

胃癌患者血清CCL2、ANXA2含量与癌细胞浸润性生长的相关性研究

王薇 布力布·吉力斯汉 许春蕾 赛福丁·柯尤木*

(新疆医科大学第三临床医学院(附属肿瘤医院)消化内科, 乌鲁木齐 830011)

摘要 该文旨在探讨胃癌患者血清CC趋化因子配体2(CCL2)、膜联蛋白A2(ANXA2)含量与癌细胞浸润性生长的相关性, 并分析其与胃癌临床病理特征的关系。选择187例胃癌患者为研究对象, 并选择153例正常人群为对照组, 使用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测所有研究对象血清CCL2、ANXA2含量, 分析组间临床病理特征(癌细胞分化程度、浸润程度和是否发生淋巴结转移等)及CCL2、ANXA2水平差异。采用qRT-PCR技术检测胃癌组织及癌旁组织中癌细胞浸润性生长相关基因*Cripto-1*、*ZEB1*、*Snail*、*Vimentin*、*Piwi2*、*STOML2*、*BCL2*、*Smo*、*XIAP*的表达。分析组间血清CCL2、ANXA2水平差异, 以及不同CCL2、ANXA2水平下分泌体Exosomes蛋白及*Cripto-1*、*ZEB1*、*Snail*、*Vimentin*、*Piwi2*、*STOML2*、*BCL2*、*Smo*、*XIAP*基因的表达差异。使用免疫组织化学SP染色法检测全部研究对象中CCL2、ANXA2含量, 分析各组间差异。胃癌组血清CCL2、ANXA2水平显著高于对照组($P<0.05$); 患者的性别、年龄、胃癌分型等数据在CCL2、ANXA2水平上作对比, 无显著差异($P>0.05$), 患者的分化程度、浸润深度和淋巴结是否转移等数据在CCL2、ANXA2水平上作对比, 具有显著性差异($P<0.05$); 高水平CCL2组、高水平ANXA2组Exosomes蛋白及上皮-间质转化(EMT)基因(*Cripto-1*、*ZEB1*、*Snail*、*Vimentin*)、增殖基因(*Piwi2*、*STOML2*、*BCL2*、*Smo*、*XIAP*)表达分别显著高于低水平CCL2组、低水平ANXA2组($P<0.05$); 胃癌组织中EMT基因(*Cripto-1*、*ZEB1*、*Snail*、*Vimentin*)、增殖基因(*Piwi2*、*STOML2*、*BCL2*、*Smo*、*XIAP*)表达显著高于癌旁组织($P<0.05$)。研究结果表明, 血清CCL2、ANXA2水平与胃癌患者癌细胞的浸润性呈正相关, 高水平表达的CCL2、ANXA2与胃癌细胞浸润性生长等生物学行为密切相关。

关键词 胃癌; CCL2; ANXA2; 癌细胞; 浸润性生长

Correlation between Serum CCL2 and ANXA2 Levels and Invasive Growth of Cancer Cells in Patients with Gastric Cancer

WANG Wei, BULIBU·Jilishan, XU Chunlei, SAIFUDING·Keyoumu*

(Department of Gastroenterology, the Third Clinical Medical College of Xinjiang Medical University (Affiliated Cancer Hospital), Urumqi 830011, China)

Abstract This study is aimed to investigate the correlation between the contents of CCL2 (CC motif chemokine ligand 2) and ANXA2 (annexin A2) and the invasive growth of cancer cells in patients with gastric cancer, and to analyze their relationship with the clinicopathological characteristics of gastric cancer. With 187 gastric

收稿日期: 2020-06-29 接受日期: 2020-08-20

新疆维吾尔自治区自然科学基金(批准号: 2016D01C362)资助的课题

*通讯作者. Tel: 13999804141, E-mail: 592996737@qq.com

Received: June 29, 2020

Accepted: August 20, 2020

This work was supported by the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (Grant No.2016D01C362)

*Corresponding author. Tel: +86-13999804141, E-mail: 592996737@qq.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5466>

cancer patients as the research objects and 153 normal people as control group, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) method was used to detect the serum levels of CCL2 and ANXA2 in all research objects. The clinicopathologic features (cancer cell differentiation, invasion and lymph node metastasis) and the levels of CCL2 and ANXA2 among the groups were analyzed. The expression of *Cripto-1*, *ZEB1*, *Snail*, *Vimentin*, *Piwil2*, *STOML2*, *BCL2*, *Smo*, and *XIAP* in gastric cancer tissues and para-cancer tissues was detected by qRT-PCR, and the serum levels of CCL2 and ANXA2 were analyzed. Expression differences of Exosomes, *Cripto-1*, *ZEB1*, *Snail*, *Vimentin*, *Piwil2*, *STOML2*, *BCL2*, *Smo* and *XIAP* at different CCL2 and ANXA2 levels were analyzed. Immunohistochemical SP staining was used to detect the levels of CCL2 and ANXA2 in all subjects and analyze the differences among groups. Serum levels of CCL2 and ANXA2 in gastric cancer group were significantly higher than those in control group ($P<0.05$). The gender, age, gastric cancer type and other data of the patients had no significant differences in CCL2 and ANXA2 levels ($P>0.05$). The degree of differentiation, the depth of infiltration and the lymph node metastasis showed significant differences in CCL2 and ANXA2 levels ($P<0.05$). The expression of Exosomes, *Cripto-1*, *ZEB1*, *Snail*, *Vimentin*, *Piwil2*, *STOML2*, *BCL2*, *Smo* and *XIAP* in high CCL2 and high ANXA2 groups were significantly higher than those in low CCL2 and low ANXA2 groups ($P<0.05$). Exosomes, *Cripto-1*, *ZEB1*, *Snail*, *Vimentin*, *Piwil2*, *STOML2*, *BCL2*, *Smo* and *XIAP* were significantly up-regulated in gastric cancer tissues compared with para-cancer tissues ($P<0.05$). According to the research results, the levels of serum CCL2 and ANXA2 are significantly correlated with the infiltration of cancer cells in gastric cancer patients, and the high expression of CCL2 and ANXA2 is closely related to the invasive growth and other biological behavior of gastric cancer cells.

Keywords gastric cancer; CCL2; ANXA2; cancer cells; invasive growth

胃癌是临床上较为常见的恶性肿瘤之一,随着肿瘤基因技术的开发和研究的逐渐深入,致癌基因、抑癌基因、肿瘤耐药基因等研究取得了跨越式的进展,但是胃癌的发病机制仍不十分明确。CC型修饰趋化因子配体2(CC chemokine ligand 2, CCL2)属于趋化因子CC家族成员,可募集肿瘤相关巨噬细胞,促进肿瘤血管形成,调节肿瘤免疫应答等。目前,CCL2被证实与多种恶性肿瘤有关,乳腺癌组织中CCL2 mRNA表达水平是癌旁组织中的13.18倍^[1],胃癌患者血清CCL2水平高于健康人群,高水平CCL2与胃癌TNM分期及淋巴结转移呈正相关^[2]。膜联蛋白A2(annexin A2, ANXA2)属于外分泌蛋白,在具有侵袭特性的癌细胞中高度表达,参与恶性肿瘤新生血管形成、侵袭及转移过程^[3]。现有研究证实,血清ANXA2水平升高与肺癌、乳腺癌、肝癌等多种实体瘤发生有关^[4]。本研究以胃癌细胞增殖相关基因为指标,分析胃癌患者血清CCL2、ANXA2水平与胃癌细胞浸润性生长的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本研究经新疆医科大学第三临床医学院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。选取

2016年2月至2018年10月在我院首次被确诊为胃癌的患者187例,其中男性112例,女性75例。年龄29~73岁,平均年龄为(52.38±4.67)岁。胃癌组纳入标准:组织病理诊断明确;TNM分期明确;临床资料完整。排除标准:合并其他部位肿瘤;有严重自身免疫性疾病者。根据Laurén分型:肠型胃癌96例,弥漫型胃癌91例;分化程度:中度和高度分化71例,未分化和低分化116例;浸润深度:T1+T2 80例,T3+T4 107例;远处淋巴结转移68例,未发现远处淋巴结转移119例。另外,选取同期门诊常规体检人群为对照组,入组标准为未发现胃部相关疾病,且体检结果总体状况良好;对照组共153例,其中男性99例,女性54例,年龄32~78岁,平均年龄为(54.05±5.12)岁。

1.2 方法

1.2.1 血清CCL2、ANXA2水平检测 所有受试者均于清晨空腹采集静脉血5 mL,室温下静置30 min后,取血清于离心管中,用TGI-16型高速离心机(上海医用分析仪器厂)于3 000 r/min离心15 min,取上清液,保存于-20℃低温冰箱(日本三洋电器股份有限公司)待检。采用美国雅培ARCHITECT i2000SR电化学发光微粒子免疫分析仪及仪器配套试剂检测ANXA2水平,酶联免疫吸附试验检测CCL2水平。

1.2.2 癌细胞浸润性生长基因检测 取100 mg新鲜胃癌标本组织, 加入1 mL Trizol试剂(美国Invitrogen公司)提取组织RNA, 利用紫外分光光度法鉴定RNA纯度和完整性。用逆转录试剂盒(美国GIBICOL公司)将RNA逆转录为cDNA, 利用实时定量PCR系统(定量7500 PCR仪, 美国ABI公司)进行qRT-PCR反应, 扩增所用引物分别针对上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)基因*Cripto-1*、*ZEB1*、*Snail*、*Vimentin*和增殖基因*Piwil2*、*STOML2*、*BCL2*、*Smo*、*XIAP*, 利用Primer Premier 5.0软件设计引物序列, 引物合成由金斯瑞生物科技有限公司完成(表1)。反应条件: 94 °C 预变性5 min; 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 35个循环; 72 °C延伸5 min。取出扩增产物25 μ L, 进行琼脂糖凝胶电泳, 用FR-250电泳仪(上海复日科技有限公司)扫描并拍照。以 β -actin作为内参基因, 于紫外灯下观察结果, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算EMT基因、增殖基因的mRNA表达量。

1.2.3 免疫组织化学检测 使用免疫组织化学SP染色法对所有研究对象中的CCL2、ANXA2分子进行

检测, 本实验方法使用武汉博士德生物工程公司生产的DAB显色剂和SP免疫组织化学试剂盒, 实验严格按照试剂盒说明书操作, 并以已有组织作为阳性对照。ANXA2蛋白均定位于肿瘤细胞胞质和胞膜, 以出现黄色颗粒为阳性染色; CCL2阳性染色大部分定位于细胞质, 表现为细胞质中可见明显黄色物质或者棕黄色物质。结果判定: 采用双盲法进行阅片, 由两名独立研究的人员对实验结果进行判定, 在显微镜下随机观察5个视野($\times 200$)并进行阳性细胞计数, 每例组织切片总计数不少于1 000个癌细胞, 并计算阳性细胞的比例。根据阳性细胞所占的比例进行定义: 0分为阴性, 1分为阳性细胞比例 $<25\%$, 2分为阳性细胞比例为 $25\% \sim 49\%$, 3分为阳性细胞比例为 $50\% \sim 74\%$, 4分为阳性细胞比例 $>74\%$ 。根据染色强度按下列标准进行评分: 0分为阴性或与阴性相仿, 1分为淡黄色, 2分为棕黄色, 3分为棕褐色。统计分析时, 将两项得分乘积 ≤ 3 定义为弱表达, >3 定义为强表达。

1.3 统计学分析

研究资料使用EPidata 3.1软件录入, 并用SPSS

表1 各引物序列信息
Table 1 Sequence information of each primer

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
<i>Cripto-1</i>	F: CAT AAA GTA GAA AGC AC R: CTA GGT GCG TTC AGT G
<i>ZEB1</i>	F: CAT AGT AGA AAA AGC AC R: CTA GGT GCG TTC AGT G
<i>Snail</i>	F: CAT ATA GAA AAG AGC AC R: CTA GGT TCA TGG CGT G
<i>Vimentin</i>	F: CAT AAA GTA GAA AGC AC R: CTA GGC GTT CAG TGT G
<i>Piwil2</i>	F: CAA ATA GTA GAA AGC AC R: CTA GGT GAG CTT CAG TG
<i>STOML2</i>	F: CAT ATA GAA AGA AGC AC R: CTA GGT GTC GCA GTG
<i>BCL2</i>	F: CAT AAA GTA GAG CAC R: CTA GGT GCA GCG TTA ATG
<i>Smo</i>	F: CAT AAA TAG AAA GGC AC R: CTA GGT GCG TTC AGT G
<i>XIAP</i>	F: CAT AAA GAA GTA AGC AC R: CTA GGT GCG TTC AGT G
<i>U6</i>	F: TAG GGT GCT CGC TTC GGC R: CTG GTG TCG TGG AGT CG
β -actin	F: GCT GTC CCT GTA TGC CTC R: GAT GTC ACG CAC GAT

21.0统计软件进行分析,计数资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组、对照组血清CCL2、ANXA2含量对比

胃癌组血清CCL2水平为(103.42±32.61) pg/mL, 对照组血清CCL2水平为(69.35±16.21) pg/mL, 胃癌组血清ANXA2水平为(46.15±9.26) pg/mL, 对照组血清ANXA2水平为(21.01±2.06) pg/mL, 胃癌组CCL2、ANXA2水平均显著高于对照组, 差异有显著性($P<0.05$)(表2)。

2.2 胃癌组织、癌旁组织癌细胞浸润性生长相关基因表达对比

胃癌组织中Exosomes蛋白以及EMT基因*Cripto-1*、*ZEB1*、*Snail*、*Vimentin*的mRNA相对表达量分别为3.26±0.52、2.75±0.42、3.56±0.57、2.43±0.32、2.98±0.43, 均显著高于癌旁组织($P<0.05$)。胃癌组织

中增殖基因*Piwi12*、*STOML2*、*BCL2*、*Smo*、*XIAP*的mRNA相对表达量分别为2.96±0.43、2.43±0.35、3.55±0.51、3.16±0.51、3.86±0.62, 均显著高于癌旁组织($P<0.05$)(图1、表3和表4)。

2.3 不同CCL2、ANXA2水平胃癌组织癌细胞浸润性生长相关基因表达

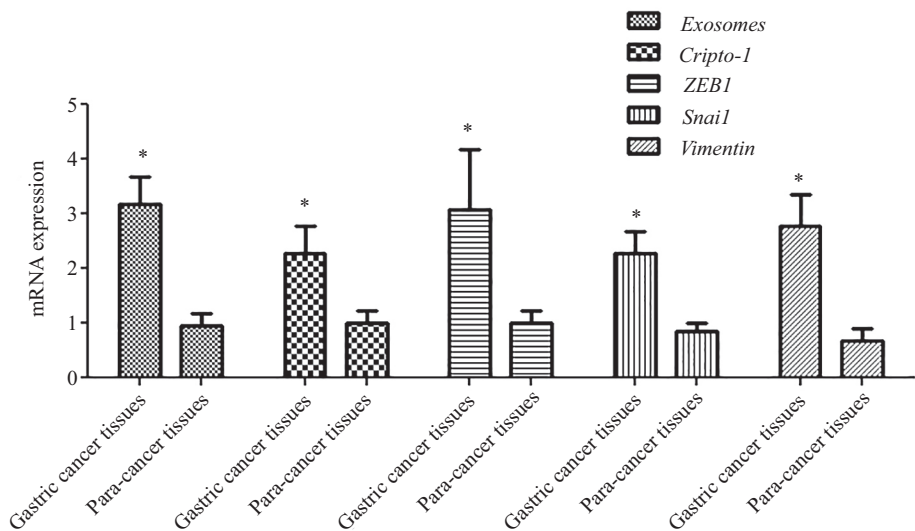
高水平CCL2组、高水平ANXA2组Exosomes蛋白及EMT基因(*Cripto-1*、*ZEB1*、*Snail*、*Vimentin*)、增殖基因(*Piwi12*、*STOML2*、*BCL2*、*Smo*、*XIAP*)的表达分别显著高于低水平CCL2组、低水平ANXA2组($P<0.05$)(表5)。

2.4 CCL2、ANXA2水平与胃癌病理参数的关系

患者的性别、年龄、胃癌分型等数据在CCL2、ANXA2水平上作对比, 无显著差异($P>0.05$), 患者的分化程度、浸润深度和淋巴结是否转移等数据在CCL2、ANXA2水平上作对比, 具有显著性差异($P<0.05$)(表6)。

表2 胃癌组、对照组血清CCL2、ANXA2含量差异

Table 2 The content differences of CCL2 and ANXA2 in the serum of gastric cancer group and control group			
组别	例数	CCL2水平/pg·mL ⁻¹	ANXA2水平/pg·mL ⁻¹
Group	Number of cases	CCL2 level /pg·mL ⁻¹	ANXA2 level /pg·mL ⁻¹
Gastric cancer group	187	103.42±32.61	46.15±9.26
Control group	153	69.35±16.21	21.01±2.06
t	-	8.220	24.353
P	-	0	0



* $P<0.05$, 与癌旁组织相比。

* $P<0.05$ compared with para-cancer tissue.

图1 胃癌组织、癌旁组织中EMT基因的表达对比

Fig.1 Comparison of EMT expression in gastric cancer tissues and para-cancer tissues

表3 胃癌组织、癌旁组织中Exosomes蛋白和EMT基因(*Cripto-1*、*ZEB1*、*Snail*、*Vimentin*)的表达量对比
Table 3 Comparison of expression levels of Exosomes protein and EMT genes (*Cripto-1*, *ZEB1*, *Snail*, *Vimentin*) in gastric cancer and para-cancer tissues

组别 Group	例数 Number of cases	相对表达量 Relative expression levels				
		<i>Exosomes</i>	<i>Cripto-1</i>	<i>ZEB1</i>	<i>Snail</i>	<i>Vimentin</i>
Gastric cancer tissue	187	3.26±0.52	2.75±0.42	3.56±0.57	2.43±0.32	2.98±0.43
Para-cancer tissues	187	1.05±0.16	1.03±0.16	1.06±0.12	0.91±0.11	1.01±0.16
<i>t</i>	-	37.888	35.695	40.032	41.899	40.050
<i>P</i>	-	0	0	0	0	0

表4 胃癌组织、癌旁组织中增殖基因(*Piwil2*、*STOML2*、*BCL2*、*Smo*、*XIAP*)的表达量对比
Table 4 Comparison of expression levels of proliferation genes (*Piwil2*, *STOML2*, *BCL2*, *Smo*, *XIAP*) in cancer tissues and para-cancer tissues

组别 Group	例数 Number of cases	相对表达量 Relative expression levels				
		<i>Piwil2</i>	<i>STOML2</i>	<i>BCL2</i>	<i>Smo</i>	<i>XIAP</i>
Gastric cancer tissue	187	2.96±0.43	2.43±0.35	3.55±0.51	3.16±0.51	3.86±0.62
Para-cancer tissues	187	1.03±0.15	1.03±0.14	0.96±0.15	1.01±0.11	0.95±0.16
<i>t</i>	-	39.529	34.641	45.444	38.437	42.390
<i>P</i>	-	0	0	0	0	0

表5 不同CCL2、ANXA2水平胃癌组织Exosomes蛋白、EMT基因、增殖基因表达差异
Table 5 Expression differences of Exosomes protein, EMT genes and proliferation genes in gastric cancer tissues with different levels of CCL2 and ANXA2

基因 Gene	高水平ANXA2组 (n=85)	低水平ANXA2组 (n=102)	<i>t</i>	<i>P</i>	高水平CCL2组(n=89)	低水平CCL2组 (n=98)	<i>t</i>	<i>P</i>
	High level ANXA2 group (n=85)	Low level ANXA2 group (n=102)			High level CCL2 group (n=89)	Low level CCL2 group (n=98)		
<i>Exosomes</i>	4.83±0.69	2.20±0.43	31.843	0	4.85±0.79	1.97±0.40	20.711	0
<i>Cripto-1</i>	3.91±0.67	1.97±0.27	26.763	0	3.98±0.64	1.75±0.21	20.866	0
<i>ZEB1</i>	5.10±0.91	2.52±0.39	25.929	0	5.12±0.96	2.29±0.38	17.339	0
<i>Snail</i>	3.52±0.70	1.70±0.37	22.731	0	3.46±0.58	1.59±0.35	17.687	0
<i>Vimentin</i>	4.31±0.53	2.08±0.31	35.789	0	4.38±0.67	1.84±0.35	21.419	0
<i>Piwil2</i>	4.23±0.68	21.11±0.43	25.894	0	4.25±0.71	1.91±0.45	27.169	0
<i>STOML2</i>	3.36±0.59	2.32±0.31	22.015	0	4.03±0.59	1.13±0.30	42.937	0
<i>BCL2</i>	5.35±0.83	2.37±0.34	32.651	0	5.05±0.86	2.33±0.40	28.142	0
<i>Smo</i>	4.41±0.70	2.32±0.31	27.143	0	3.93±0.61	2.53±0.40	18.713	0
<i>XIAP</i>	5.52±0.57	2.74±0.38	31.647	0	5.22±0.57	2.76±0.37	23.263	0

2.5 CCL2表达上调的机理

在结合ChIP的下一代测序技术鉴定的主要雌激素受体β(estrogen receptor β, *ERβ*)标记基因中,我们研究了NF-κB信号,它介导早期炎症反应。考虑到ERβ对NF-κB信号的影响,我们从*ERβ*敲除的胃癌细

胞中提取总蛋白和核蛋白,并利用Western blot评估总IkBα和核p65的水平。结果表明,IkBα总水平显著升高,而p65水平降低($P<0.05$)(图2)。

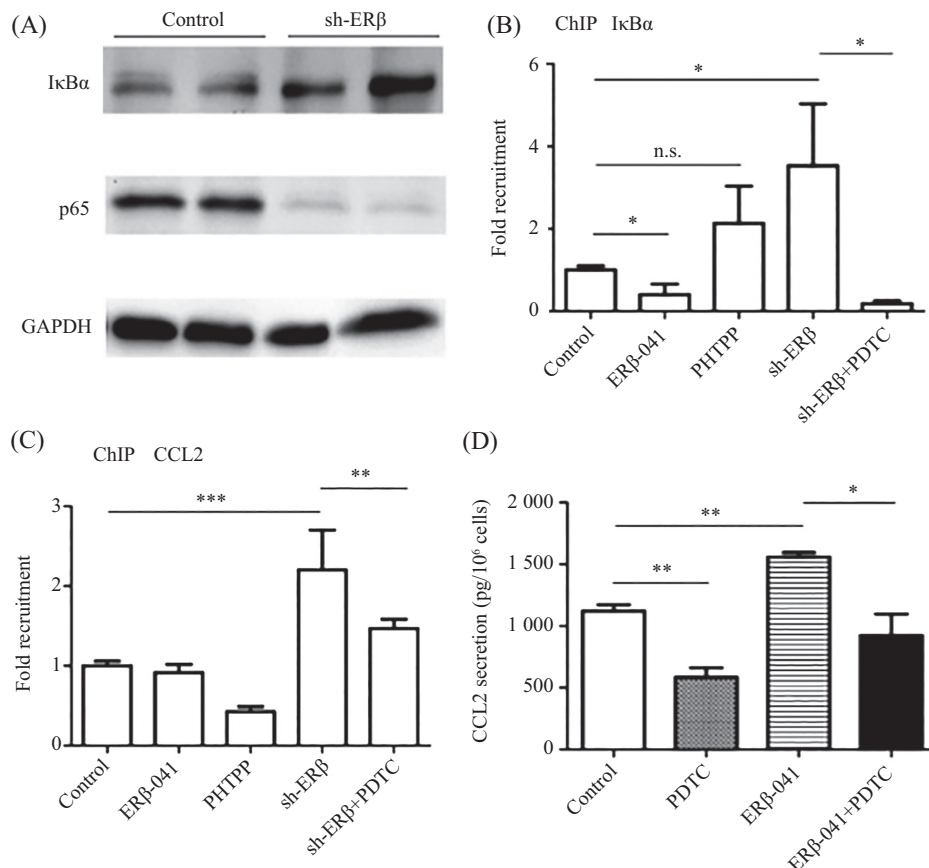
2.6 ANXA2表达上调的机理

为了检测ANXA2过表达和E-cadherin下调对胃

表6 CCL2、ANXA2水平与胃癌病理参数的关系

Table 6 The relationships between the levels of CCL2 and ANXA2 and the clinicopathologic parameters of gastric cancer

临床病理参数 Clinicopathologic parameters	分类 Classification	CCL2水平/pg·mL ⁻¹ CCL2 level /pg·mL ⁻¹	t/F	P	ANXA2水平/pg·mL ⁻¹ ANXA2 level /pg·mL ⁻¹	t/F	P
Gender	112 cases of male	102.52±33.65	0.521	0.219	45.12±9.59	0.637	0.132
	75 cases of female	103.25±35.62			46.02±9.32		
Age	>60 years old	103.26±35.47	0.675	0.135	46.15±9.34	0.519	0.225
	≤60 years old	103.54±36.59			46.37±9.55		
Laurén parting	69 cases of intestinal type	103.54±32.65	0.695	0.124	45.29±8.57	0.749	0.101
	Diffuse type (91 cases)	103.75±33.95			46.37±9.84		
The degree of differentiation	No+low (116 cases)	112.26±36.59	6.594	0	49.51±12.54	9.657	0
	Medium+high (71 cases)	95.24±30.52			42.13±6.54		
Infiltrating depth	T1+T2 (80 cases)	88.52±25.41	12.546	0	51.24±12.05	11.357	0
	T3+T4 (107 cases)	115.64±39.57			40.21±6.57		
Lymph node metastasis	No (119 cases)	119.51±40.21	15.243	0	52.03±13.47	15.243	0
	Yes (68 cases)	85.42±36.52			42.15±5.98		



A: Western blot分析sh-ERβ的胃癌中IκBα和p65的蛋白表达; B: CHIP样品, 并使用ERβ和p65特异性抗体进行分析; C: PCR技术对免疫沉淀DNA片段和输入DNA进行分析; D: 用DMSO、PDTC、ERβ-041或ERβ-04加PDTC(NF-κB拮抗剂)对子宫内膜异位症间质细胞24 h后条件培养基中CCL2水平进行ELISA分析; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与对照组相比。n.s.: 无显著差异。

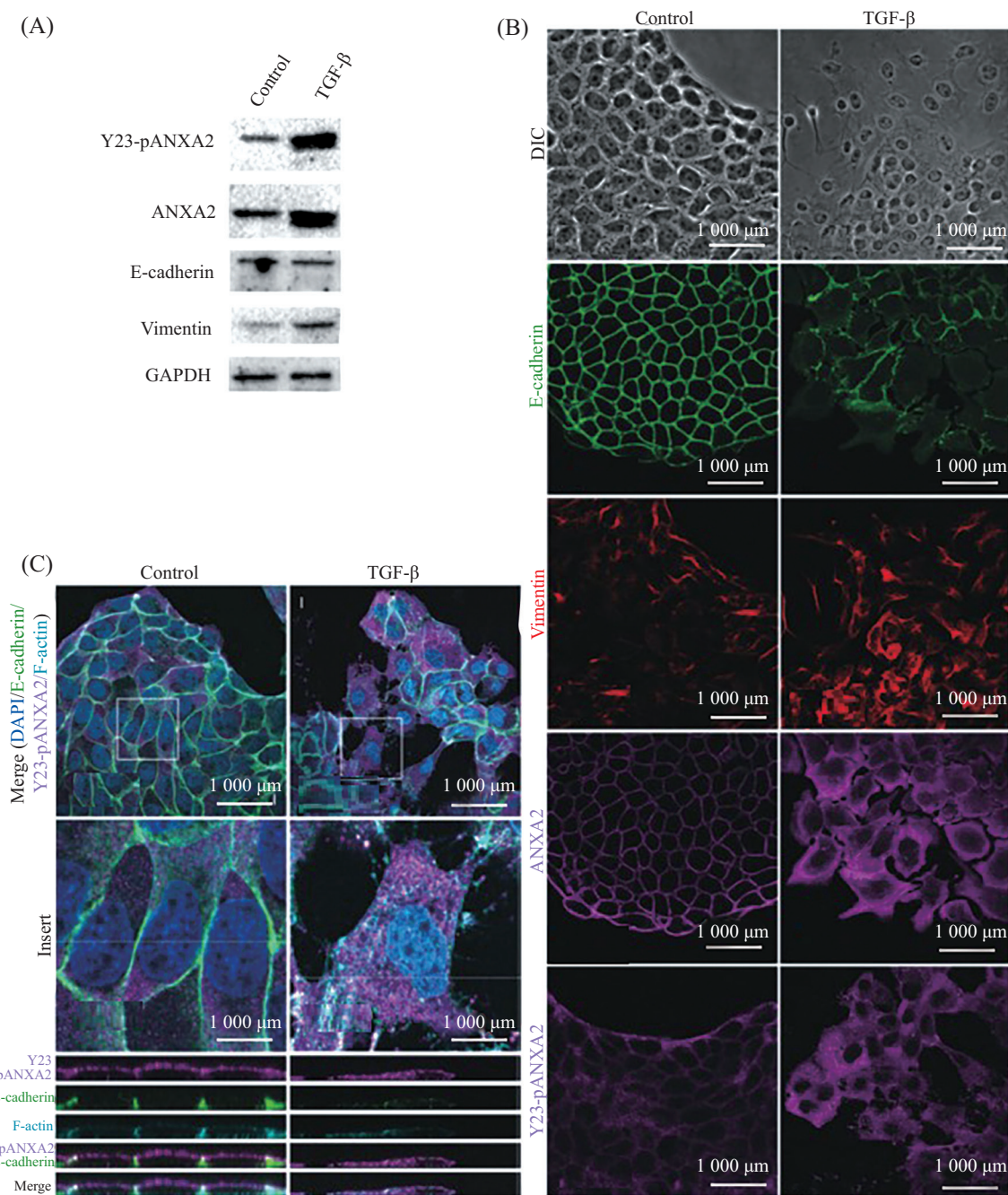
A: the expression of IκBα and p65 in sh-ERβ gastric cancer was analyzed by Western blot; B: CHIP sample, ER and P65 specific antibodies were for analysis; C: PCR technique was used for analyzing DNA fragments of immunoprecipitation and input DNA; D: DMSO, PDTC, ERβ-041 or ERβ-04 were added to PDTC (NF-κB antagonist) to activate B cells in endometriosis stromal cells. The CCL2 level in the conditioned medium was analyzed by ELISA 24 h later. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with control group. n.s.: not significant difference.

图2 CCL2表达上调的机理

Fig.2 Mechanism of CCL2 up-regulation

癌细胞侵袭是否至关重要, 我们用10 ng/mL的TGF- β 处理胃癌细胞48 h。Western blot分析结果显示, TGF- β 介导 ANXA2及其磷酸化形式(Y23-pANXA2)上调。E-cadherin(上皮标志物)表达似乎没有改变,

而波形蛋白(间质标志物)表达增加(图3A)。然后, 我们进行免疫荧光分析, 以研究TGF- β 处理后ANXA2的亚细胞定位是否改变(图3B)。差分干扰对比(differential interference contrast, DIC)图像显示, 在TGF- β



A: Western blot检测TGF- β 治疗48 h后, 相对于ANXA2(总和磷酸化)、上皮(E-cadherin)和间充质(波形蛋白)标记物的蛋白表达量; B: 免疫荧光检测ANXA2、E-cadherin和波形蛋白以及DIC的分布; C: 四联免疫荧光检测对照组、TGF- β 处理细胞的共聚焦图像、嵌入图像和z轴分析(DAPI/E-cadherin/Y23-pANXA2/F-actin)。

A: after 48 h of TGF- β treatment, protein expression levels relative to ANXA2 (total phosphorylation), epithelial (E-cadherin) and mesenchymal (Vimentin) markers were detected by Western blot; B: immunofluorescence was used to detect the distribution of ANXA2, E-cadherin, Vimentin and DIC; C: confocal images and insert images of the control group, TGF- β processed cells, and z-axis analysis (DAPI/E-cadherin/Y23-pANXA2/F-actin) were detected by quad-immunofluorescence assay.

图3 ANXA2表达上调的机理
Fig.3 Mechanisms of ANXA2 up-regulation

处理的细胞中细胞接触减少,表型延长。E-cadherin, 定位于未处理细胞(对照组)的细胞连接处,在48 h内未被降解。这解释了为什么在Western blot中E-cadherin表达没有明显变化。波形蛋白虽然存在于HT-29对照组细胞中,但在EMT诱导组中表现出更强烈的染色。在TGF- β 介导的细胞中,总ANXA2和Y23-pANXA2定位于对照细胞的细胞连接处,在TGF- β 介导的细胞中过表达并重新分布到细胞质中。众所周知,EMT会导致细胞连接和顶端-基底极性丧失。因此,我们通过共聚焦显微镜进一步研究这些变化。具体来说,我们对HT-29细胞进行Y23-pANXA2、E-cadherin和F-actin染色(phalloidin染色)(图3C)。在对照组细胞中,E-cadherin定位于细胞接触处,在TGF- β 处理后定位于细胞质中。Y23-pANXA2在对照组细胞中多定位于根尖膜,TGF- β 处理后分布于整个细胞。最后,F-actin染色突出了TGF- β 介导的细胞形状变化(从柱状变为纺锤状)(图3C)。

3 讨论

胃癌是全球发病率排名第四的恶性肿瘤,位居癌症死亡原因的第二位,其在发展中国家新发死亡病例超过全球的70%^[5],我国胃癌发病率居恶性肿瘤首位,晚期胃癌和治疗后复发的患者5年生存率仅为15%~25%^[6],因此,很有必要对胃癌转移机制进行深入研究。

CCL2在炎症反应、血管新生、损伤修复等生理病理过程中发挥重要作用,可趋化单核细胞、树突状细胞(dendritic cell, DC)、淋巴细胞等而发挥免疫调节、促进新生血管形成等作用。CCL2在多种类型肿瘤组织中均呈现出不同程度的高表达,CCL2主要通过募集肿瘤相关巨噬细胞,影响其表型和功能,促进其参与肿瘤发生和进展,并调节肿瘤免疫应答或直接作用于肿瘤细胞参与肿瘤血管形成、侵袭转移等过程,促进肿瘤疾病进程。郑张军等^[7]的研究显示,胃癌组患者血清CCL2水平高于正常人群,胃癌患者ANXA2阳性率较胃黏膜不典型增生、萎缩性胃炎、浅表性胃炎患者以及健康人群均高,而胃黏膜不典型增生患者ANXA2阳性率较萎缩性胃炎、浅表性胃炎患者和健康人高,提示胃癌癌前病变时期,ANXA2水平已经出现异常升高,ANXA2是胃癌早期诊断的敏感指标。胃癌患者ANXA2阳性表达与胃癌浸润程度、TNM分期、淋巴结转移均有关,

提示ANXA2可能参与胃癌发生、浸润、转移等生理病理过程。本研究中的胃癌组患者血清ANXA2水平明显升高,高于正常人群,未分化和低分化胃癌、T3+T4、淋巴结转移患者血清CCL2、ANXA2水平分别高于中度分化和高度分化、T1+T2、未发生淋巴结转移患者,验证了ANXA2与胃癌发生有关。

胃癌的远处转移及复发是导致胃癌患者死亡的最主要原因,也是影响临床疗效和预后的关键因素。肿瘤细胞获得侵袭性、从原发灶脱离是肿瘤转移侵袭的关键。这个过程是通过EMT实现的。EMT是指上皮细胞失去细胞极性,转化为间质细胞样形态,从而获得移行能力。在许多肿瘤中都有EMT现象,而且肿瘤细胞EMT的程度直接决定了肿瘤的恶性程度。为进一步分析血清CCL2、ANXA2与胃癌癌细胞浸润性生长的关系,本研究从EMT基因和增殖基因方面进行研究。肿瘤组织最主要的病理特征为癌细胞浸润性生长,肿瘤各级进程都可能触发EMT表型,EMT与乳腺癌、卵巢癌、胃癌等多种肿瘤的细胞侵袭、迁移、耐药、干性、预后和复发等都密切相关。Exosomes被细胞内吞后,可触发信号启动细胞内吞噬过程^[8];Cripto-1可增强细胞间质表型,促进间质表型分子表达;ZEB1和Snail是参与EMT过程的调控转录因子,E-cadherin是上皮表型标志基因,EB1和Snail可与E-cadherin结合阻碍E-cadherin基因表达,抑制细胞从上皮表型向间质表型转化^[9-10];Vimentin是EMT标志分子,在胃癌中高度表达,参与胃癌转移过程^[11]。本研究中的胃癌组织Exosomes蛋白以及EMT相关基因Cripto-1、ZEB1、Snail、Vimentin的表达均高于癌旁组织,提示病灶内癌细胞的过度EMT与胃癌的发生密切相关,进一步分析不同CCL2、ANXA2水平下EMT基因表达差异,显示高水平CCL2、ANXA2组EMT基因表达高于低水平CCL2、ANXA2组,提示胃癌患者高水平CCL2、ANXA2能促进胃癌细胞EMT,增强癌细胞运动、迁移、侵袭能力。Pit-1通过拮抗抑癌基因p53产生促进癌细胞增殖的作用,进而促进癌细胞增殖^[12];STOML2能增加线粒体膜BCL2表达,阻碍线粒体外膜通透,抑制细胞凋亡,促进细胞增殖^[13-14];Smo能增强信号通路活性触发细胞内信号转导、激活转录因子Gli1进而促进细胞增殖;XIAP通过拮抗Caspase活性抑制凋亡通路激活,进而抑制癌细胞凋亡促进增殖^[15]。

胃癌组织癌细胞增殖相关基因可通过一系列的调控方式调节细胞的有丝分裂蛋白, 其功能涉及细胞周期转换、中心体成熟、纺锤体生成和染色体分离等生理过程, 相关研究表明, 不同胃癌组织癌细胞增殖相关基因可造成细胞中心体异常扩增、异倍体形成、染色体不稳定以及细胞恶性转化的病理行为, 因此, 各种肿瘤细胞相关因子的表达及其与生物学行为的关系日渐引起人们的关注。本研究中的胃癌组织癌细胞增殖相关基因 *Piwi2*、*STOML2*、*BCL2*、*Smo*、*XIAP* 的表达均高于癌旁组织, 提示病灶内癌细胞过度增殖与胃癌的发生密切相关, 进一步分析不同 CCL2、ANXA2 水平下 *Piwi2*、*STOML2*、*BCL2*、*Smo*、*XIAP* 的表达差异, 显示高水平 CCL2、ANXA2 组 *Piwi2*、*STOML2*、*BCL2*、*Smo*、*XIAP* 表达高于低水平 CCL2、ANXA2 组(图4和图5)。提示胃癌患者中高水平 CCL2、ANXA2 能促进胃癌增殖基因表达, 增强癌细胞增殖能力。

综上, 本研究结果证实: 胃癌患者血清 CCL2、ANXA2 含量均异常升高, CCL2、ANXA2 可能参与胃癌细胞浸润性生长等过程, CCL2、ANXA2 在胃癌组织中的高水平表达预示着胃癌患者预后不良。

参考文献 (References)

- [1] TEWARI B N, SINGHBAGHE I K, TRIPAHI G, et al. A study on local expression of NF- κ B, CCL2 and their involvement in intratumoral macrophage infiltration in breast cancer [J]. *Celi Mol Biol*, 2016, 62(2): 116-25.
- [2] ZHANG J, YAN Y, CUI X, et al. CCL2 expression correlates with snail expression and affects the prognosis of patients with gastric cancer [J]. *Pathol Res Pract*, 2017, 213(3): 217-21.
- [3] 徐明星, 李曼, 彭波, 等. 肿瘤标志物联检在胃癌早期诊断临床应用研究 [J]. *中国实验诊断学* (XU M X, LI M, PENG B, et al. Clinical application of joint inspection of tumor markers gastric cancer [J]. *Chinese Experimental Diagnostics*), 2014, 6(2): 899-902.
- [4] SHETTY P, PATIL V S, MOHAN R, et al. Annals express: annexinA2 and its downstream IL-6 and HB-EGF as secretory biomarkers in the differential diagnosis of Her-2 negative breast cancer [J]. *Ann Clin Biochem*, 2016, 5(4): 85-6.
- [5] LI M, WAN X, WANG Y, et al. Time trends of esophageal and gastric cancer mortality in China, 1991-2009: an age-period-cohort analysis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 6797.
- [6] BASARAN H, KOCA T, CERKESLI A K, et al. Treatment outcomes and survival study of gastric cancer patients: a retrospective analysis in an endemic region [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(5): 2055-60.
- [7] 郑张军, 张金星, 刘情, 等. 血清 CCL11、ANXA2、OPN 在胃癌患者中的应用 [J]. *检验医学与临床* (ZHENG Z J, ZHANG J X, LIU Q, et al. Serum CCL11/ANXA2/OPN in patients with gastric cancer [J]. *Laboratory Medicine and Clinic*), 2017, 14(22): 3346-8.
- [8] AQIL F, MUNAGAIA R, JEYABALANE J, et al. Exosomes for the enhanced tissue bioavailability and efficacy of curcumin [J]. *AAPS J*, 2017, 19(6): 1691-702.
- [9] MA Y, ZHENG X, ZHOU J, et al. ZEB1 promotes the progression and metastasis of cervical squamous cell carcinoma via the promotion of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 11258-67.
- [10] ZHANG P, LIU Y, FENG Y, et al. SNAIL gene inhibited by hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) in epithelial ovarian cancer [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2016, 39(3): 364-75.
- [11] ZHANG J, CHEN X Y, HUANG K J, et al. Expression of FoxM1 and the EMT-associated protein E-cadherin in gastric cancer and its clinical significance [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(4): 2445-50.
- [12] FENG D, YAN K, ZHOU Y, et al. *Piwi2* is reactivated by HPV oncoproteins and initiates cell reprogramming via epigenetic regulation during cervical cancer tumorigenesis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(40): 64575-88.
- [13] KIM B W, CHO H, YLAYA K, et al. Bcl-2-like protein 11 (BIM) expression is associated with favorable prognosis for patients with cervical cancer [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(9): 4873-9.
- [14] LI Z, LIU X, CHEN X, et al. Targeted delivery of Bcl-2 conversion gene by MPEG-PCL-PEI-FA cationic copolymer to combat therapeutic resistant cancer [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 1(76): 66-72.
- [15] JIN X J, CAI P S, ZHU S P, et al. Negative correlation between X-linked inhibitors of apoptosis and second mitochondria-derived activator of caspase expression levels in cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(5): 5340-6.