论著

文章编号:1000-5404(2014)21-2196-05

MACC1在人食管鳞癌中的表达及对侵袭的影响

吴 剑,戴天阳,张 敏,任德莲 (646000 四川 泸州,泸州医学院免疫学教研室)

[摘要] **目的** 分析结肠癌转移相关基因1(metastasis-associated in colon cancer-1,MACC1)在人食管鳞癌组织中的表达及其与临床病例特征间的关系;研究MACC1基因在食管鳞癌侵袭转移中的生物学功能。**方法** 采用免疫组化S-P法检测MACC1在食管鳞癌组织中的表达,结合临床病理特征分析MACC1表达与食管鳞癌侵袭、迁移之间的关系及其临床意义;采用脂质体法将质粒shRNA-MACC1转染食管鳞癌细胞株ECA109,采用G418压力培养筛选稳定转染ECA109阳性细胞,通过荧光定量PCR、Western blot检测ECA109阳性细胞MACC1基因和蛋白的表达,通过MTT、Transwell检测ECA109阳性细胞增殖能力、侵袭能力的变化。**结果** 免疫组化结果显示食管鳞癌组织MACC1阳性率(94.1%)显著高于癌旁组织(37.3%),差异具有统计学意义($P<0.05$);食管鳞癌上皮细胞中MACC1强阳性率(90.0%)显著高于非典型增生食管上皮细胞(15.0%),差异具有统计学意义($P<0.05$),未明显增生食管上皮细胞中MACC1表达为阴性;在性别、年龄、肿瘤大小、病变部位、分化程度以及浸润深度分组比较中,MACC1蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。在体外实验中,随着MACC1表达下调,ECA109细胞增殖能力、侵袭迁移能力明显下降。**结论** MACC1与食管鳞癌侵袭迁移密切相关;MACC1在非典型增生食管上皮和食管鳞癌组织中异常表达,在由异常增生到食管鳞癌的过程中,MACC1蛋白表达随之升高,提示MACC1基因与食管鳞癌发生、发展密切相关。

[关键词] 食管鳞状细胞癌;结肠癌转移相关基因1;侵袭转移
[中图法分类号] R73-37; R730.23; R735.1 [文献标志码] A

Expression of MACC1 in human esophageal squamous cell carcinoma and its function in metastasis

Wu Jian, Dai Tianyang, Zhang Min, Ren Delian (Department of Immunology, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan Province, 646000, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression of metastasis-associated in colon cancer-1 (MACC1) in human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), and investigate its correlation with clinical features for its role in the invasion and metastasis of the tumor. **Methods** The expression of MACC1 in 51 ESCC specimens and para-carcinoma was measured by immunohistochemical staining. The correlation of the MACC1 expression with the clinicopathological features was analyzed in the invasion and metastasis of ESCC. The plasmid harboring MACC1-shRNA was transfected into ESCC cell line ECA109. The stable cells were screened out by G418 and identified by real-time PCR and Western blotting. Then the proliferation, migration and invasion of the positive ECA109 cells were studied by MTT assay and Transwell chamber test. **Results** The positive rate of MACC1 was 94.1% in the obtained ESCC tissues, and was only 37.3% in the corresponding para-cancer tissues ($P<0.05$). MACC1 was strongly expressed in the epithelial cells of ESCC (90.0%), significantly higher than it in the epithelial cells of atypical hyperplasia esophagus (15.0%, $P<0.05$). No MACC1 expression was found in the epithelial cells of esophagus without obvious hyperplasia. There was no statistically significance in the gender, age, tumor size, location, differentiation and depth of invasion among the ESCC with different MACC1 levels ($P>0.05$). In the *in vitro* study, MACC1-shRNA transfection resulted in significantly reduced proliferation, migration and invasion in the ECA109 cells. **Conclusion** MACC1 is closely involved in the invasion and metastasis of ESCC. It is abnormally expressed in the esophagus epithelium with atypical hyperplasia and in the ESCC. In the process of atypical hyperplasia to carcinoma, the

[基金项目] 四川省教育厅重点项目(11ZA148)
[通信作者] 任德莲,E-mail:rendelian5405@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140918.0844.011.html(2014-09-18)

protein expression of MACC1 is elevated, suggesting its intimate role in the incidence and development of ESCC.

[**Key words**] esophageal squamous cell carcinoma; metastasis-associated in colon cancer-1; metastasis and invasion; RNA interference

Supported by the Key Project of Sichuan Department of Education (11ZA148). Corresponding author: Ren Delian, E-mail: rendelian5405@163.com

食管鳞癌(esophageal carcinoma, ESCC)是一种严重威胁人类生命健康的上消化道恶性肿瘤,起病隐匿、发展迅速,患者预后极差[1],侵袭和迁移是食管癌术后预后不良的主要原因[2]。近年来随着分子生物学的发展,发现食管鳞癌的侵袭迁移是多基因、多阶段、多步骤的级联反应过程,涉及多种癌基因的激活、抑癌基因的失活、细胞周期的紊乱、信号通路的异常等[3],但目前尚未找到能有效评估食管癌转移风险的分子生物学指标。因此,对食管癌侵袭迁移相关基因的研究尤为迫切。结肠癌转移相关基因1(metastasis-associated in colon cancer-1, MACC1)最早在结肠癌组织里被发现[4],近年研究证实,其与结肠癌、肝癌、肾癌、胃癌、卵巢癌侵袭转移密切相关[5-7],MACC1可以调控HGF/C-Met信号通路来发挥其生物学功能,促进肿瘤的侵袭迁移[8]。截止2013年9月,国内外仅见王建军等[9]应用免疫组化和Western blot法研究MACC1与食管鳞癌的文献报道。本研究采用免疫组化检测MACC1在人食管鳞癌组织及相应癌旁组织的表达,分析其与临床病理特征之间的关系,并构建MACC1稳定干扰ECA109细胞株,探索MACC1对食管鳞癌增殖、侵袭、迁移的影响,研究MACC1在食管鳞癌发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床标本 收集51例2011年3-12月期间泸州医学院附属医院心胸外科行食管癌手术切除的新鲜食管癌标本,均经病理诊断为食管鳞状细胞癌,其中高分化26例,中分化22例,低分化3例;标本取出后用手术刀片分别在肿瘤组织及相应的癌旁组织(距食管鳞癌组织≥5 cm)取材,经液氮速冻后置于-80 ℃冰箱低温保存。所有患者术前均未接受放化疗及其它抗癌治疗,无其他肿瘤史,年龄45~74岁,平均60.37岁。

1.1.2 主要试剂 总RNA提取试剂Trizol购自Invitrogen公司。实时定量PCR SYBR Green试剂购自上海生工;一抗:兔抗人MACC1多克隆抗体(免疫组化工作浓度1∶200,Western blot工作浓度1∶500),购自美国Abcam公司。GAPDH抗体(工作浓度1∶5 000)购自美国Bioworld Technology公司;SP免疫组化检测试剂盒购自北京中杉公司;二抗:山羊抗兔,山羊抗鼠HRP酶标二抗(工作浓度1∶10 000)购自Bioworld公司;ECL发光液,购自美国Millipore公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织SP法 采用免疫组化SP法检测MACC1蛋白表达,食管鳞癌组织经过10%甲醛固定,石蜡包埋,连续4 μm切片后60 ℃烘干,然后进行二甲苯脱蜡,乙醇梯度脱水,随后用将切片放入3%过氧化氢溶液10 min以灭活内源性过氧化物酶。微波加热修复抗原后滴加兔抗人MACC1多克隆抗体(1∶200),室温孵育1 h,滴加生物素化的二抗室温孵育1 h,DAB显色,苏木精复染30 s,再用盐酸分化,二甲苯透明后用中性树脂封片,于正置显微镜下观察。

1.2.2 免疫组化评定标准 任选择5个高倍视野(×400)进行观察,根据标本染色强度和阳性细胞百分率对MACC1表达进行评分;阳性细胞的染色强度评分:不着色为0分,淡黄色为1分,黄色为2分,棕黄色为3分;计算视野下阳性细胞的百分率,并按以下标准评分:≤5%为0分,6%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~100%为3分,将每张切片平均染色强度得分与平均阳性细胞百分率得分各自相乘为其最后得分:0~1分为阴性(-),2~4分为弱阳性(+),5~9分为强阳性(++)。根据以上标准观察食管鳞癌组织和癌旁组织的MACC1蛋白表达,计算MACC1阳性率,分析其与临床病理特征间的关系;按照WHO诊断标准(2012年第4版),由2名病理科医师在400倍显微镜下观察食管鳞癌及癌旁组织切片,随机选取不同标本的20处食管鳞癌上皮细胞高倍视野,20处非典型增生上皮细胞高倍视野及10处未明显增生食管上皮细胞高倍视野,观察并统计MACC1表达阳性率。

1.2.3 细胞转染 转染前1 d取对数生长期的细胞1×10^5种于24孔板,分为空白组、shRNA稳定转染组、阴性对照组,阴性对照组转染无关shRNA序列质粒,均培养于不含抗生素的10% FBS 1640培养基,次日观察细胞达到70%~80%融合即开始转染,取2 μg质粒,lipo2000 1 μL分别加入含50 μL opti memi培养基的EP管中轻柔吹打混匀,静置5 min后混合为一管,室温下静置20 min后加入培养孔,6 h后更换10% FBS 1640培养基,48 h时在倒置荧光显微镜下观察GFP绿色荧光蛋白表达情况,粗略判断转染效率,经800 μg/mL G418筛选培养7 d后,按1∶10的比例稀释传代,在400 μg/mL G418培养14 d,筛选出3个单克隆细胞团进行扩大培养;通过荧光显微镜观察挑选阳性克隆,在96孔板中以200 μg/mL G418完全培养基继续扩大培养。收集阳性克隆ECA109细胞进行qRT-PCR、Western blot的鉴定。

1.2.4 实时荧光定量PCR检测MACC1基因表达水平 收集空白组、shRNA稳定转染组、阴性对照组ECA109细胞,用Trizol法提取总RNA,再分别进行逆转录得到cDNA,采用SYBR Green法进行荧光定量PCR,MACC1引物如下:上游引物:5′-GCAGACAAAGAATCAGAGAAAG-3′,下游引物:5′-GATGAGACGTCGACTAACTC-3′;GAPDH引物如下:上游引物:5′-ATGCTGGCGCTGAGTACGTC-3′,下游引物:5′-GGTCATGAGTCCTTCCACGATA-3′。实时定量PCR反应条件:95 ℃预变性3 min;40个循环:95 ℃变性30 s,60 ℃退火30 s,72 ℃延伸

20 s;72 ℃延伸1 min,结果采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法进行计算。

1.2.5 Western blot检测蛋白表达 收集空白组、shRNA稳定转染组、阴性对照组细胞,预冷PBS漂洗细胞2次,加入EBC裂解液提取总蛋白,加入2×SDS上样缓冲液,沸水浴5 min。每孔上样10 μL,100 V恒压SDS-Page电泳,300 mA恒流2 h冰浴电转至PVDF膜,5%脱脂牛奶室温封闭1 h,加入适当浓度一抗(MACC1 1∶1 000, GAPDH 1∶2 000)4 ℃摇床孵育过夜,次日用PBST漂洗15 min×3次,加入HRP标记的二抗(羊抗鼠1∶3 000,羊抗兔1∶1 000)室温孵育1 h,PBST漂洗15 min×3次,ECL发光液显影曝光,采用下列公式计算MACC1蛋白表达情况:MACC1蛋白相对表达=(干扰组灰度值/干扰组GAPDH灰度值)/(空白组MACC1灰度值/空白组GAPDH灰度值)×100%。

1.2.6 MTT法检测ECA109细胞转染前后的增殖 分别将3组细胞按1×10^3/孔密度种在96孔板上,每孔设3个复孔,分别在0、24、48、72、96 h每孔加入20 μL MTT(5 g/L)反应,最后1 d加入150 μL DMSO溶解紫色结晶,37 ℃孵育4 h后在490 nm波长处测定各孔的光密度,绘制细胞增殖曲线。

1.2.7 Transwell小室检测细胞侵袭迁移能力 实验前从-20 ℃取出Matrigel,在-4 ℃过夜融解。次日用RPMI1640无血清培养基将Matrigel原液按1∶1稀释后,取100 μL均匀涂抹上室,放入37 ℃孵育60 min待其凝固成胶,上室分别加入各组细胞2×10^5,300 μL无血清1640培养基,下室加入500 μL含10% FBS的1640培养基,48 h后取出小室,4%甲醛室温固定10 min, PBS清洗2次,擦拭去上室的细胞,吉姆萨染色后显微镜下观察,400倍倒置显微镜下随机取5个视野拍照,计算穿膜细胞数目,评定细胞侵袭迁移能力。所有操作过程在冰上进行,枪头4 ℃预冷。

1.3 统计学分析

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.0统计软件,2组间的比较采用成组t检验;MACC1阳性表达率的比较采用χ^2检验。

2 结果

2.1 免疫组织化学检测结果

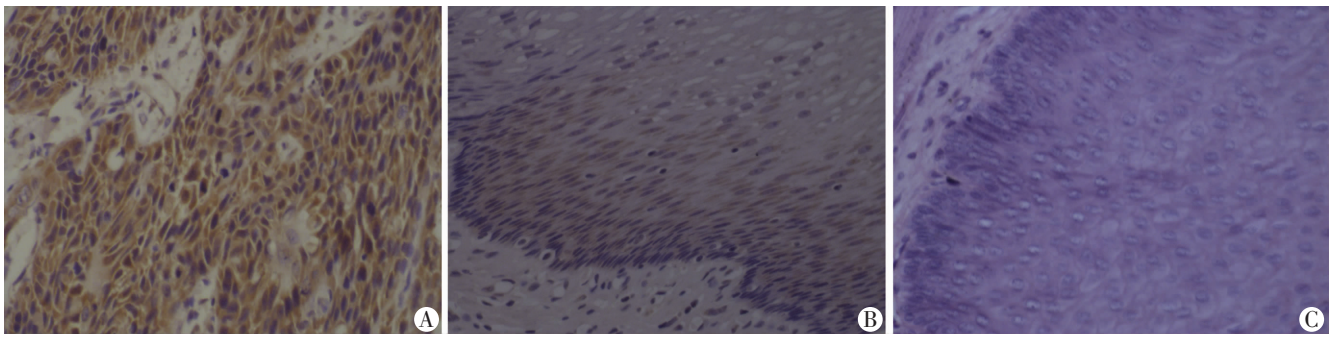
棕色颗粒代表的MACC1蛋白主要位于食管鳞癌上皮细胞质和细胞核中,以细胞质居多。MACC1蛋白在食管鳞癌组织和癌旁组织中均有不同程度的表达,食管鳞癌组织MACC1表达阳性率94.1%(48/51),癌旁组织的MACC1阳性率为37.3%(19/51),食管鳞癌组织MACC1阳性率明显高于癌旁组织($\chi^2=-2.045$, $P<0.05$)。又从不同食管上皮组织类型比较,发现食管鳞癌细胞中MACC1阳性率100%,强阳性90.0%,弱阳性10.0%;非典型增生食管上皮细胞中MACC1的阳性率70%,强阳性率15%,弱阳性率55%;而未明显增生的食管上皮细胞中MACC1表达阴性。食管鳞癌上皮细胞MACC1强阳性率显著高于非典型增生食管上皮细胞。在性别、年龄、肿瘤大小、病变部位、分化程度以及浸润深度分组比较中,MACC1蛋白阳性率差异均无统计学意义($P>0.05$),结果见图1。

2.2 MACCl蛋白在ESCC中的表达与临床病理特征之间的关系

分析MACC1蛋白表达阳性率与临床病理特征间的关系,结果显示MACC1蛋白阳性率与患者性别、年龄、肿瘤大小、病变部位、分化程度以及浸润深度差异均无统计学意义($P>0.05$),但在食管鳞癌组织的分化程度分组比较中发现,高分化组的强阳性率为42.3%(11/26),中分化组强阳性率为63.6%(14/22),3例低分化组织中MACC1均呈强阳性表达,提示MACC1的表达与食管鳞癌分化程度呈正相关,结果见表1。

表1 MACC1蛋白阳性表达与临床病理特征的相关性

指标	例数	MACC1蛋白阳性率	χ^2	P
性别				
男性	45	43/45(95%)	-1.348	0.319
女性	6	5/6(83.3%)		
年龄(岁)				
>60	19	18/19(94.7%)	-0.750	1.000
≤60	32	30/32(93.7%)		
肿瘤大小(cm)				
>5	10	9/10(90%)	0.387	0.488
≤5	41	39/41(95.1%)		
位置				
食管中段	44	41/44(93.2%)	0.650	1.000
食管下段	7	7/7(100%)		
分化程度				
高	26	24/26(92.3%)	-0.278	1.000
中	22	21/22(95.5%)		
低	3	3/3(100%)		
浸润深度				
食管外层	39	37/39(94.8%)	-1.024	0.561
食管内层	12	11/12(91.7%)		
淋巴结转移				
有	30	28/30(93.3%)	2.097	1.000
否	21	20/21(95.2%)		

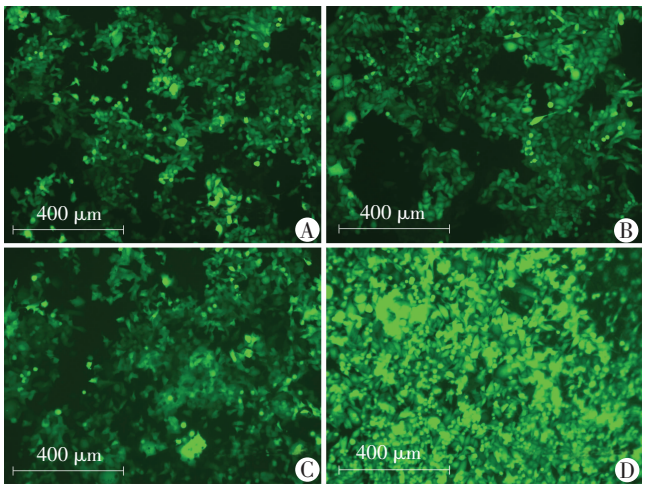


A:食管鳞癌上皮细胞中MACC1表达均呈阳性,以强阳性居多;B:非典型增生食管上皮中MACC1表达弱阳性;C:未明显增生食管上皮中MACC1表达呈阴性

图1 免疫组化检测MACC1在食管癌组织中的表达 (S-P ×40)

2.3 稳定转染 ECA109 细胞筛选

G418 抗性筛选 2 轮后，挑选出 3 个阳性细胞克隆扩大培养，分别命名为 shRNA-1、shRNA-2、shRNA-3，3 株阳性克隆细胞在荧光显微镜下均发出稳定绿色荧光，传代后能稳定表达，证实质粒已经整合进入基因组，见图 2。

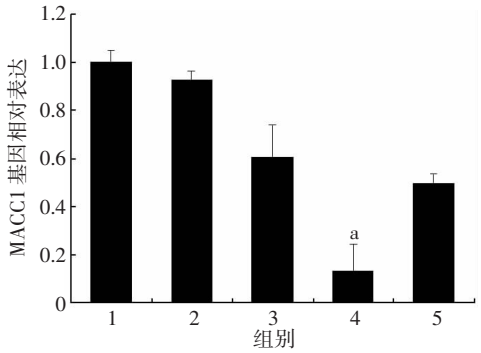


A：shRNA-1 组；B：shRNA-2 组；C：shRNA-3 组；D：阴性对照组

图 2 G418 筛选稳定转染 pGPU6/GFP/Neo-MACC1 质粒的 ECA109 细胞

2.4 荧光定量 PCR 检测 shRNA 干扰效果

空白组、阴性对照组之间的 MACC1 基因表达量无统计学差异，3 株阳性细胞克隆组 MACC1 基因表达均有降低，以 shRNA-2 组细胞 MACC1 基因表达量显著降低，选取 shRNA-2 组作进一步的生物学分析，结果见图 3。



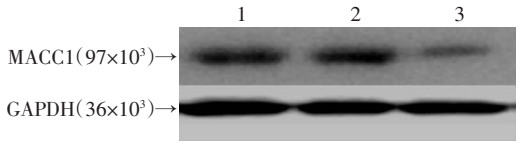
1：空白组；2：阴性对照组；3：shRNA-1 组；4：shRNA-2 组；5：shRNA-3 组

a：$P<0.05$，与空白组、阴性对照组比较

图 3 荧光定量 PCR 检测各组 MACC1 基因的表达

2.5 Western blot 检测 MACC1 蛋白水平的表达

提取 shRNA-2 组 ECA109 细胞蛋白做免疫印迹实验，结果显示 shRNA-2 干扰组（0.24 ± 0.12）与空白组相比，MACC1 蛋白表达明显受到抑制，抑制率 76%，差异有统计学意义（$P<0.05$），结果见图 4。

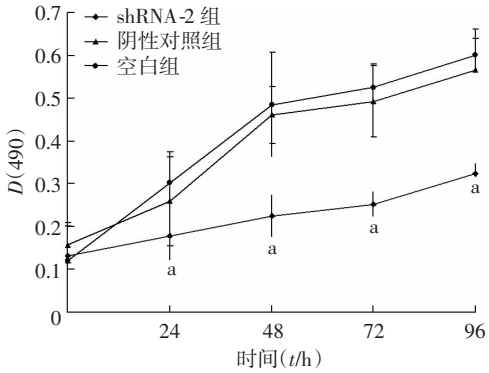


1：空白组；2：阴性对照组；3：shRNA-2 组

图 4 Western blot 检测各组细胞 MACC1 蛋白的表达

2.6 MTT 检测细胞增殖能力

以 ECA109 细胞在 0、24、48、72、96 h 的光密度值绘制细胞生长曲线，结果显示，shRNA-2 干扰组增殖能力相比其他 2 组显著降低（$P<0.05$），而空白组、阴性对照组之间无明显差异。见图 5。

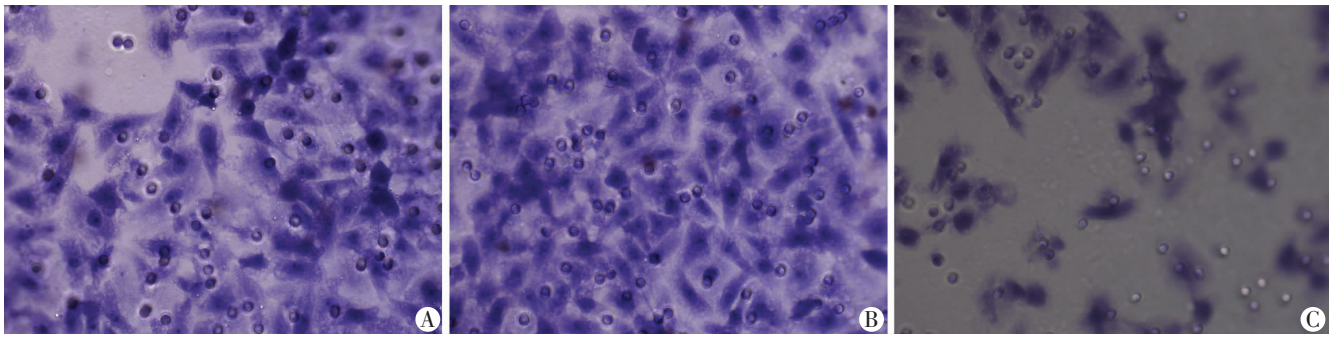


a：$P<0.05$，与空白组、阴性对照组比较

图 5 MTT 法检测 3 组细胞增殖能力

2.7 Transwell 实验结果

用 Matrigel 胶模仿基底膜检测肿瘤细胞侵袭能力，结果显示 MACC1 表达下降后，shRNA-2 组 ECA-109 细胞侵袭迁移能力下降明显，穿过小室膜的细胞数少于空白组[（69.3 ± 5.4）*vs*（12.5 ± 2.4）]和阴性对照组（53.5 ± 2.8），差异均有统计学意义（$P<0.05$）。见图 6。



A：空白组；B：阴性对照组；C：shRNA-2 组

图 6 Transwell 实验检测各组细胞侵袭能力变化（吉姆萨染色 ×40）

3 讨论

食管鳞癌是临床常见的消化道恶性肿瘤,其恶性程度高、早期诊断困难、预后极差,5年生存率为10%~30%。食管鳞癌的侵袭、转移是造成患者死亡的主要原因。目前研究证实,在肿瘤发生前,细胞内的基因表达就已出现改变,如能找到与食管鳞癌发生发展密切相关的基因,提高早期食管癌的诊出率,便能大大改善患者的预后[10]。因此,寻找食管鳞癌发生发展过程中相关的功能基因、研究其作用机制成为了近年来的热点。MACC1基因是近年来在人结肠癌组织中发现的一个新的肿瘤相关基因,能够通过激活HGF/Met信号通路[11],促进细胞外基质的降解,诱导肿瘤血管的生长,从而促进肿瘤侵袭和迁移[12]。目前,在结肠癌、肝癌、非小细胞肺癌等肿瘤组织中均检测到了MACC1基因的高表达,且与肿瘤分期呈正相关,提示MACC1与肿瘤侵袭迁移相关。研究发现MACC1在食管鳞癌中存在着高表达,但对MACC1是否与食管鳞癌的发生发展有关,能否促进食管鳞癌的侵袭迁移未作进一步的研究。

本研究中的免疫组化结果显示食管鳞癌组织阳性率显著高于癌旁组织($P<0.05$),表明MACC1在食管鳞癌组织中存在高表达;高分化组的MACC1蛋白强阳性率低于中分化组($P<0.05$),低分化组MACC1蛋白表达均呈强阳性;我们在高倍视野下根据食管上皮的病理组织类型分组比较,结果发现食管鳞癌上皮细胞与非典型增生食管上皮细胞的MACC1均阳性表达,但食管鳞癌上皮MACC1表达强阳性率明显高于非典型增生上皮组MACC1($P<0.05$),而在未明显增生食管上皮中未见表达,表明MACC1的表达随着食管上皮细胞的非典型增生、食管鳞癌恶性程度的增加MACC1基因的表达随之增高,提示MACC1在食管癌的发生发展中发挥着重要作用。为了进一步探讨MACC1在食管癌侵袭迁移过程中的作用,课题组构建了MACC1稳定干扰ECA109细胞株,通过G418压力培养,成功筛选到shRNA-2阳性细胞克隆,并对其体外增殖、侵袭迁移能力进行了研究,结果表明,干扰后的ECA109细胞增殖能力明显减弱,说明MACC1基因能够促进肿瘤增殖;Transwell实验结果显示MACC1表达的下调显著抑制了ECA109细胞迁移及侵袭能力($P<0.05$)。综合以上实验结果,我们认为MACC1基因在食管鳞癌的发生发展、侵袭迁移的过程中发挥了重要的作用,可望成为预测食管鳞癌复发和转移的一个重要指标,也可作为食管鳞癌发生发展、迁移复发研究的重要基因。而MACC1在食管鳞癌发生发展、侵袭迁移中的具体作用机制,还有待进一步的深入研究。

参考文献:

[1] 魏文强, 杨娟, 张思维, 等. 2004-2005年中国食管癌死亡情况及变化趋势[J]. 中华预防医学杂志, 2010, 44(5): 398-402.

[2] Enzinger P C, Mayer R J. Esophageal cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 349(23): 2241-2252.

[3] Lam A K. Molecular biology of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2000, 33(2): 71-90.

[4] Stein U, Schlag P M. Clinical, biological, and molecular aspects of metastasis in colorectal cancer[J]. Recent Results Cancer Res, 2007, 176: 61-80.

[5] Xie C, Wu J, Yun J, *et al*. MACC1 as a prognostic biomarker for early-stage and AFP-normal hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64235.

[6] 胡兴胜, 付曦, 文世民, 等. MACC1和c-met在非小细胞肺癌中的表达及其预后价值[J]. 中国肺癌杂志, 2012, 15(7): 399-403.

[7] Shirahata A, Sakata M, Kitamura Y, *et al*. MACC 1 as a marker for peritoneal-disseminated gastric carcinoma[J]. Anticancer Res, 2010, 30(9): 3441-3444.

[8] Stein U, Walther W, Arlt F, *et al*. MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis[J]. Nat Med, 2009, 15(1): 59-67.

[9] 王建军, 洪强, 胡丛岗, 等. 结肠癌转移相关基因1蛋白在食管癌组织中的表达及其意义[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(32): 2584-2586.

[10] Lang A H, Geller-Rhomberg S, Winder T, *et al*. A common variant of the MACC1 gene is significantly associated with overall survival in colorectal cancer patients[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 20.

[11] Kokoszynska K, Krynski J, Rychlewski L, *et al*. Unexpected domain composition of MACC1 links MET signaling and apoptosis[J]. Acta Biochim Pol, 2009, 56(2): 317-323.

[12] Matsumura A, Kubota T, Taiyoh H, *et al*. HGF regulates VEGF expression *via* the c-Met receptor downstream pathways, PI3K/Akt, MAPK and STAT3, in CT26 murine cells[J]. Int J Oncol, 2013, 42(2): 535-542.

(**收稿**:2014-04-22;**修回**:2014-07-21)

(编辑 汪勤俭)