

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.03.003

食管鳞癌中 maspin 及 EIF-5A2 的表达及临床意义

赖光湖, 杜 铭, 陈焕文, 杨双强

(重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 maspin 及 EIF-5A2 在食管鳞癌中的表达及意义。方法:应用免疫组化 SP 方法检测 60 例食管鳞癌组织中 maspin 及 EIF-5A2 的表达。结果:食管鳞癌中 maspin 蛋白的表达与病理分化程度及淋巴结转移有相关性($P=0.009$ 、 $P=0.023$), EIF-5A2 的表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移及临床分期有相关性($P=0.001$ 、 $P=0.027$ 、 $P=0.005$)。结论:maspin 及 EIF-5A2 在食管鳞癌中的表达提示它们可作为判断食管鳞癌恶性程度,评估其侵袭性及转移的分子生物学指标;联合检测 maspin 及 EIF-5A2 可能对食管鳞癌早期诊断及判断预后具有重要意义。

【关键词】食管鳞癌; maspin; EIF-5A2; 免疫组织化学

【中国图书分类法分类号】R735.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-11-30

Expressions of maspin and EIF-5A2 in esophageal squamous cell carcinoma and their clinical significance

LAI Guanghu, DU Ming, CHEN Huanwen, YANG Shuangqiang

(Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the expressions of maspin and EIF-5A2 in esophageal squamous cell carcinoma and the clinical significance. Methods: Immunohistochemical SP method was used to detect the expressions of maspin and EIF-5A2 in 60 esophageal carcinoma tissues. Results: Maspin protein expression in esophageal squamous cell carcinoma tissues had a correlation with histological differentiation and lymph node metastasis ($P<0.05$), and EIF-5A2 expression in esophageal squamous cell carcinoma tissues had a correlation with invasion, lymph node metastasis and TNM staging ($P<0.05$). Conclusion: The expressive intensity of maspin and EIF-5A2 in esophageal carcinoma tissue may be served as the molecular biological index of evaluating infiltration and metastasis. The combined examination of maspin and EIF-5A2 may be useful for the diagnosis of early esophageal squamous cell carcinoma and evaluating prognosis in esophageal squamous cell carcinoma.

【Key words】esophageal squamous cell carcinoma; maspin; EIF-5A2; immunohistochemistry

食管癌是我国常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率很高,迄今为止手术治疗仍是治疗食管癌的主要手段,但其早期诊断的困难及术后复发和转移是影响食管癌疗效及预后的关键因素。maspin 基因属于丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族的成员^[1],文献报道 maspin 蛋白在消化道等多种正常人体器官组织中有高水平表达,而在相应的恶性肿瘤中表达下调或不表达,即属抑癌基因,可抵抗血管新生、抑制肿瘤细胞的运动和迁移,促进凋亡,在抗肿瘤转移中发挥一定的作用^[2]。EIF-5A2 基因是 2001 年 Guan 等应用染色体微切割及筛选杂交技术从卵巢癌中克隆出来的一个新基因^[3],文献表明 EIF-5A2 基因在细胞生长和增殖中具有重要的作用,研究提示 EIF-5A2 的过度表达可能促进血管生成^[4]。本研究中通过免疫组化方法检测 60 例食管癌病人中 maspin 及 EIF-5A2

的表达情况,探讨它们与食管癌病理特征的关系。

1 材料及方法

1.1 材料

60 例石蜡标本取自 2009 年 1 月至 2010 年 10 月重庆医科大学附属第一医院病理科确诊且术前均未行放化疗的食管鳞癌病人,其中男性 40 例,女性 20 例;平均年龄 63.25 岁(43~75 岁);其中高分化癌 16 例,中分化癌 27 例,低分化癌 17 例;按照国际抗癌联盟(UICC)2009 年修订的 pTNM 分期标准,其中 I 期 24 例,II 期 19 例,III 期 17 例;有淋巴结转移 25 例,无淋巴结转移 35 例。

1.2 方法

1.2.1 切片制备 常规制备 4 μm 厚的连续切片 5 张,分别进行 HE 染色及免疫组织化学染色。

1.2.2 实验方法 采用免疫组化 S-P (Streptavidin-perosi-

作者介绍:赖光湖(1985-),男,硕士,

研究方向:食管癌的基础及临床研究。

通信作者:杜 铭,男,副教授,Email:ljdyt1103@sina.com。

dase)法,即链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法分别检测 maspin 和 EIF-5A2 在标本上的表达。主要步骤如下:常规脱蜡至水,置 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH6.0)中煮沸抗原修复 20 min 后,冷却至室温,PBS 冲洗,3%双氧水 37℃孵育 10~15 min,PBS 洗,正常羊血清 37℃孵育 15 min,倾去勿洗,加入一抗 maspin(兔多抗,稀释比例为 1:50)或 EIF-5A2(兔多抗,稀释比例为 1:50)4℃冰箱孵育过夜,复温,PBS 洗,滴加二抗 37℃孵育 30 min,PBS 洗,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素 37℃孵育 30 min,PBS 洗。DAB 染色,而后自来水充分冲洗,苏木素复染,分化,返蓝,脱水透明,封片。以 PBS 代替第一抗体为阴性对照。

1.2.3 结果判定 maspin 蛋白阳性表达主要定位于胞浆,及少数有细胞核表达;EIF-5A2 蛋白阳性表达定位于细胞浆,采用半定量积分法判定结果,每张切片随机选 5 个高倍(400×)视野观察,计数 200 个细胞,阳性细胞数≤5%为 0 分,6%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51~75%为 3 分,>75%为 4 分;根据免疫阳性细胞染色程度,无着色为 0 分,黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。将细胞染色程度计分与阳性百分数计分相加即为综合评分,积分为 0~2 分,表示阴性(-);3~4 分为阳性(+);5~7 分为强阳性(++);后两者均视为阳性表达。

1.3 统计学分析

应用 SPSS17.0 软件对资料进行分析,样本率的比较采用 χ^2 检验,以 $\alpha=0.05$ 作为显著性检验的标准,以双侧 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 食管鳞癌中 maspin 及 EIF-5A2 的表达情况

60 例食管鳞癌中 maspin 的阳性表达率为 31.7% (19 例),EIF-5A2 的阳性表达率为 46.7% (28 例)。

2.2 maspin 及 EIF-5A2 的表达与食管鳞癌分化程度的关系

maspin 在高分化、中分化及低分化食管鳞癌中的阳性表达率分别为 68.8%、22.2%、11.8%,差异具有统计学意义($P<0.05$);EIF-5A2 在高分化、中分化及低分化食管鳞癌中的阳性表达率分别为 43.8%、48.1%、47.0%,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 maspin 及 EIF-5A2 的表达与食管鳞癌浸润深度的关系

maspin 在 T1-T2 及 T3-T4 的表达阳性率分别为 33.4% 和 27.7%,差异无统计学意义($P>0.05$);EIF-5A2 在 T1-T2 及 T3-T4 的表达阳性率分别为 35.7% 和 72.2%,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 maspin 及 EIF-5A2 的表达与食管鳞癌临床分期的关系

maspin 在 I 期、II 期及 III 期中的阳性表达率分别为 33.3%、31.6% 和 29.4%,差异无统计学意义($P>0.05$);EIF-5A2 在 I 期、II 期及 III 期中的阳性表达率分别为 25.0%、31.0% 和 76.4%,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 maspin 及 EIF-5A2 的表达与食管鳞癌淋巴结转移的关系

淋巴结转移组中 maspin 的表达例数明显低于无淋巴结转移组,而淋巴结转移组中 EIF-5A2 表达例数显著高于无淋

巴结转移组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

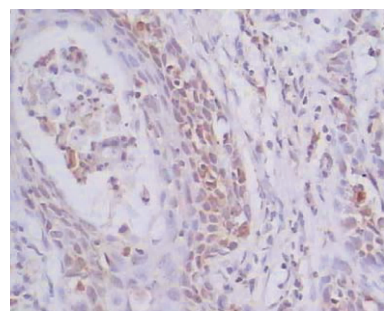


图 1 maspin 在食管鳞癌细胞浆表达(S-P 法,400×)

Fig.1 Expressions of maspin in the cytoplasm of esophageal squamous cell carcinoma (SP, 400×)

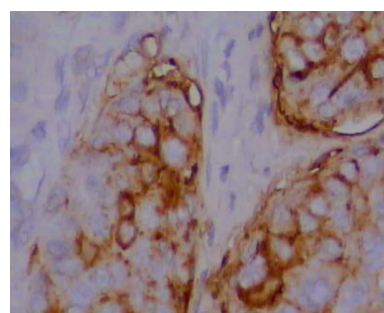


图 2 EIF-5A2 在食管鳞癌细胞浆表达(S-P 法,400×)

Fig.2 Expressions of EIF-5A2 in the cytoplasm of esophageal squamous cell carcinoma (SP, 400×)

3 讨论

maspin 基因是 1994 年 Zou 等用消减杂交技术从正常乳腺上皮细胞中分离出的 1 种新基因,被认为是 1 种抑癌基因,编码产物为丝氨酸蛋白水解酶抑制剂,可通过多种机制抑制肿瘤细胞的生长。体外实验发现,maspin 是 1 个有效的血管生成抑制因子^[5],它能够作用于成纤维细胞因子和血管内皮生长因子,阻断细胞的有丝分裂和微管的形成,抑制内皮细胞向基质转移,从而抑制血管的生长,影响肿瘤的发生和发展。maspin 可通过增加细胞的粘附能力,减低细胞运动能力而抑制肿瘤转移^[6]。另有研究表明:maspin 可以通过控制 Bax 及 gcl-2 信号通路介导细胞凋亡来抑制肿瘤细胞的生长^[7]。maspin 启动子 cytotocine 甲基化导致该基因失活^[8]。临床有大量研究表明 maspin 蛋白在乳腺、前列腺、小肠等组织器官中成高水平表达,而在相应的恶性肿瘤表达下调或不表达。本研究发现,maspin 蛋白在食管鳞癌中的表达与组织分化程度具有显著相关,即 maspin 的表达强度随组织分化程度的降低而减低,提示 maspin 的表达下调在食管鳞癌中可能具有恶性转化的能力。同时实验结果显示,maspin 的表达与食管鳞癌浸润深度、临床分期无关,但 maspin 在食管鳞癌中的表达与淋巴结转移有关($P<0.05$),在无淋巴结转移组中呈相对高表达状态,而在淋巴结转移组中呈相对低表达状态,说明 maspin 的失表达促进了肿瘤的发生、发展及转移的可能,在

表 1 maspin 和 EIF-5A2 在食管癌中的表达
Tab.1 Expressions of maspin and EIF-5A2 in the esophageal squamous cell carcinoma

例数 (<i>n</i>)		maspin阳性			EIF-5A2阳性		
		<i>n</i> (%)	χ^2 值	<i>P</i> 值	<i>n</i> (%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
性别							
男	40	12 (30.0%)	0.154	0.695	17 (42.5%)	0.837	0.360
女	20	7 (35.0%)			11 (55.0%)		
年龄							
< 60 岁	23	9 (39.1%)	0.960	0.327	13 (56.5%)	1.455	0.228
≥60 岁	37	10 (27.0%)			15 (40.5%)		
浸润深度							
T1-T2	42	14 (33.4%)	0.180	0.672	15 (35.7%)	6.747	0.009
T3-T4	18	5 (27.7%)			13 (72.2%)		
分化程度							
高分化	16	11 (68.7%)	14.393	0.001	7 (43.7%)	0.080	0.961
中分化	27	6 (22.2%)			13 (48.1%)		
低分化		2 (11.7%)			8 (47.0%)		
TNM分期							
I	24	8 (33.3%)	0.071	0.965	6 (25.0%)	10.598	0.005
II	19	6 (31.6%)			9 (31.0%)		
III	17	5 (29.4%)			13 (76.4%)		
淋巴结转移							
无	35	15 (42.8%)	4.861	0.027	12 (34.2%)	5.173	0.023
有	25	4 (16.0%)			16 (64.0%)		

其他肿瘤中也有类似结论报道^[9,10]。总之,对 maspin 基因的功能和机制的研究还有待进一步的深入,尤其是通过 maspin 基因水平表达调控的研究,能为从分子水平预防和治疗肿瘤提供依据。

真核翻译起始因子 EIF-5A2 的 mRNA 只在人体部分正常组织(睾丸、肝、胎盘、乳腺、皮肤、脑、结肠)或肿瘤细胞中存在表达,但 EIF-5A2 蛋白在人体正常组织或正常细胞系的表达很弱或不表达^[11]。目前,EIF-5A2 蛋白在肿瘤组织中过度表达的机制尚不清楚,实验表明 EIF-5A2 既能增加 p53mRNA 的表达水平,又能促进 p53 蛋白上某些 ser 位点的磷酸化修饰,从而稳定 p53 蛋白,这两方面的共同作用可能在上调 p53 蛋白中起重要作用,而 p53 是细胞中最重要的肿瘤抑制蛋白,它在细胞凋亡中发挥着决定性作用。Luo 等^[12]人在膀胱癌中的研究表明,EIF-5A2 的过度表达不仅可预测肿瘤的复发及进展,而且可为肿瘤转移提供重要参考。而 He 等人在肺癌中研究发现,EIF-5A2 的过度表达和非小细胞肺癌的局部浸润有关,可能作为早期诊断的靶点^[13]。本研究发现,EIF-5A2 的表达阳性率随着浸润的深度的增加而增加($P<0.05$),提示在食管癌中 EIF-5A2 的过度表达与肿瘤组织浸润有关。在淋巴结转移组中 EIF-5A2 表达例数显著高于无淋巴结转移组,提示 EIF-5A2 的过度表达有可能促进了淋巴结转移,这与 Tang 等^[14]人在肝癌中的研究结果是一致的。我们还发现,EIF-5A2 的表达与临床病理分期的升高显著相关,这提示在肿瘤的发生发展中 EIF-5A2 可能起重要作用。

有证据显示 maspin 基因还可通过影响其他基因的表达

发挥间接的抑瘤作用,相反许多肿瘤相关因子也可通过对 maspin RSL 作用位点和启动子上 Ap-1, Ets 和 P53 位点的修饰^[15]来影响其转录、翻译等环节,进一步影响对 maspin 的表达。EIF-5A2 作为真核翻译起始因子,是否存在某种机制可以和 maspin 基因共同影响肿瘤的发生发展,进一步的研究可有助于揭示这些尚未明了的机制。

总之,在本研究中结果提示 maspin 的失表达及 EIF-5A2 的过度表达可能在食管鳞癌的发生发展中发挥重要作用,食管鳞癌中 maspin 的失表达及 EIF-5A2 的过度表达均有可能促进了淋巴结转移。maspin 及 EIF-5A2 在食管鳞癌中的表达提示它们可作为判断食管鳞癌恶性程度,评估其侵袭性及转移的分子生物学指标,联合检测可能对食管鳞癌早期诊断及判断预后具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Zou Z, Anisowicz A, Hendrix M J, et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells[J]. Science, 1994, 263(5146):526-529.
- [2] Bailey C M, Khalkhali-Ellis Z. Biological functions of maspin[J]. J Cell Physiol, 2006, 209:617-624.
- [3] Guan X Y, Sham J S, Tang T C, et al. Isolation of a novel candidate oncogene within a frequently amplified region at 3q26 in ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2001, 61(9):3806-3809.

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.03.004

全反式维甲酸诱导肝前体细胞向肝细胞分化的研究

白光文¹, 李红丽², 申利红², 芦永良², 冯涛²

(1. 重庆市丰都人民医院普外科, 重庆 408200; 2. 重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨全反式维甲酸(All-trans retinoic acid, ATRA)对肝前体细胞分化的影响。方法:取孕 14.5 d 胎鼠制备肝前体细胞,瞬时转染带白蛋白启动子(Albumin promoter)的荧光素酶报告质粒 pALB-Luc,以便实时检测细胞的分化状态。优化 ATRA 诱导条件,分别于诱导后 3、6、9 d 收集细胞总 RNA,半定量 RT-PCR 检测分化相关指标的变化。并于诱导后 11 d 用苏木精-伊红染色法观察细胞形态的改变,PAS 染色观察细胞的分化成熟程度。结果:ATRA 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时对肝前体细胞分化诱导作用最强。与对照组相比,随培养时间的延长,ATRA 组分化早期指标膜蛋白(Delta like, DLK)、细胞角蛋白(Cytokeratin19, CK19)表达降低更为明显,而甲胎蛋白(Alpha fetal protein, AFP)、白蛋白(Albumin, ALB)表达更为升高。形态学观察细胞体积增大,呈多边形,核浆比率降低,相嵌紧密排列,可见双核细胞。PAS 染色阳性率上升。结论:浓度 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATRA 对肝前体细胞分化诱导作用最强,ATRA 能诱导肝前体细胞分化为类肝细胞。

【关键词】肝前体细胞;全反式维甲酸;诱导分化;PAS 染色法

【中国图书分类法分类号】R575

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-12-19

Role of all-trans retinoic acid in the differentiation of hepatic progenitor cells

BAI Guangwen¹, LI Hongli², SHEN Lihong², LU Yongliang², FENG Tao²

(1. Department of General Surgery, the People's Hospital of Chongqing Fengdu;

2. Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of all-trans retinoic acid (ATRA) in the differentiation of hepatic progenitor cell.

作者介绍:白光文(1970-),男,副主任医师,
研究方向:肿瘤发生机制及基因治疗。

通信作者:冯涛,男,教授,Email: fengtao9_9@yahoo.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81071770)。

Methods: The hepatic progenitor cell was isolated from E14.5 mouse liver and transfected with pALB-Luc, in which the expression of luciferase was driven by (Albumin, ALB) promoter. The concentration of ATRA based on the expression of ALB was optimized. The change of differentiation markers of (Alpha

[4] Clement P M, Hanauske-Abel H M, Wolff E C, et al. The antifungal drug ciclopirox inhibits deoxyhypusine and proline hydroxylation, endothelial cell growth and angiogenesis in vitro[J]. Int J Cancer, 2002, 100(4):491-498.

[5] Zhang M, Volpert O, Shi Y H, et al. Maspin is an angiogenesis inhibitor[J]. Nat Med, 2000, 6(2):19.

[6] Chen E I, Yates J R. Maspin and tumor metastasis[J]. IUBMB Life, 2006, 58(1):25-29.

[7] Zhang M, Shi Y H, Zhang M. Maspin overexpression modulates tumor cell apoptosis through the regulation of Bcl-2 family proteins[J]. BMC Cancer, 2005, 5:50.

[8] Oshiro M M, Watts G S, Wozniak R J, et al. Mutant p53 and aberrant cytosine methylation cooperate to silence gene expression[J]. Oncogene, 2003, 22(23):3624-3634.

[9] Yoshizawa K, Nozaki S, Okumura A, et al. Loss of maspin is a negative prognostic factor for invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma[J]. Journal of Oral Pathology and Medicine, 2009, 38(6):535-539.

[10] Bal N, Kocer N E, Ertorer M E, et al. Maspin, E-selectin, and P-

selectin expressions in papillary thyroid carcinomas and their correlation with prognostic parameters[J]. Pathol Res Pract, 2008, 204():743-750.

[11] Clement P M, Johansson H E, Wolff E C, et al. Differential expression of eIF5A-1 and eIF5A-2 in human cancer cells[J]. FEBS Journal, 2006, 273(6):1102-1114.

[12] Luo J H, Hua W F, Rao H L, et al. Overexpression of EIF-5A2 predicts tumor recurrence and progression in pTa/pT1 urothelial carcinoma of the bladder[J]. Cancer Sci, 2009, 100(5):896-902.

[13] He L R, Zhao H Y, Li B K, et al. Overexpression of eIF5A-2 is an adverse prognostic marker of survival in stage I non-small cell lung cancer patients[J]. Int J Cancer, 2010, 129(1):143-150.

[14] Tang D J, Dong S S, Ma N F, et al. Overexpression of Eukaryotic initiation factor 5A enhances cell motility and promotes tumor metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2010, 51(4):1255-1263.

[15] Lee D Y, Park C S, Kim H S, et al. Maspin and p53 protein expression in gastric adenocarcinoma and its clinical applications[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2008, 16(1):13-18.

(责任编辑:冉明会)