

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.04.041

MACC1 蛋白在食管癌中的表达及其临床意义*

杨 锋 李小飞 吴 同 杨三虎 黄立军 卢 强 张志培 姜 涛[△]

(第四军医大学唐都医院胸外科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探讨结肠癌转移相关基因 1(metastasis-associated in colon cancer-1, MACC1)在食管癌组织中的表达及其临床意义。**方法:**采用免疫组化 EnVision 法检测 MACC1 蛋白在 88 例食管癌组织中的表达,统计学分析 MACC1 蛋白在不同病理分级、TNM 分期中表达的差异性。**结果:**免疫组化结果显示 MACC1 蛋白的阳性表达主要位于胞浆中。MACC1 蛋白在食管癌组织中的总阳性率为 88.64%;在 I、II、III 级食管癌组织中的阳性率分别为 14.29%、93.65%、100%,经 Kruskal-Wallis H 检验差异性非常显著($P=0.0000$);在 I、IIa、IIb、III 期食管癌中的阳性率分别是 16.67%、89.47%、100%、100%,经 Kruskal-Wallis H 检验差异性非常显著($P=0.0000$)。**结论:**MACC1 蛋白在食管癌中呈过度表达,其表达与病理分级、TNM 分期相关,提示 MACC1 可能在食管癌的发生、发展中起重要作用。MACC1 蛋白可能成为检测食管癌的发病及判断预后的生物学指标之一。

关键词:食管癌;MACC1;预后;免疫组织化学

中图分类号:R735.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)04-765-03

Expression of MACC1 in Esophageal Cancer
and its Clinic Significance*YANG Feng, LI Xiao-fei, WU Tong, YANG San-hu, HUANG Li-jun, LU Qiang, ZHANG Zhi-pei, JIANG Tao[△]

(Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of MACC1 in esophageal cancer and analyze its clinical significance.

Methods: The expression of MACC1 protein in 88 samples of esophageal cancer tissues was detected with immunohistochemical method-EnVision method; the differences of the protein expression among different pathological grades and TNM stages were statistically analyzed. **Results:** The positive expression of MACC1 protein was mainly located in the cytoplasm indicated by immunohistochemical method. The total positive rate of MACC1 protein in esophageal cancer was 88.64%; the positive expression rates of pathological grading I, II, III in esophageal cancer tissues were 14.29%, 93.65%, 100% respectively with extremely significant difference (Kruskal-Wallis H test, $P=0.0000$); the positive expression rates of TNM stage I, IIa, IIb, III esophageal cancer tissues were 16.67%, 89.47%, 100%, 100% respectively with extremely significant difference (Kruskal-Wallis H test, $P=0.0000$). **Conclusions:** MACC1 protein is overexpressed in esophageal cancer and its expression rate is related with pathological grading and TNM stage, which suggests MACC1 might play an important role in the development of esophageal cancer. MACC1 protein may be one of biological indicators for diagnosis and prognosis of esophageal cancer.

Key words: Esophageal cancer; MACC1; Prognosis; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification(CLC): R735.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)04-765-03

我国是食管癌高发国家,病死率高,占全世界食管癌病死率的 46.6%(WHO, 1997 年)。近年食管癌外科诊疗措施不断提高,但患者的五年生存率仍无显著提高。其发病与基因多态性及遗传易感性有相关性,尤其是癌基因的活化与表达是食管癌发生、发展的重要病理基础^[1]。结肠癌转移相关基因 1(MACC1)是 2009 年由 Stein 等发现的一个与结肠癌转移、侵袭相关的新基因^[2]。研究表明,很多肿瘤的侵袭和转移与 MACC1 的过度表达密切相关,MACC1 在恶性肿瘤中的表达及其生物学作用渐渐受到人们关注^[3]。目前,MACC1 在食管癌中表达的研究尚未见报道,本研究采用免疫组化 EnVision 法检测了 88 例食管

癌组织中 MACC1 的表达,并探讨其与食管癌临床病理特征及预后的关系。

1 材料与方法

1.1 临床标本与试剂

收集 2006 年 6 月-2009 年 6 月。第四军医大学唐都医院胸外科手术标本 88 例。其中男性 70 例,女性 18 例;最大年龄 77 岁,最小年龄 33 岁。将标本用 10%中性福尔马林液固定、脱水、透明、石蜡包埋。组织病理分类及分级由第四军医大学唐都医院病理科诊断;结合手术、影像学资料进行 TNM 分期。

* 基金项目:陕西省自然科学基金项目(2009 JM4003-4)

作者简介:杨锋,硕士,主要研究方向:食管疾病的外科治疗, E-mail: docyangfeng@163.com

△ 通讯作者:姜涛,博士,电话:029-84717717, E-mail: J-taofinmu@163.com

(收稿日期:2013-04-30 接受日期:2013-05-24)

MACC1 蛋白抗体购自晶美公司 abcam 的商品化兔抗产品。

1.2 免疫组化染色

将石蜡包埋的组织块做 5 μm 连续切片, 做 HE 和免疫组织化学染色。免疫组化染色采用两步法(EnVision)。步骤如下: 切片脱蜡至水, 尿素消化, 3% 过氧化氢封闭, 用柠檬酸缓冲液进行抗原修复, 冷却, 10% 羊血清封闭, 加一抗(稀释浓度为 1:120)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 从冰箱取出 37 $^{\circ}\text{C}$ 复温, 加入抗兔二抗(EnVision), 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温反应(中间各步用 PBS 冲洗), 加 DAB 显色, 在显微镜观察终止显色。用苏木素复染, 脱水透明封片, 在光镜下观察。对照组设阳性、阴性、和空白对照: 用已知阳性表达组织作为阳性对照; 以 PBS 代替一抗作为空白对照, 用已知不表达组织作阴性对照。

1.3 免疫组化结果判断

按照半定量积分方法, 每例均随机观察 5 个高倍视野($\times 200$)。结果判断: 阳性细胞 $\leq 5\%$ 为 0 分, 6%-25% 为 1 分, 26%-50% 为 2 分, 51%-75% 为 3 分, $> 75\%$ 为 4 分; 阳性强度黄色为 1 分, 棕黄为 2 分, 棕褐色为 3 分。将细胞阳性率与染色强度两者积分相乘: 0 分为阴性(-), 1-4 分为弱阳性(+), 5-8 分为中度阳性(++), 9-12 分为强阳性(+++)。

1.4 统计学分析
采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 3 组以上采用 Kruskal-Wallis H 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

免疫组化结果显示 MACC1 阳性着色主要位于癌细胞的胞浆中(见图 1A)。MACC1 在食管癌组织中的总阳性率为 88.64%; 在 I、II、III 级食管癌组织中的阳性率分别为 14.29%、93.65%、100%, Kruskal-Wallis H 检验显示 MACC1 的表达在不同病理分级间差异性非常显著($P=0.0000$)(见表 1); 在 I、II a、II b、III 期食管癌中的阳性率分别是 16.67%、89.47%、100%、

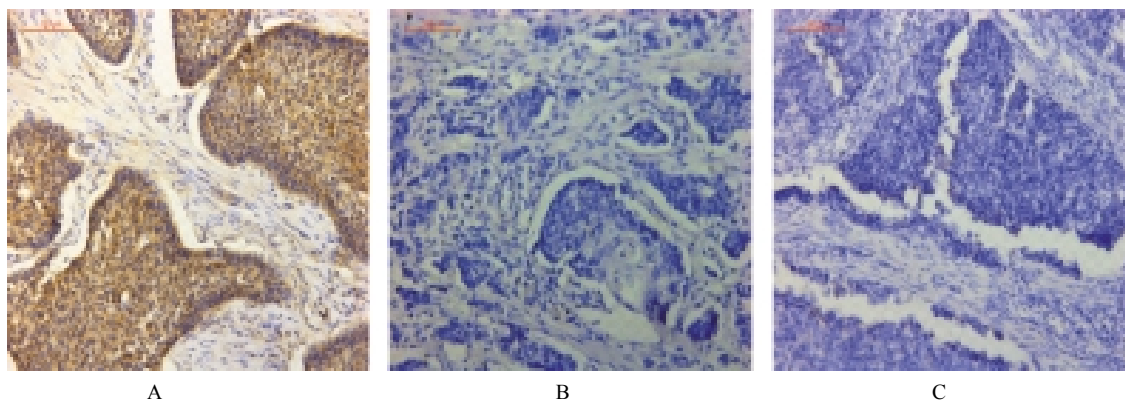


图 1 MACC1 在食管癌组织的表达。A: 癌组织中阳性表达, B: 癌组织中阴性表达, C: 空白对照($\times 200$)

Fig.1 Expression of MACC1 in esophageal cancer tissue. A: positive expression in cancer tissue, B: negative expression in cancer tissue, C: blank control($\times 200$)

表 1 MACC1 在食管癌分级中的表达

Table 1 Expression of MACC1 in esophageal cancer in different pathological grading

Groups	n	MACC1 positive intensity				Positive rate (%)	Value
		-	+	++	+++		
I	7	6	1	0	0	14.29	$\chi^2=27.07$ $P=0.0000$
II	63	4	23	34	2	93.65	
III	18	0	1	15	2	100.00	
Total	88	10	25	49	4	88.64	

表 2 MACC1 在食管癌 TNM 分期中的表达

Table 2 Expression of MACC1 in esophageal cancer in different TNM stages

Groups	n	MACC1 positive intensity				MACC1 positive intensity Positive rate (%)	Value
		-	+	++	+++		
I	6	5	1	0	0	16.67	$\chi^2=35.84$ $P=0.0000$
II a	40	5	19	16	0	89.47	
II b	19	0	2	15	2	100.00	
III	23	0	3	18	2	100.00	
Total	88	10	25	49	4	88.64	

100%, Kruskal-Wallis H 检验显示 MACC1 的表达在不同 TNM 分期间差异性非常显著 ($P=0.0000$) (见表 2)。

3 讨论

MACC1 基因定位于人染色体 7p21.1, 含有 7 个外显子和 6 个内含子, 其 cDNA 序列全长 2559bp, 编码 852 个氨基酸。MACC1 蛋白包括 4 个结构域: ZU5、SH3 和 2 个羟基端死亡结构域, 先前研究发现这种结构域与细胞信号转导和凋亡相关^[4]。MACC1 在结肠癌组织中表达异常增高, 在远处有转移的病例中表达量明显高于无转移者, MACC1 高表达者 5 年生存率也明显低于低表达者^[3]。后续的研究显示, MACC1 在胃癌^[5]、肝癌^[6]、卵巢癌^[7]、肺腺癌^[8]等腺癌组织及膀胱移行细胞癌^[9]、脑胶质瘤^[10]等非腺癌组织中过表达, 并且与浸润转移密切相关。现已证明, MACC1 是 HGF/c-met 信号通路的一个关键调节因子, 可以上调 c-met 蛋白的表达。而 HGF/c-met 信号通路在细胞增殖、迁徙、血管生成、上皮细胞间质化过程中发挥重要作用^[11-14]。这可能是 MACC1 发挥其生物学功能的机制之一。

食管癌是常见肿瘤之一, 早期诊断率低, 大部分患者就诊时已属晚期。虽然外科治疗技术的提高、联合新药化疗、术前新辅助放疗、同期放化疗等提高了晚期食管癌的缓解率和切除率, 但预后仍较差, 需要新的治疗手段来提高食管癌的疗效^[15-20]。目前, MACC1 在食管癌中的研究国内外尚未见报道。我们收集 88 例食管癌手术标本, 通过免疫组化 EnVision 法检测 MACC1 蛋白的表达, 发现 MACC1 在食管癌组织中的总阳性率为 88.64%, 提示 MACC1 可能与食管癌的发病相关。进一步的分析还显示 MACC1 在不同分级、分期食管癌组织中的存在显著的差异性表达, 初步表明 MACC1 与表达强度与食管癌分化高低、增值能力有关, 可能还与转移能力有关, 说明 MACC1 在食管癌的发生、发展中可能发挥了作用, 也证明了上述研究的一致性。但是 MACC1 是否也是通过 HGF/c-met 信号通路在食管癌的发病中发挥作用, 抑或有其它作用机制, 还有待深入研究。是否可以把 MACC1 作为食管癌诊断及判断预后的标志物, 我们将在之后的实验和随访工作中进一步验证。同时, MACC1 在食管癌中的差异性表达也为食管癌的靶向治疗提供了新的思路。

参考文献 (References)

- [1] 朱佳龙, 李峰, 易来波, 等. 食管癌遗传易感基因的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 3(12): 1398-1400
Zhu Jia-long, Li Feng, Yi Lai-bo, et al. Progress in Susceptibility Genes of Esophageal Cancer. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 3 (12): 1398-1400
- [2] 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
- [3] Ulrike S, Mathias D, Wolfgang W. MACC1 more than metastasis? Facts and predictions about a novel gene [J]. J Mol Med, 2010, 88(1): 11-18
- [4] 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
- [5] Shirahata A, Sakata M, Kitamura Y, et al. MACC1 as a maker for peritoneal-disseminated gastric carcinoma [J]. Anticancer Res, 2010, 30(9): 3441-3444
- [6] Shirahata A, Fan W, Sakuraba K, et al. MACC1 as a maker for vascular invasive hepatocellular carcinoma [J]. Anticancer Res, 2011, 31(3): 777-780
- [7] Zhang R, Shi H, Chen Z, et al. Effects of metastasis-associated in colon cancer 1 inhibition by small hairpin RNA on ovarian carcinoma OVCAR-3 cells [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30: 83
- [8] Chundong G, Uramoto H, Onitsuka T, et al. Molecular diagnosis of MACC1 status in lung adenocarcinoma by immunohistochemical analysis [J]. Anticancer Res, 2011, 31(4): 1141-1145
- [9] Wu J, Zhang X, Zhu YL. The expression of MACC1 in bladder carcinoma and clinic significance [J]. Jiangsu Medical Journal, 2011, 37(1): 101-102
- [10] Shang C, Hong Y, Xue YX. The expression of MACC1 gene in brain glioma and the influence to apoptosis in U87 cell [J]. Progress of Anatomical Sciences, 2011, 17(1): 1-3
- [11] Stein U, Smith J, Walther W, et al. MACC1 controls Met: what a difference and Sp1 site makes [J]. Cell Cycle, 2009, 8(15): 2467-2469
- [12] You WK, McDonald DM. The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis [J]. BMB Rep, 2008, 41(12): 833-839
- [13] Naka T, Kuester D, Boltze C, et al. Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in skull base chordoma [J]. Cancer, 2008, 112(1): 104-110
- [14] Toschi L, Janne PA. Single-agent and combination therapeutic strategies to inhibit hepatocyte growth factor/MET signaling in cancer [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(19): 5941-5946
- [15] Pi Guo, Ke Li. Trends in esophageal cancer mortality in China during 1987-2009: Age, period and birth cohort analyzes [J]. Cancer Epidemiology, 2012, 36(2): 99-105
- [16] Evangelos Chandanos, Jesper Lagergren. The mystery of male dominance in oesophageal cancer and the potential protective role of oestrogen [J]. European Journal of Cancer, 2009, 45(18): 3149-3155
- [17] Bouvier AM, Binquet C, Gagnaire A. Management and prognosis of esophageal cancers: Has progress been made [J]. European Journal of Cancer, 2006, 42(2): 228-233
- [18] Jang JY. The Usefulness of Magnifying Endoscopy and Narrow-Band Imaging in Measuring the Depth of Invasion before Endoscopic Submucosal Dissection [J]. Clin Endosc, 2012, 45(4): 379-385
- [19] Chai J, Jamal MM. Esophageal malignancy: A growing concern [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(45): 6521-6526
- [20] Lordick F. Optimizing neoadjuvant chemotherapy through the use of early response evaluation by positron emission tomography [J]. Recent Results Cancer Res, 2012, 196: 201-211