

跨膜丝氨酸蛋白酶 4 与 E-钙黏蛋白在 105 例结直肠癌中的表达及意义分析

Expression of TMPRSS4 and E-cad in 105 Cases with Colorectal Cancer and Its Significance
WANG Xiao-lei, KOU Shu-cheng, ZHOU Bin-jie, HUANGFU Shen-qiang

王晓磊,寇书诚,周斌杰,皇甫深强
(河南大学第一附属医院,河南 开封 475000)

摘要: [目的] 探讨跨膜丝氨酸蛋白酶 4(transmembrane protease serine 4, TMPRSS4) 和 E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-cad) 在结直肠癌中的表达及其临床意义。 [方法] 选取手术切除的结直肠腺癌标本 105 例, 应用免疫组织化学方法检测 TMPRSS4 与 E-cad 的表达, 分析两者表达与临床病理特征及预后的关系。 [结果] TMPRSS4 在结直肠癌组织和癌旁组织中的阳性表达率分别为 56.19%(59/105) 和 21.90%(23/105), 差异有统计学意义 ($\chi^2=25.93, P<0.05$); E-cad 在结直肠癌组织和癌旁组织中的阳性表达率分别为 28.57%(30/105) 和 85.71%(89/105), 差异有统计学意义 ($\chi^2=67.50, P<0.05$)。 TMPRSS4 在 III+IV 期组、有淋巴结转移组中的阳性率高于 I+II 期组 ($P=0.035$)、无淋巴结转移组 ($P=0.019$); E-cad 在 III+IV 期组、有淋巴结转移组中的阳性率低于 I+II 期 ($P=0.001$)、无淋巴结转移组 ($P=0.001$); 两者表达均与性别、年龄、肿瘤部位、组织学分期无关 ($P>0.05$)。 结直肠癌中 TMPRSS4 与 E-cad 表达呈负相关 ($r=-0.33, P=0.01$)。 TMPRSS4 高表达组及 E-cad 低表达组 5 年生存率低 ($P<0.05$)。 [结论] 结直肠癌中 TMPRSS4 表达上调、E-cad 表达下调, 两者可能在结直肠癌的发生发展过程中发挥作用。

关键词: 结直肠肿瘤; 跨膜丝氨酸蛋白酶 4; E-钙黏蛋白
中图分类号: R735.3*4 **文献标识码:** B **文章编号:** 1671-170X(2020)12-1086-04
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.12.B014

结直肠癌是常见的消化道肿瘤, 全国肿瘤登记中心资料显示: 2014 年我国结直肠癌的发病率为 27.08/10 万, 居恶性肿瘤发病率第 3 位、死亡率第 5 位^[1]。 TMPRSS4 是跨膜丝氨酸蛋白酶的一种, 在多种肿瘤组织中高表达; E-cad 是一种钙离子依赖的细胞黏附素, 其表达降低或缺失是上皮间质转化 (epithelial mesenchymal transitions, EMT) 的标志, 在乳腺癌中的研究显示^[2]: TMPRSS4 在乳腺癌组织中高表达, 通过促进 EMT 在肿瘤发生发展中起作用, 可作为乳腺癌预后不良的指标。本研究应用免疫组织化学法检测结直肠癌组织中 TMPRSS4 和 E-cad 的表达水平, 探讨两者与结直肠癌临床病理特征的关系及预后的相关性。

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(18A320020); 河南大学科技攻关项目(2013YBZR032)
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(475000); E-mail: xjtuwxl@126.com
收稿日期: 2020-01-01; **修回日期:** 2020-05-24

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2009 年 12 月 1 日至 2013 年 1 月 31 日河南大学第一附属医院手术切除的结直肠腺癌标本 105 例, 术前无抗肿瘤治疗, 取对应的癌旁组织作为对照。患者年龄 30~75 岁, 中位年龄 58 岁; 组织学分级: I 级 25 例, II 级 56 例, III 级 24 例; TNM 分期 (2017 年 AJCC 第 8 版): I 期 6 例, II 期 22 例, III 期 67 例, IV 期 10 例; 伴淋巴结转移者 74 例。以患者的手术时间为起点, 随访 5 年或死亡为终点, 随访日期截止至 2018 年 1 月 31 日, 无失访。本研究经河南大学第一附属医院伦理委员会批准, 所有患者知情同意。

1.2 主要试剂和方法

采用免疫组织化学 SP 法检测, 柠檬酸缓冲液高温高压抗原修复法修复抗原, 以磷酸盐缓冲盐水代替一抗作空白对照, 显微镜下观察。鼠抗人 TM-

PRSS4 单克隆抗体(克隆系:A-3,工作浓度 1:200)、E-cad 单克隆抗体(克隆系:4A2C7,工作浓度 1:100)购自 Santa Cruz 公司,即用型免疫组化超敏试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 结果判定

以细胞膜或细胞浆中出现棕黄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,计算阳性细胞占细胞总数百分比,结合阳性细胞表达强度进行评分^[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 分,0~25%=1 分,25%~50%=2 分,50%~75%=3 分,75%~100%=4 分;I 为阳性细胞表达强度评分:无染色计 0,弱染色计 1,中等染色计 2,强染色计 3; $S>3$ 为阳性表达。

1.4 统计学处理

应用 SPSS17.0 统计软件,计数资料采用 χ^2 检验;关联性分析采用两种属性独立性的 χ^2 检验并计算 Pearson 列联系数判定关联程度;生存分析采用 Kaplan-Meier 法,两组生存曲线的比较采用 Log-rank 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TMPRSS4 和 E-cad 的表达及与结直肠癌临床病理特征的关系

TMPRSS4 和 E-cad 主要表达于细胞膜,也可表达于细胞浆,呈棕褐色或黄褐色(Figure 1,2),TMPRSS4 在结直肠癌组织的阳性表达率为 56.19% (59/105),高于癌旁黏膜组 21.90% (23/105);E-cad 在癌旁组织组中的阳性表达率为 85.71% (89/105),高于结直肠癌组 28.57% (30/105);差异均有统计学意义($P<0.05$)(Table 1)。

TMPRSS4 在结直肠癌中的表达:TNM III+IV 期组(62.34%)、淋巴结转移组(63.51%)分别高于 TNM I+II 期组(39.29%)、无淋巴结转移组(38.71%),差异均有统计学意义($P<0.05$)。E-cad 在结直肠癌中的

表达:TNM III+IV 期组(19.48%)、淋巴结转移组 18.92% 分别低于 TNM I+II 期组(53.57%)、无淋巴结转移组 51.61% (16/31),差异均有统计学意义($P<0.05$)。TMPRSS4 和 E-cad 在结直肠癌组织中的表达与患者性别、年龄、肿瘤部位和分化程度均无明显相关性($P>0.05$)(Table 2)。

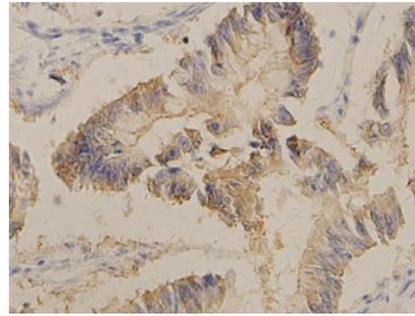


Figure 1 Positive expression of TMPRSS4 in colorectal cancer (SP $\times 400$)

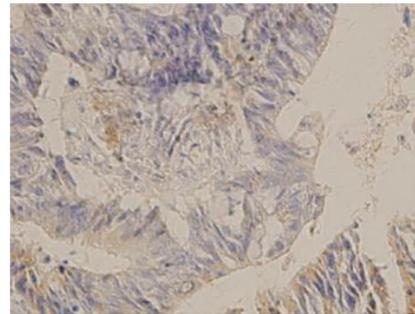


Figure 2 Positive expression of E-cad in colorectal cancer (SP $\times 400$)

2.2 TMPRSS4 和 E-cad 的表达相关性

TMPRSS4 和 E-cad 共同表达阳性者 9 例,TMPRSS4 表达阳性和 E-cad 表达阴性者 50 例,TMPRSS4 表达阴性和 E-cad 表达阳性者 21 例,TMPRSS4 和 E-cad 共同表达阴性者 25 例,采用两种属性独立的 χ^2 检验,结直肠癌 TMPRSS4 和 E-cad 的表达具有关联性($\chi^2=11.70, P=0.01$),Pearson 列联系数 $r=-0.33$ 。

2.3 生存分析

TMPRSS4 阳性表达组患者中位生存期为 40 个月。Log-rank 检验显示:TMPRSS4 阳性表达者 5 年生存率显著低于阴性表达者($\chi^2=9.386, P=0.002$)。E-cad 阴性表达组患者中位生存期为 43 个月。Log-rank 检验显示:E-cad 阳性表

Table 1 Expression of TMPRSS4 and E-cad in colorectal cancer and adjacent mucosa

Groups	N	TMPRSS4				E-cad			
		+	-	χ^2	P	+	-	χ^2	P
Colorectal cancer	105	59	46	25.93	<0.05	30	75	67.50	<0.05
Adjacent mucosa	105	23	82			89	16		

Table 2 Relationship between the expressions of TMPRSS4, E-cad and clinicopathological Features in colorectal cancer

Clinicopathological features	N	TMPRSS4				E-cad			
		+	-	χ^2	P	+	-	χ^2	P
Gender									
Male	59	38	21	3.693	0.055	20	39	1.873	0.171
Female	46	21	25			10	36		
Age(years)									
≤50	25	11	14	1.981	0.159	6	19	0.336	0.562
>50	80	48	32			24	56		
Tumor location									
Rectum	72	40	32	0.038	0.846	24	48	2.545	0.111
Colon	33	19	14			6	27		
Lymph node metastasis									
Yes	74	47	27	5.460	0.019	14	60	11.442	0.001
No	31	12	19			16	15		
TNM stage									
I + II	28	11	17	4.432	0.035	15	13	11.693	0.001
III+IV	77	48	29			15	62		
Histological stage									
I	25	14	11	0.545	0.762	7	18	2.808	0.246
II	56	30	26			13	43		
III	24	15	9			10	14		

达者 5 年生存率显著高于阴性表达者 ($\chi^2=6.597, P=0.010$)(Figure 3、4)。

3 讨论

2018 年全球癌症统计报告显示^[4]:结直肠癌的发病率和死亡率分别居全球癌症发病率和死亡率的第 3 位和第 2 位。2018 年全球新增结直肠癌患者 185 万例,死亡 88.1 万例。目前普遍认为结直肠癌发

病与生活方式密切相关,随着经济的发展和饮食结构的改变,其发病率逐渐升高,也越来越成为威胁健康的重要因素;其病因复杂多样,需要肿瘤相关基因的多阶段参与,转移是结直肠癌预后不良的主要原因^[5]。

TMPRSS4 是丝氨酸蛋白酶的一种,具有典型的丝氨酸蛋白酶的结构特征并具有胰蛋白酶活性。有研究显示^[6],丝氨酸蛋白酶在肿瘤中通过活化不同的蛋白,调节信号转导途径来促进肿瘤细胞生长、血管发生、侵袭和转移,II 型丝氨酸蛋白酶在肿瘤中的主要功能是通过分解细胞外基质并且重塑细胞骨架来促进肿瘤的转移。在胆囊癌中的研究显示^[7],TM-

PRSS4 在胆囊癌中高表达,检测 TMPRSS4 的表达有助于判断患者预后。本研究显示,TMPRSS4 在结直肠癌组的表达显著高于癌旁黏膜组,提示 TMPRSS4 的高表达可能与结直肠癌的发生有一定的关系。在结直肠癌中,TMPRSS4 在 TNM 分期 III+IV 期组、淋巴结转移组的表达分别高于 TNM 分期 I+II 期组、无淋巴结转移组($P<0.05$)。在胃癌中的研究发现^[8],TMPRSS4 可通过激活 NF-kappaB/MMP-9 信号途径增强胃癌细胞的侵袭性。在乳腺癌中的研究显

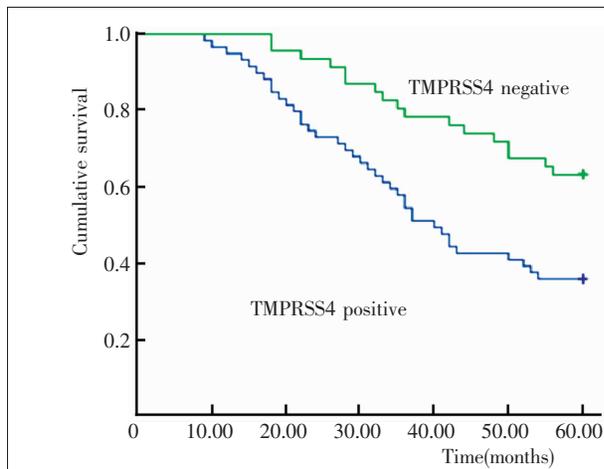


Figure 3 The survival curve of patients with positive or negative expression of TMPRSS4

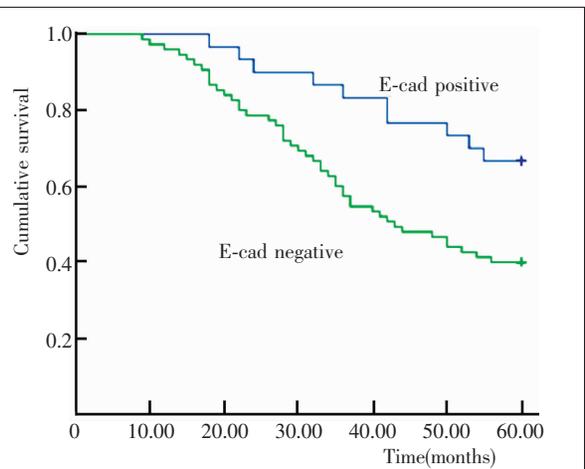


Figure 4 The survival curve of patients with positive or negative expression of E-cad

示^[2]:TMPRSS4 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。还有研究发现^[9],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。TMPRSS4 的表达上调,可通过 NF-κB 信号转导途径下调 miR-125a-5p 的表达,促进人肺腺癌的生长^[10]。进一步的生存分析显示,TMPRSS4 表达阴性的结直肠癌患者 5 年生存率显著高于阳性表达组,提示 TMPRSS4 的高表达与结直肠癌的浸润与转移有关,而浸润和转移是结直肠癌预后不良的主要因素。

E-cad 是一种细胞黏附分子,主要介导同质细胞间黏附,参与形成和维持正常细胞间的连接,表达下调或缺失可以开启 EMT,导致上皮肿瘤浸润和转移^[11],Bmi-1 可以通过下调 E-cad 诱发 EMT 的发生,促进结肠癌细胞的浸润和转移^[12]。本研究显示,E-cad 在结直肠癌组织中的表达低于癌旁组织。有研究发现^[13],E-cad 在正常结肠组织中强表达,而在结直肠癌细胞外基质中表达减少,E-cad 的缺失参与了有利于肿瘤发生发展的微环境。在结直肠癌中,Ⅲ+Ⅳ期组、淋巴结转移组的中 E-cad 表达分别低于 I+II 期组、无淋巴结转移组。生存分析显示,E-cad 阳性表达组的结直肠癌患者生存时间显著高于阴性表达组,提示 E-cad 的表达下调可能参与了结直肠癌的浸润、转移。

有研究发现^[14]:TMPRSS4 通过激活下游信号通路,包括 FAK、ERK、Akt、Src 和 Rac1 等促进 EMT 的发生,促进肿瘤细胞浸润和转移。在肝癌的研究中发现^[15],miR-541-3p 通过下调 TMPRSS4 的表达在抑制肝癌细胞浸润及转移过程中起作用,这些效应可能是通过改变 EMT 相关分子蛋白的表达而表现出来的,包括 TGF-β、E-cad 和 N-cad。

在结直肠癌中,TMPRSS4 表达上调,E-cad 表达下调,两者表达呈负相关,TMPRSS4 的高表达或 E-cad 低表达提示结直肠癌患者预后差,两者可能在结直肠癌的发生发展过程中发挥了作用,可作为预后评估的生物学指标。

参考文献:

[1] Chen WQ, Li H, Sun KX, et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2014[J]. Chinese Journal of

Oncology, 2018, 40(1):5-13.[陈万青,李贺,孙可欣,等. 2014 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2018, 40(1):5-13.]

- [2] Li XM, Liu WL, Chen Xu et al. Overexpression of TMPRSS4 promotes tumor proliferation and aggressiveness in breast cancer[J]. Int J Mol Med, 2017, 39(4):927-935.
- [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] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [5] Wu ZH, Qin XY, Ding Q. Practice of surgery [M]. Fourth Edition. Beijing: People's Health Publishing House, 2017.556-558.[吴肇汉,秦新裕,丁强.实用外科学,第四版[M].北京:人民卫生出版社,2017.556-558.]
- [6] 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.
- [7] Wang XL, Duan WF, Yang HJ, et al. Expression of TMPRSS4 in gallbladder cancer and its significance[J]. Journal of Chinese Oncology, 2019, 25(10):887-889.[王晓磊,段文飞,杨海舰,等.跨膜丝氨酸蛋白酶 4 在胆囊癌中的表达及意义[J]. 肿瘤学杂志, 2019, 25(10):887-889.]
- [8] Jin J, Shen X, Chen L, et al. TMPRSS4 promotes invasiveness of human gastric cancer cells through activation of NF-kappaB/MMP-9 signaling [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 77(2):30-36.
- [9] 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.
- [10] Fan X, Liang Y, Liu Y, et al. The upregulation of TMPRSS4, partly ascribed to the downregulation of miR-125a-5p, promotes the growth of human lung adenocarcinoma via the NF-κB signaling pathway [J]. Int J Oncol, 2018, 53(1):148-158.
- [11] Shen T, Zhang K, Siegal GP, et al. Prognostic value of E-Cadherin and β-Catenin in triple-negative breast cancer [J]. Am J Clin Pathol, 2016, 146(5):603.
- [12] Zhang Z, Bu X, Chen H, et al. Bmi-1 promotes the invasion and migration of colon cancer stem cells through the downregulation of E-cadherin [J]. Int J Mol Med, 2016, 38(4):1199-1207.
- [13] Li ZL, Wang ZJ, Zhao B, et al. Effect of changes of extracellular matrix at the different clinical stages of CRC on epithelial-mesenchymal transition in cancer cell [J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2016, 23(16):1076-1080.[李竹林,王振军,赵博,等.结直肠癌细胞外基质与癌细胞上皮-间质转化和分期的相关性[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2016, 23(16):1076-1080.]
- [14] Dai W, Zhou Q, Xu Z, et al. Expression of TMPRSS4 in patients with salivary adenoid cystic carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognosis [J]. Med Oncol, 2013, 30(4):749.
- [15] Xia YH, Ren L, Li JZ, et al. Role of miR-541-3p/TMPRSS4 in the metastasis and EMT of hepatocellular carcinoma[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 3(24):10721-10728.