than that with negative expression of TMPRSS4 ($P=0.009$). [Conclusion] TMPRSS4 is over expressed in gallbladder cancer, which may be used as an indicator for prognosis of patients with gallbladder cancer.

Subject words: transmembrane protease serine 4; gallbladder cancer; prognosis

胆囊癌是发病率最高的胆道系统恶性肿瘤,临床上胆囊癌明确诊断时病情多已属中晚期,生存时间短,预后较差^[1]。胆囊癌早期症状隐蔽且不典型,易与胆结石混淆不为患者所关注,故应加强对胆囊癌高危人群的随访和早期诊治以提高生存率。跨膜丝氨酸蛋白酶 4 (transmembrane protease serine 4, TMPRSS4)是一种新型的 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶,在胰腺癌、甲状腺癌、肺癌、结肠癌等肿瘤中高表达^[2]。该研究应用免疫组化方法检测 TMPRSS4 在胆囊中的表达,探讨其与胆囊癌临床病理特征及预后的关系。

基金项目:国家自然科学基金(81641180);河南省高等学校重点科研项目(18A320020);开封市科技发展计划项目(1503083)

通信作者:王晓磊,主治医师,硕士;河南大学第一附属医院普通外科,河南省开封市龙亭区西门大街 357 号(475001);E-mail: hdyfywxl@126.com

收稿日期:2018-07-27;修回日期:2018-10-10

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2007 年 6 月至 2015 年 1 月在我院手术切除的经病理确诊的胆囊癌标本 67 例,取对应的癌旁非肿瘤组织 67 例作为对照。所有患者术前均未给予放、化疗,且随访资料完整。标本及资料的采集经河南大学第一附属医院伦理委员会批准,并经患者及家属知情同意。其中男性 30 例、女性 37 例;年龄>50 岁 42 例、≤50 岁 25 例;临床分期参照 AJCC 胆囊癌 TNM 分期第 7 版(2010): I 期 12 例、II 期 38 例、III 期 15 例、IV 期 2 例;伴淋巴结转移者 31 例;分化程度分级参照 UICC 分级标准: G₁ 期 15 例、G₂ 期 32 例、G₃ 期 19 例、G₄ 期 1 例。生存时间以手术时间为

起点,死亡或最近一次随访时间为终点,通过门诊复诊及电话回访方式随访,无失访患者,完全数据 63 例,截尾数据 4 例,随访时间截止至 2018 年 4 月 30 日。

1.2 主要试剂

鼠抗人 TMPRSS4 单克隆抗体:购自 Santa Cruz 公司,即用型免疫组化超敏试剂盒:(1)内源性过氧化物酶阻断;(2)正常动物非免疫血清;(3)生物素标记的第二抗体;(4)链霉菌抗生素蛋白-过氧化物酶购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学方法

HE 染色确诊的石蜡包埋组织,5 μ m 切片,脱蜡去水,所用的载玻片经防脱剂处理,EDTA 加热抗原修复,免疫组化方法参照试剂说明书进行;以磷酸盐缓冲盐水代替一抗作空白对照。

1.3.2 结果判定

以细胞膜和细胞质中出现棕黄色或褐色颗粒状物为阳性染色,在高倍镜下($\times 400$),随机观察 5 个不连续视野,计算阳性细胞百分比,结合表达强度进行评分^[3],评分计算公式如下: $S=\sum EI$ 。其中 S 为总评分;E 为阳性细胞百分比评分:0%=0,1%~25%=1,25%~50%=2,50%~75%=3,75%~100%=4;I 为阳性细胞表达强度评分:无染色 0,弱染色 1,中等染色 2,强染色 3;最终以 $S>3$ 为阳性表达。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计软件分析数据,计数资料采用 χ^2 检验或连续校正的 χ^2 检验;生存分析采用 Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TMPRSS4 在胆囊癌中的表达

TMPRSS4 主要表达于细胞膜和细胞质,染色呈棕黄色或褐色(Figure 1)。TMPRSS4 在胆囊癌组的阳性表达率为 56.72% (38/67), 高于癌旁组织组的 14.93% (10/67), 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

2.2 TMPRSS4 与胆囊癌临床病理特征的关系

TMPRSS4 在胆囊癌中的阳性表达率:TNM 分期 III + IV 期组 82.35% (14/

17)、淋巴结转移组 70.97% (22/31); 分别高于 TNM 分期 I + II 期组的 48.00% (24/50) 和无淋巴结转移组的 44.44% (16/36), 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。TMPRSS4 表达与患者性别、年龄、分化程度、是否合并胆囊结石和病理类型均无关 ($P>0.05$)。见 Table 1。

2.3 生存分析

生存分析显示:全组患者中位生存时间 22.87 ± 1.58 个月 (95%CI: 19.77 个月~25.97 个月) (Figure 2)。TMPRSS4 阳性表达组患者 3 年生存率低于阴性表达者 ($\chi^2=6.806$, $P=0.009$)。见 Figure 3。

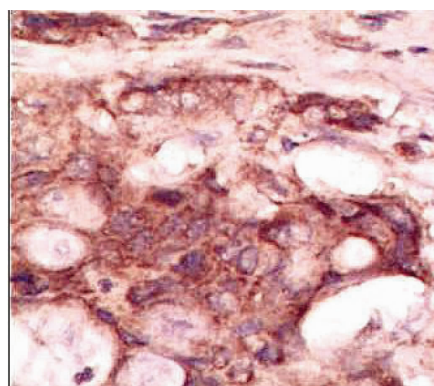


Figure 1 Positive expression of TMPRSS4 in gallbladder cancer (SP $\times 400$)

Table 1 The relationship between TMPRSS4 and clinicopathology features of gallbladder cancer

Clinicopathological features	n	TMPRSS4			χ^2	P
		Positive	Negative	Positive rate(%)		
Lymph node metastasis						
Yes	31	22	9	70.97	4.770	0.029
No	36	16	20	44.44		
TNM stage						
I + II	50	24	26	48.00	6.100	0.014
III + IV	17	14	3	82.35		
Histological grade						
G ₁ +G ₂	47	25	22	53.19	0.800	0.372
G ₃ +G ₄	20	13	7	65.00		
Gender						
Male	30	18	12	54.05	0.239	0.625
Female	37	20	17	56.72		
Age(years)						
≤ 50	25	14	11	56.00	0.008	0.927
> 50	42	24	18	57.14		
Accompanied with gallstone						
Yes	52	30	22	57.69	0.090	0.764
No	15	8	7	53.33		
Pathological type						
Adenocarcinoma	62	35	27	56.45	0.024*	0.878
Squamous adenocarcinoma	5	3	2	60.00		

Notes: *continuity correction chi-square test.

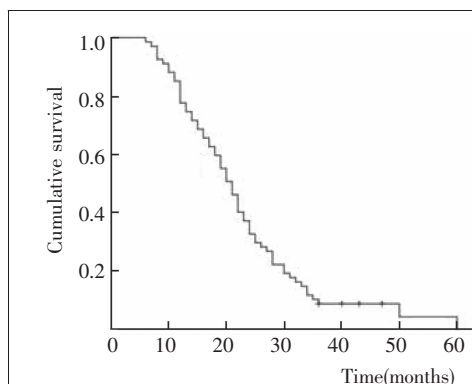


Figure 2 Kaplan-Meier survival curve of all patients

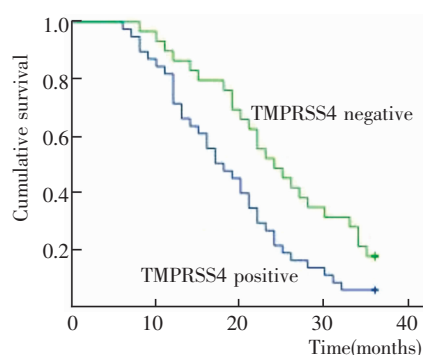


Figure 3 Kaplan-Meier survival curve of patients with positive or negative expression of TMPRSS4

发的因素,是肝癌的一个潜在的预后不佳标志物。还有研究发现^[8],TMPRSS4 可以引发整合素 $\alpha 5$ 表达及信号转导,伴随着 E-钙黏蛋白的下调,导致侵袭和上皮间质转化;在肿瘤的侵袭和转移过程中起作用。

3 讨论

TMPSR4 基因位于染色体 11q23.3^[4],全长 48 565bp,共有 13 个外显子和 12 个内含子,在蛋白结构上具备所有 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶的结构特征,并具有胰蛋白酶活性,参与蛋白或多肽的水解反应。

本研究显示,TMPRSS4 在胆囊癌组的表达显著高于癌旁非肿瘤组,提示 TMPRSS4 的高表达可能与胆囊癌的发生有关。Huang 等^[5] 研究发现,TMPRSS4 在体外可调节结肠癌细胞株 HCT116 的细胞增殖和自我更新能力;通过 siRNA 干扰 TMPRSS4 的表达可以通过促进 HCT116 细胞凋亡来抑制细胞增殖,认为 TMPRSS4 参与形成有利于肿瘤发生的微环境。在乳腺癌中的研究显示^[6]:TMPRSS4 的高表达与乳腺癌的发生发展有关,认为 TMPRSS4 是肿瘤治疗潜在的靶点。

在胆囊癌中,TMPRSS4 在 TNM 分期 III+IV 期组中的阳性表达高于 I+II 期组(82.35% vs 48.00%),在淋巴结转移组中的阳性表达高于无淋巴结转移组(70.97% vs 44.44%),提示 TMPRSS4 的高表达与胆囊癌的浸润转移有关。有研究发现^[7],TMPRSS4 在 PC3 癌细胞中通过 AP-1 激活诱导 Slug 和细胞周期蛋白 D1,在癌细胞侵袭和增殖过程中起作用。此外还发现 Slug 和 AP-1 之间存在一条正反馈回路,可以诱导 cyclinD1 和细胞增殖。在肝癌中的研究发现^[3],TMPRSS4 可通过 snail 和 slug 的介导,激活 Raf/MEK/ERK1/2,导致肝癌的 EMT 发生,TMPRSS4 显著抑制血管生成抑制剂 RECK 的表达,并显著诱导肿瘤血管生成和生长,促进肝癌的浸润和转移,认为 TMPRSS4 的表达增加是肝癌术后生存期差和复

发的因素,是肝癌的一个潜在的预后不佳标志物。还有研究发现^[8],TMPRSS4 可以引发整合素 $\alpha 5$ 表达及信号转导,伴随着 E-钙黏蛋白的下调,导致侵袭和上皮间质转化;在肿瘤的侵袭和转移过程中起作用。

表达与患者的性别、年龄、分化程度、是否合并胆管结石及病理类型无显著相关性。由于本课题选择的病例有限,其中胆管鳞癌 5 例,组织分化分级 G₄ 级仅 1 例,可能影响实验结果,有待于进一步扩大样本量进行分析。结合患者生存分析发现,TMPRSS4 在胆管癌中的表达水平与患者的预后呈负相关,检测 TMPRSS4 在胆管癌中的表达有可能成为胆管癌预后判断的指标之一。对 TMPRSS4 与肿瘤相关机制需做进一步研究,以期寻找抑制胆管癌侵袭转移的治疗靶点提供新的思路。

参考文献:

- [1] Wu ZH,Qin XY,Ding Q. Practice of surgery [M].Fourth Edition. Beijing:People's Health Publishing House, 2017.687.[吴肇汉,秦新裕,丁强.实用外科学[M].第四版.北京:人民卫生出版社,2017.687.]
- [2] Kim S,Lee JW. Membrane proteins involved in epithelial-mesenchymal transition and tumor invasion;studies on TMPRSS4 and TM4SF5[J].Genomics Inform,2014,12(1):12-20.
- [3] Wang CH,Guo ZY,Chen ZT,et al.TMPRSS4 facilitates epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma and is a predictive-marker for poor prognosis of patients after curative resection[J].Sci Rep,2015,5:12366.
- [4] Szabo R,Bugge TH.Type II transmembrane serine proteases in development and disease [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008,40(6-7):1297-1316.
- [5] Huang A,Zhou H,Zhao H,et al. TMPRSS4 correlates with colorectal cancer pathological stage and regulates cell proliferation and self-renewal ability [J]. Cancer Biol Ther,2014,15(3):297-304.
- [6] Li XM,Liu WL,Chen X,et al. Overexpression of TMPRSS4 promotes tumor proliferation and aggressiveness in breast cancer[J].Int J Mol Med,2017,39(4):927-935.
- [7] Lee Y,Ko D,Min HJ,et al.Tmprss4 induces invasion and proliferation of prostate cancer cells through induction of slug and cyclin d1[J]. Oncotarget,2016,7(31):50315-50332.
- [8] Kim S,Kang HY,Nam EH,et al.Tmprss4 induces invasion and epithelial-mesenchymal transition through upregulation of integrin $\alpha 5$ and its signaling pathways[J].Carcinogenesis,2010,31(4):597-606.