

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.35.020

结肠癌中肿瘤相关钙信号转导蛋白-2 的表达及其临床意义

赵 鹏,陈俊卯,曹文斌,杨光华,虞向阳,刘春辉,郑 阳
(华北理工大学附属医院普外科,河北唐山 063000)

[摘要] **目的** 检测肿瘤相关钙信号转导蛋白-2(TROP-2)在结肠癌组织及结肠癌细胞中的表达水平,探讨 TROP-2 与结肠癌进展的相关性及其对临床预后的意义。**方法** 应用免疫组织化学法检测 TROP-2 蛋白在结肠癌组织、癌旁组织及正常结肠组织中的表达情况,回顾患者的临床资料,分析 TROP-2 蛋白表达水平与不同临床病理特征的相关性及其对临床预后的意义。应用蛋白质印迹法检测 TROP-2 蛋白在新鲜结肠癌组织标本中的表达情况,并应用免疫荧光法观察 TROP-2 蛋白的定位。**结果** TROP-2 蛋白主要定位于肿瘤细胞的细胞膜,在细胞质、细胞核则少量表达或不表达。结肠癌组织中 TROP-2 蛋白表达水平高于癌旁组织和正常组织,差异有统计学意义($P<0.01$);结肠癌组织中 TROP-2 蛋白表达与患者的性别、年龄、肿瘤分化程度无相关性($P>0.05$),而与淋巴结转移情况及 Dukes 分期有明显相关性($P<0.05$);伴淋巴结转移的患者结肠癌组织 TROP-2 蛋白阳性率高于无淋巴结转移者,差异有统计学意义($P<0.05$);随着肿瘤 Dukes 分期的进展,结肠癌组织中 TROP-2 表达水平逐渐升高;TROP-2 蛋白的高表达是结肠癌患者不良预后的独立因子。**结论** 结肠癌中存在 TROP-2 的高表达,其在结肠癌侵袭和转移过程中可能发挥着重要作用。

[关键词] 结肠肿瘤;肿瘤相关钙信号转导蛋白-2;侵袭;迁移
[中图分类号] R735.3+5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)35-4963-04

The expression and clinical significance of TROP-2 protein in colon cancer
Zhao Peng, Chen Junmao, Cao Wenbin, Yang Guanghua, Yu Xiangyang, Liu Chunhui, Zheng Yang
(Department of General Surgery, North China University of Science and Technology
Affiliated Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

[Abstract] **Objective** To detect the expression of TROP-2 protein in colon cancer tissues and cell line, and to explore the relationship between TROP-2 protein and the prognosis of colon cancer and its clinical significance. **Methods** Immunohistochemical staining method was used to detect the expression of TROP-2 protein in colon cancer tissues, tumor-adjacent tissues and normal colon tissues. By reviewing the clinical data of patients, the correlation between the expression level of TROP-2 and clinical pathological features and significance of TROP-2 for clinical prognosis we analyzed. The expression of TROP-2 protein in fresh tissue specimens was detected by using Western blotting method. Furthermore, the immunofluorescence staining was applied to observe the localization of TROP-2 protein. **Results** The TROP-2 protein mainly located on tumor cell membrane, while little or no TROP-2 protein expressed in the cytoplasm and nucleus. The expression level of TROP-2 in colon cancer tissues was significantly higher than that in tumor-adjacent tissues and normal tissues, there was statistically significant difference ($P<0.01$). No correlation was found between the expression of TROP-2 and sex, age and degree of tumor differentiation ($P>0.05$), while the expression of TROP-2 was significantly correlated with lymph node metastasis and Dukes stage ($P<0.05$). The positive rate of TROP-2 protein expression in colon cancer tissues with lymph node metastasis was obviously higher than those without lymphatic metastasis ($P<0.05$). With the progress of the Dukes stage, the expression level of TROP-2 protein also increased gradually. TROP-2 protein up-regulation maybe identified as an independent predictive factor for poor prognosis. **Conclusion** Increased expression of TROP-2 is observed in colon cancer tissues. TROP-2 may play an important role in colon cancer metastasis and invasion, and could be used as an independent predictive factor for poor prognosis.

[Key words] colonic neoplasms; tumor-associated calcium signal transducer-2; invasion; migration

结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,近年来发病率逐年上升,且总体 5 年生存率仍然较低。肿瘤的侵袭和转移是导致患者死亡的主要原因,目前对于结肠癌侵袭和转移机制的研究成为热点,但确切的机制尚不明确。肿瘤相关钙信号转导蛋白-2(tumor-associated calcium signal transducer-2, TROP-2)是一种跨膜糖蛋白,最早发现于人滋养层细胞^[1],也称为人滋养层细胞表面抗原-2,它主要参与细胞内钙离子水平的调控。近年来发现,TROP-2 在多种人类上皮源性肿瘤中存在高表达,而其在正常组织中不表达或低表达,TROP-2 被认为是一种肿瘤相关抗原,与肿瘤细胞的侵袭和转移密切相关。然而,目前

国内外对于结肠癌中 TROP-2 表达情况的研究较少。本实验采用蛋白质印迹法(Western blotting)、免疫组织化学法和免疫荧光法检测结肠癌手术切除标本中 TROP-2 蛋白的表达情况,并结合患者的临床病理资料进行分析,旨在探讨结肠癌中 TROP-2 的表达与其进展的相关性,并进一步探讨其临床意义,为结肠癌的早期诊断治疗和预后评价提供理论依据和参考指标,为选择结肠癌靶向治疗的新靶点提供理论基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 用于 Western blotting 检测的新鲜结肠癌手术切除组织标本共 47 份,均取自华北理工大学附属医院术后

病理确诊为原发性结肠腺癌的患者,所有患者均具有完整的临床病理资料,术前均未接受放、化疗等辅助治疗。其中,无淋巴结转移 20 例,有淋巴结转移 27 例;根据国际 Dukes 分期标准:A 期 6 例、B 期 14 例、C 期 20 例、D 期 7 例。

用于免疫组织化学及免疫荧光染色的结肠癌组织切片来源于华北理工大学附属医院病理科存档的结肠癌组织蜡块,所选病例共 82 例,且选取的病例术前均未接受放、化疗等辅助治疗,术后病理诊断均为原发性结肠腺癌。其中,女 30 例,男 52 例;年龄 35~90 岁,平均(61.6±9.8)岁;低分化腺癌 25 例、高分化腺癌 24 例、中分化腺癌 33 例;无淋巴结转移 40 例,伴有淋巴结转移 42 例;根据国际 Dukes 分期标准:A 期 10 例、B 期 28 例、C 期 26 例、D 期 18 例。本组病例中 7 例失访,75 例有完整的随访信息,生存时间为病理确诊到死亡或最后 1 次随访的时间。

1.2 主要试剂 鼠抗人 TROP-2 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司;兔抗人 β -actin 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;山羊抗免疫荧光二抗(IgG-DyLight 488)、细胞核染料碘化丙啶(PI)购自美国 Cell Signaling Technology 公司;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶配置试剂盒、二喹啉甲酸(BCA)法蛋白浓度测定试剂盒、牛血清蛋白(BSA)及超敏电化学发光(ECL)试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。免疫组织化学检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学染色检测结肠癌组织切片中 TROP-2 蛋白的表达 免疫组织化学染色步骤采用 SP 法,以鼠抗人 TROP-2 抗体为一抗,以自身对照作阳性对照,以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。由本院病理科两名医师参照文献[2]各自独立完成免疫组织化学结果的判定和评分。肿瘤细胞质及细胞膜中出现棕黄色颗粒记为阳性细胞,在高倍镜下任选 5 个视野进行观察,根据阳性肿瘤细胞所占百分率记分,无明显阳性染色细胞记为 0 分,阳性细胞数占 1%~10%记为 1 分,阳性细胞数大于 10%~50%记为 2 分,阳性细胞数大于 50%记为 3 分;染色强度按肿瘤细胞着色的深浅计分:无着色

记为 0 分;黄色为弱阳性,记为 1 分;浅棕色为中等阳性,记为 2 分;棕褐色为强阳性,记为 3 分;每份标本 TROP-2 染色的总分为两项之积:0 分为(-),1~3 分为(+),4~6 分为(++),7~9 分为(+++),总分 4 分以上记为高表达。

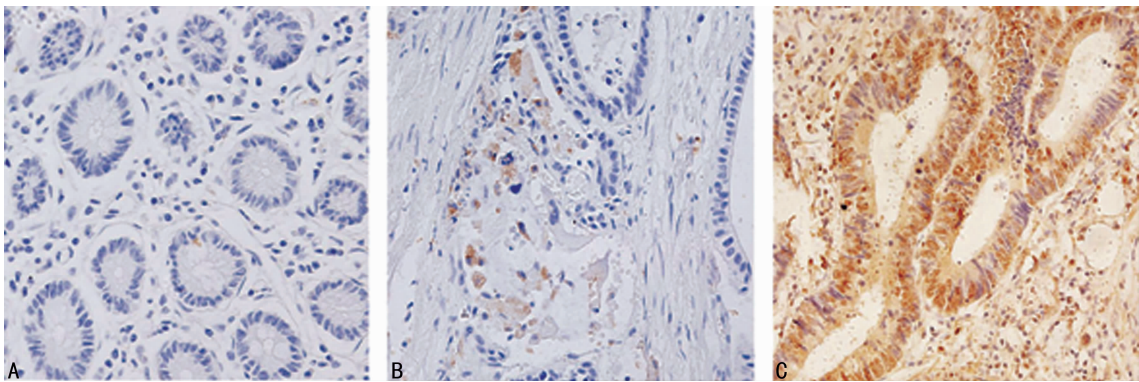
1.3.2 间接免疫荧光法检测结肠癌组织切片中 TROP-2 的表达及定位 切片常规脱蜡及脱水,滴加 3%过氧化氢(H_2O_2),抗原修复后加入一抗(鼠抗人 TROP-2 抗体)和荧光素 Alexa Fluor® 488 标记的荧光二抗,细胞核以 PI 染色, FV1000 激光共聚焦显微镜(CLSM)下观察并拍片。

1.3.3 Western blotting 检测结肠癌组织标本和细胞中 TROP-2 蛋白的表达 提取组织标本的总蛋白,蛋白质定量后行 SDS-PAGE 凝胶电泳,每孔上样量为 100 μ g 蛋白,电泳并转膜至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,抗 TROP-2 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。Tris 缓冲生理盐水吐温(TBST)漂洗 3 次,二抗室温孵育 2 h,增强化学发光法显色。以 β -actin 为内参。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,计数资料以例数或百分率表示,比较采用 χ^2 检验;采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,采用 Log-rank 检验进行生存分析,独立因素分析采用 Logistic 回归分析;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫组织化学检测结肠癌组织中 TROP-2 蛋白的表达 82 例结肠癌组织中 TROP-2 蛋白阳性表达者 75 例(91.5%),其中高表达 55 例(67.1%),低表达 20 例(24.4%);癌旁组织中 TROP-2 蛋白阳性表达者 10 例(12.2%),高表达 2 例(2.4%),低表达 8 例(9.8%)。如图 1 所示,TROP-2 的阳性染色颗粒呈棕色或深棕色颗粒,主要分布在肿瘤细胞的细胞膜和细胞质中,呈弥散分布,胞核阴性。切缘正常结肠组织中无 TROP-2 阳性染色颗粒。结肠癌组织中 TROP-2 蛋白的表达强度高于癌旁组织和正常组织。结肠癌组织 TROP-2 的阳性率高于癌旁组织和正常组织,差异有统计学意义($P<0.01$)。随着肿瘤 Dukes 分期的进展,肿瘤组织中 TROP-2 的表达强度亦逐渐增强,见图 2。



A:正常组织;B 癌旁组织;C:癌组织。

图 1 结肠癌组织 TROP-2 蛋白的表达(免疫组织化学法,×200)

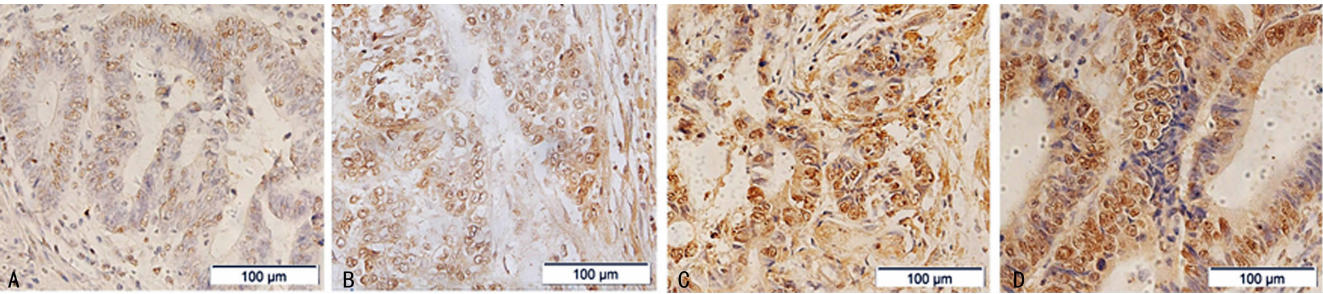
2.2 结肠癌组织中 TROP-2 的表达与各临床病理参数的关系 结肠癌组织中 TROP-2 蛋白的表达与患者的性别、年龄、肿瘤分化程度无相关性($P>0.05$),而与淋巴结转移情况及肿瘤 Dukes 分期有明显相关性。伴淋巴结转移的患者结肠癌组织 TROP-2 蛋白阳性率高于无淋巴结转移者,差异有统计学意

义($P<0.05$);随着肿瘤 Dukes 分期的进展, TROP-2 蛋白阳性率逐渐升高,C+D 期患者 TROP-2 蛋白阳性率高于 A+B 期者,差异有统计学意义($P<0.05$)。结肠癌组织中 TROP-2 蛋白的表达与各临床病理参数的关系,见表 1。

2.3 CLSM 观察结肠癌组织中 TROP-2 的免疫荧光染色 本

实验以双标法分别标记 TROP-2 蛋白和细胞核,荧光素 Alexa Fluor® 488(绿色荧光)偶联的山羊抗小鼠二抗,特异性结合一抗鼠抗人 TROP-2 单克隆抗体,PI 标记细胞核(红色荧光)。CLSM 下观察荧光,如图 3 所示,TROP-2 呈环形绿色荧光,主要是肿瘤细胞膜表达,细胞核呈红色,TROP-2 在细胞质、细胞

核则少量表达或不表达。正常结肠组织基本无 TROP-2 蛋白的绿色荧光表达,提示 TROP-2 在正常结肠组织中基本无表达。随着 Dukes 分期的进展,TROP-2 的绿色荧光呈逐渐增多的趋势,提示随着肿瘤 Dukes 分期的进展,TROP-2 的表达量逐渐升高。



A:Dukes A 期;B:Dukes B 期;C:Dukes C 期;D:Dukes D 期。
图 2 不同临床 Dukes 分期结肠癌组织 TROP-2 蛋白的表达(免疫组织化学法,×200)

表 1 结肠癌组织中 TROP-2 蛋白的表达与各临床病理参数的关系				
临床病理特征	n	TROP-2(+)	TROP-2(-)	P
性别				0.512
男	52	48	4	
女	30	27	3	
年龄(岁)				0.684
≤59	39	34	5	
>59	43	41	2	
肿瘤分化程度				0.857
高分化	24	21	3	
中分化	33	30	3	
低分化	25	24	1	
淋巴结转移情况				0.018
有	42	41	1	
无	40	34	6	
Dukes 分期				0.002
A+B 期	38	32	6	
C+D 期	44	43	1	

2.4 Western blotting 检测结肠癌组织中 TROP-2 蛋白的表达 如图 4 所示,正常结肠组织、癌旁组织及结肠癌组织中均有 TROP-2 蛋白的表达,结肠癌组织中 TROP-2 蛋白表达水平高于癌旁组织和切缘正常结肠组织,差异有统计学意义($P<0.01$);癌旁组织 TROP-2 表达水平高于切缘正常结肠组织,但差异无统计学意义($P>0.05$)。如图 5 所示,伴淋巴结转移的结肠癌组织 TROP-2 表达水平高于无淋巴结转移的结肠癌组织,差异有统计学意义($P<0.01$);如图 6 所示,随着肿瘤 Dukes 分期的进展,结肠癌组织中 TROP-2 表达水平逐渐升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 结肠癌中 TROP-2 的表达与预后的相关性 TROP-2 高表达结肠癌患者总体生存时间为(31.65±10.14)个月,低表达患者总体生存时间为(64.42±6.45)个月。如图 7 所示,TROP-2 高表达患者的 5 年生存率明显低于 TROP-2 低表达患者(38.2% vs. 63.6%),差异有统计学意义($\chi^2=34.520$, $P=0.005$)。单因素生存分析结果显示,TROP-2 高表达

($RR=6.43$,95% $CI:2.17\sim9.62$, $P<0.001$)、淋巴结转移($RR=10.94$,95% $CI:7.43\sim12.96$, $P<0.001$)、肿瘤 Dukes 分期($RR=7.58$,95% $CI:4.26\sim10.71$, $P<0.001$)与术后的不良预后相关;多因素回归分析表明,校正性别、年龄、肿瘤分化程度、淋巴结转移等影响因素后,TROP-2 蛋白高表达($RR=17.209$,95% $CI:4.239\sim69.857$, $P<0.001$)是结肠癌患者不良预后的独立因子。

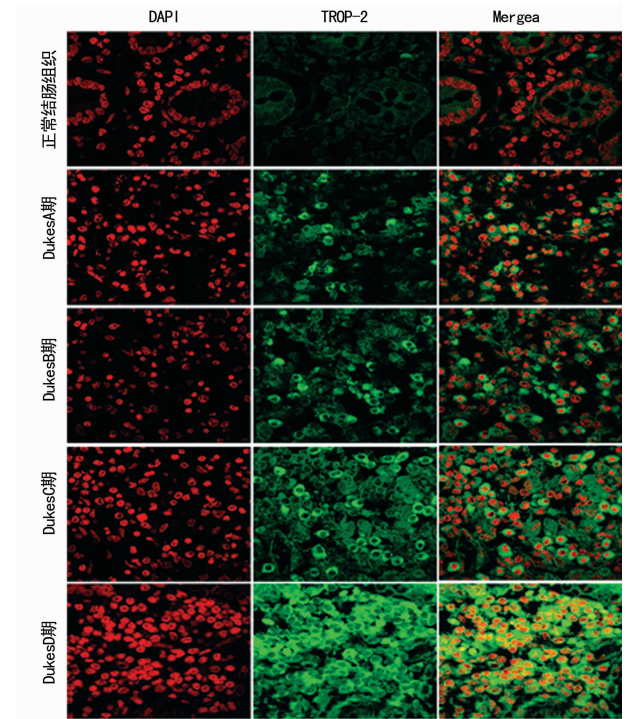
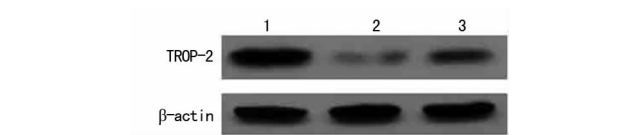
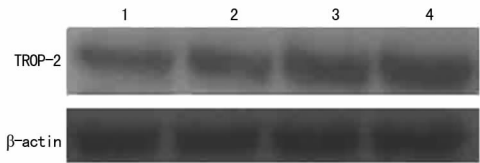


图 3 结肠癌组织与正常结肠组织 TROP-2 蛋白的表达与定位(CLSM×1 200)



1:结肠癌组织;2:正常结肠组织;3:癌旁组织。
图 4 结肠癌组织、癌旁组织及正常结肠组织 TROP-2 蛋白的表达



1、2:无淋巴转移的结肠癌组织;3、4:伴淋巴结转移的结肠癌组织。

图 5 TROP-2 蛋白表达与淋巴转移的相关性

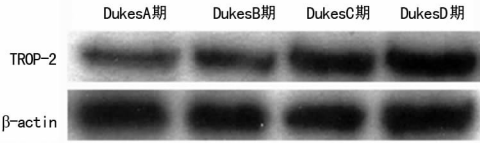


图 6 不同临床 Dukes 分期结肠癌组织 TROP-2 蛋白的表达

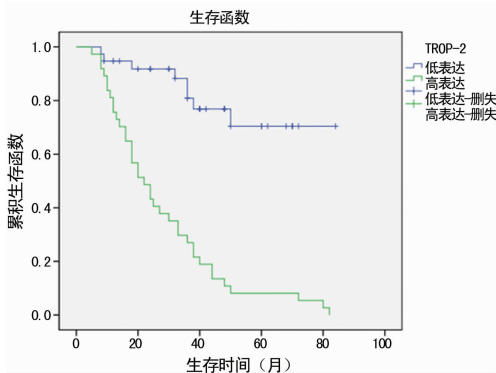


图 7 TROP-2 蛋白表达相关结肠癌患者 Kaplan-Meier 生存曲线

3 讨 论

结肠癌是人类常见的消化道恶性肿瘤之一,尽管治疗方法有了很大的进步,但总体病死率仍然很高。肿瘤的侵袭和转移是导致患者死亡的主要原因之一。统计表明约 50%的结肠癌患者虽然接受了有效的治疗,但最终仍死于肿瘤的侵袭与转移。国内外针对结肠癌侵袭和转移机制的研究较多,但其确切的机制仍不完全清楚。

TROP-2 是一种 I 型跨膜糖蛋白,属于 TACSTD 基因家族,由 323 个氨基酸所组成,包括信号肽、胞外区、跨膜区和胞质尾区 4 个部分。最初认为 TROP-2 主要参与细胞内钙离子水平的调控,能够改变细胞内的钙离子水平^[3-4]。近年来发现,多种人类上皮源性肿瘤(如卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌、胃癌等)中均存在 TROP-2 蛋白的高表达^[5-13],其在正常组织中不表达或低表达,TROP-2 也被认为是一种肿瘤相关抗原,目前国内对结肠癌中 TROP-2 表达情况及其作用的研究较少。

本研究发现,TROP-2 蛋白主要定位于结肠癌细胞的细胞膜上,结肠癌组织中 TROP-2 蛋白表达水平高于癌旁组织和正常结肠组织;结肠癌中 TROP-2 蛋白表达水平与肿瘤的淋巴结转移、临床 Dukes 分期有明显相关性,而与患者年龄、性别、肿瘤分化程度无相关性。随着 Dukes 分期的进展,结肠癌组织中 TROP-2 表达水平逐渐升高。本研究还发现,TROP-2 高表达患者总生存率低于 TROP-2 低表达患者。

综上所述,TROP-2 在结肠癌的进展过程中可能起着重要

作用,TROP-2 蛋白有望成为结肠癌分子靶向治疗的新靶点,但结肠癌中 TROP-2 蛋白高表达的具体机制仍有待进一步研究。

参考文献

[1] Stepan LP, Trueblood ES, Hale K, et al. Expression of Trop2 cell surface glycoprotein in normal and tumor tissues; potential implications as a cancer therapeutic target [J]. J Histochem Cytochem, 2011, 59(7): 701-710.

[2] 仇金荣,唐奇,林红,等.人滋养层细胞表面抗原 2 在人胰腺癌中的表达及其临床意义[J].中华医学杂志,2011,91(2):103-106.

[3] 江爱桂,黄建安. TROP2 在晚期非小细胞肺癌组织中的表达及其对预后的影响[J]. 江苏医药, 2013, 39(22): 2702-2705.

[4] Trerotola M, Li J, Alberti S, et al. Trop-2 inhibits prostate cancer cell adhesion to fibronectin through the β 1 integrin-RACK1 axis [J]. J Cell Physiol, 2012, 227(11): 3670-3677.

[5] Fong D, Spizzo G, Gostner JM, et al. TROP2; a novel prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity[J]. Mod Pathol, 2008, 21(2): 186-191.

[6] Cubas R, Li M, Chen C, et al. Trop2; a possible therapeutic target for late stage epithelial carcinomas[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1796(2): 309-314.

[7] Fong D, Moser P, Krammel C, et al. High expression of TROP2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer[J]. Br J Cancer, 2008, 99(8): 1290-1295.

[8] Mühlmann G, Spizzo G, Gostner J, et al. TROP2 expression as prognostic marker for gastric carcinoma[J]. J Clin Pathol, 2009, 62(2): 152-158.

[9] Stepan LP, Trueblood ES, Hale K, et al. Expression of Trop2 cell surface glycoprotein in normal and tumor tissues; potential implications as a cancer therapeutic target [J]. J Histochem Cytochem, 2011, 59(7): 701-710.

[10] Bignotti E, Todeschini P, Calza S, et al. Trop-2 overexpression as an Independent marker for poor overall survival in ovarian carcinoma patients [J]. Eur J Cancer, 2010, 46(5): 944-953.

[11] Trerotola M, Rathore S, Goel HL, et al. CD133, Trop-2 and alpha2beta1 integrin surface receptors as markers of putative human prostate cancer stem cells [J]. Am J Transl Res, 2010, 2(2): 135-144.

[12] 顾宇平,黄建安. TROP-2 在非小细胞肺癌中的表达及意义[J]. 江苏医药, 2012, 38(5): 540-542.

[13] Pak MG, Shin DH, Lee CH, et al. Significance of EpCAM and TROP2 expression in non-small cell lung cancer[J]. World J Surg Oncol, 2012(10): 53.