论著

文章编号:1000-5404(2014)03-0232-04

legumain在胃癌中的表达及其临床意义

冯 倩,刘 杞,向 荣,孙 航,刘燕倩,胡怀东 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院病毒性肝炎研究所,国家教育部感染性疾病分子生物学重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨legumain在胃癌中的表达以及临床意义。**方法** 采用免疫组织化学染色方法检测胃腺癌组织芯片上50例胃癌组织及2007年9月至2011年6月期间重庆医科大学附属第二医院普通外科收治的210例胃癌患者(其中男性140例,女性70例,平均年龄65岁)经临床手术切除的胃癌组织中legumain的表达,分析其与多项临床指标间的相关性,运用单因素和多因素生存分析研究legumain表达以及各项临床指标与预后的关系。**结果** 芯片上50例胃癌组织中,29例(58%)高表达legumain,而在50例相应正常组织中只有16例(32%)高表达legumain,胃癌组织中legumain表达较相应正常组织中高($P<0.05$);在210例临床手术切除胃癌组织切片中,124例(59%)高表达legumain;legumain与多项临床指标间具有一定程度的相关性;生存分析结果显示legumain高表达($P<0.01$)、MMP-9高水平($P<0.05$)、肿瘤远处转移($P<0.01$)以及肿瘤低分化($P<0.01$)是影响胃癌预后的因素。**结论** legumain在胃癌组织中高表达,高表达legumain的胃癌患者其生存率明显降低,legumain高表达是影响胃癌临床预后的独立危险因素。

[关键词] legumain;胃癌;MMP-9;远处转移;预后
[中图法分类号] R345; R730.23; R735.2 [文献标志码] A

Prognostic significance of legumain overexpression in gastric cancer patients

Feng Qian, Liu Qi, Xiang Rong, Sun Hang, Liu Yanqian, Hu Huaidong (Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Disease of Ministry of Education, Institute for Viral Hepatitis, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] Objective To study the expression of legumain in gastric cancer patients and its prognostic significance. Methods Legumain expression was tested with immunohistochemical staining in 50 cases of gastric cancer tissues and 50 corresponding normal tissues on tissue chips and in 210 cases of gastric cancer patients (including 140 male and 70 female with mean age of 65 years, which were treated in the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University from September 2007 to June 2011). The correlation between legumain expression and various clinical parameters was evaluated. Both the univariate and multivariate survival analysis were performed to evaluate the prognostic significance of legumain expression and all the clinical parameters. Results On the tissue chips, 29 (58%) of 50 gastric cancer tissues and only 16 (32%) of 50 corresponding normal tissues showed legumain overexpression, with statistical difference ($P<0.05$). Legumain overexpression was also observed in 124 (59%) of 210 gastric cancer patients. High expression of legumain was correlated with various clinical parameters. Patients with legumain overexpression ($P<0.01$), high level of MMP-9 ($P<0.05$), distant metastasis ($P<0.01$) and poor tumor differentiation ($P<0.01$) resulted in bad prognosis. Conclusion Legumain is overexpressed in gastric cancer tissues compared with corresponding normal tissues. Gastric cancer patients with higher expression of legumain have a lower survival rate. Legumain overexpression is an independent risk factor for clinical prognosis of gastric cancer patients. Legumain may affect the survival rate of gastric cancer patients via increase the level of MMP-9 and tumor metastasis.

[**Key words**] legumain; gastric cancer; MMP-9; distant metastasis; prognosis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30572116). Corresponding author: Hu Huaidong, E-mail: hhd0126@163.com

胃癌是高发的恶性肿瘤之一,预后差,病死率高[1-3]。进展期胃癌往往生长迅速,发现时较多已进入中晚期阶段,5年生存率低[4]。临床上根治术是治

[基金项目] 国家自然科学基金(30572116)
[通信作者] 胡怀东,E-mail:hhd0126@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131121.1720.013.html(2013-11-21)

疗胃癌的首选方式,而对胃癌预后的判断,仍停留在较传统的方式,局限于肿瘤组织学类型、淋巴结转移和TNM 分期等[5],缺乏新的思路。legumain 是近年来发现的一种半胱氨酸蛋白酶[6],在多种肿瘤组织中呈现高表达,如乳腺癌、结肠癌等[7-9],它可能在肿瘤的发生和发展过程中具有重要作用。本研究通过检测胃癌组织中 legumain 的表达情况,分析 legumain 表达与肿瘤临床预后的关系,以期能找到新的胃癌预后因子,并且对胃癌的治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 材料

胃癌组织芯片购自西安艾丽娜生物科技有限公司(BC01114),其中Ⅰa 期 0 例,Ⅰb 期 7 例,Ⅱa 期 12 例,Ⅱb 期 14 例,Ⅲa 期 10 例,Ⅲb 期 5 例,Ⅲc 期 2 例,Ⅳ期 0 例;1 级(高分化)19 例,2 级(中分化)18 例,3 级(低分化)13 例。胃癌组织切片取自 2007 年 9 月至 2011 年 6 月期间重庆医科大学附属第二医院普通外科(胃肠外科)210 例诊断为胃部恶性肿瘤的住院患者,其中男性 140 例,女性 70 例,所有患者行手术治疗。小鼠抗人 legumain 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司(sc-133234),辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记羊抗小鼠二抗购自 Santa Cruz 公司(sc-2010),DAB 显色试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司(CW0125A)。所有患者的临床资料来自其医疗记录,平均年龄为 65(32~89)岁,平均随访时间为 24.7 个月。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 5 μm 石蜡切片经常规脱蜡水化后,加入柠檬酸钠(0.01 mol/L,pH=6.0)微波 2 min 进行抗原修复,再用 3% H_2O_2 室温孵育 10 min 以封闭内源性过氧化物酶活性,用 5% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)室温封闭 1 h 后滴加 1∶50 小鼠抗人 legumain 一抗,阴性对照滴加磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS),4 ℃孵育过夜,再滴加 1∶500 HPR 标记羊抗小鼠二抗,室温孵育 1 h,DAB(3,3′-diaminobenzidine)显色,苏木精复染后脱水透明,中性树胶封片。

1.2.2 免疫组织化学结果评价 组织芯片染色情况由 2 位研究者独立观察评价。组织染色强度分为阴性、弱染色、中染色和强染色;组织染色比例分为 <50% 和≥50%;染色强度为阴性或弱染色,同时染色比例 <50% 的组织判定为低表达,其余为高表达。

1.2.3 临床资料评价 ①组织坏死程度分为≤10% 和 >10%。②血清基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9,MMP-9)>400 ng/mL 为高表达;血清血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)>500 pg/mL 为高表达。③分析 legumain 表达与各个临床指标间的相关性。④分析包括 legumain 表达在内各个指标与胃癌患者临床预后的关系。

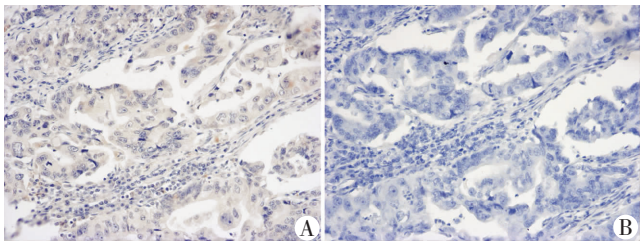
1.3 统计学处理

legumain 在胃癌组织及相应正常组织中的差异表达用配对 McNemar 检验;legumain 的表达与各个临床指标间的相关性分析采用 χ^2 检验,legumain 的表达与各个临床指标间相关性大小用相关系数 r 值表示;单因素生存分析采用 Kaplan-Meier 模型,多因素生存分析采用 Cox 回归模型。所有统计分析采用 SPSS 17.0 统计软件。

2 结果

2.1 legumain 在胃癌中的表达

组织芯片上 50 例胃癌组织中 29 例(58%)高表达 legumain,21 例(42%)低表达;50 例相应正常组织中 16 例(32%)高表达,34 例(68%)低表达。胃癌组织与相应正常组织比较,表达差异有统计学意义($P<0.05$)。210 例胃癌组织切片中,124 例(59%)高表达 legumain,其余为低表达。高表达 legumain 的胃癌组织可见肿瘤细胞细胞质被染成清晰的棕黄色,染色强度强,染色面积大(图 1)。



A:胃癌组织;B:未添加小鼠抗人 legumain 一抗的阴性对照

图 1 免疫组化检测 legumain 在胃癌组织中的表达 (SABC ×200)

2.2 legumain 表达与各临床指标间相关性分析

除了与年龄差异无统计学意义($P>0.05$)外,legumain 表达与临床各指标差异均有统计学意义($P<0.01$)。其中,legumain 表达与患者性别($r=-0.192$)、肿瘤分化程度($r=0.166$)和肿瘤临床分期($r=0.269$)呈弱相关,与肿瘤远处转移($r=0.462$)、MMP-9 水平($r=0.482$)和 VEGF 水平($r=0.411$)呈中等相关,而与肿瘤坏死($r=0.706$)呈强相关。见表 1。

表 1 legumain 表达与各临床指标间相关性分析[例(%)]

指标	legumain 低表达	legumain 高表达
年龄(岁)		
<65	36(17.1)	42(20.0)
≥65	50(23.8)	82(39.0)
性别		
男性	48(22.9)	92(43.8)[a]
女性	38(18.1)	32(15.2)
分化程度		
高分化	34(16.2)	22(10.5)[b]
中分化	34(16.2)	74(35.2)
低分化	18(8.6)	28(13.3)
临床分期		
Ⅰ&Ⅱ	48(22.9)	36(17.1)[c]
Ⅲ&Ⅳ	38(18.1)	88(41.9)
远处转移		
无	72(34.3)	46(21.9)[d]
有	14(6.7)	78(37.1)
坏死		
≤10%	72(34.3)	16(7.6)[e]
>10%	14(6.7)	108(51.4)
MMP-9		
高表达	64(30.5)	38(18.1)[f]
低表达	22(10.5)	86(41.0)
VEGF		
高表达	63(30.0)	39(18.6)[f]
低表达	23(11.0)	85(40.5)

a:$P<0.01$,与女性比较;b:$P<0.01$,与低分化比较;c:$P<0.01$,与临床Ⅲ&Ⅳ期比较;d:$P<0.01$,与有远处转移比较;e:$P<0.01$,与坏死 >10% 比较;f:$P<0.01$,与低表达比较

2.3 生存分析

2.3.1 单因素生存分析 从表2中可见，就单个因素来说，除了性别（$P>0.05$）以外，legumain表达以及其余临床指标均是影响生存率的因素。

2.3.2 多因素生存分析 同样从表2中得知，将legumain表达以及所有临床指标综合分析以后，发现肿瘤分化程度（$P<0.01$）、肿瘤远处转移（$P<0.01$）、legumain表达（$P<0.01$）和MMP-9水平（$P<0.05$）是影响生存率的重要因素。见图2。

表2 胃癌患者临床各指标与生存率的单因素及多因素生存分析

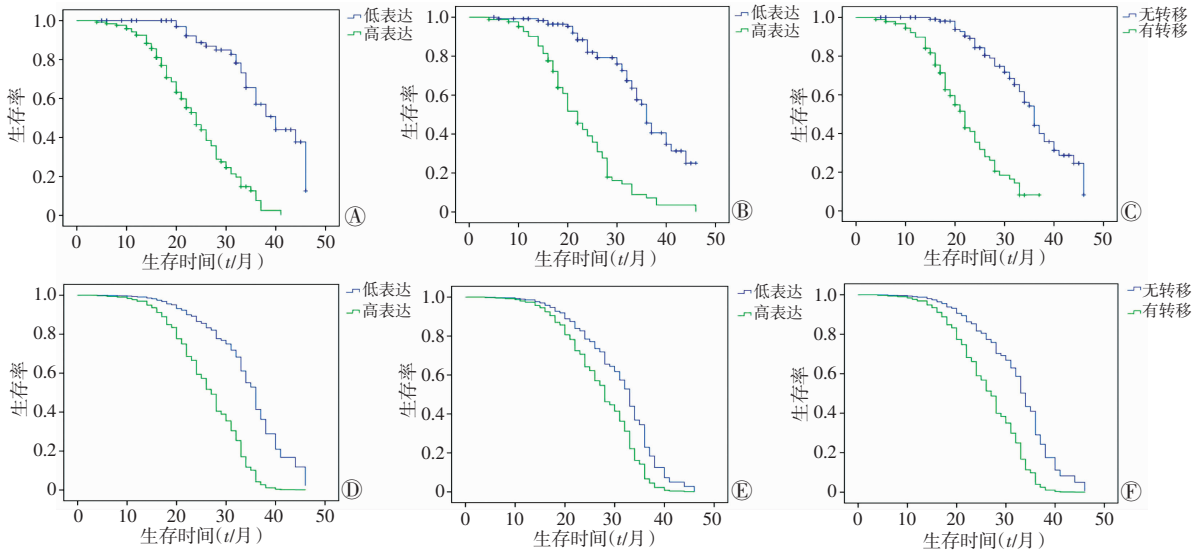
指标	例数	肿瘤死亡危险比(95%置信区间)
年龄(岁)		
<65	78	1.0
≥65	132	0.871(0.519~1.463)
性别		
男性	140	1.0
女性	70	0.994(0.621~1.590)
分化程度		
高分化	56[a]	1.0[a]
中分化	108	1.447(0.776~2.698)
低分化	46	3.971(1.838~8.579)
临床分期		
Ⅰ&Ⅱ	84[b]	1.0
Ⅲ&Ⅳ	126	1.420(0.718~2.807)
远处转移		
无	118[c]	1.0[c]
有	92	2.603(1.592~4.258)
坏死		
≤10%	88[d]	1.0
>10%	122	1.596(0.782~3.257)
legumain		
低表达	86[f]	1.0[e]
高表达	124	3.590(1.641~7.853)
MMP-9		
低表达	102[f]	1.0[e]
高表达	108	1.830(1.144~2.927)
VEGF		
低表达	102[f]	1.0
高表达	108	0.843(0.490~1.452)

a:$P<0.01$，与低分化比较；b:$P<0.01$，与临床Ⅲ&Ⅳ期比较；c:$P<0.01$，与有远处转移比较；d:$P<0.01$，与坏死>10%比较；e:$P<0.05$，f:$P<0.01$，与高表达比较

3 讨论

胃癌的高发病率和高病死率使其成为了最常见的恶性肿瘤之一。胃癌的治疗与预后也进入到一个需要新思路的阶段。legumain蛋白表达是否与胃癌发生、发展及临床预后具有相关性，国内外少见文献报道。legumain属于半胱氨酸蛋白酶C13家族[8]，其基因定位在染色体14q32.1上，编码长度为433个氨基酸的蛋白[10-14]。legumain由肿瘤细胞或者肿瘤相关巨噬细胞（tumor associated macrophage，TAMs）表达并分泌，在多种实体肿瘤中高表达，但在正常组织中却不表达或者低表达，提示了legumain在肿瘤的发生、发展过程中发挥了重要的作用。

本研究运用免疫组织化学染色方法检测组织芯片上50例胃腺癌组织及相应正常组织，结果发现在胃癌组织中legumain高表达，与相应正常组织比较差异显著（$P<0.05$）。对210例胃癌组织切片进行检测，发现124例（59%）高表达legumain，legumain高表达的胃癌组织切片上可见清晰的黄棕色染色，染色强度大，染色面积广。分析legumain表达与患者临床指标的相关性时发现，高表达legumain的肿瘤组织其坏死程度较重（$r=0.706$，$P<0.01$）。同时，高表达legumain的胃癌患者存在更多远处转移（$r=0.462$，$P<0.01$）和较高血清MMP-9水平（$r=0.482$，$P<0.01$）。这提示legumain表达与肿瘤坏死、远处转移以及血清MMP-9水平有密切联系。在生存分析中，不论是单因素分析还是多因素分析，legumain高表达（$P<0.01$）、肿瘤远处转移（$P<0.01$）、血清高水平MMP-9（$P<0.05$）和肿瘤低分化（$P<0.01$）都显示与肿瘤预后有关，是影响胃癌患者生存率的重要因素。



A:legumain表达与生存率的Kaplan-Meier曲线；B:MMP-9水平与生存率的Kaplan-Meier曲线；C:肿瘤远处转移与生存率的Kaplan-Meier曲线；D:legumain表达与生存率的Cox回归曲线；E:MMP-9表达与生存率的Cox回归曲线；F:肿瘤远处转移与生存率的Cox回归曲线

图2 legumain表达、MMP-9水平及肿瘤远处转移与胃癌患者生存率的单因素及多因素生存分析

肿瘤的发生、发展过程复杂而多变,多种细胞因子参与其中。胃癌组织中高表达 VEGF 和 MMPs[15],提示其可能与胃癌的发生、发展过程密切相关。VEGF 能促进肿瘤新生血管形成,增加肿瘤转移[16],对胃癌的预后判断有一定价值[17-18]。高水平 MMP-9 能使肿瘤侵袭力增加[19-20],更容易发生转移,使病情发展迅速。当肿瘤发生远处转移,往往已经进入中晚期阶段,患者生存率降低,预后差[21]。另有研究显示[22],胃癌组织缺氧与 TAMs 数量以及 VEGF、MMPs 水平密切相关,肿瘤组织严重缺氧、高表达 VEGF 和 MMPs,以及富含 TAMs 的胃癌患者,其生存率明显降低。而 legumain 不仅在多种肿瘤组织中高表达,在缺血、缺氧等应激环境中同样高表达[8]。肿瘤生长迅速,内部供血供氧相对不足,导致肿瘤一方面迅速生长,另一方面却由于供氧相对不足而出现坏死,因此肿瘤坏死部位往往存在明显缺血、缺氧的情况。这也解释了为何 legumain 的高表达与肿瘤坏死具有密切关联。legumain 的本质是一种蛋白酶,它可能直接或间接作用于 MMP-9,将其从无活性的蛋白酶原形式活化成为能降解肿瘤基质的蛋白酶形式,从而发挥其增加肿瘤转移的生物学作用。在打靶 legumain 治疗肿瘤的研究中,去除肿瘤中的 legumain 可以减少肿瘤的生长和转移[8-9,12],提示 legumain 可能同 VEGF、MMPs 一样,是一个新的独立的胃癌预后因素[7-9,23]。

本研究表明,除了 legumain 的表达外,肿瘤分化程度同样是影响胃癌预后的因素,但由于 legumain 表达与肿瘤分化只是呈弱相关,因此我们估计 legumain 表达与肿瘤分化程度应该是两个独立的影响胃癌预后的因素。

综上所述,高表达 legumain 的胃癌患者其生存率明显降低,它是影响胃癌预后的一个独立危险因素。legumain 作为一个新的肿瘤相关因子,为胃癌的预后判断和治疗都提供了新的思路和方向。

参考文献:

[1] 蔻冲. 青年人胃癌 100 例分析[J]. 吉林医学, 2010, 31(15): 2271-2272.

[2] 季加孚. 胃癌外科治疗研究现状与发展趋势[J]. 医学研究杂志, 2008, 37(1): 4.

[3] Ali Z, Deng Y, Ma C. Progress of research in gastric cancer[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2012, 12(11): 8241-8248.

[4] Zhao Z S, Wang Y Y, Chu Y Q, *et al*. SPARC is associated with gastric cancer progression and poor survival of patients[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(1): 260-268.

[5] 陈千益, 欧敬民, 庄鹏远, 等. 进展期胃癌根治术患者预后危险因素分析[J]. 东南大学学报: 医学版, 2011, 30(6): 909-914.

[6] Barrett A J, Rawlings N D, O'Brien E A. The MEROPS database as a protease information system[J]. J Struct Biol, 2001, 134(2/3): 95-102.

[7] Gawenda J, Traub F, Luck H J, *et al*. Legumain expression as a prognostic factor in breast cancer patients[J]. Breast Cancer Res Treat, 2007, 102(1): 1-6.

[8] Luo Y, Zhou H, Krueger J, *et al*. Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer[J]. J Clin Invest, 2006, 116(8): 2132-2141.

[9] Wang L, Chen S, Zhang M, *et al*. Legumain: a biomarker for diagnosis and prognosis of human ovarian cancer[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(8): 2679-2686.

[10] Teng L, Wada H, Zhang S. Identification and functional characterization of legumain in amphioxus Branchiostoma belcheri[J]. Biosci Rep, 2009, 30(3): 177-186.

[11] Dall E, Brandstetter H. Mechanistic and structural studies on legumain explain its zymogenicity, distinct activation pathways, and regulation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(27): 10940-10945.

[12] Lee J, Bogyo M. Development of near-infrared fluorophore (NIRF)-labeled activity-based probes for in vivo imaging of legumain[J]. ACS Chem Biol, 2010, 5(2): 233-243.

[13] Berdowska I. Cysteine proteases as disease markers[J]. Clin Chim Acta, 2004, 342(1/2): 41-69.

[14] Haugen M H, Johansen H T, Pettersen S J, *et al*. Nuclear legumain activity in colorectal cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e52980.

[15] Partyka R, Gonciarz M, Jalowiecki P, *et al*. VEGF and metalloproteinase 2 (MMP 2) expression in gastric cancer tissue[J]. Med Sci Monit, 2012, 18(4): BR130-BR134.

[16] Kigure W, Fujii T, Sutoh T, *et al*. The association of VEGF-C expression with tumor lymphatic vessel density and lymph node metastasis in patients with gastric cancer and gastrointestinal stromal tumor[J]. Hepatogastroenterology, 2013, 60(122): 277-280.

[17] Wu J, Liu X, Wang Y. Predictive value of preoperative serum CCL2, CCL18, and VEGF for the patients with gastric cancer[J]. BMC Clin Pathol, 2013, 13: 15.

[18] Lastraioli E, Romoli M R, Arcangeli A. Immunohistochemical biomarkers in gastric cancer research and management[J]. Int J Surg Oncol, 2012, 2012: 868645.

[19] Choi J Y, Jang Y S, Min S Y, *et al*. Overexpression of MMP-9 and HIF-1α in Breast Cancer Cells under Hypoxic Conditions[J]. J Breast Cancer, 2011, 14(2): 88-95.

[20] Aalinkeel R, Nair B B, Reynolds J L, *et al*. Overexpression of MMP-9 contributes to invasiveness of prostate cancer cell line LNCaP[J]. Immunol Invest, 2011, 40(5): 447-464.

[21] Masuda R, Kijima H, Imamura N, *et al*. Laminin-5γ2 chain expression is associated with tumor cell invasiveness and prognosis of lung squamous cell carcinoma[J]. Biomed Res, 2012, 33(5): 309-317.

[22] Osinsky S, Bubnovskaya L, Ganusevich I, *et al*. Hypoxia, tumour-associated macrophages, microvessel density, VEGF and matrix metalloproteinases in human gastric cancer: interaction and impact on survival[J]. Clin Transl Oncol, 2011, 13(2): 133-138.

[23] Murthy R V, Arbman G, Gao J, *et al*. Legumain expression in relation to clinicopathologic and biological variables in colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(6): 2293-2299.

(收稿:2013-08-21;修回:2013-10-21)

(编辑 栾 嘉)