

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.03.019

· 短篇论著 ·

## TFPI-2 在结直肠癌及正常结肠黏膜组织中的表达差异

### Different expression of TFPI-2 protein in colorectal cancer and normal colorectal mucosa tissues

韩东兴, 刘兵, 潘卉, 郭坚, 谭卫林(上海建工医院 普外科, 上海 200083)

**[摘要]** **目的:** 探讨组织因子途径抑制物 2 (tissue factor pathway inhibitor 2, TFPI-2) 蛋白在结直肠癌、癌旁组织及正常结肠黏膜组织中的表达情况。**方法:** 选取 2011 年 5 月至 2011 年 10 月在上海交通大学附属新华医院肛肠外科住院手术切除并经病理证实的结直肠癌组织及相应癌旁组织标本各 50 份, 同时收集在上海建工医院体检行肠镜活检的正常结肠黏膜组织 23 例, 应用免疫组化法检测 TFPI-2 蛋白在结直肠癌组织、癌旁组织及正常结肠黏膜组织中的表达。**结果:** 与癌旁组织及正常黏膜组织相比, TFPI-2 蛋白在结直肠癌中呈阴性表达 (0/50), 明显低于癌旁黏膜组织 [24% (12/50)] 及正常肠黏膜组织 [78.3% (18/23)], 3 组 TFPI-2 蛋白的表达差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。**结论:** TFPI-2 蛋白在结直肠癌组织及正常结肠黏膜组织中的表达存在差异, 可能与结直肠癌的发生、发展相关。

**[关键词]** 组织因子途径抑制物 2; 结直肠癌; 免疫组化

**[中图分类号]** R735.3; R730.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2015)03-0385-03

人组织因子途径抑制物 2 (human tissue factor pathway inhibitor 2, TFPI-2) 属于库尼 (Kunitz) 型丝氨酸蛋白酶抑制剂家族蛋白, 是一种丝氨酸蛋白酶抑制物<sup>[1]</sup>, 其在人类多种正常组织如肝、胰腺、肾、心、骨骼肌、前列腺及胎盘组织中表达<sup>[2]</sup>。TFPI-2 主要由内皮细胞合成和分泌, 其 60% ~ 90% 直接分泌到内皮下细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 层, 发挥对 ECM 的保护作用<sup>[3]</sup>。目前多项研究<sup>[7-9]</sup>发现, 肿瘤组织中 TFPI-2 表达下降, 并且其表达与肿瘤的恶性程度、分期密切相关。国内关于 TFPI-2 在结直肠癌中表达的研究报道较少, 本研究通过免疫组化法检测 TFPI-2 蛋白在结直肠癌组织及正常结肠黏膜组织中的表达差异, 以探讨 TFPI-2 在结直肠癌发生、发展中的可能作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 标本来源

选取 2011 年 5 月至 2011 年 10 月在上海交通大学附属新华医院肛肠外科行手术切除并经病理证实的结直肠癌组织及相应癌旁组织 (距离癌灶边缘 3 ~ 5 cm) 标本各 50 份, 患者病例资料完整, 其中男性 28 人、女性 22 人, 年龄范围 47 ~ 78 岁, 中位年龄 68 岁。按照直肠癌 TNM 分期, 其中 I 期 10 例, II 期 20 例, III 期 15 例, IV 期 5 例 (术前经过放化疗)。同时收集同时期在上海建工医院体检行肠镜活检的正常结肠黏膜组织 23 份, 其中男性 10 人、女性 13 人, 年龄范围 39 ~ 78 岁, 中位年龄 61 岁。所有

标本及临床资料的收集均经上海市新华医院及建工医院医学伦理委员会批准, 征得患者或其家属同意并签署知情同意书。

#### 1.2 主要试剂

TFPI-2 鼠抗人单克隆抗体 (稀释度 1:1 000)、二抗为羊抗鼠多克隆抗体 (稀释度 1:200) 均购自 Abcam 公司, 免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司。

#### 1.3 免疫组化法检测 TFPI-2 蛋白在结直肠癌及正常结肠黏膜组织中的表达

切片常规脱蜡至水, 依次置入二甲苯 I 30 min、二甲苯 II 30 s、二甲苯 III 30 s, 然后依次置入梯度酒精: 无水酒精、95% 酒精、75% 酒精依次各 3 min; 蒸馏水洗 2 次, 放入 3%  $H_2O_2$  室温 30 min 去除内源性过氧化物酶; 热抗原修复: 从上步取出后蒸馏水洗 3 次, 放入塑料玻片架中, 转置入煮沸的枸橼酸盐缓冲液中, 煮沸维持 10 min, 后保温 10 min, 至自然冷却, 冷却后 PBS 洗涤 1 次; 滴加 5% BSA 封闭液, 室温 10 min; 滴加 1:1 000 的鼠抗人 TFPI-2 抗体,

**[基金项目]** 上海市虹口区科委基金资助项目 (No. 1102-18)。Project supported by the Foundation of Hongkou District Science and Technology Commission of Shanghai (No. 1102-18)

**[作者简介]** 韩东兴 (1955-), 男, 上海市人, 副主任医师, 主要从事消化道肿瘤综合治疗的基础与临床研究, E-mail: 29158107@qq.com

**[通信作者]** 谭卫林 (Tan Weilin, corresponding author), E-mail: weilin\_tan@msn.com

37 °C 孵育 2 h, PBS 代替一抗作阴性对照; PBS 冲洗 3 次, 每次 2 min; 滴加 1:200 的 HRP 标记的二抗, 37 °C 孵育 30 min; PBS 冲洗 3 次, 每次 2 min; 加 DAB 显色, 镜下控制反应时间, 蒸馏水冲洗 15 min; 苏木精复染 10~30 s, 蒸馏水洗涤, 1% 盐酸分化, 浸于蒸馏水中; 梯度酒精脱水: 75% 酒精、95% 酒精、无水酒精各 10 s 脱水; 石炭酸润色, 二甲苯透明; 中性树胶封片镜检。细胞核染色棕黄色为阳性。

染色评分标准判定: 综合考虑切片中阳性细胞所占观察同类细胞数的百分比和阳性细胞着色强度两项指标, 半定量判定结果。根据显色程度判断阳性程度: 标本无染色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。根据阳性细胞在观察细胞中所占比例分为: 阳性细胞数 < 10% 为 0 分, 10%~50% 为 1 分, 51%~75% 为 2 分, > 75% 为 3 分。再按这两项指标的评分之和将结果分成 4 级: 0~3 分为阴性(-), 4~6 分为表达阳性(+), 7~9 分为表达强阳性(++); 其中“+”~“++”为阳性表达。

1.4 统计学处理

采用 SAS 9.0 统计学软件, 计数资料以率表示, 采用  $\chi^2$  检验和 Fisher 确切概率计算分析, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学差异。

2 结果

2.1 TFPI-2 蛋白在结直肠癌组织中的表达水平明显低于癌旁及正常肠黏膜组织

TFPI-2 蛋白为分泌性蛋白, 在细胞外基质、血管周围有着高丰度的表达, 部分分布在肠细胞胞浆中, 为粗细不一的棕黄色颗粒。免疫组织化学 SP 法检测结果(图 1、表 1)显示, 结直肠癌组织中 TFPI-2 蛋白表达均为阴性, 与癌旁组织[24.0%(12/50)]及正常肠黏膜组织[78.3%(18/23)]的阳性表达相比, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

表 1 TFPI-2 蛋白在结直肠癌、癌旁和正常肠黏膜组织中的表达

组别	N	TFPI-2 (n)			阳性率 (%)	P
		-	+	++		
结直肠癌组织	50	50	0	0	0	0.0002*
结直肠癌癌旁组织	50	38	11	1	24.0	<0.0001 <sup>△</sup>
正常结直肠黏膜组织	23	5	11	7	78.3	<0.0001 <sup>▲</sup>

\*: 与结直肠癌癌旁组织相比; <sup>△</sup>: 与结直肠癌组织相比; <sup>▲</sup>: 与结直肠黏膜组织相比

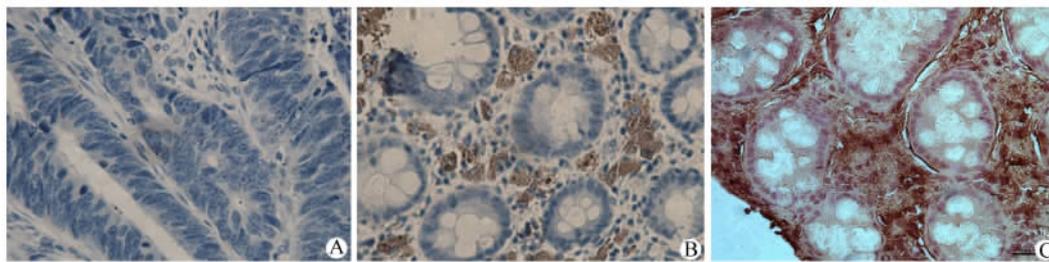


图 1 免疫组化检测 TFPI-2 蛋白在结直肠癌、癌旁及正常直结肠黏膜组织中的表达(SP, ×40)

A: TFPI-2 蛋白在结直肠癌组织中表达阴性; B: TFPI-2 蛋白在癌旁组织中表达阳性; C: TFPI-2 蛋白在正常结直肠黏膜组织中表达阳性

3 讨论

结直肠癌是我国的高发恶性肿瘤之一, 其发病率在我国已经达到 40/10 万, 而且还有逐渐上升的趋势。复发与转移使得结直肠癌根治率下降, 是导致治疗失败的主要原因。目前临床上结直肠癌的总体疗效并不满意, 关键在于对其病因机制还不甚了解。结直肠癌患者生存率的提高有赖于结直肠癌的早期诊断、早期治疗以及对转移和复发的有效预防。肿瘤发生转移和侵袭需降解 ECM 和基底膜( basement membrane, BM)。肿瘤细胞分泌的多种丝氨酸

蛋白酶以及基质金属蛋白酶( matrix metalloproteinases, MMPs )参与 ECM 的降解是肿瘤发生浸润转移过程中的关键一步<sup>[4-5]</sup>。

TFPI-2 基因位于人类染色体 7q22, 全长约 7.0 kb, 属于库尼( Kunitz )型丝氨酸蛋白酶抑制剂家族蛋白<sup>[6]</sup>。TFPI-2 主要由内皮细胞合成和分泌, 其产生的 60%~90% 的 TFPI-2 直接分泌到内皮下 ECM 层, 发挥对 ECM 的保护作用。TFPI-2 是广谱的丝氨酸蛋白酶抑制物, 在体外可强烈抑制纤溶酶、胰蛋白酶、纤维蛋白溶酶、糜蛋白酶、血浆激肽释放酶、凝血因子 FXa 及 MMP-1 和 MMP-3, 而纤溶酶、胰蛋白酶

及基质金属蛋白酶 1 (MMP-1) 和 3 (MMP-3) 等参与 ECM 的重塑过程, 在肿瘤细胞的浸润和转移、伤口愈合、血管新生、纤维蛋白溶解及动脉粥样硬化等生理和病理过程中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。TFPI-2 在多种肿瘤如胰腺癌、乳腺癌、肝癌、胃癌、食道癌、肺小细胞癌等组织中表达下降, 并且其表达与肿瘤的恶性程度、分期密切相关<sup>[7-11]</sup>。国内外多项研究<sup>[12-15]</sup>发现, TFPI-2 与肿瘤转移、侵袭有关。

本实验通过免疫组化法检测了结直肠癌组织、癌旁组织及正常直结肠黏膜组织中 TFPI-2 蛋白的表达情况, 结果显示, 癌旁组织及正常直结肠黏膜组织中 TFPI-2 蛋白的阳性表达率均明显高于结直肠癌组织, 说明在结直肠癌患者肿瘤组织中, 其 TFPI-2 基因都处于一种被抑制状态, 提示 TFPI-2 蛋白表达的下降或缺失与结直肠癌的发生有关。因此 TFPI-2 基因可以作为控制肿瘤转移及复发研究的一个切入点, 通过上调其表达可能达到控制肿瘤复发和转移的目的, 具体机制和方法有待进一步研究。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Kong D, Ma D, Bai H, et al. Expression and characterization of the first kunitz domain of human tissue factor pathway inhibitor-2 [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324( 4 ): 1179-1185.
- [ 2 ] Chand HS, Schmidt AE, Bajaj SP, et al. Structure-function analysis of the reactive site in the first kunitz-type domain of human tissue factor pathway inhibitor-2 [ J ]. *J Biol Chem*, 2004, 279( 17 ): 17500-17507.
- [ 3 ] 潘俊杰. 组织因子途径抑制物-2( TFPI-2 ) 在动脉粥样硬化斑块稳定性中的作用 [ J ]. *复旦学报( 医学版)*, 2013, 40( 5 ): 606-609.
- [ 4 ] Hube F, Reverdiau P, Iochmann S, et al. Computer model of the interaction of human TFPI-2 kunitz-type serine protease inhibitor with human plasmin [ J ]. *Thromb Res*, 2003, 111( 3 ): 197-198.
- [ 5 ] Du X, Chand HS, Kisiel W. Human tissue factor pathway inhibitor-2 does not bind or inhibit activated matrix metalloproteinase-1 [ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1621( 3 ): 242-245.
- [ 6 ] Rao CN, Reddy P, Liu Y, et al. Extracellular matrix-associated serine protease inhibitors ( Mr 33,000, 31,000, and 27,000 ) are single-gene products with differential glycosylation, cDNA cloning of the 33 kDa inhibitor reveals its identity to tissue factor pathway inhibitor-2 [ J ]. *Arch Biochem Biophys*, 1996, 335( 1 ): 82-92.
- [ 7 ] 汤志刚, 孙振阳, 胡何节, 等. 胰腺癌 TFPI-2 的表达及与临床病例关系的分析 [ J ]. *胰腺病学*, 2007, 7( 5 ): 306-308.
- [ 8 ] 周金敬, 徐勇, 涂植光. TFPI-2 在肝癌和正常肝组织中表达的差异 [ J ]. *重庆医科大学学报*, 2009, 34( 11 ): 1472-1474.
- [ 9 ] 冷雪, 孙保存, 臧凤琳, 等. 胃癌中组织因子途径抑制剂 2 的表达及其与预后和肿瘤血管生成模式的相关性研究 [ J ]. *中国肿瘤临床*, 2012, 39( 8 ): 433-438.
- [ 10 ] 孙楨, 樊青霞, 师晓天, 等. 组织因子途径抑制物-2 和神经突触核蛋白在食管癌中的表达及其与肿瘤细胞浸润、转移和凋亡之间的关系 [ J ]. *肿瘤*, 2010, 30( 13 ): 220-225.
- [ 11 ] 段朝霞, 刘锋, 冯云, 等. 组织因子途径抑制剂-2 与乳腺癌的相关研究 [ J ]. *山西医药杂志*, 2010, 39( 1 ): 7-9.
- [ 12 ] Chand HS, Du X, Ma D, et al. The effect of human tissue factor pathway inhibitor-2 on the growth and metastasis of fibrosarcoma tumors in athymic mice [ J ]. *Blood*, 2004, 103( 3 ): 1069-1077.
- [ 13 ] 秦晓林, 徐勇, 范晓卿, 等. TFPI-2 对人肝癌细胞生长增殖、凋亡及 AFP 合成的影响 [ J ]. *中国生物工程杂志*, 2011, 31( 12 ): 33-38.
- [ 14 ] Fischer EG, Riewald M, Huang HY, et al. Tumor cell adhesion and migration supported by interaction of a receptor-protease complex with its inhibitor [ J ]. *J Clin Invest*, 1999, 104( 9 ): 1213-1221.
- [ 15 ] Peerschke EI, Petrovan RJ, Ghebrehiwet B, et al. Tissue factor chemical localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in human tumor tissue [ J ]. *Thromb Haemost*, 2003, 90( 1 ): 140-146.

[ 收稿日期 ] 2015 - 01 - 10

[ 修回日期 ] 2015 - 05 - 07

[ 本文编辑 ] 阮芳铭

#### · 简 讯 ·

### 本刊喜获 2015 - 2017 年度中国科协精品科技期刊工程项目资助

近日,《中国肿瘤生物治疗杂志》获得了 2015 - 2017 年度“中国科协精品科技期刊工程——期刊学术质量提升项目”资助。中国科协从 2006 年开始启动精品科技期刊工程资助项目, 项目重点资助数学、物理、化学、工程学及生命科学(医学、药学)等领域的科技期刊, 目的是提升中国科协系统科技期刊的学术影响力和核心竞争力, 发挥示范引领作用, 更好地服务于科技创新和广大科技工作者, 发挥科技期刊在国家科技创新驱动发展战略中的重要作用。

2015 - 2017 年为中国科技精品科技期刊工程项目第四期, 共分 6 个分项目: 精品科技期刊 TOP 50 项目; 学术质量提升项目; 数字出版建设项目; 期刊集群(联盟)建设项目; 出版人才培养项目; 精品科普期刊项目。本刊获得的“期刊学术质量提升项目”建设周期为 3 年, 每年资助经费为 15 万元。

本刊将获得中国科协精品期刊工程项目资助为契机, 大力加强期刊学术质量建设, 拓展期刊学术交流, 强化科技创新成果报道, 努力推进跨媒体出版, 进一步提高期刊的整体实力和可持续发展能力, 不断提高期刊的学术影响力和核心竞争力, 为把期刊早日建设国内一流水平、国际有较广泛显示度的中国高端精品科技期刊努力奋进。