

组织芯片技术检测 MRP1/CD9 在胃癌中的表达

张徐宁^{1*}, 季宁东¹, 季润元¹, 刘海燕², 戴翠萍¹, 史恩溢³, 李小宁³

(¹淮阴卫生高等职业技术学校外科护理教研室, 淮安市消化道肿瘤重点实验室, 江苏 淮安 223300; ²淮安市第一人民医院病理科, 江苏 淮安 223300; ³苏州卫生职业技术学院病理教研室, 江苏 苏州 215009)

[摘要] 目的:探讨运动相关蛋白-1(MRP1/CD9)在胃癌组织中的表达与胃癌生物学行为之间的相关性。方法:采用组织芯片技术及免疫组化方法对 223 例胃癌组织的 MRP1/CD9 蛋白表达进行研究。结果:在胃癌组织中 MRP1/CD9 表达的阳性率为 58.3%,其表达与患者的性别、年龄、浸润深度、胃癌分期无关,而与肿瘤的分化程度、淋巴结转移密切相关。其中高-中分化组表达高于低分化组,差异有显著性($P < 0.05$);无淋巴结转移组表达高于淋巴结转移组,亦具有显著性($P < 0.01$)。二元 Logistic 回归前进法显示:淋巴结转移最先进入方程,是影响 MRP1/CD9 表达最显著的因素,其次是分化。结论:胃癌组织中 MRP1/CD9 表达改变与肿瘤的分化、淋巴结转移密切相关。

[关键词] 胃癌; MRP1/CD9; 组织芯片; 免疫组化

[中图分类号] R735.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)12-1700-04

Expression of MRP1/CD9 in gastric cancer detected by tissue microarray

ZHANG Xu-ning^{1*}, JI Ning-dong¹, JI Run-yuan¹, LIU Hai-yan², DAI Cui-ping¹, SHI En-yi³, LI Xiao-ning³

(¹Department of Surgical Nursing, Huaiyin Advanced Vocational and Technical Hygiene School, Huai'an Key Lab of the Tumor of Digestive System, Huai'an 223300; ²Department of Pathology, Huai'an First People's Hospital, Huai'an 223300; ³Department of Pathology, Suzhou Health College, Suzhou 215009, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the correlation between the expression of MRP1/CD9 and the biological behaviors of gastric cancer. **Methods:**Tissue microarray and immunohistochemistry technique were used to detect the expression of MRP1/CD9 in 223 cases with gastric cancer. **Results:**The positive rate of MRP1/CD9 in gastric cancer patients was 58.3%,and the expression was not associated with gender,age,infiltration depth and stages,but had close relationship with the differentiated degree and lymphnode metastasis. The expression of MRP1/CD9 in moderate or high differentiated group was higher than that in the low differentiated group significantly ($P < 0.05$);which was the same when compared between non-lymphnode metastasis group and lymphnode metastasis group ($P < 0.01$). Forward stepwise binary logistic regression showed:lymphnode metastasis,which was first into the equation,is the most significant factor of MRP1/CD9 expression and followed by differentiation. **Conclusion:**The change of MRP1/CD9 expression in gastric cancer was closely correlated with the differentiated degree and lymphnode metastasis.

[Key words] gastric cancer; MRP1/CD9; tissue microarray; immunohistochemistry

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(12): 1700-1703]

MRP1/CD9 基因是跨膜 4 超家族 (transmembrane 4 superfamily, TM4SF) 成员之一,参与细胞的黏附、增殖和迁移的调控,因此与肿瘤的侵袭转移密切相关^[1]。组织芯片又称组织微阵列 (tissue microarray, TMA), 是生物芯片的一个重要组成部分,

具有体积小,信息含量大,一次性实验即可获大量结果的特点。组织芯片技术与传统技术相结合,对特定基因和蛋白质进行定性、半定量的研究,是快速、经济、大规模筛查组织中基因结构改变、表达异常的工具^[2]。

本实验应用组织芯片技术和免疫组织化学方法,研究 MRP1/CD9 蛋白在人胃癌组织中的表达规律,探讨其在胃癌侵袭转移中的作用,以期胃癌的

[基金项目] 淮安市“533 英才工程”资助科研项目(201178)

*通讯作者, E-mail: hyzxn@yahoo.com.cn

预后判断及治疗方案的确定、为组织芯片在病理研究中的应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

全部标本(223例)取自淮安市第一人民医院2008~2010年手术切除胃组织。其中,男169例,女54例,年龄22~89岁。按WHO病理诊断标准进行组织学分型均为腺癌,其中高分化25例、中分化67例、低分化131例。早期14例、进展期209例。有淋巴结转移143例、无淋巴结转移80例。术前均未行放化疗。

MRP1/CD9单克隆抗体(Thermo公司,美国);MaxVision试剂盒、DAB酶底物显色试剂盒(福州迈新公司)。

1.2 方法

1.2.1 胃癌组织芯片构建

选取存档蜡块,常规4 μm 连续切片并做HE染色,依据HE切片进而确定具有代表性的病变部位。应用组织芯片构建仪(自有专利技术产品,专利号200920350099.2)穿取直径1.5mm组织放入空白蜡块中,详细记录每一孔中所放组织的对应编号,每一个标本选取2点,制成10 \times 8两个对应的阵列块。

1.2.2 免疫组织化学法检查

采用MaxVision染色法检测MRP1/CD9在胃癌组织中的表达部位及强度。主要染色步骤:胃癌组织芯片常规脱蜡水化,经1mmol/L EDTA(pH 8.0)水浴修复20min后,滴加一抗(MRP1/CD9工作浓度为1:50)放入4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,次日切片恢复室温后,滴加MaxVision二抗放温箱孵育30min,滴加新鲜配制的DAB溶液显色,苏木素复染,封片。用PBS缓冲液替代一抗作为阴性对照。

1.2.3 结果判定

MRP1/CD9染色的阳性信号为细胞膜出现棕褐色颗粒沉淀。按阳性细胞占镜下肿瘤细胞的百分比将阳性强度分为4个等级,分别是无阳性细胞为(-),阳性细胞数<25%为(+),25%~50%为(++),>50%为(+++),(-)~(+)记为阴性,(++)~(+++)记为阳性。胃癌组织选取的2个点中有1个染色阳性标本,即判断此病例为阳性,2个点中无1个染色阳性,即判断此病例为阴性。

1.3 统计学方法

全部数据经SPSS17.0统计学软件处理。MRP1/CD9蛋白的表达与临床病理参数之间的单因素分

析采用 χ^2 检验;多因素分析采用二元Logistic回归前进法。以 $\alpha = 0.05$ 作为检验标准。

2 结果

2.1 胃癌组织芯片

223例胃癌标本共制成446个组织点阵,排列整齐,HE、免疫组化染色均匀,无掉片、脱片、扭曲和重叠现象。223例胃癌组织中130例MRP1/CD9阳性表达(图1),阳性率为58.3%。

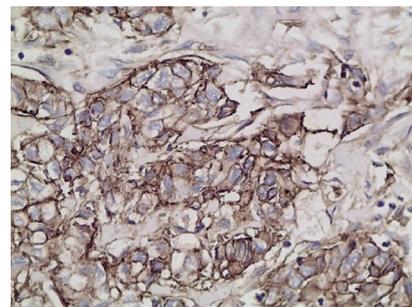


图1 MRP1/CD9在胃癌组织中阳性表达(MaxVision, $\times 400$)
Figure 1 The positive expression of MRP1/CD9 in gastric cancer(MaxVision, $\times 400$)

2.2 MRP1/CD9表达与临床病理特征的相关分析

MRP1/CD9在男性患者中阳性表达率为59.1%(100/169),女性患者中阳性表达率为55.6%(30/54);在<60岁年龄组中表达阳性率为53.3%(49/92),在 ≥ 60 岁年龄组中表达阳性率为61.8%(81/131);浸润深度达浆膜内、浆膜外组阳性表达率分别为65.8%(25/38)、56.8%(105/185);在早期和进展期阳性表达率分别为71.4%(10/14)、57.4%(120/209);对性别、年龄、浸润深度、分期进行两组间的 χ^2 检验,均没有显著性差异。在高-中分化型腺癌中表达阳性率为68.5%(63/92)、在低分化型腺癌中表达阳性率为51.1%(67/131),两者比较,差异有显著性意义($P < 0.05$);无淋巴结转移组MRP1/CD9蛋白的阳性表达率70.0%(56/80)高于淋巴结转移组阳性表达率51.7%(74/143),两者相比差异显著($P < 0.01$,表1)。

将年龄<60岁、男性、高-中分化、浆膜内、淋巴结无转移、胃癌早期赋值“0”,年龄>60岁、女性、低分化、浆膜外、淋巴结有转移、胃癌进展期赋值“1”,采用二元Logistic回归前进法分析。结果表明分化、淋巴结转移和MRP1/CD9表达显著相关。淋巴结转移最先进入方程、其次为分化。年龄、性别、浸润深度、肿瘤分期不在方程里。淋巴结转移是影响MRP1/CD9表达最显著因素(表2)。

表 1 MRP1/CD9 在胃癌组织中的表达与临床病理特征的相关分析

Table 1 The relationships between the expression of MRP1/CD9 and their clinicopathological characteristic in gastric cancer (n = 223)

临床病理特征	阳性例数(%)	阴性例数	χ^2 值	P 值
性别				
男	100(59.1)	69	0.220	> 0.05
女	30(55.6)	24		
年龄(岁)				
< 60	49(53.3)	43	1.633	> 0.05
≥60	81(61.8)	50		
组织学分型				
中/高	63(68.5)	29	6.679	< 0.05
低	67(51.1)	64		
浸润深度				
浆膜内	25(65.8)	13	1.058	> 0.05
浆膜外	105(56.8)	80		
肿瘤分期				
早期	10(71.4)	4	1.060	> 0.05
进展期	120(57.4)	89		
淋巴结转移				
无	56(70.0)	24	7.029	< 0.01
有	74(51.7)	69		

3 讨论

MRP1 即运动相关蛋白(motility related protein 1, MRP1), 是 Ikeyama 等^[3]通过单克隆抗体 M31-15 首先发现的一种能抑制细胞运动的跨膜糖蛋白, 其基因序列与白细胞分化抗原 CD9 同源, 属于跨膜 4 超家族。CD37、CD53、ME491/CD63、TAPA1/CD81 和 KAI1/CD82 等均为该家族成员, 在哺乳动物组织中均有不同程度的表达。已有研究表明, 该家族成员对细胞黏附、增生、运动等有重要影响, 其中 MRP1/CD9 是被研究较多的成员之一。目前, 在肺癌、乳腺癌、结直肠癌、食管癌、口腔癌等的研究表明 CD9 表达的缺失与淋巴结转移的发生密切相关, CD9 表达阴性或低下的患者无病生存或 5 年生存情况显著低于 CD9 表达阳性患者。因此, 推测 MRP1/CD9 能够抑制肿瘤生长和迁移, 可能是判断肿瘤预后的一个指标^[4-5], 虽然如此, 尚需进行深入的研究。

目前, 国内外关于 MRP1/CD9 在胃癌中表达的研究报道极少。Chen 等^[6]报道 CD9 在有淋巴结转移的晚期胃癌中表达明显低下或缺失, 认为 CD9 蛋白水平与胃癌淋巴结转移、远处转移呈负相关, CD9

表 2 二元 Logistic 回归方程中的变量

Table 2 The variable in equation of binary Logistic regression

		B	S.E.	Wald	df	P	Exp (B)	95% CI
步骤 1 ^a	淋巴结转移	-0.777	0.296	6.903	1	0.009	0.460	0.257~0.821
	常量	0.847	0.244	12.061	1	0.001	2.333	
步骤 2 ^b	分化	-0.592	0.293	4.071	1	0.044	0.553	0.311~0.983
	淋巴结转移	-0.642	0.305	4.431	1	0.035	0.526	0.290~0.957
	常量	1.116	0.284	15.447	1	0.000	3.052	

a: 在步骤 1 中输入的变量为淋巴结转移; b: 在步骤 2 中输入的变量为分化。

表达的减少是判断胃癌具有较高转移能力的指示物。张维铭等^[7]采用荧光 mRNA 差异显示技术、Northern 印迹分析和 RT-PCR 技术开展了 MRP1/CD9 在胃癌及其癌前病变中的差异表达, 结果与 Chen 等^[6]报道一致。然而, 在 Hori 等^[8]的研究中显示胃癌组织中 CD9 表达强于正常组织, 尤其是在晚期胃癌组织中 CD9 表达更为显著, CD9 表达与淋巴结转移、远处转移呈正相关, 提示 CD9 的高表达与胃癌的侵袭力增强相关。这与 Soyuer 等^[9]观察结果一致。此外, 关于 CD9 的研究, 出现这两种相反结果的还见于卵巢癌研究领域^[10-11]。

采用组织芯片技术大样本检测 MRP1/CD9 在胃癌中的表达国内外未见报道。本研究单因素分析表明, 胃癌中 MRP1/CD9 表达与患者的年龄、性

别、浸润深度、分期均没有关系 ($P > 0.05$), 而与胃癌的分化程度、淋巴结转移有关系。高中分化组 MRP1/CD9 表达高于低分化组, 分化程度越差, MRP1/CD9 表达越少。有淋巴结转移组表达低于无淋巴结转移组。研究结果支持将 MRP1/CD9 作为预测肿瘤进展及预后的指标。多因素分析结果亦表明只有分化、淋巴结转移和 MRP1/CD9 表达显著相关。淋巴结转移最先进入方程、其次为分化。本课题前期研究表明 MRP1/CD9 表达与结直肠癌 Dukes 分期有关^[12], 但本实验表明与胃癌分期没有关系; 采用多因素分析时, MRP1/CD9 在结直肠癌中表达与分化显著相关, 但 Dukes 分期和淋巴结转移被掩盖^[12]; 而在胃癌中表达与淋巴结转移和分化均有关。MRP1/CD9 在胃癌和结直肠癌中表达结果不同之处的原因

有待进一步探究。施伟等^[13]对 1 340 例胃癌根治术后患者预后进行了多因素分析,显示肿瘤分期和区域淋巴结转移数目是胃癌根治术患者的独立预后因素。因此,MRP1/CD9 在胃癌中的表达有可能与患者的预后密切相关。下一步可对 223 例患者进行回访调查,观察他们的生存年限等相关信息。

尽管 MRP1/CD9 抑制肿瘤侵袭转移的机制还不清楚,但已有的研究表明 MRP1/CD9 对肿瘤细胞转移的抑制作用是通过多种途径实现的,并与膜嵌整合蛋白结合形成复合体,共同调节细胞的黏附、运动及信号转导。Lee 等^[14]发现 CD9/CD82 和糖蛋白相互作用,可以抑制原癌基因 Wnt 的信号转导功能,从而抑制 Wnt 的促进细胞增殖、分化、转移等作用。还有研究表明 MRP1/CD9 可以与 TM4SF 家族其他成员 CD63、CD82 相互交连,还可以与磷脂酰肌醇-4-激酶、HLR-DR 和 VLA- β 1 等交连,促进细胞表面的蛋白定位,决定细胞黏附和细胞运动方式。

组织芯片以其高通量、大样本、高效率、实验条件一致的优点,在肿瘤相关基因的生物学功能及筛选肿瘤相关标志物等方面应用渐趋广泛。本研究使用自主研发的技术制备了胃癌组织芯片,保证了 223 例标本一次完成检测,所有条件一致,图像清晰,实验结果稳定可靠。

综上所述,MRP1/CD9 在胃癌中的表达有可能为患者的预后提供参考。但是这需要开展更深入的 MRP1/CD9 和胃癌的相关性研究。

[参考文献]

- [1] Zheng R, Yano S, Zhang H, et al. CD9 overexpression suppressed the liver metastasis and malignant ascites via inhibition of proliferation and motility of small-cell lung cancer cells in NK cell-depleted SCID mice[J]. *Oncol Res*, 2005, 15(7-8): 365-372
- [2] Nazar MT Jawhar. Tissue microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool [J]. *Ann Saudi Med*, 2009, 29(2): 123-127
- [3] Ikeyama S, Koyama M, Yamaoko M, et al. Suppression of cell motility and metastasis with human motility-related protein (MRP1/CD9) DNA [J]. *J Exp Med*, 1993, 177: 1231-1237
- [4] Buim ME, Loureno SV, Carvalho KC, et al. Downregulation of CD9 protein expression is associated with aggressive behavior of oral squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncology*, 2010, 46: 166-171
- [5] 季润元, 束晓明, 张徐宁, 等. 食管癌组织 KAI1/CD82、MRP1/CD9 的表达及其病理临床联系 [J]. *江苏医药*, 2010, 36(13): 1498-1501
- [6] Chen Z, Gu S, Trojanowicz B, et al. Down-regulation of TM4SF is associated with the metastatic potential of gastric carcinoma TM4SF members in gastric carcinoma [J]. *World J Surg Oncol*, 2011, 9: 43-51
- [7] 张维铭, 郑洁, 徐焱, 等. MRP1 /CD9 基因在胃癌及其癌前病变中的差异表达 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2004, 21(5): 426-429
- [8] Hori H, Yano S, Koufujii K, et al. CD9 expression in gastric cancer and its significance [J]. *J Surg Res*, 2004, 117(2): 208-215
- [9] Soyuer S, Soyuer I, Unal D, et al. Prognostic significance of CD9 expression in locally advanced gastric cancer treated with surgery and adjuvant chemoradiotherapy [J]. *Pathol Res Pract*, 2010, 206(9): 607-610
- [10] Hwang JR, Jo K, Lee Y, et al. Upregulation of CD9 in ovarian cancer is related to the induction of TNF- α gene expression and constitutive NF- κ B activation [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(1): 77-83
- [11] 方媛媛, 夏志军, 张淑兰, 等. CD82 和 CD63 及 CD9 基因与卵巢癌进展的相关性研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2007, 14(12): 930-933
- [12] 季润元, 史恩溢, 王永实, 等. 应用组织芯片技术检测结肠直肠癌中 MRP1/CD9 的表达 [J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2012, 32(8): 1066-1070
- [13] 施伟, 王建, 张梅玲, 等. 1340 例胃癌根治术后患者预后的多因素分析 [J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2011, 31(9): 1310-1315
- [14] Lee JH, Bae JA, Lee JH, et al. Glycoprotein 90K, down-regulated in advanced colorectal cancer tissues, interacts with CD9/CD82 and suppresses the Wnt/beta-catenin signal via ISGylation of beta-catenin [J]. *Gut*, 2010, 59(7): 907-917

[收稿日期] 2012-06-13