PRR11在胃癌中的表达及其与预后的关系

叶建新[1] 郑 炜[1] 赵新泰[2]*

([1]福建医科大学附属第一医院胃肠外科, 福州 350005; [2]卫生部医药卫生科技发展研究中心肿瘤个体化治疗分子诊断技术研究基地, 上海赛安生物医药科技有限公司, 上海 200436)

摘要 检测PRR11蛋白在胃癌中的表达, 分析其表达异常与胃癌临床指标及预后间的关系。用Western免疫印迹比较胃癌和正常组织中PRR11的表达。构建含167例胃癌的组织芯片, 用免疫组化法检测PRR11蛋白在胃癌组织中的表达, 统计学分析其与肿瘤大小、肿瘤侵袭、组织分化、淋巴结转移、TNM分期及胃癌患者总生存期之间的关系。PRR11在胃癌组织中的表达高于癌旁组织, 在胃癌中的表达率为50.9%(85/167), 而在癌旁黏膜中不表达或微弱表达。PRR11的表达与胃壁侵袭、淋巴结转移、疾病分期和组织分化呈正相关(P<0.05)。单因素生存分析表明, PRR11蛋白阳性表达患者较阴性患者生存期短(45个月*vs* 81个月, P<0.001)。多因素生存分析也表明, PRR11蛋白阳性表达患者生存期短于阴性患者(95% CI: 0.347~0.865, P=0.01)。高表达PRR11与胃癌的发生、进展及预后密切相关, 是判断胃癌患者预后的重要指标之一。

关键词 胃癌; PRR11; 生存分析

Expression of PRR11 in Gastric Cancer and Its Relationship with Prognosis

Ye Jianxin[1], Zheng Wei[1], Zhao Xintai[2]*

([1]*Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350005*; [2]*Shanghai Shines Pharmaceuticals Company Limited*; *Research Base of Molecular Diagnosis Technology for Tumor Personalized Medicine, Development Center for Medical Science and Technology, Ministry of Health, Shanghai 200436*)

Abstract To detect PRR11 expression and determine its clinical significance in gastric cancer, tissue microarray blocks containing tumor specimens obtained from 167 patients with gastric cancer were constructed. Expression of PRR11 in human gastric cancer specimens was analyzed using immunohistochemistry (IHC) and Western blot. PRR11 was overexpressed in human gastric cancers compared with that in adjacent non-cancerous tissues by Western blot. IHC results showed that expression of PRR11 was observed in 85 cases (50.9%) of 167 primary gastric cancers. PRR11 expression was significantly associated with gastric wall invasion, lymph node metastasis, tumor progression and poor differentiation (P<0.05). PRR11 expression significantly correlated with poor outcome of patients with gastric cancer in univariate (45 months *vs* 81 months, P<0.001) and multivariate analyses (95% CI: 0.347~0.865, P=0.01). Our results showed that PRR11 expression significantly increased with the progression of human gastric cancer, suggesting the importance of PRR11 as a potential biomarker in cancer diagnosis and treatment.

Key words gastric cancer; PRR11; survival analysis

收稿日期: 2013-10-19 接受日期: 2013-11-18

卫生部医药卫生科技发展研究中心项目(批准号: W2012FZ139)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-60733300, E-mail: zhaoxintai@shineschina.com

Received: October 19, 2013 Accepted: November 18, 2013

This work was supported by the Development Center for Medical Science and Technology, Ministry of Health, China (Grant No.W2012FZ139)

*Corresponding author. Tel: +86-21-60733300, E-mail: zhaoxintai@shineschina.com

网络出版时间: 2014-01-26 14:11 URL: http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.02.0336.html

在世界范围内, 胃癌的发病率呈下降趋势, 然而由于早诊率低、治疗手段相对单一、基础和临床研究较为缓慢, 胃癌患者的预后未见显著改善, 5年生存率不足20%[1]。深入研究胃癌的发病机制, 有助于提高胃癌的诊疗效果和预后评估。*PRR11*(proline rich 11)是新近发现的一个位于染色体17q22的新基因, 其在肺癌中高表达, 且与疾病进展密切相关[2], 但国内外未见其在胃癌中的研究报道。本文从蛋白水平研究PRR11在胃癌中的表达, 探讨其表达异常与临床病理参数和预后的相关性。

1 材料与方法

1.1 组织标本

收集我院2002~2005年的部分胃癌标本, 与患者签订知情同意书, 构建含有胃癌原发灶和对应癌旁正常黏膜的胃癌组织芯片。该芯片含有167例胃癌术后样本, 其中男性116例, 女性51例, 最小年龄30岁, 最大79岁, 中位年龄59岁。所有患者具有完整的随访资料, 最长随访110个月, 最短1个月, 中位时间为37个月。另外, 收集部分新鲜胃癌样本置于液氮保存。

1.2 Western印迹杂交

从液氮中取出组织样本, 研钵碾碎, 加入蛋白裂解液, 冰上裂解10 min后, 移入1.5 mL离心管, 4 ℃ 14 000 r/min离心30 min, 吸取上清, 以BCA法蛋白定量。10.5% SDS-PAGE胶分离蛋白样品, 以250 mA电转移2 h至硝酸纤维素膜。5%脱脂奶粉封闭1 h; TBST (0.01 mol/L Tris-HCl, pH8.0; 0.05% Tween-20)稀释兔抗PRR11抗体(购自SIGMA公司, HPA023923)(1:1 000), 4 ℃反应过夜; TBST洗膜3次, 每次10 min, TBST稀释HRP标记的羊抗兔二抗(1:5 000), 室温反应1 h, 洗膜3次, ECL显色。

1.3 免疫组化

免疫组化方法采用S-P法(S-P免疫组化试剂盒购自福州迈新公司), 1:100稀释兔抗PRR11抗体为一抗, PBS代替一抗作阴性对照。采用二级计分法, 根据阳性细胞所占5个以上高倍镜视野比例计数分为四 类: 0%~5%, 0分; 5%~25%, 1分; 25%~50%, 2分; 50%~75%, 3分; >75%, 4分。染色强度分类: 无着色, 0; 淡黄色, 1分; 黄或深黄色, 2分; 褐或棕褐色, 3分。两者计分相乘大于1为阳性。

1.4 统计学分析

采用SPSS 16.0软件进行统计学分析, 计数资料采用卡方检验; 单因素生存分析采用Kaplan-Meier分析, 多因素生存分析采用Cox多元回归法。

2 结果

2.1 PRR11在癌旁胃上皮和肿瘤细胞中的表达

Western blot显示, 胃癌组织中PRR11蛋白的表达高于正常组织(图1)。免疫组化结果显示, PRR11阳性染色为淡黄色、棕黄色或棕褐色, 定位于细胞浆和/或细胞膜。非肿瘤组织不着色或呈微弱着色(图2A), 肿瘤中呈弥漫、片状分布(图2B), PRR11在胃癌中的表达率为50.9%(85/167)。

2.2 PRR11表达与临床病理参数间的关系

PRR11的表达与性别、年龄和肿瘤大小之间无统计学关系。而与肿瘤的胃壁侵袭、淋巴结转移、疾病分期和组织分化程度呈正相关(P<0.05)(表1)。

2.3 生存分析

单因素分析发现, PRR11阳性患者的无病生存期为45个月, 阴性患者为81个月, P<0.001(图3)。此外, 年龄(<60 y *vs* ≥60 y: 73个月*vs* 57个月, χ^2=4.489, P=0.034)、肿瘤大小(<6 cm *vs* ≥6 cm: 68个月*vs* 38个月, χ^2=12.716, P<0.001)、胃壁侵袭(T1/T2 *vs* T3/T4:

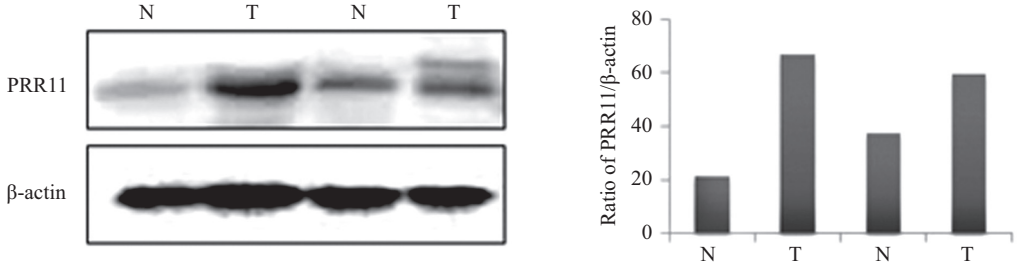
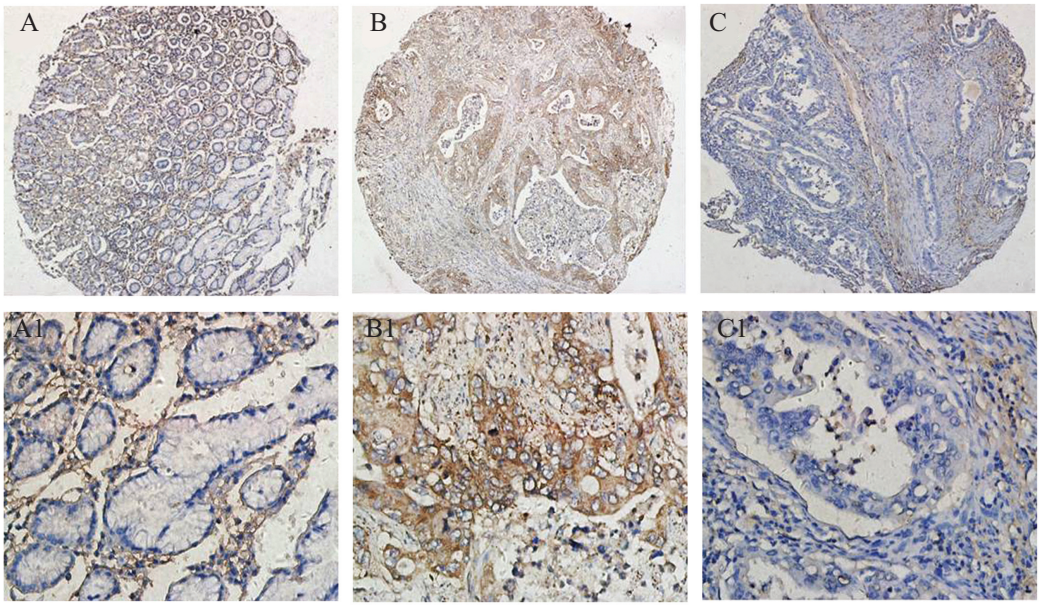


图1 Western blot显示胃癌样本(T)和非肿瘤样本(N)中PRR11的表达

Fig.1 Expression of PRR11 in gastric cancer (T) and non-cancerouse (N) tissues by Western blot



A和A1: PRR11在癌旁组织中的阴性染色; B和B1: PRR11在原发癌中的阳性染色; C和C1: PRR11在原发癌中的阴性表达。A、B和C: 40×; A1、B1和C1: 200×。

A and A1: negative expression of PR11 in non-cancerous tissues; B and B1: positive expression of PRR11 in cancerous tissues; C and C1: negative expression of PRR11 in cancerous tissues. A, B and C: 40×; A1, B1 and C1: 200×.

图2 免疫组织化学检测PRR11在胃癌中的表达

Fig.2 Expression of PRR11 in gastric cancer tissues by immunohistochemistry

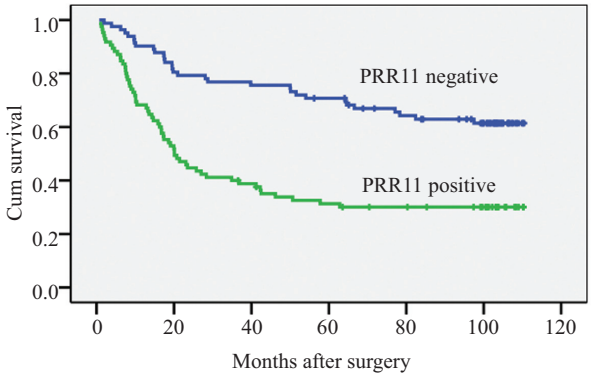


图3 PRR11表达和总生存时间之间的关系

Fig.3 Kaplan-Meier plot of overall survival of gastric cancer patients according to PRR11 expression

84个月*vs* 49个月, χ^2=22.167, *P*<0.001)、组织分化(高中分化*vs*低未分化: 75个月*vs* 38个月, χ^2=26.366, *P*<0.001)、淋巴结转移(有*vs*无: 48个月*vs* 83个月, χ^2=20.223, *P*<0.001)和TNM分期(I/II *vs* III/IV: 83个月*vs* 41个月, χ^2=33.857, *P*<0.001))也与胃癌患者的预后相关。将上述因素纳入Cox多元回归分析, 结果显示组织分化、TNM分期和PRR11表达是判断胃癌患者预后的独立因素(表2)。

表1 PRR11与胃癌临床病理参数间的关系

Table 1 The relation of PRR11 expression with clinical pathological parameters

临床参数 Clinical parameters	病人数目 No. of patients	PRR11表达(%) PRR11 expression (%)	*P*值 *P* value
Median age			0.143
≤60	60	26	
>60	107	34	
Sex			0.307
male	116	56	
female	51	29	
Gastric wall invasion			
T1/T2	66	25	0.007
T3/T4	101	60	
Size			
≤6 cm	137	65	0.056
>6 cm	30	20	
Lymph node etastasis			
N0	72	30	0.038
N1-3	95	55	
Stages			
I/II	87	36(41.4)	0.010
III/IV	80	49(61.3)	
Differentiation			
high/medium	115	48(41.7)	<0.001
low	52	37(71.2)	
Total	167	85(50.9)	

表2 影响胃癌预后的多因素分析

Table 2 Multivariate analyses of affecting gastric cancer prognosis

参数 Variates	偏回归系数 Beta	偏回归系数的标准误 SE	Wald统计量 Wald	相对危险度 Exp (B)	95%可信区间 95% CI	*P*值 *P* value
PRR11 (positive *vs* negative)	–0.602	0.233	6.685	0.548	0.347~0.865	0.010
Tumor size (≤6 cm *vs* >6 cm)	0.241	0.125	3.717	1.273	0.996~1.627	0.054
Gastric wall invasion (T1/T2 *vs* T3/T4)	–0.281	0.317	0.784	0.755	0.406~1.406	0.376
Differentiation (high/medium *vs* low/no)	–0.657	0.228	8.285	0.518	0.331~0.811	0.004
Lymph node metastasis (yes *vs* no)	–0.167	0.443	0.142	0.846	0.355~2.017	0.707
TNM phases (I/II *vs* III/IV)	–0.723	0.289	6.243	0.485	0.275~0.856	0.012

3 讨论

我国胃癌发病人数约占到全世界的1/3, 虽然早期诊断率的提高、治疗手段的改进和生物学技术的应用, 使胃癌患者的生活质量和治疗效果有了显著改善, 但胃癌患者尤其是进展期胃癌患者的5年生存率未见显著提高。究其原因在于胃癌的基础和临床转化研究滞后, 未能为病人带来益处。加大对胃癌发病机理研究的投入, 发现与胃癌预后相关的分子标志物并加以干预, 对于提高胃癌治疗疗效和改善胃癌患者预后具有重要的意义。*PRR11*是2000年上传的全长基因序列(FLJ11029), 当时没有命名。2002年, 由美国国立健康研究院哺乳动物基因收集项目组将其命名为*PRR11*(Accession BC008669)。Weinmann等[3]发现, PRR11可以和E2FI、E2F4等转录因子相结合, 而E2Fl、E2F4在控制肿瘤发生过程中具有关键性的作用, *PRR11*被预测可能是一个新的肿瘤基因。Spira等[4]在研究吸烟肺癌病人基因表达中观察到*PRR11*有改变。Ji等[2]在肿瘤和正常组织芯片表达差异数据荟萃分析中发现, *PRR11*是一个差异表达基因, 进而实验证明PRR11依赖于细胞周期呈阶段性表达, 沉默*PRR11*引起S期阻滞、生长延迟。在肺癌组织中比正常组织表达升高, 并与肺癌病人预后相关。这些结果说明, PRR11在细胞周期和肿瘤发生进程中起着重要作用。到目前为止, 未见PRR11在其他肿瘤中的相关研究。本文首次检测了PRR11蛋白在胃癌中表达情况, 并分析了其与预后关系。

我们发现, 胃癌组织中PRR11蛋白表达显著升高, 为50.9%, 而癌旁黏膜上皮中PRR11基本不表达。去分化是肿瘤细胞最为显著的特点之一, 分化越差, 恶性程度越高, 我们的结果显示, 低分化胃癌的表达率为71.2%, 显著高于分化好的胃癌, 后者仅为41.7%。此外, PRR11的过表达还与胃壁侵犯、淋巴结转移和疾病进展相关, 其中TNM分期综合反映了疾病进展程度, 有利于指导治疗和判断预后。本研究中发现随疾病进展, PRR11表达逐步升高, III和IV期中PRR11表达率高达61.3%, 而I和II期为41.4%。上述数据表明, PRR11蛋白在胃癌组织中高表达, 其异常活化参与了胃癌的发生和进展。

许多因素影响胃癌患者的预后, 譬如患者的机体状态、手术因素、病理和临床因素等, 本研究中也发现年龄、肿瘤大小、胃壁侵犯、组织分化、淋巴结转移和TNM分期与胃癌患者的预后相关。除了上述临床病理因素外, 许多分子生物学标志物也已经成为判断胃癌预后的理想指标, 比如ANXA1、pmTOR、VEGF和FoxM1等[5-8]。本研究中单因素生存分析发现, PRR11表达阳性患者生存期显著短于表达阴性患者, 而多因素回归分析也表明同TNM和组织分化一样, PRR11是判断胃癌患者预后的独立因素; 加之PRR11主要表达于晚期胃癌患者和胃癌细胞恶性生物学行为较高的患者, 本研究表明PRR11可作为判断胃癌预后的重要指标。

总之, 本研究发现PRR11在胃癌组织中高表达, 与肿瘤的分化和疾病进展显著相关, PRR11的表达还可作为评判胃癌患者预后的重要指标。提示PRR11在胃癌的发生和发展中发挥了重要的作用, 可能与PRR11影响了细胞周期有关, 但其具体作用机制还有待于进一步研究。

参考文献 (References)

1 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011; 61(2): 69-90.

2 Ji Y, Xie M, Lan H, Zhang Y, Long Y, Weng H, *et al*. PRR11 is a novel gene implicated in cell cycle progression and lung cancer. Int J Biochem Cell Biol 2013; 45(3): 645-56.

3 Weinmann AS, Yan PS, Oberley MJ, Huanq TH, Farnham PJ. Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis. Genes Dev 2002; 16(2): 235-44.

4 Spira A, Beane JE, Shah V, Steiling K, Liu G, Schembri F, *et al*. Airway epithelial gene expression in the diagnostic evaluation of smokers with suspect lung cancer. Nat Med 2007; 13(3): 361-6.

5 Yu G, Wang J, Chen Y, Wang X, Pan J, Li G, *et al*. Overexpression of phosphorylated mammalian target of rapamycin predicts lymph node metastasis and prognosis of chinese patients with gastric cancer. Clin Cancer Res 2009; 15(5): 1821-9.

6 Sato Y, Kumamoto K, Saito K, Okayama H, Hayase S, Kofunato Y, *et al*. Up-regulated Annexin A1 expression in gastrointestinal cancer is associated with cancer invasion and lymph node metastasis. Exp Ther Med 2011; 2(2): 239-43.

7 Yu G, Wang J, Chen Y, Wang X, Pan J, Li Q, *et al*. Tissue microarray analysis reveals strong clinical evidence for a close association between loss of annexin A1 expression and nodal metastasis in gastric cancer. Clin Exp Metastasis 2008; 25(7): 695-702.

8 Li Q, Zhang N, Jia Z, Le X, Dai B, Wei D, *et al*. Critical role and regulation of transcription factor FoxM1 in human gastric cancer angiogenesis and progression. Cancer Res 2009; 69(8): 3501-9.