

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01119

• 短篇论著 •

胃癌组织中增殖诱导配体及其受体蛋白的表达

Expression of APRIL and its receptors in gastric cancer tissues and its significance

张健锋^{1△}, 朱慧珺^{2△}, 毛振彪^{1*}, 许 钟¹, 潘正平², 蔡丙华³

1. 南通大学附属医院消化内科, 南通 226001
2. 南通大学附属医院病理科, 南通 226001
3. 南通大学附属医院普通外科, 南通 226001

[摘要] 目的: 观察人胃癌组织中增殖诱导配体(APRIL)及其受体 B 细胞成熟抗原(BCMA)和穿膜蛋白活化物(TACI)蛋白的表达, 探讨其临床意义。方法: 采用 H-E 染色及间接免疫荧光法检测 30 例人胃癌组织及相应 10 例癌旁正常组织 APRIL 及其受体蛋白的表达, 分析不同临床病理特征下相关蛋白的表达水平。结果: 胃癌组织中 APRIL 阳性率为 86.7%, 癌旁正常组织未见表达($P<0.05$); 而其受体 BCMA 和 TACI 蛋白表达水平在两者间无统计学差异。胃癌组织不同临床病理指标下(肿瘤大小、分化程度、浸润深度、有无淋巴结转移和 TNM 临床分期), APRIL 及其受体蛋白表达无统计学差异。结论: 胃癌组织中 APRIL 蛋白高表达, 检测其表达水平可能有助于胃癌的早期诊断。

[关键词] 胃肿瘤; 增殖诱导配体; B 细胞成熟抗原; 穿膜蛋白活化物

[中图分类号] R 735.2 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2008)09-1119-03

胃癌是一种常见的消化道恶性肿瘤, 发病率和病死率较高, 早期多无症状, 临床亦缺乏敏感和特异的血清学肿瘤标志物, 发现时多处于进展期, 因此早发现、早诊断具有重要的临床意义, 是改善预后的关键。增殖诱导配体(a proliferation-inducing ligand, APRIL)是肿瘤坏死因子家族成员, 在人消化系统肿瘤细胞株及肿瘤组织中均异常高表达, 而在正常组织低表达或不表达^[1-5]。APRIL 蛋白通过膜结合型和可溶型两种形式与其受体 B 细胞成熟抗原(B cell maturation antigen, BCMA)和穿膜蛋白活化物(transmembrane activator and CAML interactor, TACI)结合发挥生物学效应, 如促进肿瘤细胞增殖和(或)抑制肿瘤细胞凋亡, 发挥免疫调节作用^[2]。食管癌、胃癌、结直肠癌和胰腺癌等组织均有 APRIL 蛋白表达^[5-6], 但其与肿瘤发生发展的确切关系尚不清楚。为此, 本研究应用间接免疫荧光法检测胃癌组织中 APRIL 及其受体蛋白的表达情况, 并与癌旁正常组织作比较, 分析其与胃癌生物学行为的关系, 为筛选胃癌早期诊断的新指标奠定基础。

1 材料和方法

1.1 标本来源 收集 2005 年 5 月至 2006 年 10 月南通大学附属医院普通外科手术切除并经病理组织学证实的胃癌标本 30 例。其中男 19 例, 年龄 32~80 岁, 平均(65±11.27)岁; 女 11 例, 37~81 岁, 平均(65±12.46)岁。病理类型包括腺癌和黏液腺癌, 其中高中分化 12 例, 低分化 18 例; 肿瘤直

径<5 cm 14 例, ≥5 cm 16 例; 浸润浆膜外 19 例, 未及浆膜 11 例; 无淋巴转移 8 例, 有淋巴转移 22 例; TNM 分期: I 期 6 例, II 期 7 例, III 期 15 例, IV 期 2 例。10 例对照组即癌旁胃黏膜组织均取自胃癌行胃切除的近侧断端胃黏膜, 所有断端均距癌组织 5 cm 以上, 组织学检查为基本正常胃黏膜, 其中男 6 例, 女 4 例。入选病例术前皆未进行化疗或放疗, 无长期服用非甾体类抗炎药、皮质激素等药物史。

1.2 主要试剂 山羊抗人 APRIL 多克隆抗体(编号 SC-5739)、山羊抗人 BCMA 多克隆抗体(编号 SC-11746)和兔抗人 TACI 多克隆抗体(编号 SC-28986)均购自美国 Santa Cruz 公司; FITC 标记的驴抗山羊 IgG 和 TRITC 标记的驴抗兔 IgG 均购自美国 Jackson Lab 公司; 标记有辣根过氧化物酶(HRP)的驴抗山羊和驴抗兔 IgG 抗体均购自美国 Jackson Immunity 公司。

1.3 胃组织 APRIL 蛋白及其受体蛋白的表达 标本甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 4 μm 切片, 常规脱蜡, 进行 H-E 染色及免疫荧光染色。将切片插入片架, 放置在枸橼酸盐缓冲液中, 高压锅加热法修复抗原, 取出自然冷却至室温。加二抗来源的封闭血清 4℃封闭过夜, 吸去封闭血清, 加入一抗(1:100), 室温孵育 1 h 后 4℃孵育过夜。PBS 漂洗 5 min×3 次, 加入二抗: FITC 偶联的驴抗山羊 IgG(1:100)、TRITC 偶联的驴抗兔 IgG(1:200), 避光, 4℃孵育 2 h。甘油封片后荧光显微镜下观察。

[收稿日期] 2008-03-12 [接受日期] 2008-06-20

[基金项目] 江苏省社会发展计划基金资助项目(BS2005625). Supported by the Social Development Foundation of Jiangsu Province (BS2005625).

[作者简介] 张健锋, 硕士生, 住院医师, E-mail: zhangjf05090@163.com; 朱慧珺, 主管技师, E-mail: zjf.78@163.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0513-85817191, E-mail: mzb63@163.com

1.4 免疫荧光染色结果的判断 根据染色阳性细胞荧光强度评定。APRIL 及其受体蛋白阳性染色定位于细胞质或胞膜,APRIL 和 BCMA 染色呈绿色,TACI 染色呈红色。荧光亮度判断:“—”无或可见微弱的自发荧光;“+”能见到明确可见的荧光。阴性对照采用 0.01 mmol/L PBS 替代一抗。

1.5 统计学处理 应用 Stata 10.0 统计软件进行 Fisher 确切概率法统计分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 H-E 染色结果 30 例胃癌组织和 10 例癌旁正常组织均经 H-E 染色证实(图 1)。

2.2 免疫荧光染色结果 胃癌组织中 APRIL 和 BCMA 蛋白阳性表达呈绿色荧光,TACI 呈红色荧光,位于胞膜或胞质,而正常组织主要位于胞膜(图 2);胃癌组织中 APRIL 和 TACI 双标时当两者表达同一部位时呈黄色。APRIL 蛋白表达阳性率为 86.7%(26/30),10 例癌旁正常组织全部阴性

(0/10),两者差别具有统计学意义($P<0.01$);而胃癌组织中 BCMA 和 TACI 蛋白阳性率分别为 76.7%(23/30)、83.3%(25/30),与癌旁正常组织无统计学差异[50%(5/10)、70%(7/10)]。

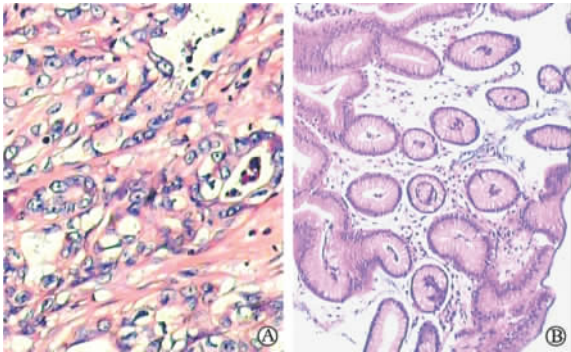


图 1 胃癌组织(A)、胃正常组织(B)的 H-E 染色
Original magnification: ×400

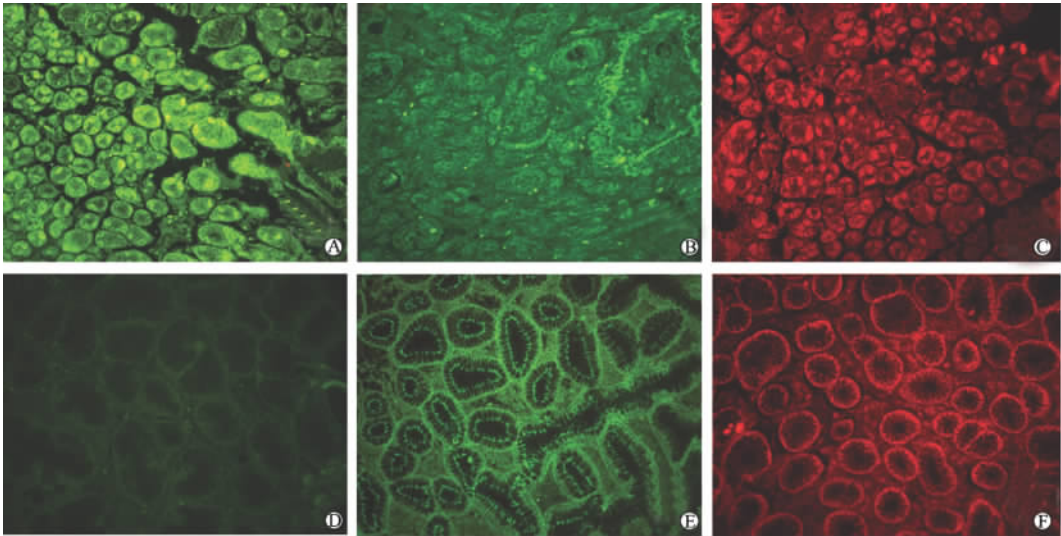


图 2 胃癌(A-C)和正常胃黏膜组织(D-F)APRIL 及其受体蛋白表达的免疫荧光染色结果
A,D: APRIL; B,E: BCMA; C,F: TACI. Original magnification: ×400

2.3 不同临床病理特征下 APRIL 及其受体蛋白的表达 胃癌组织中 APRIL 及其受体蛋白表达在不同的肿瘤大小(直径<5 cm 和≥5 cm)、分化程度(高中和低分化)、浸润

深度(是否浸润浆膜层)、淋巴结转移(有和无)和 TNM 临床分期(Ⅰ+Ⅱ和Ⅲ+Ⅳ)之间无统计学差异(表 1)。

表 1 不同病理特征下 APRIL 及其受体蛋白的表达

病理特征	APRIL		P	BCMA		P	TACI		P
	—	+		—	+		—	+	
肿瘤大小	<5 cm	1	0.602	3	11	1.000	2	12	1.000
	≥5 cm	3		4	12		3	13	
分化程度	高、中	3	0.274	4	8	0.392	3	9	0.364
	低	1		3	15		2	16	
浸润深度	未及浆膜层	1	1.000	3	8	1.000	2	9	1.000
	浆膜及以外	3		4	15		3	16	
淋巴转移	有	1	1.000	3	5	0.345	2	8	0.637
	无	3		4	18		3	19	
临床分期	Ⅰ+Ⅱ	1	0.613	3	10	1.000	2	11	1.000
	Ⅲ+Ⅳ	3		4	13		3	14	

3 讨 论

APRIL 是由 TNFSF13A 基因编码的 II 型跨膜单链糖蛋白, 由 250 个氨基酸组成^[1]。APRIL 蛋白在细胞内合成后可以可溶性形式(sAPRIL)分泌到胞外, 而 sAPRIL 在细胞外与膜蛋白 TWEAK 融合形成 TWE-PRIL, 后者可能代表着 APRIL 的膜结合形式^[7]。APRIL 蛋白可以通过自分泌、内分泌及旁分泌的形式与靶细胞表面受体 BCMA 和 TACI 结合, 激活 NF- κ B 途径, 从而促进肿瘤细胞增殖, 抑制肿瘤细胞凋亡^[8-9]。

APRIL mRNA 在人类许多肿瘤细胞株(结肠癌细胞株 SW480、肺癌细胞株 A459、黑色素瘤细胞株 G361 和人肝癌细胞株 HepG2 等)和肿瘤组织(结肠癌、胃癌、食管癌、肝癌、淋巴瘤和前列腺癌等)中高表达^[1, 3-5, 10-11]。低浓度重组 APRIL 能刺激体外培养的多种人类肿瘤细胞株增殖, 转染 APRIL 基因的 NIH-3T3 裸鼠移植瘤肿瘤生长速度明显高于 NIH-3T3 裸鼠移植瘤。外加可溶性 BCMA 能竞争性抑制 APRIL 与结肠癌细胞株 HT29 表面受体 BCMA 的结合, 阻碍由 APRIL 引起的肿瘤细胞增殖, 抑制裸鼠 HT29 移植瘤生长^[12]。Roth 等^[13]在 APRIL 基因转移实验中发现, APRIL 能防止瘤细胞免受死亡配体 CD95L、FasL 和凋亡诱导配体 TRAIL/Apo2L 诱导的细胞凋亡。Hendriks 等^[14]发现, APRIL 蛋白还能与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPG)特异性结合, 通过与多种生长因子结合或者使 APRIL 其他受体之间存在协同作用从而使细胞增殖。Mhaweche-Fauceglia 等^[6]证实胃癌组织可高表达 APRIL 蛋白, 并且可能是以与 HSPG 结合的方式存在, 但有关其蛋白在胃癌组织中表达的生物学意义尚未被进一步阐明。

本研究应用间接免疫荧光法检测胃癌组织中 APRIL 及其受体蛋白的表达, 发现 APRIL 蛋白在胃癌组织中呈高表达, 蛋白主要分布于胞膜和胞质中, 而癌旁正常组织表达全部阴性, APRIL 蛋白表达与肿瘤大小、分化程度、浸润深度、有无淋巴结转移和 TNM 临床分期等临床病理特征无关。这些结果提示 APRIL 作为一个重要的肿瘤增殖刺激因子、一种胞膜或胞质蛋白, 可能在诱导胃癌发生发展过程中起一定作用, 检测其表达水平可能有助于胃癌的早期诊断。APRIL 受体 BCMA 和 TACI 蛋白在胃癌和正常组织中的表达水平无统计学差异, 说明可能还存在肿瘤特异性的 APRIL 未知受体, 仍有待进一步的研究探讨。

[参 考 文 献]

[1] Hahne M, Kataoka T, Schröter M, Hofmann K, Irmeler M, Bodmer J L, et al. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth[J]. J Exp Med, 1998, 188: 1185-1190.

[2] Tangye S G, Bryant V L, Cuss A K, Good K L. BAFF, APRIL and human B cell disorders[J]. Semin Immunol, 2006, 18: 305-317.

[3] 毛振彪, 张冬雷, 施 健, 黄介飞, 王唯一, 孟宪镛. 胃黏膜癌变过程中增殖诱导配体及其受体表达水平分析[J]. 中华消化杂志, 2005, 25: 476-479.

[4] 张冬雷, 鞠少卿, 施 健, 王惠民, 倪红兵, 苏建友. 人肝癌组织中 APRIL 及其受体 mRNA 水平的定量测定[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28: 433-436.

[5] 王唯一, 毛振彪, 潘正平, 黄介飞, 邵建国. 人胰腺癌组织中增殖诱导配体蛋白的表达及意义[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28: 214-215.

[6] Mhaweche-Fauceglia P, Kaya G, Sauter G, McKee T, Donze O, Schwaller J, et al. The source of APRIL up-regulation in human solid tumor lesions[J]. J Leukoc Biol, 2006, 80: 697-704.

[7] López-Fraga M, Fernández R, Albar J P, Hahne M. Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase[J]. EMBO Rep, 2001, 2: 945-951.

[8] Endo T, Nishio M,ENZLER T, Cottam H B, Fukuda T, James D F, et al. BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway[J]. Blood, 2007, 109: 703-710.

[9] Chiu A, Xu W, He B, Dillon S R, Gross J A, Sievers E, et al. Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL[J]. Blood, 2007, 109: 729-739.

[10] Bossen C, Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling[J]. Semin Immunol, 2006, 18: 263-275.

[11] Okano H, Shiraki K, Yamanaka Y, Inoue H, Kawakita T, Saitou Y, et al. Functional expression of a proliferation-related ligand in hepatocellular carcinoma and its implications for neovascularization[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11: 4650-4654.

[12] Rennert P, Schneider P, Cachero T G, Thompson J, Trabach L, Hertig S, et al. A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth[J]. J Exp Med, 2000, 192: 1677-1684.

[13] Roth W, Wagenknecht B, Klumpp A, Naumann U, Hahne M, Tschopp J, et al. APRIL, a new member of the tumor necrosis factor family, modulates death ligand-induced apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2001, 8: 403-410.

[14] Hendriks J, Planelles L, de Jong-Odding J, Hardenberg G, Pals S T, Hahne M, et al. Heparan sulfate proteoglycan binding promotes APRIL-induced tumor cell proliferation[J]. Cell Death Differ, 2005, 12: 637-648.

[本文编辑] 贾泽军