

转移相关蛋白 2 对结直肠癌病人预后判断的价值

杨尊敬, 杜先玲

[摘要] **目的:**探讨转移相关蛋白 2 (MTA2) 作为结直肠癌病人疾病预后标志物的价值。**方法:**采用组织芯片方法及免疫组织化学方法检测结直肠癌组织和临近非肿瘤组织中 MTA2 表达情况, 采集病人随访信息, 统计分析 MTA2 表达与病人临床病理学特征间关系。**结果:**与临近非肿瘤组织相比, 结直肠癌组织中 MTA2 表达上调 ($P < 0.05$)。结直肠癌组织中 MTA2 表达是疾病独立相关因素, 与病人疾病预后不良密切相关 ($P < 0.01$)。**结论:**MTA2 与结直肠癌病人预后密切相关, 作为结直肠癌病人疗效评价和预后的分子标志物具有较高价值。

[关键词] 结直肠肿瘤; 转移相关蛋白 2; 组织芯片; 免疫组织化学; 生物标志物; 预后

[中图分类号] R 735.3 **[文献标志码]** A **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.09.010

The value of metastasis associated protein 2 expression level in the prediction of the prognosis of patients with colorectal cancer

YANG Zun-jing, DU Xian-ling

(Department of Radiochemotherapy, Enshi Central Hospital, Enshi Hubei 445000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the value of metastasis associated protein 2 (MTA2) expression level in the prediction of the prognosis of patients with colorectal cancer. **Methods:** The levels of MTA2 mRNA and protein expression in 90 cancer tissue samples and adjacent noncancer tissue samples were detected using the tissue microarrays and immunohistochemistry, respectively. The relationship between MTA2 level and clinicopathologic features were statistically analyzed. **Results:** Compared with the adjacent noncancer tissue, the expression of MTA2 in colorectal cancer was upregulated ($P < 0.05$). The MTA2 expression was an independent correlation factor of colorectal cancer, which was closely correlated with the poor prognosis of patients ($P < 0.01$). **Conclusions:** The MTA2 is closely correlated with the prognosis of patients with colorectal cancer, which has more higher value in evaluating the clinical effect and prognosis of patients with colorectal cancer.

[Key words] colorectal neoplasms; metastasis associated protein 2; tissue microarray; immunohistochemistry; biomarker; prognosis

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是临床上常见肿瘤之一, 其病死率是继肺癌、胃癌和肝癌之后排第四。临床上每年约 100 万病人确诊为 CRC, 1990 年确诊病人数为 49 万, 2012 年该数据增长到 71.5 万^[1]。其中约 60% CRC 病人由于发生肿瘤远处转移而死亡, 因此, 找到有效的 CRC 疾病进展和转移标志物对疾病临床治疗方案的治疗将大有益处。

肿瘤的远处转移是一个复杂的过程, 其涉及多种基因表达和多个通路的调节, 然而 CRC 的具体转移机制目前仍不清楚。研究发现 CRC 细胞的扩散可能是多种途径共同作用结果, 包括胞外骨架重构、侵入, 上述途径均受转移调节因子调节^[2-3]。LI 等^[4] 研究发现, 转移相关蛋白 1 (metastasis associated protein 1, MTA1) 是肿瘤转化的主要调节因子, 在结直肠癌的发展中发挥重要作用。MTA1 首先在鼠乳腺腺癌细胞系中发现, 之后在多种人源

实体瘤中发现, 例如卵巢癌、子宫内膜癌和乳腺癌^[5-7], 此外, 研究^[8] 还发现 MTA1 是肿瘤预后不良的生物标志物。MTA1 属于 MTA 蛋白家族成员 (包括 MTA1、MTA2 和 MTA3), 与核小体重构和组蛋白脱乙酰基作用有关, 通过上述途径调节转录^[8]。除 DNA 结合域外, MTA1 也具有两个 Src 同源域 (SH-结合域) 参与信号转导和 1 个溴基同源域参与蛋白间相互作用^[9-10]。研究^[11-12] 发现 MTA2 在氨基酸序列上与 MTA1 具有较高同源性, 其同样参与核小体重构。基因表达检测表明 MTA2 在迁移型乳腺癌和前列腺癌细胞系中出现过表达^[12-13]。同样也在其他实体瘤组织中检测到 MTA2 过表达的报道, 例如胃肠癌^[14], 且与肿瘤的迁移密切相关。YAO 等^[15] 研究表明, 抑制 MTA2 的表达能导致肿瘤细胞生长抑制。这些研究表明 MTA2 可能在肿瘤细胞生长和迁移过程中发挥重要作用。然而, 目前关于 MTA2 在 CRC 中的作用的报道较为少见。本研究通过组织芯片和免疫组织化学方法检测 MTA2 在 CRC 组织中表达情况, 探讨 MTA2 在 CRC 肿瘤发

生、发展和迁移中的作用,评估其作为 CRC 疾病预后标志物的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采集 90 例样品均来自于我院肿瘤科 2008-2012 年收治的 CRC 病人,术后随访截止时间为 2015 年 8 月。所有病人均经过组织学检测确诊,纳入本研究前未接受放疗或化疗。其中男 47 例,女 43 例,中位年龄 57 岁。每位病人都采集了 CRC 组织和临近非肿瘤组织,临床非肿瘤组织采集的标准为距离肿瘤组织位置 3 cm 以上。本研究获得我院伦理委员会审批,纳入本研究的临床样品也获得病人同意。90 例 CRC 病人中 94.4% 的 CRC 病人肿瘤分级为 2 和 3 级。T 分期中 T1 病人 3 例, T2 病人 6 例, T3 病人 68 例, T4 病人 13 例。N 区淋巴结转移情况,其中 N0 病人 56 例, N1 病人 25 例, N2 病人 9 例。90 例病人中 97.8% 的病人为 M0 远处转移, 剩余 2 例为 M1 远处转移。90 例 CRC 病人肿瘤临床分期结果为 1 期 7 例, 2 期 47 例, 3 期 34 例, 4 期 2 例。

1.2 组织芯片检测 本实验的组织芯片是由上海芯超生物科技有限公司合成,所有石蜡包埋组织样本经过常规病理学 HE 染色后,由 2 位对样本与病人病情对应关系不知情的病理学家对染色结果进行判断。通过组织芯片制备仪器(Beecher 公司,美国),将石蜡包埋的组织加入直径 1.5 mm 的打孔器中,根据 HE 染色结果,采集相应部位的石蜡包埋组织,之后将目的组织芯片放入石蜡块接收口的列阵位置。重复上述步骤,最终 CRC 组织和临近非肿瘤组织共制作 180 个芯片孔,切片厚度为 4~5 μm 。

1.3 免疫组织化学染色 采用 EnVision 两步法进行免疫组织化学染色,在切片上随机抽取 3 个视野,视野中阳性染色细胞数不得少于 3×100 个,根据总细胞数计算出阳性细胞率。将染色阳性率纳入统计学分析,其中阳性率 $\leq 95\%$ 判断为低表达,反之则认为是高表达。

1.4 统计学方法 采用 t' 检验、 χ^2 检验、Kaplan-Meier 生存分析和 Cox 多重变量回归分析。

2 结果

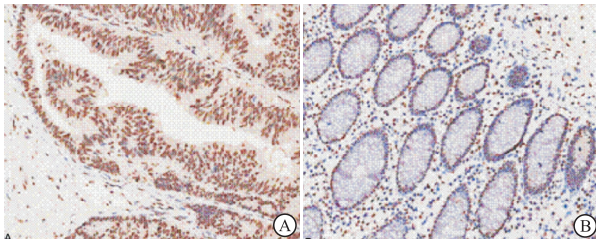
2.1 MTA2 表达与 CRC 病人临床病理学特征关系比较 不同性别、年龄、肿瘤大小、分级、T 分期、M 分期、N 分期及临床分期病人 MTA2 表达差异均无统计学意义($P > 0.05$) (见表 1)。

表 1 MTA2 表达与 CRC 病人临床病理学特征关系分析

临床病理学特征	病人数	MTA2 表达		χ^2	P
		低表达	高表达		
性别					
男	47	42	5	0.62	>0.05
女	43	36	7		
年龄/岁					
≤ 65	34	29	5	0.06	>0.05
> 65	56	48	8		
肿瘤大小/cm					
≤ 5	46	39	7	0.05	>0.05
> 5	44	38	6		
分级					
1 级	5	5	0	0.05	>0.05
2 和 3 级	85	73	12		
T 分期					
T1	3	3	0	5.99	>0.05
T2	6	4	2		
T3	68	61	7		
T4	13	9	4		
淋巴结转移					
N0	56	50	6	1.33	>0.05
N1	25	20	5		
N2	9	8	1		
M 远处转移					
M0	88	76	12	0.24	>0.05
M1	2	2	0		
临床分期					
1	7	6	1	1.93	>0.05
2	47	42	5		
3	34	27	7		
4	2	2	0		

2.2 MTA2 表达与 CRC 病人疾病预后关系 CRC 组织与临床肺肿瘤组织的免疫组织化学染色结果见图 1, CRC 组织的 MTA2 表达量 (1.13 ± 0.34) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 显著高于临近非肿瘤组织 (0.99 ± 0.11) $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($t' = 3.72, P < 0.05$)。分析 90 例 CRC 病人的术后随访资料,其中 7 例病人随访丢失,共获得完整随访数据病人 83 例,其中 49 例病人死亡,随访时间 3~82 个月;34 例病人存活,随访时间 87~97 个月。根据随访数据对病人进行 Kaplan-Meier 生存分析, MTA2 低表达的 CRC 病人的生存时间和 5 年生存率高于 MTA2 高表达病人 ($P < 0.05$) (见图 2)。将单因素分析中存在统计学差异的变量纳入 Cox 多变量回归分析,结果表明 MTA2 表达、局部淋巴结转移、远处淋巴结转移和年龄均为影响 CRC 病人疾病预

后的独立因素($P < 0.01$) (见表 2)。



A: CRC组织; B: 临近非肿瘤组织
图1 免疫组织化学检测结果

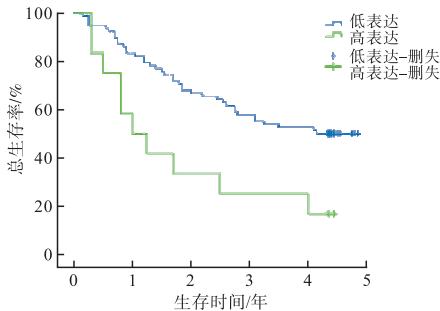


图2 CRC病人Kaplan-Meier生存分析

表 2 CRC 病人疾病预后因素的 Cox 多变量回归分析

因素	回归系数	SE	Wald 系数	自由度	P	RR	95% CI
MTA2 表达	1.263	0.395	10.246	1	0.001	3.537	1.632 ~ 7.666
年龄	1.322	0.382	11.967	1	0.001	3.749	1.773 ~ 7.927
N 转移	1.662	0.404	16.936	1	0.000	5.268	2.388 ~ 11.624
M 转移	2.621	0.917	8.177	1	0.004	13.752	2.281 ~ 82.916
TNM 分期	-0.517	0.377	1.882	1	0.170	0.596	0.285 ~ 1.248

3 讨论

本研究采用免疫组织化学方法检测了 90 例 CRC 病人肿瘤组织和临近非肿瘤组织中 MTA2 表达情况, 结果表明, CRC 组织的 MTA2 表达量显著高于临近非肿瘤组织; MTA2 低表达的 CRC 病人的生存时间和 5 年生存率高于 MTA2 高表达病人; MTA2 表达、局部淋巴结转移、远处淋巴结转移和年龄均为影响 CRC 病人疾病预后的独立因素。

MTA2 是转移相关肿瘤基因家族成员, 与 MTA 家族其他成员均有较高氨基酸同源性^[16]。MTA 1 与 MTA2 序列同源性表明 MTA2 可能均有 MTA1 类似的生物学活性和功能, MTA2 是核小体重构和组蛋白去乙酰作用复合物的的重要组成部分, 表明其可能参与三磷酸腺苷依赖的核小体重构和组蛋白去乙酰作用^[17-18]。MTA2 表达与恶性肿瘤的关系最早是由 ZHANG 等^[19]发现, 随后也在肝细胞癌、上皮性卵巢癌和非小细胞肺癌中发现^[20-22]。然而, 目前关于

MTA2 表达与 CRC 之间关系的报道较少。本研究结果表明 MTA2 表达与 CRC 病人疾病预后关系密切。关于 MTA2 在肿瘤细胞迁移中作用机制目前尚不完全清楚, MTA2 是 Twist 复合物的组成成分, 影响 E 钙黏蛋白基因的转录。Twist 在介导中胚层细胞和上皮细胞间质化过程中发挥重要作用^[23-25], 含有 MTA2 的核小体重构复合物需要与 Twist 结合才能抑制 E-钙黏蛋白转录^[23]。此外, MTA2 通过 Rho/ROCK 信号通路调节细胞骨架和细胞能动性。MTA2 降低 Rho GTP 解离抑制因子 α (Rho GDI α) 表达, 同时介导 GTP 结合 Rho 表达。同时 Rho GDI α 或 ROCK 抑制因子的修复可能抵消 MTA2 增强的迁移作用^[25-27]。BARONE 等^[28]采用基因敲除技术敲除了 Rho GDI α 基因, 结果导致 ER α 阳性的乳腺癌细胞中 MTA2 表达上调, 该细胞表现出他莫昔芬耐药。MTA2 是肿瘤迁移途径中的重要调节因子, 深入研究 MTA2 在肿瘤迁移机制中的作用对肿瘤的临床治疗意义重大。

综上, 本研究结果表明, CRC 组织中 MTA2 高表达提示病人肿瘤具有迁移倾向, 因此, MTA2 蛋白检测具有作为预测 CRC 病人肿瘤转移的潜在价值。

[参 考 文 献]

- [1] LOZANO R, NAGHAVI M, FOREMAN K, *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2095.
- [2] LUBBE WJ, ZUZGA DS, ZHOU Z, *et al.* Guanylyl cyclase C prevents colon cancer metastasis by regulating tumor epithelial cell matrix metalloproteinase-9 [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(8): 3529.
- [3] GILES RH, VAN ES JH, CLEVERS H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1653(1): 1.
- [4] LI DQ, PAKALA SB, NAIR SS, *et al.* Metastasis-associated protein 1/nucleosome remodeling and histone deacetylase complex in cancer [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(2): 387.
- [5] SKLODOWSKA A. Oxidation of thiosulphate and sulphite by *Thiobacillus neapolitanus* [J]. *Acta Microbiol Pol*, 1985, 34(3/4): 271.
- [6] KONG X, XU X, YAN Y, *et al.* Estrogen regulates the tumour suppressor MiRNA-30c and its target gene, MTA-1, in endometrial cancer [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90810.
- [7] KANG HJ, LEE MH, KANG HL, *et al.* Differential regulation of estrogen receptor α expression in breast cancer cells by metastasis-associated protein 1 [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(5): 1484.
- [8] TOH Y, NICOLSON GL. The role of the MTA family and their encoded proteins in human cancers: molecular functions and clinical implications [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2009, 26(3): 215.
- [9] TOH Y, PENCIL SD, NICOLSON GL. A novel candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in

- highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. cDNA cloning, expression, and protein analyses[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(37):22958.
- [10] SINGH RR, KUMAR R. MTA family of transcriptional metaregulators in mammary gland morphogenesis and breast cancer[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2007, 12(2/3):115.
- [11] HOFER MD, MENKE A, GENZE F, *et al.* Expression of MTA1 promotes motility and invasiveness of PANC-1 pancreatic carcinoma cells[J]. *Br J Cancer*, 2004, 90(2):455.
- [12] QIAN H, LU N, XUE L, *et al.* Reduced MTA1 expression by RNAi inhibits *in vitro* invasion and migration of esophageal squamous cell carcinoma cell line[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2005, 22(8):653.
- [13] CUI Y, NIU A, PESTELL R, *et al.* Metastasis-associated protein 2 is a repressor of estrogen receptor alpha whose overexpression leads to estrogen-independent growth of human breast cancer cells [J]. *Mol Endocrinol* 2006, 20(9):2020.
- [14] CHEN DW, FAN YF, LI J, *et al.* MTA2 expression is a novel prognostic marker for pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(3):1553.
- [15] YAO YL, YANG WM. The metastasis-associated proteins 1 and 2 form distinct protein complexes with histone deacetylase activity [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(43):42560.
- [16] KUMAR R, WANG RA, BAGHERI-YARMAND R. Emerging roles of MTA family members in human cancers [J]. *Semin Oncol*, 2003, 30(5 Suppl 16):30.
- [17] XUE Y, WONG J, MORENO GT, *et al.* NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities[J]. *Molecular Cell*, 1998, 2(6):851.
- [18] ZHANG Y, LEROY G, SEELIG HP, *et al.* The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities [J]. *Cell*, 1998, 95(2):279.
- [19] ZHANG Y, NG HH, ERDJUMENT-BROMAGE H, *et al.* Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(15):1924.
- [20] 冀予心, 张萍, 卢运萍, 等. *et al.* Expression of MTA2 gene in ovarian epithelial cancer and its clinical implication[J]. *华中科技大学学报(医学英德文版)*, 2006, 26(3):359.
- [21] LEE H, RYU SH, HONG SS, *et al.* Overexpression of metastasis-associated protein 2 is associated with hepatocellular carcinoma size and differentiation [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(8):1445.
- [22] LIU SL, HAN Y, ZHANG Y, *et al.* Expression of metastasis-associated protein 2 (MTA2) might predict proliferation in non-small cell lung cancer[J]. *Target Oncol*, 2012, 7(2):135.
- [23] YANG J, MANI SA, DONAHER JL, *et al.* Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis[J]. *Cell*, 2004, 117(7):927.
- [24] CASAS E, KIM J, BENDESKY A, *et al.* Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(1):245.
- [25] COVINGTON KR, BRUSCO L, BARONE I, *et al.* Metastasis tumor-associated protein 2 enhances metastatic behavior and is associated with poor outcomes in estrogen receptor-negative breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 141(3):375.
- [26] KEDRIN D, VAN RHEENEN J, HERNANDEZ L, *et al.* Cell motility and cytoskeletal regulation in invasion and metastasis [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2007, 12(2/3):143.
- [27] AMANO M, NAKAYAMA M, KAIBUCHI K. Rho-kinase/ROCK: a key regulator of the cytoskeleton and cell polarity [J]. *Cytoskeleton*, 2010, 67(9):545.
- [28] BARONE I, BRUSCO L, GU G, *et al.* Loss of Rho GDI α and resistance to tamoxifen via effects on estrogen receptor α [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2011, 103(7):538.

(本文编辑 刘梦楠)

(上接第 1185 页)

- [3] MCCULLOUGH PA. Contrast-induced acute kidney injury[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51(15):1419.
- [4] MARENZI G, ASSANELLI E, MARANA I, *et al.* N-acetylcysteine and contrast-induced nephropathy in primary angioplasty[J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(26):2773.
- [5] CHO JY, JEONG MH, HWAN PARK S, *et al.* Effect of contrast-induced nephropathy on cardiac outcomes after use of nonionic isosmolar contrast media during coronary procedure [J]. *J Cardiol*, 2010, 56(3):300.
- [6] WATABE H, SATO A, HOSHI T, *et al.* Association of contrast-induced acute kidney injury with long-term cardiovascular events in acute coronary syndrome patients with chronic kidney disease undergoing emergent percutaneous coronary intervention[J]. *Int J Cardiol*, 2014, 174(1):57.
- [7] MERTEN GJ, BURGESS WP, RITTASE RA, *et al.* Prevention of contrast-induced nephropathy with sodium bicarbonate: an evidence-based protocol[J]. *Crit Pathw Cardiol*, 2004, 3(3):138.
- [8] GOLDENBERG I, MATETZKY S. Nephropathy induced by contrast media: pathogenesis, risk factors and preventive strategies[J]. *CMAJ*, 2005, 172(11):1461.
- [9] NOZUE T, MICHISHITA I, IWAKI T, *et al.* Contrast medium volume to estimated glomerular filtration rate ratio as a predictor of contrast-induced nephropathy developing after elective percutaneous coronary intervention[J]. *J Cardiol*, 2009, 54(2):214.
- [10] MARENZI G, DE METRIO M, RUBINO M, *et al.* Acute hyperglycemia and contrast-induced nephropathy in primary percutaneous coronary intervention [J]. *Am Heart J*, 2010, 160(6):1170.
- [11] LIU Y, TAN N, ZHOU YL, *et al.* High-sensitivity C-reactive protein predicts contrast-induced nephropathy after primary percutaneous coronary intervention[J]. *J Nephrol*, 2012, 25(3):332.

(本文编辑 卢玉清)