

· 短 篇 ·

[文章编号]1000-8861(2012)02-0181-04

## TNFAIP8 在胃癌组织中表达的研究和临床意义

闻 强, 廖洪锋, 袁思波, 邱兴烽, 庄国洪\*, 刘忠臣\*

**[摘 要]** 目的 通过检测胃癌组织中肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白 8(TNFAIP8) 的表达, 探讨其与胃癌临床病理参数的关系及与胃癌发生发展的关系, 揭示胃癌的发病机制。方法 采用免疫组化 SP 法, 检测 50 例胃癌以及 50 例正常胃粘膜中 TNFAIP8 的表达。结果 50 例正常胃粘膜组织中 TNFAIP8 无表达, 而在 50 例胃癌组织中 TNFAIP8 阳性表达 13 例, TNFAIP8 阳性率为 26%。低分化胃癌组 TNFAIP8 阳性表达率明显高于中分化腺癌组 ( $P < 0.05$ ); 期胃癌组 TNFAIP8 阳性表达率明显高于 期胃癌组 ( $P < 0.05$ ); 有淋巴结转移组 TNFAIP8 阳性表达明显高于无淋巴结转移组; TNFAIP8 在不同性别和年龄的胃癌组织中无差异。结论 TNFAIP8 的表达与患者的性别和年龄无关, 而与胃癌的组织学分级、胃癌的 TNM 分期和淋巴结转移有相关性。TNFAIP8 在胃癌组织中表达率较正常胃粘膜升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示 TNFAIP8 可能参与了胃癌的发生、发展。

**[关键词]** TNFAIP8; 胃癌; 免疫组织化学

**[中图分类号]** R735.2

**[文献标识码]** B

## The expression of TNFAIP8 in gastric cancer and its clinical significance

WEN Qiang, LIAO Hongfeng, YUAN Sibao, QIU Xingfeng, ZHUANG Guohong, LIU Zhongchen

Anti-Cancer Research Center, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China

**[Abstract]** Tumor necrosis factor- $\alpha$  induced protein-8 (TNFAIP8) is a recently discovered antiapoptotic molecule. Recent data have demonstrated that TNFAIP8 is involved in the regulation of apoptosis, cellular signaling cascade, tumor proliferation and invasion, as well as metastasis. In this study, we aimed to investigate the expression of TNFAIP8 in patients with gastric cancer and their relationships with clinicopathology. We detected the expression of TNFAIP8 in 50 cases of gastric cancer and 50 cases of normal gastric tissues with SP immunohistochemical. In gastric cancer, the expression of TNFAIP8 was located in cytoplasm and/or nucleolus of tumor cells; the expression of TNFAIP8 in patients with gastric cancer (26%) was higher than that in the normal gastric tissues (0%,  $P < 0.05$ ). And the expression of TNFAIP8 in poor differentiated adenocarcinoma of gastric was higher compared with that in well differentiated ( $P < 0.05$ ), the same difference was found between and stages of adenocarcinoma. However, the expression of TNFAIP8 was on significant difference among different person with different age and gender. The results suggest that the expression of TNFAIP8 is not related with patient gender or age, but related with the stage of disease. And the expression of TNFAIP8 may be involved in the generation and development of gastric cancer.

**[Key words]** TNFAIP8; Gastric cancer; Immunohistochemistry

胃癌是我国消化道最常见的恶性肿瘤, 其高发率在全世界位居第 2 位<sup>[1]</sup>, 已成为严重威胁人民健康的主要恶性肿瘤之一, 病死率较高, 其确切发病机制仍然未明了。近年研究发现肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白 8(TNFAIP8) 在细胞凋亡、信号转导、肿瘤发生、

发展及侵袭过程中具有重要的调控作用<sup>[2]</sup>。TNFAIP8 是肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白 8 家族 4 个成员之一, TNFAIP8 mRNA 在人多种正常组织和各种恶性肿瘤细胞均表达, 不同类型的肿瘤细胞受到肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 刺激时均可稳定表达 TNFAIP8 mRNA, 且 TNFAIP8 mRNA 在转移癌组织的表达高于原位癌组织。过表达的 TNFAIP8 可导致乳腺癌、肺癌、肾细胞癌和食管鳞状细胞癌的进展<sup>[3-5]</sup>。本研究应用免疫组织化学方法检测 TNFAIP8 在胃癌中的表达, 探讨 TNFAIP8 是否参与胃癌的发生、发展及其机制, 着重讨论

基金项目: 福建省自然科学基金(2010D009)

作者单位: 361005, 厦门大学抗癌研究中心(闻强, 庄国洪); 厦门大学附属中山医院胃肠外科(袁思波, 邱兴烽, 刘忠臣); 厦门大学附属中山医院病理科(廖洪锋)

\* 通信作者: 庄国洪, E-mail: zhuanguohong@yahoo.com.cn; 刘忠臣, E-mail: lzc@xmzsh.com

TNFAIP8 蛋白与胃癌的病理组织学分级、淋巴结转移及肿瘤 TNM 分期间的相关性, 以及探讨 TNFAIP8 与胃癌生物学特性的关系, 揭示其在胃癌发病机制中的作用。

### 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 选择 2010 年至 2011 年间厦门大学附属中山医院收治的有完整资料的胃癌患者手术切除胃癌石蜡包埋组织标本 50 例, 其中男 32 例、女 18 例; 年龄 33~69 岁, 平均年龄 51 岁。所有患者术前均未行放疗和化疗。另取 50 例距胃癌切缘 10 cm 粘膜作为正常胃粘膜。标本经 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋切片 4 μm。按 WHO 病理学分级标准: 中分化腺癌 17 例, 低分化 33 例; 按照 TNM 分期: Ⅰ期 19 例,

Ⅱ期 31 例; 有淋巴结转移 15 例, 无淋巴结转移 35 例。兔抗人 TNFAIP8 PolyClonal Antibody 购自美国的 abcam 公司。UltraSensitive™ S-P 超敏试剂盒购自福建省福州迈新生物技术开发有限公司, 浓缩型 DAB 试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

**1.2 实验方法** 采用免疫组织化学 SP 法检测: 常规脱蜡, 水化; 85 °C 抗原修复过夜, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消化内源性过氧化物酶; 10% 羊血清封闭; 一抗(1:100) 4 °C 冰箱过夜; 二抗, 室温孵育 30 min; DAB 镜下控制染色, 流水冲 10 min; 苏木素核复染; 脱水、透明、封片、观察。每一步骤间均用磷酸盐缓冲液(pH7.4、0.01 mol/L PBS)冲洗 3~4 次, 每次 5 min。阳性对照为人淋巴瘤, 阴性对照以 PBS 代替一抗。

**1.3 结果判定** 细胞着棕黄色颗粒或线网状为阳性

细胞。根据抗体在切片中阳性反应细胞的比例分为: 阳性细胞数<5%或完全消失的标记为阴性, 阳性细胞数>5%的标记为阳性。计数方法: 每张切片选取 10 个高倍视野, 计算阳性细胞数。采用以下评分标准: 1) 阳性细胞百分率: <5% 阳性细胞数为 0 分, 5%~25% 为 1 分, 25%~75% 为 2 分, >75% 为 3 分。2) 着色深浅: 不显色或显色不清者为 0 分, 浅黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。以上 2 项相加最终评定结果, 0~1 分为阴性, 2~3 分为弱阳性(+), 4~5 分为中度阳性(++), >5 分为强阳性(+++)。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS18.0 对免疫组织化学结果进行 χ<sup>2</sup> 检验, 取 P<0.05 有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 TNFAIP8 蛋白在胃癌组织阳性染色分布** TNFAIP8 蛋白主要表达在胃腺癌细胞的胞浆, 个别出现在胞核(图 1)。胃腺癌细胞周围有淋巴细胞浸润。

**2.2 TNFAIP8 在胃癌及正常胃粘膜中的表达** TNFAIP8 在正常胃粘膜中没有表达, 而在胃腺癌中的阳性表达率为 26%。与正常胃粘膜组织相比, TNFAIP8 在胃癌中的表达有明显增加(P<0.05), 详见表 1。

**2.3 TNFAIP8 与胃癌患者的年龄和性别之间的关系** TNFAIP8 在不同年龄胃癌患者以及不同性别的患者中的阳性表达率无明显差异, 差异无统计学意义(P>0.05), 详见图 2 和表 2。

**2.4 TNFAIP8 与胃癌患者的临床病理参数之间的关系** 胃中分化腺癌组 TNFAIP8 阳性表达率分别为 5.9%, 低分化组 TNFAIP8 阳性表达率为 36.4%, 组间

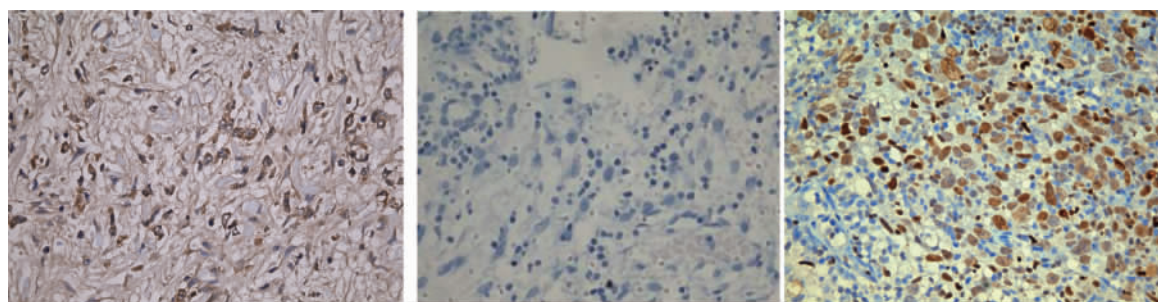


图 1 TNFAIP8 在胃腺癌细胞的胞浆和/或胞核阳性表达(左)、正常胃粘膜(中)和阳性对照淋巴瘤(右)(DAB, ×40)

Fig 1 The positive expression of TNFAIP8 in cytoplasm and/or nucleolus of gastric cancer cells (left), normal gastric mucosa (middle) and positive control lymphoma (right) (DAB, ×40)

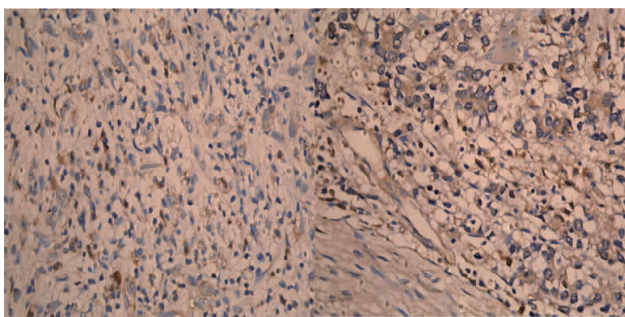
表 1 TNFAIP8 和在正常胃粘膜、胃癌组织中的表达

Tab 1 The expression of TNFAIP8 in the normal gastric tissues and gastric cancer

Group	TNFAIP8		Positive rate (%)	P value
	+	-		
normal gastric mucosa	0	50	0.0	<0.05
gastric cancer	13	37	26.0	

有差异。随病理分化程度的降低, TNFAIP8 阳性表达强度逐渐增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 在肿瘤的 TNM 分期中, TNFAIP8 在 期阳性表达率分别为 10.5%, 期的阳性表达率为 35.5%, 随胃癌临床分期的进展, TNFAIP8 阳性表达率增高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 胃癌中有淋巴结转移组 TNFAIP8 阳性表达率为 80.0%, 无淋巴结转移组 TNFAIP8 阳性表达率为 2.8%, 组间比较有明显差异, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 详见图 3 和表 2。

### 3 讨论



The left picture is from a male patient (69 years old), while the right picture is from a female patient (48 years old).

图 2 TNFAIP8 在不同年龄和不同性别的胃癌患者中的阳性表达无差异 (DAB,  $\times 40$ )

Fig 2 The expression of TNFAIP8 demonstrated no significant difference in different person with different age and gender (DAB  $\times 40$ ).

表 2 TNFAIP8 在胃癌组织中的表达和临床病理参数之间的关系  
Tab 2 The expression of TNFAIP8 in gastric cancer and their relationship with clinicopathology

Clinical data	TNFAIP8		Positive rate (%)	P value
	+	-		
gender				
male	8	24	25.0	>0.05
female	5	13	27.8	
age				
<60	2	7	22.2	>0.05
>60	11	30	26.8	
differentiation				
moderate	1	16	5.9	<0.05
poor	12	21	36.4	
clinical stage				
stage	2	17	10.5	<0.05
stage	11	20	35.5	
lymph node metastasis				
yes	12	3	80.0	<0.05
no	1	34	2.8	

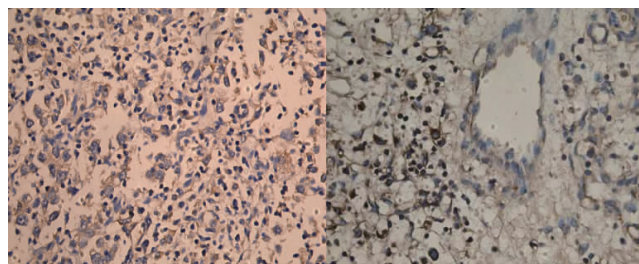


图 3 TNFAIP8 在 期中分化(左)和 期低分化(右)的胃癌患者中的阳性 (DAB,  $\times 40$ )

Fig 3 TNFAIP8 proteins expression in the stage (left) gastric cancer and the stage (right) gastric cancer (DAB,  $\times 40$ )

免疫组织化学技术是免疫学及临床病理应用的重要技术, 结果准确、客观<sup>[6]</sup>。本研究应用该技术检测 TNFAIP8 在 50 例胃腺癌及 50 例正常胃粘膜的表达, 以探讨 TNFAIP8 与胃癌发生、发展、分化的关系。结果显示, TNFAIP8 在正常胃粘膜组织不表达, 在胃腺癌阳性表达率为 26%。与正常胃粘膜组织相比, TNFAIP8 在胃腺癌的表达增加明显。Hadisaputri 等<sup>[4]</sup>研究发过表达的 TNFAIP8 能够负性调节食管鳞癌细胞凋亡, 促进食管癌细胞转化, 导致食管鳞癌形成。有文献报道与未转染 HeLa 细胞相比, HeLa 细胞通过短暂性转染 TNFAIP8 cDNA 序列的表达载体并给予 TNF- $\alpha$  刺激, 可有效地减少凋亡细胞数量<sup>[7]</sup>。证实了 TNFAIP8 过表达时对细胞凋亡具有显著负性调控作用。

本研究中 TNFAIP8 在胃腺癌 期、 期的阳性表达率明分别为 10.5%、35.5%; 胃中分化腺癌组 TNFAIP8 阳性表达率分别为 5.9%, 低分化组 TNFAIP8 阳性表达率为 36.4%; 胃癌中有淋巴结转移组 TNFAIP8 阳性表达率为 80.0%, 无淋巴结转移组 TNFAIP8 阳性表达率为 2.8%, TNFAIP8 在不同性别、年龄胃癌组织中的表达无差异。从结果来看 TNFAIP8 在胃腺癌 期的阳性表达率明显高于 期阳性表达率, 尤其是有淋巴结转移组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) 而在不同年龄和不同性别组, TNFAIP8 的表达无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。揭示了 TNFAIP8 的表达与患者的性别和年龄无关, 而与胃癌的组织学分级、胃癌的 TNM 分期和淋巴结转移有一定的相关性, 提示 TNFAIP8 可能参与了胃癌的发生, 促进了胃癌的发展、增殖、分化和转移。有实验通过对人类乳腺癌 MDA-MB 435 细胞转染 TNFAIP8 并使其稳定表达, 与空载体转染组相比, 发现 TNFAIP8 转染后明显影响 MDA-MB43 细胞的形态和生长速度同时, 培养的 MDA-MB 435 细胞由于 TNFAIP8 过表达会变成不同梭型形状, 并呈游走性生长<sup>[2]</sup>。业已明确, 运动能力是评价肿瘤细胞恶性生



长和恶性发展表型的一个重要参数<sup>[8]</sup>。Kumar 等<sup>[9]</sup>认为 TNFAIP8 过表达可促进 MDA- MB 435 细胞的生长增生和迁移能力。有学者对 TNFAIP8 与非小细胞肺癌淋巴结转移及患者预后的相关性进行了探讨<sup>[3]</sup>, 结果发现非小细胞癌组织 TNFAIP8 表达上调有利于肺癌发展, 利用 siRNA 沉默 A549 和 H1299 肺癌细胞 TNFAIP8 的表达, 这两种细胞的增生速率和集落形成能力均明显降低, 且 TNFAIP8 敲除细胞的侵袭能力发生改变。Dong 等<sup>[10]</sup>提出 TNFAIP8 促进肺癌细胞系侵袭的分子机制除 MMPs 以外, 可能还存在其他效应分子, 认为 TNFAIP8 是评估非小细胞肺癌恶性程度一个非常重要的癌蛋白分子, 将来有可能成为肿瘤治疗的新靶点。据以上研究, 胃癌组织中 TNFAIP8 的表达增加可能提高了胃癌细胞的运动能力, 增强了胃癌细胞的侵袭和转移能力, 促进了胃癌细胞的恶性生长和恶性发展。

综上所述, TNFAIP8 在胃癌的发生、发展、分化中均起到了重要的作用, TNFAIP8 可能参与了胃癌的发生、侵袭、发展以及转移, 具体机制还有待进一步的研究。对 TNFAIP8 生物学功能的研究, 有利于更好地揭示胃癌的发病机制, 为胃癌的防治提供有力的支持, 更有利于控制胃癌患者的预后, 为其他肿瘤研究打下良好的生物学和临床基础。

#### 【参考文献】

- [1] 彭素芳, 王胜军, 陈建国, 等. 胃癌患者外周血单个核细胞 ROR $\gamma$ t 和 IL-17 mRNA 水平的检测及临床意义[J]. 免疫学杂志, 2009, 25(3):319-321.
  - [2] Lou Y, Liu S. The TIPE (TNFAIP8) family in inflammation, immunity, and cancer [J]. Mol Immunol, 2011, 49(1/2): 219-226.
  - [3] Radu CG, Cheng D, Nijagal A, et al. Normal immune development and glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in mice deficient for the T-cell death-associated gene 8 receptor[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(2):668-677.
  - [4] Zhang CB, Chakravarty D, Sakabe I, et al. Role of SCC-S2 in experimental metastasis and modulation of VEGFR-2, MMP-1, and MMP-9 expression[J]. Mol Ther, 2006, 13(5):947-955.
  - [5] Hadisaputri YE, Miyazaki T, Suzuki S, et al. TNFAIP8 overexpression: clinical relevance to esophageal squamous cell carcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2011, 10(3):112-116.
  - [6] 王 军, 贾育红, 张志勇. Shh 和 Ptch 在胃癌中的表达及其临床意义[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(6):544-546.
  - [7] 蒋丽娜, 姚咏明. 肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白 8 家族的研究进展[J]. 中华损伤与修复杂志, 2011, 6(2):268-278.
  - [8] Huggins GS, Bacani CJ, Boltax J, et al. Friend of GATA 2 physically interacts with chicken ovalbumin upstream promoter -TF2 (COUP -TF2) and COUP -TF3 and represses COUP -TF2-dependent activation of the atrial natriuretic factor promoter [J]. J Biol Chem, 2001, 276(30): 28029-28036.
  - [9] Kumar D, Gokhale P, Broustas C, et al. Expression of SCC -S2, an antiapoptotic molecule, correlates with enhanced proliferation and tumorigenicity of MDA - MB 435 cell[J]. Oncogene, 2004, 23(2): 612-616.
  - [10] Dong QZ, Zhao Y, Liu Y, et al. Overexpression of SCC-S2 correlates with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer[J]. Cancer Sci, 2010, 101(6):1562-1569.
- (收稿日期:2011-10-11;修回日期:2011-11-6)  
(编辑 侯 瑞)
- 
- (上接第 180 页)
- structure assay as an independent predictor of fertility *in vivo*: a case-control study[J]. Int J Androl, 2009, 33(1): 221-227.
  - [10] Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, et al. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team[J]. Fertil Steril, 2000, 73(1): 43-50.
  - [11] Zini A, Bielecki R, Phang D, et al. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men [J]. Fertil Steril, 2001, 75(4): 674-677.
  - [12] Zini A, Kamal K, Phang D, et al. Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men [J]. Urology, 2001, 58(2): 258-261.
  - [13] Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART[J]. Hum Reprod Update, 2005, 11(4): 337-349.
  - [14] Zini A, Phillips S, Courchesne A, et al. Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay[J]. Fertil Steril, 2009, 91(6):2495-2500.
  - [15] Dimitrova DK, Kalaidzhiev SK, Nakov LS, et al. The role of antisperm antibodies in the induction of immunologically-mediated human infertility[J]. Akush Ginekol (Sofia), 2001, 40(3):34-38.
  - [16] Chiu WW, Chamley LW. Clinical associations and mechanisms of action of antisperm antibodies [J]. Fertil Steril, 2004, 82(3):529-535.
  - [17] Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa[J]. Biol Reprod, 1998, 59(5): 1037-1046.
  - [18] Zini A, Phillips S, Lefebvre J, et al. Anti-sperm antibodies are not associated with sperm DNA damage: a prospective study of infertile men [J]. J Reprod Immunol, 2010, 8(2): 205-208.
- (收稿日期:2011-09-20;修回日期:2011-12-01)  
(编辑 侯 瑞)