

网络出版时间: 2019-1-3 17:26 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20181230.1809.021.html>

胃癌组织中 NEDD4L 的表达及其临床意义

蒋兴旺 闫强 张尚鑫 孙若川 李德关 鲁明典 张震 李永翔

摘要 目的 研究胃癌中神经前体细胞表达发育下调样基因 4 (NEDD4L) 的表达及其临床意义。方法 分别采用实时荧光定量 PCR 和蛋白质免疫印迹法检测 25 对胃癌组织及其对应癌旁正常胃组织中 NEDD4L 的 mRNA 和蛋白表达水平, 采用免疫组化方法 (IHC) 检测 NEDD4L 在 124 例胃癌组织和 25 例癌旁正常胃组织中的表达情况, 并统计分析其表达与胃癌患者临床病理参数及预后之间的关系。结果 NEDD4L 在胃癌组织中的 mRNA 和蛋白表达水平均显著低于对应癌旁正常组织 ($P < 0.05$)。免疫组化结果显示 NEDD4L 在胃癌组织中的阳性表达率明显低于癌旁正常组织 ($P < 0.05$)。NEDD4L 的表达与肿瘤组织分化程度

($P < 0.05$)、浸润深度 ($P < 0.05$) 和临床 TNM 分期 ($P < 0.05$) 显著相关, 且 NEDD4L 高表达的胃癌患者其预后较好 ($P < 0.001$)。结论 NEDD4L 在胃癌组织中低表达, 可能与胃癌的发生发展密切相关, 且可能作为判断胃癌预后的潜在指标。

关键词 胃癌; 神经前体细胞表达发育下调样基因 4; 预后
中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)01-0107-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.01.021

胃癌发病率在我国连年居高不下, 是我国第二大常见肿瘤^[1], 要降低胃癌的总体死亡率, 早期发现并及时治疗是非常重要的, 而早期胃癌并无明显症状, 多数患者就诊时已是中晚期。手术治疗是胃癌的首选治疗方式, 但对于中晚期患者, 手术预后不佳。泛素化是人体内的蛋白质修饰系统, 能够介导膜蛋白、细胞周期调控因子、转录因子、癌蛋白和抑癌蛋白等底物蛋白的降解、稳定和重定位, 该过程受

2018-08-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 81672389); 安徽省科技攻关重大项目(编号: 1704a0802167); 安徽高校自然科学基金研究项目(编号: KJ2016A329)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院普外科, 合肥 230022

作者简介: 蒋兴旺, 男, 硕士研究生;

李永翔, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yongxiangli_1@hotmail.com

Analysis on the changes of lymphocytes and their subpopulations in the peripheral blood of patients with carcinoma after intensity modulated radiotherapy

Yang Jing^{1,2}, Gao Jin², Xiao Liang^{1,3}, et al

¹Teaching and Research Section of Nuclear Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Radiation Oncology Division, West Branch of Anhui Provincial Hospital, Hefei 230031;

³Dept of Radiation Oncology Division, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To analyze the changes of lymphocytes and their subsets in the peripheral blood of patients with carcinoma before and after intensity modulated radiotherapy (IMRT), and discuss the influence of these changes on therapeutic effects. **Methods** Flow cytometer (FCM) was used to analyze the blood samples from 183 patients, of which 66 and 117 blood samples were utilized for analyses of immunologic function and regulatory T (Treg) cells respectively. **Results** Total counts of lymphocytes, the percentages of CD3⁺T cells, CD4⁺ helper T (Th) cells, CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Treg cells and B cells in peripheral blood were reduced by IMRT. Conversely, the percentages of CD8⁺ suppressor T (Ts)/cytotoxic T (Tc) cells and nature killer (NK) cells were increased. The ratio of CD4⁺ cells and CD8⁺ cells was also reduced by IMRT. **Conclusion** IMRT can decrease the number of lymphocytes in peripheral blood, and lead to the redistribution of lymphocytes subpopulations. It is therefore important that the recovery of immunological homeostasis may be helped by immunological modulating therapies during and in an early stage after IMRT.

Key words intensity modulated radiotherapy; tumor; lymphocyte; radiotherapy; immunity

到激活酶(E1s)、结合酶(E2s)及蛋白酶(E3s)的严密调控。泛素化在肿瘤发生发展的各方面都发挥着重要作用,该过程的紊乱可能会导致机体发生肿瘤或其他疾病^[2]。

神经前体细胞表达发育下调样基因4(neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4 like, NEDD4L)又称Nedd4-2,属于E3泛素连接酶Nedd4家族,NEDD4L可作用于上皮钠通道(ENaC),协助维持体内钠平衡、维持血压等^[3]。已有研究^[4-5]表明NEDD4L在多种肿瘤中发挥重要作用,但其在胃癌中的作用尚不明确。该研究通过检测胃癌组织、癌旁正常组织中NEDD4L的表达情况及其与胃癌患者的预后、分化程度、浸润深度和TNM分期等临床病理参数之间的关系,以分析其对临床判断胃癌预后的参考价值。

1 材料与方法

1.1 病例资料 胃癌组织标本中用于免疫组化的标本收集自2006年12月~2008年9月医院普外科手术切除组织,术后病理明确诊断为胃癌,均具有完整的病理与相关随访资料。共包含124例胃癌组织与25例随机选取的癌旁正常组织(距肿瘤边缘>5cm),将组织样本制作成组织芯片,进行免疫组化检测。其中男96例,女28例;年龄29~80岁,平均60.86岁,中位年龄60岁,≥61岁有63例,<61岁有61例;肿瘤直径≥6cm有83例,<6cm有41例;淋巴结转移阳性有83例,阴性有41例;肿瘤浸润深度较浅的(T1和T2)有26例,较深的(T3和T4)98例;根据第七版AJCC(the American Joint Committee on Cancer)TNM分期标准,I~II期52例,III~IV期72例。另收集2016年8~10月于安徽医科大学第一附属医院普外科手术切除的25对新鲜胃癌及配对癌旁正常组织标本(距肿瘤边缘>5cm),-80℃保存待用,所有患者均被告知并签署知情同意书,实验方案得到医院伦理委员会审核及批准。

1.2 主要试剂和仪器 TRIzol(上海翊圣生物科技公司);逆转录试剂盒、SYBR Green 荧光定量PCR试剂盒(日本Toyobo公司);NEDD4L抗体(美国Proteintech Group公司);二抗(上海碧云天生物技术公司);Western blot 化学发光液(美国Millipore公司)。384孔PCR板;7900H型实时荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司)。

1.3 方法

1.3.1 定量PCR 取适量胃癌和癌旁正常组织提取mRNA,反转成cDNA,以此作为模板进行定量PCR反应,以β-actin作为内参,NEDD4L F:5'-TCC AATGGTCTCAGCTGTTTA-3',R:5'-ATTTTCCACG GCCATGAGA-3';β-actin F:5'-CTCCATCCTGGCCTC GCTGT-3',R:5'-GCTGTCACCTTCACCGTTC-3',反应条件设置如下:95℃变性10min,然后95℃变性15s,60℃退火20s,72℃延伸40s,以上三步进行40个循环。所用仪器为美国Applied Biosystems(ABI)公司7900H型实时荧光定量PCR仪,使用384孔定量板作为反应容器,每个样品重复3个复孔。目的基因的相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.3.2 Western blot 提取胃癌和癌旁正常组织中的总蛋白,然后经过上样、电泳(80V电泳30min后换110V电泳约1h30min)、转膜(0.3A,1h30min)、封闭(5%脱脂牛奶封闭液)、孵育(一抗稀释比1:1000,二抗稀释比1:5000)、显影(AB液按1:1配制)后,采用image J软件分析目的条带与β-actin的灰度值之比表示目的蛋白的相对表达水平。

1.3.3 免疫组化 石蜡标本切成4μm厚的切片,然后经过脱蜡、抗原修复、孵育一抗、孵育二抗、显色、封片后,在显微镜下观察,采用免疫反应积分法(IRS)[即染色强度(SI)与阳性细胞百分率(PP)的乘积评分。阳性细胞评分按阳性细胞占总细胞数的百分比评分,分为四级:≤25%(1分);26%~50%(2分);51%~75%(3分);>75%(4分)。染色强度评分,共四级,标准为:无色(-,0分);淡黄色(+,1分);棕黄色(++ ,2分);棕褐色(+++,3分)。为便于分析结果,按IRS分数将结果分为两组,分别为[IRS≤2,低表达(阴性)组]和[IRS>2,高表达(阳性)组]。

1.4 统计学处理 使用SPSS 17.0软件进行数据分析,采用t检验进行组间均数比较,NEDD4L表达与临床病理参数之间的分析采用Pearson χ^2 检验,生存曲线分析采用Kaplan-Meier法,并采用Log-Rank检验,采用Cox回归模型进行多因素分析,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NEDD4L在胃癌和癌旁正常组织中低表达 定量PCR结果显示,在多数(72%,18/25)的胃癌组织中,NEDD4L mRNA水平均明显低于其对应的癌旁正常组织(P<0.05);蛋白质免疫印迹法结果显示NEDD4L在胃癌组织的平均灰度值(0.55±

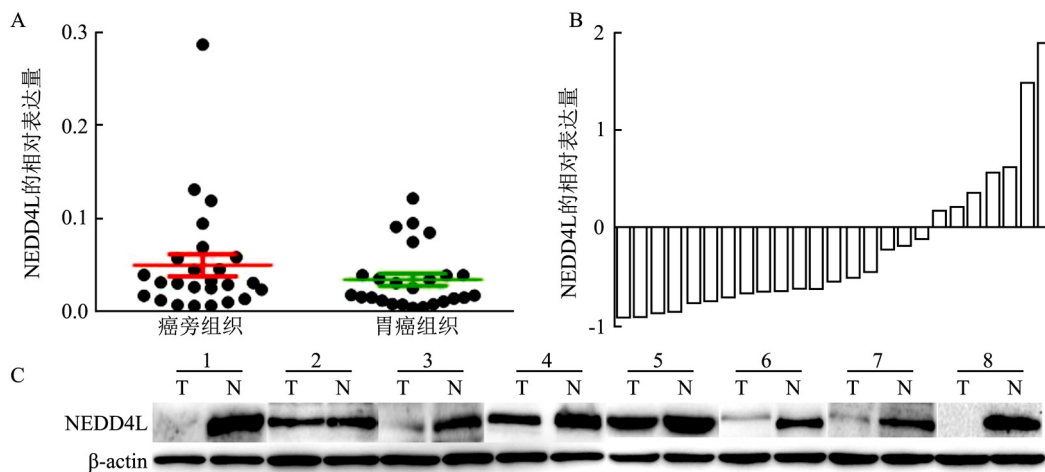


图1 NEDD4L在胃癌组织(T)和癌旁组织(N)中 mRNA 和蛋白表达

A、B: NEDD4L在胃癌组织和癌旁组织中 mRNA 的相对表达量; C: NEDD4L在8对(1~8)胃癌组织(T)和癌旁组织(N)中蛋白的相对表达量

0.49) 明显低于癌旁正常组织(1.27 ± 0.51) ($t = 0.0125, P < 0.01$), 见图1; 免疫组化结果显示 NEDD4L 蛋白主要定位于细胞质, 见图2, 且 NEDD4L 在胃癌组织标本中的阳性率为 45.97% (57/124) 明显低于癌旁正常组织标本的 72% (18/25) ($\chi^2 = 5.64, P < 0.05$)。

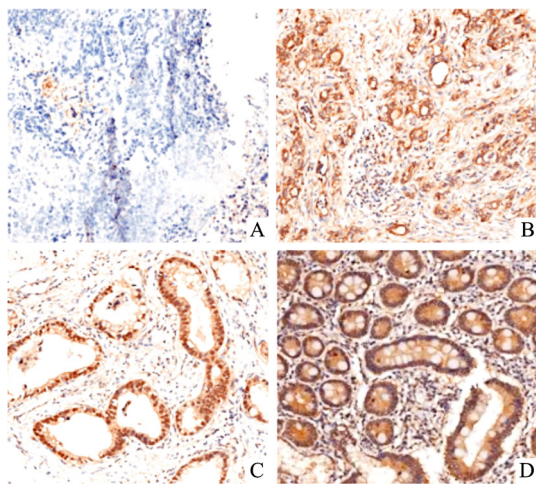


图2 胃癌组织和癌旁组织中 NEDD4L 的免疫组化结果 ×200

A: 低分化胃癌组织; B: 中分化胃癌组织; C: 高分化胃癌组织; D: 癌旁正常组织

表1 胃癌组织中 NEDD4L 的表达与临床病理参数之间的关系

病理参数	总数	NEDD4L		χ^2 值	P 值
		阴性	阳性		
性别				0.237	0.627
男	96	43	53		
女	28	14	14		
年龄(岁)				0.807	0.369
<61	61	33	28		
≥61	63	29	34		
肿瘤大小(cm)				0.771	0.380
<6	82	42	40		
≥6	42	25	17		
分化程度				4.746	0.029
高/中分化	32	12	20		
差/未分化	92	55	37		
肿瘤部位				0.050	0.975
贲门部	64	34	30		
胃体部	27	15	12		
幽门部	33	18	15		
T分期				4.994	0.025
T1/T2	26	9	17		
T3/T4	98	58	40		
淋巴结转移				0.680	0.410
阴性	41	47	36		
阳性	83	20	21		
TNM分期				4.957	0.026
I/II	52	30	22		
III/IV	72	45	27		

2.2 NEDD4L 在胃癌组织中的表达与临床病理参数之间的关系 胃癌组织中 NEDD4L 蛋白的表达与分化程度($P < 0.05$)、浸润深度($P < 0.05$)和临床 TNM 分期($P < 0.05$)显著相关, 而与其他病理参数无显著相关性, 见表1。

2.3 生存分析 Kaplan-Meier 生存分析表明浸润

深度、肿瘤大小、临床 TNM 分期、分化程度、淋巴结转移及 NEDD4L 的表达水平均与胃癌患者预后生存期相关, 见表2; 高表达 NEDD4L 的患者其平均生存时间(mean survival time, MST) 要明显高于低表达 NEDD4L 的患者(59.1 个月 vs 37.7 个月, $P < 0.001$), 见图3; 单因素 Cox 回归分析表明浸润深

表 2 胃癌病理参数与患者预后关系的分析

参数	MST(月)	P 值
性别		0.452
男	47.4	
女	49.5	
年龄(岁)		0.633
<61	48.3	
≥61	47	
肿瘤大小(cm)		0.016
<6	39.5	
≥6	51.9	
肿瘤部位		0.148
贲门	47.1	
胃体	40.8	
幽门	54.3	
浸润深度		<0.001
T1/T2	68.2	
T3/T4	42.1	
分化程度		0.001
高/中分化	62	
差/未分化	43	
淋巴结转移状态		<0.001
阴性	66.8	
阳性	38.3	
TNM 分期		<0.001
I ~ II	67.1	
III ~ IV	33.9	
NEDD4L 表达水平		<0.001
阴性	37.7	
阳性	59.1	

度、肿瘤大小、TNM 分期、分化程度、淋巴结转移状态以及 NEDD4L 的表达水平均与胃癌患者生存期密切相关;多因素 Cox 回归模型分析结果表明 NEDD4L 的表达水平($HR = 0.467$, $95\% CI: 0.260 \sim 0.838$, $P < 0.05$) 是胃癌的独立预后因素,见表 3。

3 讨论

近年来有多项研究表明,NEDD4L 在肿瘤的发

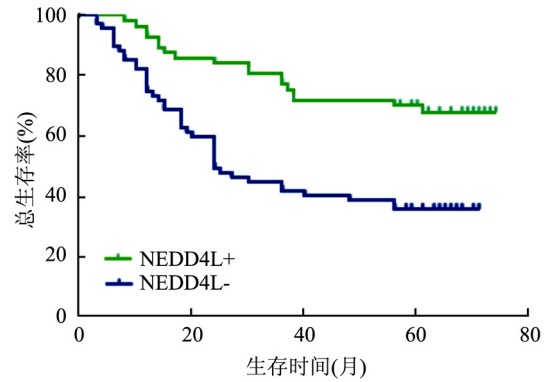


图 3 NEDD4L 表达与胃癌患者术后生存期的生存曲线分析

展中扮演着重要角色。Hu et al^[6]报道 NEDD4L 在前列腺癌组织中低表达,而且 NEDD4L 表达降低和肿瘤的侵袭性正相关。He et al^[7]发现 NEDD4L 的下调在恶性脑胶质瘤中和肿瘤的侵袭性增强以及患者的不良预后相关。在肺癌以及肝癌也发现类似情况^[8-9]。Gao et al^[10]发现 NEDD4L 在胃癌组织中的低表达与患者的不良预后相关,但该研究样本量相对较小,且未包含正常对照,临床意义有限。

本研究结果显示 NEDD4L 在胃癌组织中的 mRNA 和蛋白质表达水平相对于癌旁正常组织明显降低,提示 NEDD4L 基因的低表达或许参与胃癌发生过程;大样本量组织芯片的免疫组化结果也显示 NEDD4L 在胃癌组织中的表达明显低于正常对照,临床病理参数分析表明肿瘤分化程度、浸润深度和临床 TNM 分期均与 NEDD4L 蛋白的表达显著相关,提示 NEDD4L 可能与胃癌细胞的增殖和侵袭密切相关,在胃癌发展中发挥重要作用;生存分析结果表明 NEDD4L 的下调与胃癌患者较短的生存期显著相关,NEDD4L 高表达是胃癌患者良好预后的独立预测因子。

表 3 临床病理参数及患者预后的 Cox 回归分析

参数	单因素分析	P 值	多因素分析	P 值
	HR(95% CI)		HR(95% CI)	
性别(男 vs 女)	0.782(0.407 ~ 1.503)	0.46		NA
年龄(<61 岁 vs ≥61 岁)	1.128(0.682 ~ 1.864)	0.639		NA
肿瘤大小(<6 cm vs ≥6 cm)	0.544(0.326 ~ 0.905)	0.019	0.891(0.525 ~ 1.512)	0.670
分化程度(差/未分化 vs 高/中分化)	3.425(1.557 ~ 7.535)	0.002	2.192(0.970 ~ 4.955)	0.059
浸润深度(T3/T4 vs T1/T2)	11.393(2.779 ~ 46.700)	0.001	2.646(0.446 ~ 15.716)	0.284
淋巴结转移(阳性 vs 阴性)	5.771(2.619 ~ 12.715)	1.37E-5	1.333(0.128 ~ 13.843)	0.810
TNM 分期(III/IV vs I/II)	7.987(3.779 ~ 16.880)	5.26E-8	3.537(0.319 ~ 39.182)	0.303
NEDD4L 表达水平(+ vs -)	0.354(0.204 ~ 0.615)	2.30E-4	0.467(0.260 ~ 0.838)	0.011

本研究虽然探讨了 NEDD4L 在胃癌和癌旁正常组织中的表达差异及 NEDD4L 表达与胃癌患者预后的关系,但是并没有深入研究其作用的内在分子机制,关于 NEDD4L 在肿瘤中发挥作用的具体分子机制,目前相关报道有限,还有待进一步研究。

综上所述,NEDD4L 在胃癌组织中的表达与肿瘤组织分化程度、浸润深度和临床 TNM 分期负相关,而且 NEDD4L 高表达的胃癌患者预后较好,这表明 NEDD4L 在胃癌的发生发展中可能发挥着重要作用,随着研究的深入,NEDD4L 有可能作为胃癌诊断和治疗的新靶标。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin* 2016 66(2): 115–32.
- [2] Morrow J K, Lin H K, Sun S C, et al. Targeting ubiquitination for cancer therapies [J]. *Future Med Chem* 2015 7(17): 2333–50.
- [3] Luo F, Wang Y, Wang X, et al. A functional variant of NEDD4L is associated with hypertension, antihypertensive response, and orthostatic hypotension [J]. *Hypertension* 2009 54(4): 796–801.
- [4] Goel P, Manning J A, Kumar S. NEDD4-2 (NEDD4L): the ubiquitin

- ligase for multiple membrane proteins [J]. *Gene* 2015 557(1): 1–10.
- [5] Yang Q, Zhao J, Cui M, et al. Nedd4L expression is decreased in ovarian epithelial cancer tissues compared to ovarian non-cancer tissue [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2015 41(12): 1959–64.
- [6] Hu X Y, Xu Y M, Fu Q, et al. Nedd4L expression is downregulated in prostate cancer compared to benign prostatic hyperplasia [J]. *Eur J Surg Oncol* 2009 35(5): 527–31.
- [7] He S M, Deng J P, Li G, et al. Down-regulation of Nedd4L is associated with the aggressive progression and worse prognosis of Malignant Glioma [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2012 42(3): 196–201.
- [8] Sakashita H, Inoue H, Akamine S, et al. Identification of the NEDD4L gene as a prognostic marker by integrated microarray analysis of copy number and gene expression profiling in non-small cell lung cancer [J]. *Ann Surg Oncol* 2013 20 Suppl3: S590–8.
- [9] Zhao F, Gong X, Liu A, et al. Downregulation of Nedd4L predicts poor prognosis, promotes tumor growth and inhibits MAPK/ERK signal pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2018 495(1): 1136–43.
- [10] Gao C, Pang L, Ren C, et al. Decreased expression of Nedd4L correlates with poor prognosis in gastric cancer patient [J]. *Med Oncol* 2012 29(3): 1733–8.

Expression of NEDD4L in gastric carcinoma and its clinical significance

Jiang Xingwang, Yan Qiang, Zhang Shangxin, et al

(Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the expression of neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4 like (NEDD4L) and its clinical significance in gastric cancer. **Methods** The expression levels of NEDD4L mRNA and protein were detected in 25 pairs of gastric carcinoma tissues and their corresponding normal tissues by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot assay. Immunohistochemistry (IHC) was used to observe the expression of NEDD4L protein in 124 cases of gastric cancer tissues and 25 cases of normal tissues. Then the relationship of the expression of NEDD4L protein with the clinical pathological parameters and prognosis of gastric cancer patients was analyzed by statistical methods. **Results** The expression of NEDD4L mRNA and protein in gastric cancer tissues was significantly lower than that in normal tissues ($P < 0.05$). In addition, the result of immunohistochemistry revealed that the positive expression rate of NEDD4L protein in gastric cancer tissue was significantly lower than that in normal tissue ($P < 0.05$). The expression of NEDD4L protein was significantly correlated with the degree of tumor tissue differentiation ($P < 0.05$), depth ($P < 0.05$) and clinical TNM staging ($P < 0.05$), and overexpression of NEDD4L protein had a notable correlation with favorable prognosis of gastric cancer patients ($P < 0.001$). **Conclusion** The low expression of NEDD4L in gastric cancer tissues may be closely related to the occurrence and development of gastric cancer, and may be a potential indicator for judging the prognosis of gastric cancer.

Key words gastric cancer; NEDD4L; prognosis