



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.02.013
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3787.shtml

· 基础研究 ·

跨膜丝氨酸蛋白酶 4 在胃癌中的表达及临床意义

李瑞欣, 陈子华, 袁伟杰, 陈志康

(中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008)

摘要

目的: 探讨跨膜丝氨酸蛋白酶 4 (TMPRSS4) 在胃癌中的表达及其临床意义。

方法: 应用实时荧光定量 PCR 及 Western blot 检测 33 例新鲜胃癌及其癌旁组织中 TMPRSS4 的 mRNA 与蛋白表达, 应用免疫组化法检测 108 例胃癌及其癌旁组织石蜡切片中 TMPRSS4 的表达, 并分析 TMPRSS4 表达与临床病理特征及预后的关系。

结果: 胃癌组织中 TMPRSS4 mRNA 和蛋白的表达均明显高于癌旁组织 (均 $P < 0.05$), TMPRSS4 蛋白在胃癌组织中表达率明显高于癌旁组织 (55.56% vs. 18.52%) ($P < 0.05$), 其高表达与癌灶大小 (≥ 5 cm)、浸润深度、TNM 分期、淋巴结转移 (≥ 3 个) 有关 (均 $P < 0.05$)。Kaplan-Meier 生存分析显示 TMPRSS4 高表达患者 5 年总体生存明显差于低表达患者 ($P = 0.035$); COX 多因素分析发现 TMPRSS4 蛋白高表达是影响胃癌患者预后的独立因素 ($P = 0.045$)。

结论: TMPRSS4 的表达与胃癌进展密切相关, 可作为胃癌患者预后的指标之一。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(2):202-206]

关键词

胃肿瘤; 丝氨酸内肽酶类; 预后
中图分类号: R735.2

The expression and clinical values of transmembrane proteases serine 4 in gastric cancer

LI Ruixin, CHEN Zihua, YUAN Weijie, CHEN Zhikang

(Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Corresponding author: CHEN Zhikang, Email: chenzk1974@yahoo.com.cn

ABSTRACT

Objective: To investigate the expression of transmembrane protease, serine 4 (TMPRSS4) and its clinical significance in gastric cancer.

Methods: The mRNA and protein expressions of TMPRSS4 in 33 specimens of gastric cancer along with their adjacent tissues were measured by real-time RT-PCR and Western blot analysis, respectively. The TMPRSS4 expressions in 108 paraffin specimens of gastric cancer along with their adjacent tissues were determined by immunohistochemical staining, and the relations of TMPRSS4 expression with the clinicopathological profiles and prognosis of gastric cancer patients were analyzed.

Results: Both the TMPRSS4 mRNA and protein levels in gastric cancer tissue were significantly higher than those in adjacent tissues (both $P < 0.05$). TMPRSS4 expression rate in gastric cancer tissue was significantly higher than that in adjacent tissue (55.56% vs. 18.52%) ($P < 0.05$), and high TMPRSS4 expression was significantly

基金项目: 湖南省科学技术厅科技计划资助项目 (2010FJ6019)。

收稿日期: 2013-03-20; 修订日期: 2013-10-22。

作者简介: 李瑞欣, 中南大学湘雅医院博士研究生, 主要从事消化道肿瘤基础与临床方面的研究。

通信作者: 陈志康, Email: chenzk1974@yahoo.com.cn

related to the tumor size (≥ 5 cm), depth of invasion, TNM stage and lymph node metastases (≥ 3) (all $P < 0.05$). Kaplan-Meier survival analysis showed that the 5-year overall survival in TMPRSS4 expression patients was poorer than that in low TMPRSS4 expression patients ($P = 0.035$). Cox analysis revealed that the high TMPRSS4 expression was an independent prognostic factor for gastric cancer patients ($P = 0.045$).

Conclusion: The TMPRSS4 level is closely associated with the progression of gastric cancer and could be used as a potential prognostic marker for gastric cancer. [Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(2):202-206]

KEYWORDS Stomach Neoplasms; Serine Endopeptidases; Prognosis

CLC number: R735.2

胃癌是威胁人类健康的主要恶性肿瘤之一^[1-2]。侵袭和转移是导致进展期胃癌不良预后的关键因素^[3]。肿瘤细胞通过异常的蛋白水解系统降解细胞外基质并侵入周围组织是肿瘤发生侵袭和转移的关键步骤。跨膜丝氨酸蛋白酶4 (TMPRSS4) 是II型跨膜丝氨酸蛋白酶家族成员,具有水解细胞外基质的活性,在恶性肿瘤组织中表达增高,并促进肿瘤侵袭和转移^[4]。本研究检测了胃癌组织中TMPRSS4的表达,并分析了TMPRSS4表达与临床病理特征及预后的关系,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床标本资料

33例新鲜胃癌及其癌旁组织(距肿瘤 ≥ 5 cm)来自中南大学湘雅医院普通外科2012年3月—2012年5月手术切除标本;108例石蜡切片来自湘雅医院病理科(所取标本均获得患者知情同意,并获得中南大学湘雅医院伦理委员会批准)。新鲜标本离体后30 min内取材,立即置于液氮中保存备用。108例胃癌患者男性66例,女性42例;年龄31~81岁,中位年龄58岁。所有患者术前均由活检证实为胃癌,并未接受针对肿瘤的治疗。胃癌病理诊断参照2010年NCCN指南,分期根据UICC/AJCC 2009年第7版分期标准^[5]。

随访资料:以门诊、电话或信件为随访方式。随访起始时间为术后第1天,随访截止日期为病死日期或2012年3月31日,最长随访时间70个月,最短随访时间3个月,中位生存期42个月,失访19例,随访率82.41%。

1.2 主要试剂

Trizol (Invitrogen公司)、TMPRSS4单克隆抗体(Santa Cruz公司)、cDNA合成试剂盒(Thermo

Scientific公司)、荧光定量PCR试剂盒(Applied Biosystems公司),即用型SP免疫组化染色试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 总RNA提取

取新鲜组织30 mg至于研钵中,于液氮中研磨,按厂家提供步骤提取总RNA。紫外分光光度计测定RNA浓度, -80 °C保存备用。

1.4 实时荧光定量PCR

取1 μ g RNA于PCR管中,按厂家提供步骤合成cDNA。按照荧光定量PCR试剂盒说明检测TMPRSS4的表达量。TMPRSS4及内参 β -actin引物由上海吉凯生物技术有限公司合成。TMPRSS4上游引物序列为:5'-CCA TCT GTC TGC CCT TCT-3';下游引物序列:5'-CAT CTT CTC GGT GAC TTC C-3'。 β -actin引物上游序列:5'-CGG GAA ATC GTG CGT GAC-3',下游引物序列:5'-CAG GAA GGA AGG CTG GAA G-3'。样本中TMPRSS4相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.5 Western blot

取50 mg新鲜胃癌组织置入匀浆器并加入1 mL组织裂解液,于冰上研磨组织形成匀浆,离心匀浆后获得总蛋白。将总蛋白及内参加入SDS-PAGE胶上的上样孔,120 V恒压电泳。电泳结束后将凝胶置入转膜槽中转膜,加入1:1 000稀释的羊抗人TMPRSS4单克隆抗体,4 °C过夜,用PBS洗一抗后加入二抗,37 °C孵育1 h,洗去二抗,发光液孵育3 min,暗室中显影,定影,曝光。

1.6 免疫组化

108例石蜡切块,4 μ m切片。试验步骤按SP法试剂盒说明书进行。以胞膜或胞浆出现棕黄色染色为阳性染色,结果判定依据文献报道^[6]:染色细胞数评分:无染色细胞为0,染色细胞 $< 15\%$ 为1,染色细胞15%~50%为2,染色细

胞 >50% 为 3；染色强度评分：无染色为 0，弱棕黄色染色为 1；中度棕黄色染色为 2；强棕黄色染色为 3。染色细胞数评分 + 染色强度评分为 TMPRSS4 的表达水平：0~2 为低表达，3~6 为高表达。染色结果判定采用统一评分标准和双盲法，评分过程重复 3 次。

1.7 统计学处理

用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，采用独立样本 *t* 检验。计数资料采用 χ^2 检验。生存分析采用 Kaplan-Meier 曲线和 Log-rank 检验。多因素分析采用 COX 比例风险模型。所有检验采用双侧检验，

$P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 新鲜胃癌组织中 TMPRSS4 的表达

33 例新鲜胃癌组织 TMPRSS4 mRNA 及蛋白的相对表达量明显高于癌旁组织 [(0.0393 ± 0.0025) vs. (0.0187 ± 0.00070)；(0.76 ± 0.12) vs. (0.15 ± 0.09)] (均 $P < 0.05$) (图 1)；mRNA 与蛋白表达水平相关性分析发现，胃癌中 TMPRSS4 mRNA 与蛋白表达水平呈正相关 ($r = 0.879$, $P < 0.01$)。

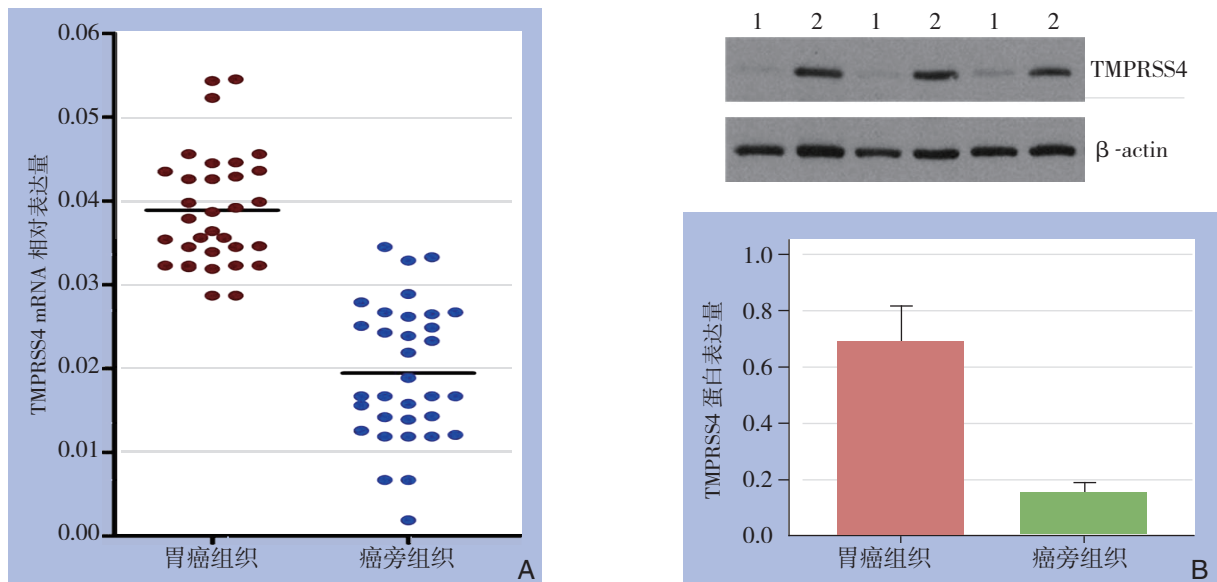


图 1 TMPRSS4 在胃癌及癌旁组织中的表达情况 A: mRNA 相对表达量; B: 蛋白相对表达量 1: 癌旁组织; 2: 胃癌组织

Figure 1 TMPRSS4 expressions in gastric cancer tissues and adjacent tissues A: Relative mRNA expression; B: Relative protein expression 1: Adjacent tissue; 2: Gastric cancer tissue

2.2 胃癌石蜡切片中 TMPRSS4 蛋白表达与临床病理特征的关系

在 108 例胃癌组织中，TMPRSS4 蛋白高表达 60 例，表达率 55.56%；癌旁组织中高表达 20 例，表达率 18.52% (图 2)，两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。TMPRSS4 蛋白高表达与癌灶 ≥ 5 cm ($P = 0.037$)、浸润深度 ($P = 0.042$)、TNM 分期 ($P = 0.026$) 及淋巴结转移 ≥ 3 个 ($P = 0.009$) 有关，但与年龄、性别和肿瘤分化程度无关 ($P > 0.05$) (表 1)。

2.3 TMPRSS4 蛋白高表达与胃癌临床预后的关系

根据免疫组化的结果，将有随访资料的 89 例胃癌患者分为 TMPRSS4 高表达组 ($n = 42$) 和 TMPRSS4 低表达组 ($n = 47$)，分析两组间总体生存的差异。结果显示，TMPRSS4 蛋白高表达组和低表达组中位生存时间分别为 28 个月和 46 个月，TMPRSS4 蛋白高表达组总体生存较低表达组明显缩短 ($P = 0.035$) (图 3)。多因素分析发现，肿瘤浸润深度 ($P = 0.029$)、淋巴结转移 ≥ 3 个 ($P = 0.002$)、TMPRSS4 蛋白高表达 ($P = 0.045$) 是影响胃癌患者预后的独立因素 (表 2)。

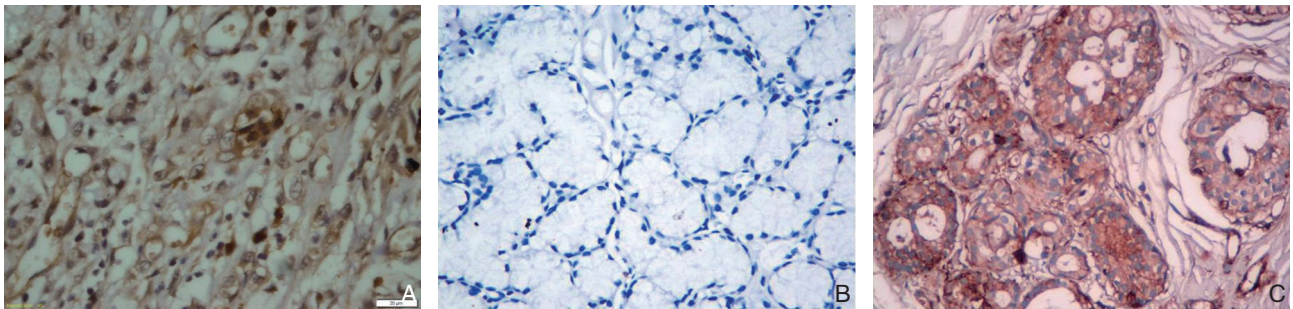


图 2 TMPRSS4 免疫组化染色结果 (×400) A: 胃癌组织 (高表达); B: 癌旁胃组织 (阴性表达); C: 胰腺癌 (高表达, 阳性对照)

Figure 2 Immunohistochemical staining for TMPRSS4 (SP×400) A: Gastric cancer tissue (high expression); B: Adjacent tissue (negative expression); C: Pancreatic cancer tissue (high expression as positive control)

表 1 胃癌组织中 TMPRSS4 蛋白的表达与患者临床病理特征之间的关系

Table 1 Relations of TMPRSS4 protein expression with the clinicopathologic characteristics of gastric cancer patients

临床病理指标	n	TMPRSS4		P	临床病理指标	n	TMPRSS4		P
		低表达	高表达				低表达	高表达	
年龄 (岁)					分化程度				
< 65	68	29	39	0.581	1/2 级	28	13	15	0.242
≥ 65	40	19	21		3/4 级	80	35	45	
性别					TNM 分期				
男	66	28	38	0.579	I/II	36	27	9	0.026
女	42	20	22		III/IV	72	21	51	
肿瘤直径 (cm)					淋巴结转移 (个)				
< 5	50	35	15	0.037	< 3	38	30	8	0.009
≥ 5	58	13	45		≥ 3	70	18	52	
浸润深度									
T ₁ /T ₂	35	28	7	0.042					
T ₃ /T ₄	73	20	53						

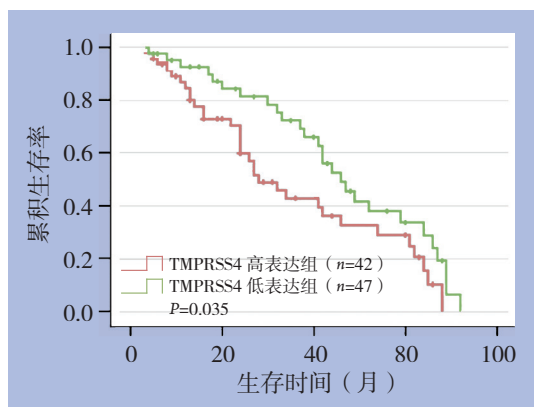


图 3 胃癌患者总体生存曲线

Figure 3 Survival curves for the entire group of gastric cancer patients

表 2 Cox 比例风险模型多因素分析

Table 2 Multivariate analysis by a Cox proportional hazard regression model (n=89)

临床病理指标	HR	95% CI	P
浸润深度 (T ₁ -T ₂ vs. T ₃ -T ₄)	1.658	1.411~2.850	0.029
分化程度 (1、2 级 vs. 3、4 级)	1.020	0.497~1.433	0.523
TNM 分期 (I-II vs. III-IV)	2.121	1.202~3.456	0.182
淋巴结转移 (<3 个 vs. ≥ 3 个)	4.783	2.932~9.372	0.002
TMPRSS4 表达 (高 vs. 低)	1.672	1.343~3.212	0.045

3 讨论

TMPRSS4 是 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶家族成员, 基因位于 11q23.3, 全长 48 565 bp; 其蛋白结构含有一个蛋白水解结构域、一个跨膜结构域、一个短的胞内结构域, 具有胰酶活性, 能够水解蛋白或多肽^[7]。TMPRSS4 在一些上皮来源的恶性肿瘤如胰腺癌、结直肠癌中表达增高, 在正常消化道和泌尿生殖道中微量表达, 在心、脑、肺等组织中不表达^[7]。

TMPRSS4 的高表达与多种肿瘤的进展及预后有关。TMPRSS4 在乳腺癌组织中的表达高于癌旁组织, 且与肿瘤的大小、TNM 分期、淋巴结转移成正相关, TMPRSS4 高表达患者总生存和无病生存时间明显缩短^[8]。在涎腺腺样囊性癌^[9]、结直肠癌^[10]、宫颈鳞癌^[11]、肺鳞癌^[12]、胰腺癌^[13]中的研究也得到相似的结论。本研究发现, 与癌旁组织相比, TMPRSS4 在胃癌中的表达明显增高, 其高表达与胃癌的大小、浸润深度、TNM 分期以及淋

巴结转移密切相关, TMPRSS4 高表达组的胃癌患者总体生存较 TMPRSS4 低表达组显著缩短, 与相关研究^[14]结论相似, 提示 TMPRSS4 在胃癌的进展中发挥了重要作用, 并可作为评估胃癌患者预后的指标。

TMPRSS4 在肿瘤诊断中具有潜在价值。研究^[15-16]发现甲状腺细针穿刺活检组织中 TMPRSS4 的阳性表达对于鉴别甲状腺肿瘤的良恶性具有重要价值。然而, 在胃镜下活检的胃组织中检测 TMPRSS4 表达是否对早期胃癌具有诊断意义, 尚不清楚。

近来研究^[17]表明, TMPRSS4 可能通过上皮间质转化促进肿瘤侵袭和转移。Kim 等^[18]研究发现, TMPRSS4 能够诱导整合素 $\alpha 5$ 的表达, 并通过下调 E 钙粘蛋白促进侵袭和上皮间质转化。Li 等^[19]研究发现, 放射线照射治疗后, 残留肝癌细胞高表达 TMPRSS4 可能是肝癌复发的重要原因, 其机制可能是 TMPRSS4 通过抑制 E 钙粘蛋白的表达, 促肝癌细胞上皮间质转化。此外, TMPRSS4 可能通过 JNK 信号通路促进尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)的表达, 从而增强肿瘤细胞的侵袭能力^[20]。

综上所述, TMPRSS4 在肿瘤进展中发挥了重要作用, 并与肿瘤侵袭转移和预后密切相关, 在临床诊断和预后判断方面具有潜在价值。虽然 TMPRSS4 在肿瘤上皮间质转化过程中发挥着关键作用, 但其促进肿瘤侵袭转移的机制仍不十分清楚, 需要进一步深入研究。

参考文献

- Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- Lin Y, Ueda J, Kikuchi S, et al. Comparative epidemiology of gastric cancer between Japan and China[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(39):4421-4428.
- Li JH, Zhang SW, Liu J, et al. Review of clinical investigation on recurrence of gastric cancer following curative resection[J]. Chin Med J(Engl), 2012, 125(8):1479-1495.
- Ohler A, Becker-Pauly C. TMPRSS4 is a type II transmembrane serine protease involved in cancer and viral infections[J]. Biol Chem, 2012, 393(9):907-914.
- Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM[J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(6):1471-1474.
- Liang B, Wu M, Bu Y, et al. Prognostic value of TMPRSS4 expression in patients with breast cancer[J]. Med Oncol, 2013, 30(2):497.
- Wallrapp C, Hähnel S, Müller-Pillasch F, et al. A novel transmembrane serine protease (TMPRSS3) overexpressed in pancreatic cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60 (10):2602-2606.
- Cheng D, Kong H, Li Y. TMPRSS4 as a poor prognostic factor for triple-negative breast cancer[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(7):14659-14668.
- 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.
- Huang A, Zhou H, Zhao H, et al. High expression level of TMPRSS4 predicts adverse outcomes of colorectal cancer patients[J]. Med Oncol, 2013, 30(4):712.
- Cheng D, Liang B, Li Y. High TMPRSS4 expression is a predictor of poor prognosis in cervical squamous cell carcinoma[J]. Cancer Epidemiol, 2013. [Epub ahead of print]
- Larzabal L, Nguewa PA, Pio R, et al. Overexpression of TMPRSS4 in non-small cell lung cancer is associated with poor prognosis in patient with squamous histology[J]. Br J Cancer, 2011, 105(10):1608-1614.
- 李东哲, 赵梅芬, 宋少伟, 等. II 型跨膜丝氨酸蛋白酶 4 在胰腺导管腺癌中的表达及其与 E-cadherin 的相关性研究[J]. 中国医科大学学报, 2011, 40(6):562-564.
- Luo ZY, Wang YY, Zhao ZS, et al. The expression of TMPRSS4 and Erk1 correlates with metastasis and poor prognosis in Chinese patients with gastric cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(7):e70311.
- Jarab B, Wiench M, Fajarewicz K, et al. Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications[J]. Cancer Res, 2005, 65(4):1587-1597.
- Kebebew E, Peng M, Reiff E, et al. ECM1 and TMPRSS4 are diagnostic markers of malignant thyroid neoplasms and improve the accuracy of fine needle aspiration biopsy[J]. Ann Surg, 2005, 242(3):353-361.
- Jung H, Lee KP, Park SJ, et al. TMPRSS4 promotes invasion, migration and metastasis of human tumor cells by facilitating an epithelial-mesenchymal transition[J]. Oncogene, 2008, 27(18):2635-2647.
- Kim S, Kang HY, Nam EH, et al. TMPRSS4 induces invasion and epithelial-mesenchymal transition through upregulation of integrin alpha5 and its signaling pathways[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(4):597-606.
- Li T, Zeng ZC, Wang L, et al. Radiation enhances long-term metastasis potential of residual hepatocellular carcinoma in nude mice through TMPRSS4-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Gene Ther, 2011, 18(9):617-626.
- Min HJ, Lee Y, Zhao XF, et al. TMPRSS4 upregulates uPA gene expression through JNK signaling activation to induce cancer cell invasion[J]. Cell Signal, 2013. [Epub ahead of print]

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 李瑞欣, 陈子华, 袁伟杰, 等. 跨膜丝氨酸蛋白酶 4 在胃癌中的表达及临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(2):202-206. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.02.013
Cite this article as: LI RX, CHEN ZH, YUAN WJ, et al. The expression and clinical values of transmembrane proteases serine 4 in gastric cancer[J]. Chin J Gen Surg, 2014,23(2):202-206. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.02.013