论著

文章编号:1000-5404(2010)05-0478-04

Cyr61在人肿瘤组织中的表达

李志强,司维柯,丁 伟,李 军,潘 静 (400038 重庆,第三军医大学医学检验系临床血液学教研室)

[摘要] **目的** 观察分析富含半胱氨酸61(cysteine-rich61, Cyr61)在人类肿瘤组织中的表达情况。**方法** 采用HE染色、免疫组化的方法检测多组织肿瘤组织芯片和30例肿瘤组织标本(包括食管癌、胃癌、直肠癌、肺癌、乳腺癌和肝癌组织标本各5例)中Cyr61的表达。**结果** 组织芯片中79%(38/48)的肿瘤组织Cyr61表达阳性,93%(28/30)肿瘤组织标本中Cyr61表达阳性。其中神经、食管和甲状腺等肿瘤组织中呈强阳性表达,胃、肝、结肠、直肠、肺、肾、子宫、皮肤、卵巢、乳腺等组织的肿瘤呈阳性表达,在膀胱、前列腺和胰腺等肿瘤组织中表达较弱。**结论** Cyr61在多数肿瘤组织中均过表达,在不同肿瘤组织中表达程度不同,Cyr61可能成为新的肿瘤标志物应用于多种肿瘤的诊断。

[关键词] Cyr61;组织阵列分析;肿瘤, 各部位;免疫组织化学;人类

[中图法分类号] R730.2;R341;R446.8 [文献标志码] A

Cyr61 expression in several human tumor tissues

Li Zhiqiang, Si Weike, Ding Wei, Li Jun, Pan Jing (Department of Clinical Hematology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe and analyze the expression of cysteine-rich61 (Cyr61), a secreted, cysteine-rich, heparin-binding protein encoded by a growth factor-inducible immediate-early gene, in a variety of human tumors, in order to explore its role as a new marker for tumor diagnosis. **Methods** HE and immunohistochemical staining were used to detect the expression of Cyr61 in several organ tumor tissue array and 30 human tumors samples. **Results** The expression of Cyr61 was found in human tumor tissue array and in human tumor samples with positive straining in 79% (38/48) and 93% (28/30), respectively. Strong positive staining was found in the tumors from the brain, esophagus and thyroid. Positive staining was seen in the tumors from the stomach, liver, colon, rectum, lungs, kidneys, uterine, skin, ovary and breasts. Negative staining was defined in the tumors from the prostate, bladder and pancreas. **Conclusion** Overexpression of Cyr61 is seen in many human tumors and the expression is different in different types of tumors. Cyr61 is probably used to diagnose the tumor as a new marker.

[**Key words**] Cyr61; tissue microarray; neoplasms by site; immunohistochemistry; human

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30672393). Corresponding author: Si Weike, Tel: 86-23-68752312, E-mail: weikesi@yahoo.com.cn

富含半胱氨酸61(cysteine-rich61, Cry61)属CCN家族成员之一,是一种分泌型的细胞外基质蛋白,属即刻早期反应基因,具有促进细胞黏附、迁移、增殖及血管生成的功能[1]。近年的研究发现Cyr61与肿瘤发生密切相关[2-6],本研究旨在广谱观察Cyr61在多种肿瘤组织中的表达情况,探讨Cyr61是否可作为肿瘤诊断的标志物,为进一步研究其与肿瘤发生的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 组织芯片

Cybrdi公司多器官肿瘤组织芯片(CC00-01-001),包括发生于16种组织(器官)的肿瘤标本共48例(包括神经、食管、胃、肝、结肠、直肠、肺、膀胱、肾、甲状腺、胰腺、子宫、皮肤、卵巢、乳腺和前列腺组织,每种组织肿瘤由3例不同患者标本组成),呈8×6排列,芯片于4 ℃避光保存。1张行HE染色以确定肿瘤部位。

[基金项目] 国家自然科学基金(30672393)

[通信作者] 司维柯,电话:(023)68752312,E-mail:weikesi@yahoo.com.cn

1.2 病例标本

收集第三军医大学西南医院病理学研究所石蜡包埋肿瘤组织标本30例,包括食管癌、胃癌、直肠癌、肺癌、乳腺癌、肝癌组织标本各5例,其中男性18例,女性12例,年龄35~73岁。

1.3 试剂

北京中杉公司免疫组化试剂盒SP-9001、SAP-9101,瑞典IDL公司BCIP/NBT显色试剂;Santa Cruz公司Cyr61兔多克隆抗体。

1.4 免疫组化染色及结果判断

1.4.1 组织芯片 石蜡切片脱蜡、水化,蒸馏水洗,PBS浸泡2 min;热修复法进行抗原修复,10%正常羊血清封闭,室温孵育10 min;倾去血清,勿洗,滴加Cyr61一抗工作液(以PBS按1∶100稀释),4 ℃孵育过夜;PBS冲洗,5次×10 min;滴加生物素标记羊抗兔IgG工作液,37 ℃孵育40 min;PBS冲洗,5次×10 min;滴加碱性磷酸酶标记链霉卵白素工作液,室温孵育20 min。PBS冲洗,3次×5 min;显色剂显色(BCIP/NBT);自来水充分冲洗,封片,镜下观察,阳性结果为组织中出现蓝黑色颗粒。用NIS-Elements图像分析系统分析,用阳性细胞的平均吸光度值(MD)表示Cyr61蛋白的表达程度,以平均吸光度值小于0.15记为阴性,0.15~0.25记为弱阳性,0.25~0.35记为阳性,大于0.35记为强阳性。

1.4.2 病例标本检测 采用免疫组化S-P法,按照SP-9001试剂盒说明书操作,Cyr61工作液以PBS按1∶100稀释,阴性对照以PBS代替一抗,滴加DAB显色剂显色,苏木精复染,镜下观察。阳性结果为组织中出现棕黄色颗粒,用NIS-Elements图像分析系统分析,每张切片以高倍镜(40×)选取5个视野,且所选视野可以代表整张切片的阳性程度,测定其阳性细胞的平均光密度值(MD)表示Cyr61蛋白的表达情况。

1.5 统计学处理

采用SPSS 13.0软件,Cyr61蛋白表达量以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

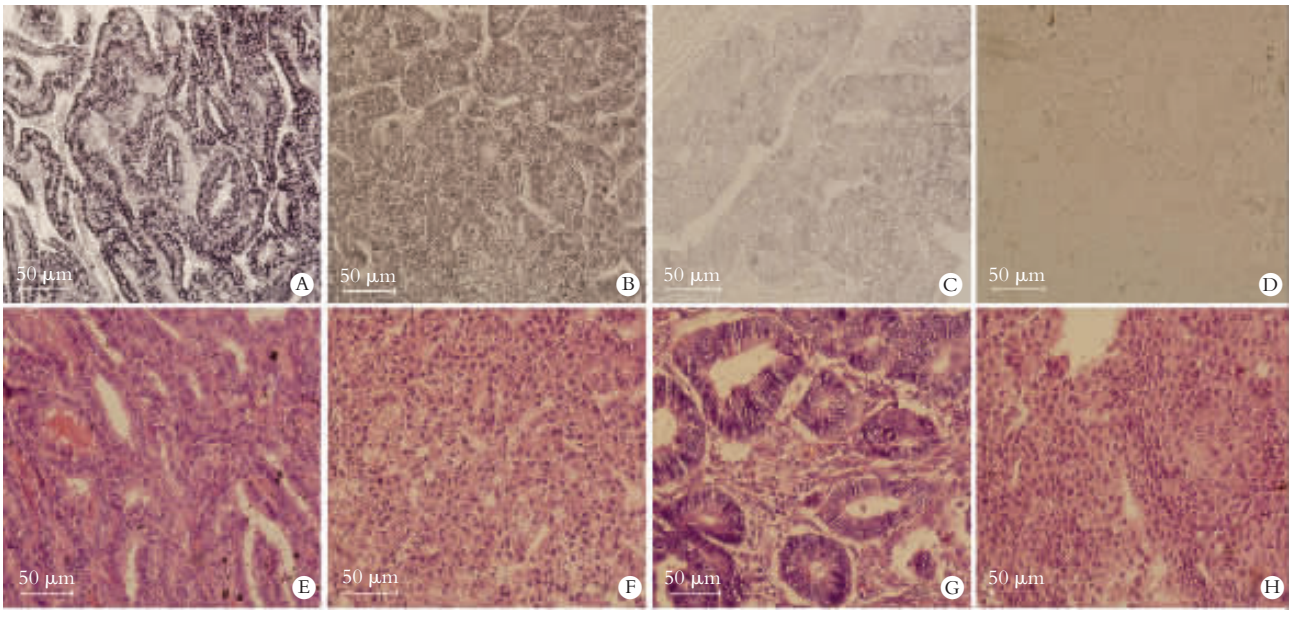
2 结果

2.1 组织芯片中各组织肿瘤中Cyr61蛋白表达情况

多系统肿瘤组织芯片CC00-01-001染色后,对照HE染色图片找出肿瘤组织部位观察,发现79%(38/48)的肿瘤组织Cyr61表达阳性,呈蓝黑色颗粒,主要位于细胞膜和细胞质(图1)。表1为Cyr61在16种组织的肿瘤中的表达情况,其表达强度由阳性细胞的平均吸光度值表示,结果项显示的为依据1.4.1的原则确定的每种组织肿瘤中Cyr61阳性、弱阳性及阴性表达的例数;可见不同组织的肿瘤中Cyr61表达程度各不相同,神经、食管和甲状腺等组织的肿瘤呈强阳性表达,胃、肝、结肠、直肠、肺、肾、子宫、皮肤、卵巢、乳腺等组织的肿瘤呈阳性表达,膀胱、前列腺和胰腺等组织的肿瘤表达较弱。

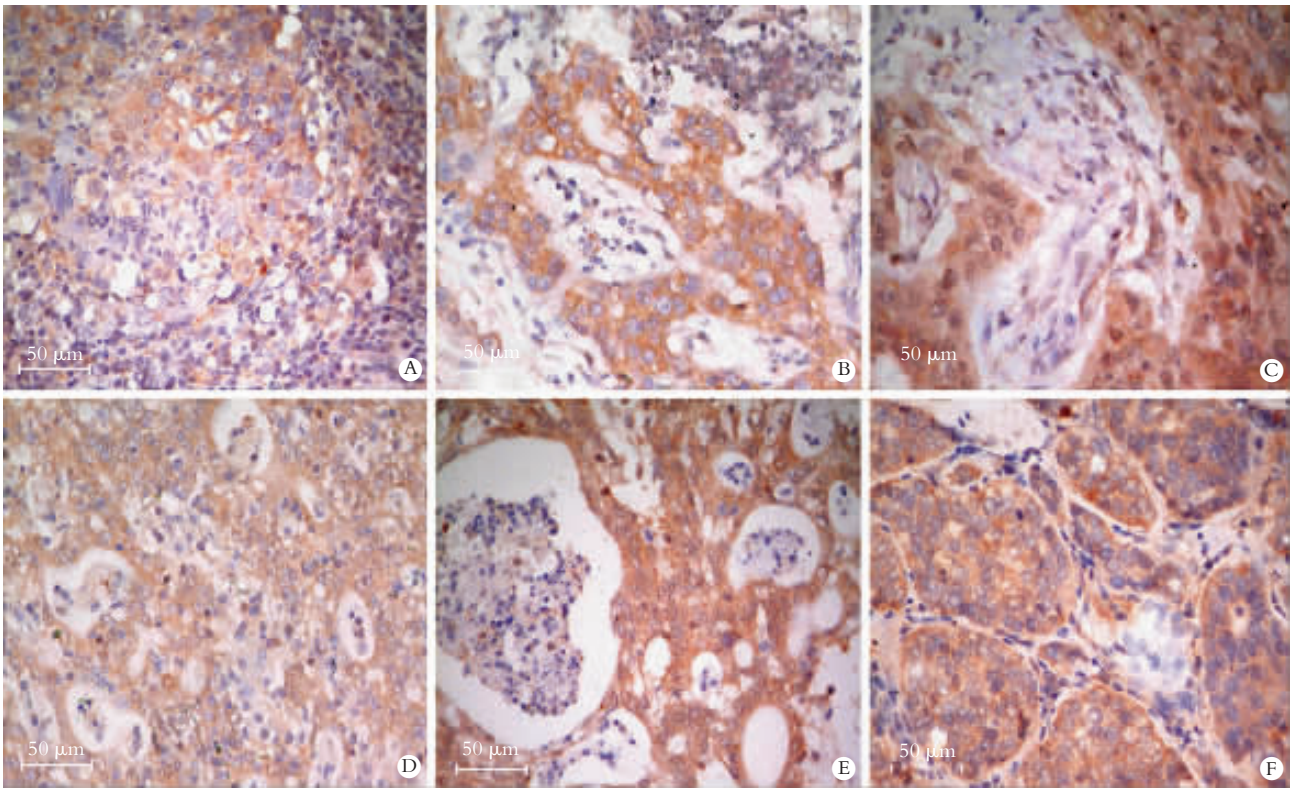
表1 组织芯片中各组织肿瘤中Cyr61蛋白表达情况($n=3$)

部位	结果			强度
	阳性	弱阳性	阴性	
神经	3	0	0	0.385±0.010
食管	3	0	0	0.393±0.012
胃	2	1	0	0.324±0.021
肝	3	0	0	0.328±0.011
结肠	2	1	0	0.266±0.008
直肠	2	0	1	0.256±0.018
肺	1	2	0	0.323±0.015
膀胱	1	0	2	0.165±0.032
肾	0	2	1	0.293±0.009
甲状腺	3	0	0	0.436±0.026
胰腺	0	1	2	0.126±0.010
子宫	2	1	0	0.316±0.028
皮肤	1	2	0	0.320±0.011
乳腺	2	0	1	0.298±0.018
卵巢	0	2	1	0.310±0.015
前列腺	1	0	2	0.189±0.020



A~D:免疫组化(SAP)染色;E~H:HE染色;A、E:乳头状甲状腺癌 Cyr61呈强阳性表达;B、F:肝癌 Cyr61呈强阳性表达;C、G:结肠癌 Cyr61呈弱阳性表达;D、H:膀胱移行细胞癌 Cyr61呈阴性表达

图1 免疫组化和HE染色观察组织芯片各肿瘤中Cyr61蛋白表达



A～F:分别为肺癌、乳腺癌、食管癌、胃癌、直肠癌、肝癌

图2 6种肿瘤组织标本中Cyr61蛋白表达情况 (S-P)

2.2 病例标本中Cyr61蛋白表达情况

6种共30例肿瘤组织标本中,93%(28/30)的肿瘤组织Cyr61表达阳性,阳性呈棕黄色颗粒,位于细胞质,其中肺癌3例阳性,但表达较弱;乳腺癌、食管癌、肝癌、胃癌和直肠癌5例均有表达。Cyr61在各种肿瘤中的表达强度为:肺癌为(0.247±0.043),乳腺癌(0.408±0.065),食管癌(0.460±0.039),胃癌(0.469±0.051),直肠癌(0.378±0.051),胃癌和食管癌表达程度最高,见图2。

3 讨论

近年来,Cyr61与肿瘤的关系越来越受关注,国内外研究显示Cyr61与多种肿瘤的发生、发展及侵袭有着密切的联系。本研究应用免疫组化的方法研究了多系统肿瘤组织芯片中肿瘤组织Cyr61蛋白表达的情况,发现79%(38/48)的肿瘤组织Cyr61表达阳性,而6种30例肿瘤组织标本切片的免疫组化结果也显示93%(28/30)的肿瘤组织Cyr61表达阳性。两组标本中Cyr61蛋白的阳性率有一定差异,主要是因为肿瘤组织芯片包含发生于16种组织的肿瘤标本,而我们的病例组织标本只包含发生于6种组织的肿瘤标本,组织芯片包含的组织种类多且全面,能相对真实地反映Cyr61在人体肿瘤中的表达情况,而我们取的病例包含的组织种类少,且标本可能正是Cyr61表达高的组织,因此两种方法得出的阳性率会有一定的差别。另外组织芯片上与我们病例标本相对应的肿瘤(食管癌、胃癌、直肠癌、肺癌、乳腺癌、肝癌),其Cyr61的阳性表达率也达到为89%。从表达程度上看,Cyr61在甲状腺肿瘤中的表达量最高,呈强阳性。目前国内外少见研究说明Cyr61与甲状腺肿瘤的关系。Wasenius等[2]发现在甲状腺癌cDNA芯片检测中,Cyr61表达较正常组织降低,但没有说明Cyr61对甲状腺肿瘤的作用机制。另外组织芯片中的3例肝癌组织和5例肝癌病例中Cyr61均呈阳性表达,而目前Cyr61与肝癌的关系尚有争论,我们前期的研究[3]显示65%的肝癌组织Cyr61呈阳性表达,且其表达与β-catenin的表达呈正相关,提示在肝癌中Cyr61可能通过与Wnt/β-catenin信号通路作用,从而对肝癌起调节作用。

Cyr61在不同系统的肿瘤中发挥不同作用,对于某些肿瘤Cyr61起促癌基因的作用。神经胶质瘤细胞和组织中Cyr61表达增高,且其表达与肿瘤的发展、患者的年龄、性别及疾病的预后有关,可以做为诊断的标志物和治疗的靶点[4,5]。食管癌中Cyr61表达异常,且与肿瘤的局部淋巴结转移和肿瘤大小有密切关系,可

以作为判断预后的因子[6]。体外实验[7]表明 Cyr61 可激活胃癌细胞株 AGS 细胞核因子-κB 通路,上调了 COX-2 因子,从而提高了 AGS 细胞的侵袭力,Cyr61 在胃癌组织中的表达与肿瘤大小、浸润深度、TNM 分期及淋巴结转移相关[8]。乳腺癌中 Cyr61 呈高表达,与肿瘤的预后、结节浸润及侵袭力密切相关[9,10],体外实验[11]发现 Cyr61 通过整联蛋白/NF-κB/XIAP 信号通路抑制乳腺癌细胞的凋亡,从而抵抗化疗药物对肿瘤的作用。其他如前列腺癌[12]、结肠癌等[13] Cyr61 也呈高表达。而在其他一些肿瘤中 Cyr61 起相反的作用。研究[14]表明 Cyr61 通过 β-catenin-c-myc-p53 途径抑制非小细胞肺癌生长,起抑癌基因作用。在宫颈癌、子宫内膜癌[15,16]中 Cyr61 表达量降低,其过表达可抑制肿瘤细胞的生长和侵袭。

Cyr61 这种即促癌又抑癌的生物学功能尚未有明确的解释。本研究显示不同组织的肿瘤其 Cyr61 的表达量各不相同,提示 Cyr61 对肿瘤的作用具有组织特异性。有研究[17]报道在不同来源的肿瘤中与不同的整联蛋白受体结合,包括 $\alpha_v\beta_3$、$\alpha_v\beta_5$、$\alpha_6\beta_1$、$\alpha_m\beta_2$、$\alpha_{IIb}\beta_3$ 等,激活不同的信号通路,从而产生不同的生物学效应。一方面,Cyr61 与 $\alpha_6\beta_1$ 结合,通过下游的 β-catenin、c-myc 诱导 p53 激活,从而产生抗增殖的作用;而另一方面,Cyr61 与 $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ 结合,PI3K/Akt、NF-κB 促进抗凋亡蛋白 XIAP 的表达,则细胞的凋亡就会受到抑制。另外,Cyr61 可影响的因子还有 MAPK/ERK kinase、Bax、Bad 等,说明 Cyr61 对肿瘤细胞的影响是通过多因素、多途径完成的,而这些因子和通路在不同组织的细胞中存在的状态有很大差异,因此 Cyr61 对不同肿瘤细胞作用的结果也就不同,具体的机制还需要做深入的研究。

本研究观察了 Cyr61 在多种肿瘤组织中的表达情况,提示 Cyr61 对于肿瘤的临床诊断、判断发展和预后有一定的价值,但在分子机制上的探讨还有待进一步深入。未来的研究应对某一种肿瘤发生、发展过程中 Cyr61 的表达变化加以动态监测,另外,Cyr61 如何与多种因子和信号通路相互作用,发挥其对肿瘤的生物学效应,也应作为研究重点。

参考文献:

[1] Kireeva M L, Mo F E, Yang G P, *et al*. Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(4): 1326-1334.

[2] Wasenius V M, Hemmer S, Kettunen E, *et al*. Hepatocyte growth factor receptor, matrix metalloproteinase-11, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and fibronectin are up-regulated in papillary thyroid carcinoma: a cDNA and tissue microarray study[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(1): 68-75.

[3] 孙世俊, 司维柯, 丁伟, 等. Cyr61 与 β-catenin 在肝癌组织和细胞株中表达的相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(6): 485-488.

[4] Xie D, Yin D, Tong X, *et al*. Cyr61 is overexpressed in gliomas and involved in integrin-linked kinase-mediated Akt and beta-catenin-TCF/Lef signaling pathways[J]. Cancer Res, 2004, 64(6): 1987-1996.

[5] Xie D, Yin D, Wang H J, *et al*. Levels of expression of CYR61 and CTGF are prognostic for tumor progression and survival of individuals with gliomas[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(6): 2072-2081.

[6] Huang X, Xiao D W, Xu L Y, *et al*. Prognostic significance of altered expression of SDC2 and CYR61 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2009, 21(4): 1123-1129.

[7] Lin M T, Zuon C Y, Chang C C, *et al*. Cyr61 induces gastric cancer cell motility/invasion *via* activation of the integrin/nuclear factor-kappaB/cyclooxygenase-2 signaling pathway[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(16): 5809-5820.

[8] 张布衣, 姚根有. CCN 家族成员 CYR61 NOV mRNA 在胃癌中的表达及意义[J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(14): 814-818.

[9] Jiang W G, Watkins G, Fodstad O, *et al*. Differential expression of the CCN family members Cyr61, CTGF and Nov in human breast cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2004, 11(4): 781-791.

[10] Nguyen N, Kuliopulos A, Graham R A, *et al*. Tumor-derived Cyr61 (CCN1) promotes stromal matrix metalloproteinase-1 production and protease-activated receptor 1-dependent migration of breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(5): 2658-2665.

[11] Lin M T, Chang C C, Chen S T, *et al*. Cyr61 expression confers resistance to apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by a mechanism of NF-kappaB-dependent XIAP up-regulation[J]. J Biol Chem, 2004, 279(23): 24015-24023.

[12] Lv H, Fan E, Sun S, *et al*. Cyr61 is up-regulated in prostate cancer and associated with the p53 gene status[J]. J Cell Biochem, 2009, 106(4): 738-744.

[13] 张晓君, 李建生, 李珍杰, 等. Cyr61、VEGF 在结肠癌中的表达及临床意义[J]. 临床消化病杂志, 2008, 20(4): 227-229, 244.

[14] Tong X, O'Kelly J, Xie D, *et al*. Cyr61 suppresses the growth of non-small-cell lung cancer cells via the beta-catenin-c-myc-p53 pathway[J]. Oncogene, 2004, 23(28): 4847-4855.

[15] Song J Y, Lee J K, Lee N W, *et al*. Microarray analysis of normal cervix, carcinoma *in situ*, and invasive cervical cancer: identification of candidate genes in pathogenesis of invasion in cervical cancer[J]. Int J Gynecol Cancer, 2008, 18(5): 1051-1059.

[16] Chien W, Kumagai T, Miller C W, *et al*. Cyr61 suppresses growth of human endometrial cancer cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279(51): 53087-53096.

[17] Chen Y, Du X Y. Functional properties and intracellular signaling of CCN1/Cyr61[J]. J Cell Biochem, 2007, 100(6): 1337-1345.

(**收稿**:2009-07-20;**修回**:2009-09-26)

(编辑 汪勤俭)