

组织芯片分析 PRSS2 蛋白在胃癌组织中的表达与意义

赵强^{1,3}, 张志伟^{2,3*}, 肖娟⁴, 刘重元¹, 伍石华^{2,5}, 李臻⁶, 雷明生⁷, 杨代水⁷, 权里平⁷, 舒友成⁷
 (1. 南华大学附属第一医院病理科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学医学院肿瘤研究所, 肿瘤细胞与分子病理学湖南省高校重点实验室; 3. 湖南省胃癌研究中心; 4. 南华大学附属第二医院耳鼻喉科; 5. 邵阳医学高等专科学校附属医院病理科; 6. 衡阳市中心医院急诊科; 7. 南华大学医学院临床医学卓越医师班)

摘要: **目的** 采用组织芯片分析 PRSS2 蛋白在胃癌组织中表达与意义, 为获取胃癌诊断相关的蛋白分子提供实验资料。 **方法** 首先收集 8 例胃癌手术切除标本, 包括正常胃粘膜、癌旁组织与胃癌组织, 选用 Western-blotting 方法检测 PRSS2 蛋白在正常胃粘膜、癌旁组织与胃癌组织中的表达; 其次运用免疫组织化学染色方法观察组织芯片 (包括正常胃粘膜、癌旁和胃癌组织) 中 PRSS2 蛋白在胃癌组织中的表达, 分析其临床意义。 **结果** 胃癌组织中 PRSS2 蛋白表达较正常胃粘膜和癌旁组织明显升高, 癌旁组织中的表达较正常胃粘膜组织升高; 正常胃粘膜、癌旁和胃癌组织中 PRSS2 蛋白的阳性表达率分别为 14.29% (5/34)、26.92% (7/26) 和 77.78% (63/81), 在胃癌组织中高分化、中分化和低分化腺癌的阳性表达率分别为 60.00% (3/5)、70.59% (12/17) 和 81.36% (48/59); PRSS2 蛋白的阳性表达与胃癌组织的分化程度也呈现负相关。 **结论** PRSS2 蛋白在胃癌组织中表达较正常胃粘膜和癌旁组织高, 癌旁组织中的表达较正常胃粘膜组织高, 该蛋白表达与胃癌组织的发生和分化程度有关。

关键词: 胃癌; PRSS2 蛋白; 蛋白表达; 分化程度

中图分类号: R735.2 文献标识码: A

Significance and Expression of PRSS2 Proteins Analyzed by Tissue Array in Gastric Cancer Tissue

ZHAO Qiang, ZHANG Zhiwei, XIAO Juan, et al

(Department of Pathology, the First Affiliated Hospital, University of Southern China, Hunan, Hengyang 421001, China)

Abstract: **Objective** The significance and expression of PRSS2 protein was analyzed by tissue array in gastric cancer tissue and provide valuable data for finding diagnosis related protein of gastric cancer. **Methods** The 8 cases including normal gastric mucosa, cancer side tissue and gastric cancer were respectively collected. The expression of PRSS2 proteins was checked by Western-blotting. Then, the expression of PRSS2 protein was detected in gastric tissue arrays including normal gastric mucosa, cancer side tissue and gastric cancer by immunohistochemistry staining. The clinical pathology significance of expression of PRSS2 protein was analyzed in gastric cancer tissue. **Results** The expressions of PRSS2 protein was higher in gastric cancer tissue than that in normal gastric mucosa and cancer side tissue. It was higher in cancer side tissue than that in normal gastric mucosa. The expression positive rates of PRSS2 protein were 14.29% (5/34), 26.92% (7/26) and 77.78% (63/81) in normal gastric mucosa, cancer side tissue and gastric cancer tissue, respectively. The expressing of PRSS2 was 60.00% (3/5), 70.59% (12/17) and 81.36% (48/59) in gastric well differentiated, middle differentiated and poorly differentiated adenocarcinoma, respec-

收稿日期: 2014-10-09; 修回日期: 2015-02-05

基金项目: 湖南省自然科学衡阳联合基金 (12JJ9033); 湖南省自然科学基金 (12JJ3102、13JJ3079); 湖南省科技厅项目 (2013SK3118、2014SK3081); 湖南省高校创新平台基金 (12K094、13K082、13K083); 湖南省教育厅课题 (11C1112、12C0340); 衡阳市科技局项目 (2013KJ12、2013KJ28); 邵阳市科技局重点项目 (2013SK13); 湖南省卫生厅项目 (B2013-048、B2014-163)。

* 通讯作者, E-mail: nhdzww@qq.com.

tively. ($P < 0.01$). There are negative relation between tissue differentiation level of gastric cancer and the expression positive rate of PRSS2 ($P < 0.01$). **Conclusion** The expression positive rate of PRSS2 protein was higher in gastric cancer tissue than that in normal gastric mucosa and cancer side tissue and higher in cancer side tissue than in normal gastric mucosa tissue. The expression of PRSS2 protein was related with effluence and differentiaation level of gastric cancer tissue.

Key words: Gastric cancer; PRSS2 protein; protein expression; differentiaation level

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一^[1,2]。近年来,我国胃癌发病率呈逐渐下降趋势,但呈现年轻化趋势,仍严重威胁着人们的健康与生命^[3,5]。早期诊断是目前防治胃癌的关键,因此寻找高效、敏感的胃癌诊断标记物,对提高胃癌早期诊断,改善整体疗效,延长患者生命具有十分重要的意义。本研究旨在分析 PRSS2 蛋白在胃癌中表达与意义,为胃癌早期诊断及评估患者预后提供有价值的资料。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 8 例南华大学附一医院胃癌手术切除标本,其中男性 7 例,女性 3 例,年龄 38 ~ 72 岁,平均年龄约 48 岁。标本收集时以距癌灶 10 cm 以上者为正常胃粘膜组织(经病理确诊为正常胃粘膜组织),距癌灶 3 ~ 5 cm 者为癌旁组织(经病理确诊为非典型增生或伴肠上皮化生的胃粘膜组织)。上述所有患者术前均未进行化疗或放疗,所有标本均经病理确诊。

组织芯片由湘潭市第一人民医院病理科吴勇军主任医师制作赠送。芯片中包括正常胃粘膜、癌旁与胃癌组织,芯片中组织样本取自 2003 年 ~ 2009 年湘潭市第一人民医院手术切除胃癌标本 81 例,其中高分化腺癌 5 例、中分化腺癌 17 例、低分化腺癌 59 例。所有胃癌患者中男性 56 例,女性 25 例,年龄 27 ~ 81 岁,平均年龄为 55.35 岁;芯片中另有 34 例正常胃粘膜对照(经病理确诊),芯片包括 5×10 个点阵,芯片中包含的所有组织均经病理确诊^[5],患者也未进行化疗或放疗。鼠抗人 PRSS2 蛋白抗体购自上海优宁维生物科技有限公司,SP 免疫组化检测试剂盒均购自福建迈新生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Western-blotting 将收集组织加入组织裂解液后,在匀浆器中研磨,制备总蛋白液,测定浓度后,以各泳道 50 μg 的总蛋白进行 10% SDS 不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜、封闭,一抗(1:1 000)及抗 β -actin 单体(1:2 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗膜后,HRP

标记的羊抗兔二抗(1:1 000)孵育、洗膜、发光、曝光、显影、定影以及分析结果。

1.2.2 免疫组织化学染色 操作按照超敏 SP 试剂盒所附说明书进行,用已知阳性片作阳性对照(福建迈新生物有限公司提供),同时用 PBS 替代第一抗体作阴性对照,实验步骤如下:将制备好的石蜡切片 58 $^{\circ}\text{C}$ 隔水式恒温培养箱中过夜;二甲苯脱蜡 2 次后水化,PBS 洗片 3 次,每次 3 min;将切片浸入盛有枸橼酸盐缓冲液容器中微波炉加热进行抗原修复;加 3% 过氧化物酶阻断液,37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,PBS 洗片 3 次,每次 3 min;加足量非免疫性动物血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,阻断非特异性结合位点;分别滴加一抗,置湿盒中 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜;滴加生物素标记的二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min;滴加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min;DAB 显色、苏木素复染、返蓝、脱水、透明、封片、显微镜观察、照相(结果阳性部位呈棕黄色)。

1.2.3 免疫组织化学染色结果判定 组织芯片中黄色、棕色、棕褐色部位为蛋白阳性表达。选取五个不重复视野,记数组织中细胞总数与阳性表达细胞数,计算阳性表达率。蛋白表达结果的判定,按染色强度与阳性细胞数占细胞总数的百分比综合计分^[2,4]。染色强度:无色者为 1 分,黄色者为 2 分,棕褐色者为 3 分;阳性细胞数: \leq 总数的 10% 者为 1 分;11% ~ 50% 者为 2 分; $>$ 50% 者为 3 分。将染色强度分值与阳性细胞数分值相乘,1 分者为阴性“-”;2 ~ 4 分者为阳性“+”, \geq 6 分者为强阳性“+++”,其中阳性细胞数 $>$ 10% 者为阳性表达。

1.2.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件对所有数据进行统计处理和分析。选用 χ^2 检验分析 PRSS2 蛋白的表达与不同胃组织临床资料的关系,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Western-blotting 检测 PRSS2 蛋白的表达 PRSS2 蛋白在胃癌组织中的表达较正常胃粘膜和癌旁组织低。同时,癌旁组织中 PRSS2 蛋白表达较正

常胃粘膜组织低(图 1)。

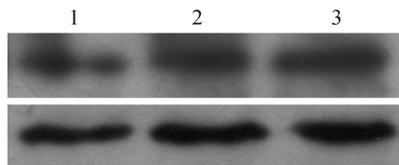


图 1 PRSS2 蛋白的表达 1:正常胃粘膜;2:癌旁组织;3:胃癌组织

2.2 免疫组织化学染色观察 PRSS2 蛋白的表达

采用免疫组织化学染色检测 PRSS2 蛋白在组织芯片中的表达。结果显示 PRSS2 蛋白表达主要位于细胞浆(图 2)。

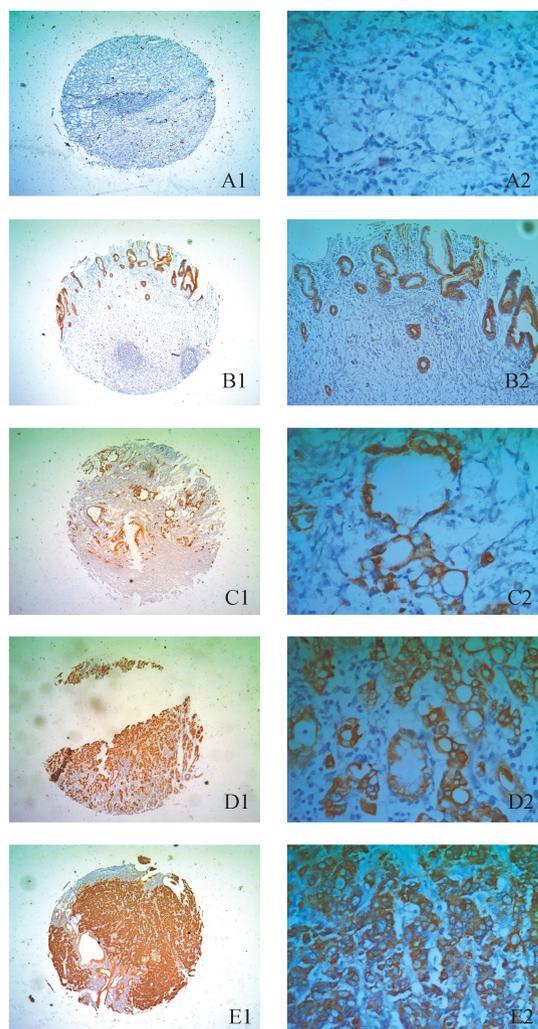


图 2 免疫组织化学检测组织中 PRSS2 蛋白表达代表切片 A:正常胃粘膜(-);B:癌旁组织(+);C:高分化腺癌(++);D:中分化腺癌(+++);E:低分化腺癌(+++). A1、B1、C1、D1 和 E1 放大倍数为 40 倍;A2、B2、C2、D2 和 E2 放大倍数为 400 倍

2.3 PRSS2 蛋白表达情况的分析 根据免疫组织化学染色结果,分别计算 PRSS2 蛋白在不同类型组织中的阳性表达率。PRSS2 蛋白在正常胃粘膜、癌旁组织及胃癌组织中的阳性表达率分别为 14.29% (5/34)、26.92% (7/26) 和 77.78% (63/81)。胃癌组织中 PRSS2 蛋白的阳性表达率较正常胃粘膜和癌旁组织高。同时,癌旁组织中 PRSS2 蛋白的阳性表达率较正常胃粘膜组织高(表 1, $P < 0.01$)。胃高分化、中分化和低分腺癌中 PRSS2 蛋白的阳性表达率分别为 60.00% (3/5)、70.59% (12/17) 和 81.36% (48/59),结果提示,PRSS2 蛋白的表达与胃癌的发生及分化程度有关,即该蛋白在胃癌组织中高表达,且癌组织分化程度降低,其表达增加。

表 1 不同组织中 PRSS2 蛋白的表达情况

组别	n	PRSS2 蛋白表达			阳性率(%)
		-	+~+++		
正常胃粘膜	34	25	5		14.29
癌旁组织	26	19	7		26.92 ^a
胃癌组织					
高分化腺癌	5	2	3		60.00 ^{ab}
中分化腺癌	17	5	12		70.59 ^{abc}
低分化腺癌	59	11	48		81.36 ^{abcd}

与正常胃粘膜组比较, a: $P < 0.01$; 与癌旁组织比较, b: $P < 0.01$; 与高分化腺癌比较, c: $P < 0.01$; 与中分化腺癌比较, d: $P < 0.01$

3 讨 论

近年来,人们对胃癌的早期诊断做了大量的系统研究,使胃癌的早期筛查、诊断与治疗水平均取得了一定程度的提高,但临床疗效仍有待进一步改观。现已有一些胃癌诊断分子标记物应用临床的诊断与治疗,如 CA19-9^[6]、CEA^[7]、Span-1^[8] 等,但它们针对胃癌早期诊断的应用效果尚有待分析。近年来,随着蛋白质组学技术的不断发展,许多胃癌相关蛋白被不断的发现,为获取胃癌早期诊断的标志物提供了可能。

胰蛋白酶原 2 (PRSS2) 是一种丝氨酸蛋白酶,许多研究均证实其与多种恶性肿瘤密切相关,因此 PRSS2 也称为肿瘤相关胰蛋白酶原 2 (PRSS2)。PRSS2 具有以下特征^[9-11]:多种恶性肿瘤细胞株和人体恶性肿瘤中均表达该蛋白,其表达与肿瘤的侵袭与转移机制有关,可直接或间接地水解肿瘤周围基质蛋白,促进肿瘤细胞的侵袭与转移,其抑制剂可

抑制肿瘤侵袭,多产生于胰腺外的器官或组织。PRSS2 是基质金属蛋白酶(MMP)的激活物,能激活间质胶原酶(MMP-1、8 和 13),导致肿瘤细胞周围的胶原蛋白降解,促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[12]。基于 PRSS2 蛋白的功能,结合我们在胃癌组织中的检测结果,胃癌组织中该蛋白的表达与其分化程度成负相关,即恶性程度高的低分化腺癌呈现高表达,低分化腺癌临床常表现易发生侵袭与转移,其在转移过程中需要 PRSS2 蛋白水解癌细胞周围的基质蛋白、血管壁组织、淋巴管组织,有利于癌细胞的浸润、转移。因此,临床检测该蛋白在癌组织中的表达水平,可分辨癌细胞的恶性程度与转移能力,对预测评估患者的预后具有十分重要的意义。

PRSS2 蛋白能够激活蛋白酶激活受体,促进肿瘤的生长发育^[9,10]。有研究报道^[13],结直肠肿瘤组织 PRSS2 的表达较其周围的正常粘膜组织明显上调。我们在胃癌组织中检测该蛋白得到了类似的结果,即 PRSS2 蛋白在癌组织中高表达,在非典型增生的胃粘膜也高于正常粘膜组织,结果提示该蛋白在胃粘膜癌变过程中呈现逐渐上调的现象。另外,许多研究显示,多种肿瘤患者体内呈现血清 PRSS2 蛋白的高水平,检测血清中该蛋白的变化,可预测体内肿瘤的进展情况^[14]。因此,观察 PRSS2 蛋白在胃癌组织与患者体内血清蛋白的水平,了解该蛋白的改变情况,有望监测患者体内胃癌的进展情况。由于血清检测的简单、便捷,深入揭示该蛋白在胃癌发生与发展中的作用,有望成为胃癌早期诊断与检测胃癌发展的蛋白分子。因胃癌发生发展的多基因与多因素参与的复杂性,以及本次研究样的本量有限,临床应用前仍需扩大检测样本进行分析与评估。

参考文献:

[1] 陈万青,张思维,郑荣寿,等. 中国肿瘤登记地区 2007 年肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2011,20(3): 162-169.

[2] 张志伟,汤国辉,赵强,等. AKT-p27Kip1-Cyclin E 在胃癌组织中的表达及意义[J]. 世界华人消化杂志,2011,19(21):2233-2240.

[3] 郭玉凤,张志伟,贺修胜,等. 组织芯片检测 p16 蛋白在不同胃组织中的表达意义. 肿瘤学杂志,2012,18

(10):746-749.

[4] 赵强,张志伟,刘重元,等. PKC α -Annexin A2-S100A10 在胃癌组织中的表达及意义[J]. 世界华人消化杂志,2014,22(13):1793-1800.

[5] 杨军,刘妮,康安静,等. 一种新型胃癌组织学分型、分级-评分系统[J]. 临床与实验病理学杂志,2013,29(2):159-162.

[6] Chen S, Feng XY, Li YF, et al. The prognosis of gastric cancer patients with marginally elevated carcinoembryonic antigen (CEA) values after D2 radical gastrectomy [J]. J Surg Oncol, 2013, 107(6):641-645.

[7] He CZ, Zhang KH, Li Q, et al. Combined use of AFP, CEA, CA125 and CA19-9 improves the sensitivity for the diagnosis of gastric cancer[J]. BMC Gastroenterol, 2013, 14(13):87.

[8] Kubo N, Ohira M, Sakurai K, et al. SPan-1 is a useful prognostic marker for patients with stage IV gastric cancer who underwent palliative gastrectomy: a retrospective multivariate study[J]. World J Surg, 2013, 37(7):1681-1687.

[9] Shah RB, Chinnaiyan AM. The discovery of common recurrent transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2)-erythroblastosis virus E26 transforming sequence (ETS) gene fusions in prostate cancer: significance and clinical implications[J]. Adv Anat Pathol, 2009, 16(3):145-153.

[10] Vest D, Schalken JA, Muir G, et al. Transmembrane protease serine 2 in prostate cancer[J]. BJU Int, 2010, 105(11):1490-1492.

[11] Gou S, Yu J, Wang C, et al. Three female familial cases of solid pseudopapillary tumors with a protease serine 1 gene mutation[J]. Pancreas, 2013, 42(1):168-173.

[12] Moilanen M, Sorsa T, Stenman M, et al. Tumor-associated trypsinogen-2 (trypsinogen-2) activates procollagenases (MMP-1,-8,-13) and stromelysin-1 (MMP-3) and degrades type I collagen[J]. Biochemistry, 2003, 42(18):5414-5420.

[13] Moilanen M, Sorsa T, Stenman M, et al. Tumor-associated trypsinogen-2 (trypsinogen-2) activates procollagenases (MMP-1,-8,-13) and stromelysin-1 (MMP-3) and degrades type I collagen[J]. Biochemistry, 2003, 42(18):5414-5420.

[14] Williams SJ, Gotley DC, Antalis TM. Human trypsinogen in colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 2001, 93(1):67-73.

[15] Gao J, Zhu F, Lv S, et al. Identification of pancreatic juice proteins as biomarkers of pancreatic cancer[J]. Oncol Rep, 2010, 23(6):1683-1692.

(此文编辑:秦旭平)