

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.011

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.011>

CPEB4和VEGF-C在胃癌中的表达及其临床意义

田伟峰¹, 郎小梅²

(青海省第五人民医院 1. 中西医结合科; 2. 内分泌科, 西宁 810007)

[摘要] 目的: 分析胞质多聚腺苷酸化成分结合蛋白4(cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4, CPEB4)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)在胃癌中的表达及其与临床病理因素及预后的关系。方法: Western印迹检测胃癌细胞株及正常胃黏膜细胞株中蛋白的表达, 免疫组织化学分析胃癌石蜡标本蛋白的表达, 运用统计学方法研究蛋白表达与胃癌临床病理的相关性。运用相关分析分析蛋白表达与临床相关性, Log-rank单因素分析和Cox多因素分析对预后进行分析。结果: Western印迹检测CPEB4和VEGF-C蛋白在GES-1胃黏膜细胞株相对表达量明显低于HGC-27, SGC7901和MGC803胃癌细胞株, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。CPEB4阳性表达率为55.0%, VEGF-C阳性表达率为41.4%; 相关分析显示肿瘤大小、肿瘤部位和T分期与CPEB4表达相关, 肿瘤大小和N分期与VEGF-C表达密切相关, 预后生存Cox多因素分析结果显示分化程度、淋巴结转移N分期、CPEB4表达与VEGF-C表达是胃癌患者的独立预后因素。结论: CPEB4和VEGF-C表达在胃癌的侵袭中起重要作用, 其表达为胃癌预后独立因素, 可作为胃癌预后指标。

[关键词] 胃癌; CPEB4; 内皮生长因子C; 预后

Value of CPEB4 and VEGF-C expression in patients with gastric cancer

TIAN Weifeng¹, LANG Xiaomei²

(1. Department of Integrative Medicine; 2. Department of Endocrinology, Fifth People's Hospital of Qinghai Province, Xining 810007, China)

Abstract **Objective:** To investigate the protein expression levels of cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4 (CPEB4) and vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in gastric cancer (GC), and to explore the correlations between these proteins and biological behaviors of GC. **Methods:** The expression levels of proteins were detected by Western blotting in cell lines and GC tissues. In addition, protein expressions were analyzed by immunohistochemistry in formalin-fixed tissues from GC patients. Data analysis was performed by statistical methods. **Results:** The protein expression levels of CPEB4 and VEGF-C in GC cell lines were both higher than those in normal gastric mucosa cell line. CPEB4 and VEGF-C protein was mainly localized in the cytoplasm of GC cells. The positive CPEB4 expression ratio in GC tissues was 55.0%, while VEGF-C positive ratio was 41.4%. Size of tumor, tumor location and T stage were identified as the relative factors of CPEB4 expression, while size

收稿日期 (Date of reception): 2017-07-05

通信作者 (Corresponding author): 田伟峰, Email: m15297093015@163.com

of tumor and N stage was identified as the relative factors of VEGF-C expression in GC tissues. Cox analysis indicated that degree of differentiation, N stage, CPEB4 expression and VEGF-C expression were independent prognostic indicators for GC patients. **Conclusion:** CPEB4 and VEGF-C expression were elevated in GC and related to tumor invasion, metastasis and prognosis, and may be promising indicators of prognosis for GC patients.

Keywords gastric cancer; CPEB4; VEGF-C; prognosis

胃癌是常见的恶性肿瘤之一, 至2030年预计全球每年胃癌发生100万, 死于胃癌的患者将近70万^[1]。越来越多的研究^[2]认为胃癌的发生是一系列分子生物学作用的结果。早期诊断早期治疗能够提高胃癌患者的生存率, 因此探索敏感度和特异度较高的肿瘤标志物, 早期发现胃癌, 提高胃癌患者生存率。胞质多聚腺苷酸化成分结合蛋白4(cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4, CPEB4)是新发现的CPEB家族成员之一^[3]。近年研究^[4]发现CPEB4可能在恶性肿瘤的发生发展过程中起到重要作用。许多研究者发现在脑膜瘤、乳腺癌及直肠恶性肿瘤中发现CPEB4表达与肿瘤的侵袭、迁移及不良预后密切相关。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)即淋巴管内皮生长因子-C, VEGF与其受体VEGFR-3与其配体共同作用, 在肿瘤诱导的淋巴管的生成和淋巴管的发生中起重要作用^[5]。Yang等^[6]发现VEGF-C表达是胃癌患者预后的独立危险因素。而目前对CPEB4和VEGF-C在胃癌中的作用及其相互作用的研究较少。本研究通过检测CPEB4和VEGF-C mRNA和蛋白的表达, 结合临床病理因素, 探讨CPEB4和VEGF-C在胃癌发生发展中的作用。

1 对象与方法

1.1 对象

收集2008年6月至2014年12月在青海省第五人民医院实施胃癌根治术并具有完整临床病理资料的胃癌患者的随访记录。本组患者纳入标准为: 1)病理诊断为胃腺癌; 2)围手术期内未死亡的患者; 3)术前未接受新辅助放化疗的患者; 4)具有完整随访资料的患者。排除标准为: 1)术前检查有腹腔、肝、肺等远处脏器转移患者; 2)清扫淋巴结数目小于15枚; 3)未接受胃癌根治性R0切除。对本组胃癌患者术后定期复查, 第1年每3个月1次, 第2年每6个月1次, 3年及以后每年1次, 对患者进行定期随访。本组患者术后进行病理分型, 分级分期参考第7版胃癌TNM分期。

1.2 Western 印迹检测蛋白表达

Western印迹检测蛋白表达水平, 总蛋白提取物在10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶电泳分离, 电转移至PVDF膜。非特异性结合位点, 阻断后60 min和5%的脱脂牛奶膜孵育过夜4℃加入原兔抗人CPEB4(ab155204, 1:1 000稀释; 英国Abcam公司)和VEGF-C(ab63221, 1:1 000稀释; 英国Abcam公司), 然后对膜清洗15 min, 3×PBS-T用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记, 抗兔免疫球蛋白抗体(1:2 000稀释; 中山生物技术)在室温下孵育60 min。然后用10 mL的免疫复合物用PBS-T洗涤3次(美国Cell Signaling公司)。利用软件技术测定凝胶蛋白条带的强度(美国Alpha Innotech公司)。以GAPDH作为内参照。最后计算出蛋白相对表达量。

1.3 免疫组织化学及阳性判定

常规烤片、脱蜡、水化, 加入柠檬酸钠缓冲液抗原修复, 用3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶, 5%羊血清封闭30 min, 加用CPEB4 兔抗人单克隆抗体(1:50稀释; 英国Abcam公司)或VEGF-C 兔抗人单克隆抗体(1:50稀释, 英国Abcam公司)室温孵育2 h, 用PBS洗涤, 滴加HRP标记的山羊抗兔IgG(美国Sigma公司)室温孵育30 min, PBS充分洗涤后使用DAB显色, 流水冲洗后用苏木精复染, 乙醇、二甲苯脱水, 最后封片镜检。未加一抗者为阴性对照。

评分时在至少5个区域进行随机观察, 此区域必须存在典型病理特征, 分低度视野区域和高倍视野区域, 采用染色强度和肿瘤细胞阳性率综合评价染色指数。按肿瘤细胞着色强度和阳性细胞率分别进行计分。每个视野计数100个细胞, 按阳性细胞占全部细胞的比例并记分: <9%为0分, 10%~25%为1分, 26%~50%为2分, 51%~75%为3分, >75%为4分。按染色强度评分: 未着色或与背景一致为0分, 浅黄色为1分, 棕黄色为2分, 黄褐色为3分。采取染色强度和肿瘤细胞阳性率综合评价染色指数。阳性细胞率计分乘以着色强度评分≤3分为表达阴性, >3分为表达阳性^[7]。

1.4 统计学处理

采用SPSS 21.0统计学软件。*t*检验检测胃癌细胞株和正常胃黏膜细胞株中蛋白表达差异, 卡方检验检测石蜡组织中蛋白表达与临床病理因素之间相关性, Kaplan-Merier生存分析进行单因素分析, Log-rank比较组间差异, 将单因素有意义的因素纳入Cox回归进行多因素分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌患者临床病理情况

本研究共纳入140例胃癌患者, 男79例, 女61例; 肿瘤最大直径 ≤ 5 cm者94例, > 5 cm者46例; 远端1/3胃癌54例, 中1/3胃癌53例, 近端1/3胃癌33例; 高中分化癌11例, 低分化癌129例; 年龄平均58.9岁, ≤ 60 岁者82例, > 60 岁者58例; 淋巴结转移N分期N0期44例, N1期21例, N2期29例, N3期46例; 肿瘤浸润T1期10例, T2期4例, T3期7例, T4期119例。

2.2 胃癌细胞株及正常胃黏膜细胞中 mRNA 表达水平

CPEB4蛋白在正常胃黏膜细胞株GES-1

(0.54 ± 0.12)表达水平明显低于胃癌细胞株HGC-27(1.21 ± 0.32), SGC7901(1.13 ± 0.32)和MGC803(0.85 ± 0.29), 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。VEGF-C蛋白在正常胃黏膜细胞株GES-1(0.43 ± 0.11)表达水平明显低于胃癌细胞株HGC-27(0.97 ± 0.24), SGC7901(1.24 ± 0.21)和MGC803(0.83 ± 0.21), 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图1)。

2.3 CPEB4 和 VEGF-C 蛋白表达与临床病理因素的相关性

免疫组织化学结果显示CPEB4和VEGF-C均在细胞胞浆中表达(图2)。本组胃癌石蜡标本中CPEB4阳性表达77例, 阳性表达率55.0%, VEGF-C阳性表达58例, 阳性表达率为41.4%。结合临床病理因素相关分析显示肿瘤大小($P = 0.023$)、肿瘤部位($P = 0.030$)和T分期($P = 0.013$)与CPEB4表达相关, 进一步发现浸润深度越深、肿瘤越大、远端胃癌CPEB4阳性表达越高; 而肿瘤大小($P < 0.001$)和N分期($P < 0.001$)与VEGF-C表达密切相关, 进一步发现淋巴结转移越多, VEGF-C阳性表达越高(表1)。进一步相关分析显示CPEB4的表达与VEGF-C的表达成正相关($r = 0.242$, $P = 0.004$)。

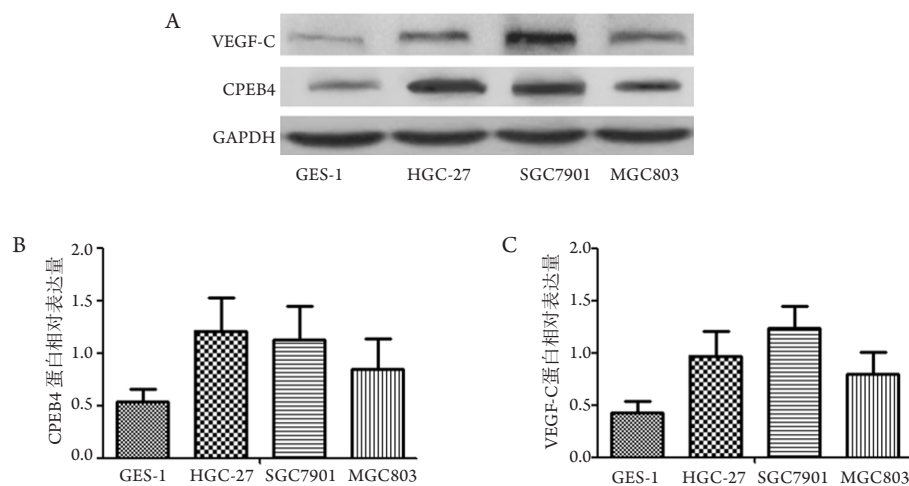


图1 CPEB4和VEGF-C在正常细胞株(GES-1)及胃癌细胞株(HGC-27, SGC7901, MGC803)表达

Figure 1 Western blot analysis of CPEB4 and VEGF-C protein expressions in gastric cancer cells and non-tumor cells

(A) CPEB4和VEGF-C在正常细胞株(GES-1)及胃癌细胞株(HGC-27, SGC7901, MGC803)表达; (B)CPEB4蛋白相对表达量; (C)VEGF-C蛋白相对表达量。

(A) Western blot analysis of CPEB4 and VEGF-C protein expressions in gastric cancer cells and non-tumor cells; (B) Relative quantity of CPEB4 protein; (C) Relative quantity of VEGF-C protein.

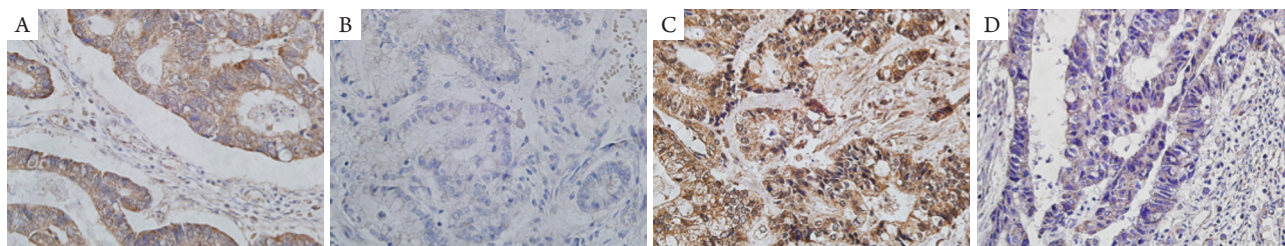


图2 CPEB4和VEGF-C蛋白在胃癌组织中的表达(IHC, × 400)

Figure 2 CPEB4 and VEGF-C protein expressions in gastric cancer tissue (IHC, × 400)

(A) CPEB4在胃癌组织表达阳性; (B) CPEB4在胃癌组织表达阴性; (C) VEGF-C在胃癌组织表达阳性; (D) VEGF-C在胃癌组织表达阴性。

(A) CPEB4 is positively expressed in gastric cancer tissue; (B) CPEB4 is negatively expressed in gastric cancer tissue; (C) VEGF-C is positively expressed in gastric cancer tissue; (D) VEGF-C is negatively expressed in gastric cancer tissue.

表1 胃癌患者CPEB4和VEGF-C表达与临床病理因素之间相关性

Table 1 Correlation between the expressions of CPEB4/VEGF-C and clinicopathological factors in gastric cancer patients

因素	CPEB4 阳性数	P	VEGF-C 阳性数	P
性别		0.401		0.068
男	41		38	
女	36		20	
年龄/年		0.469		0.056
≤60	43		40	
>60	34		18	
肿瘤大小/cm		0.023		<0.001
≤5	58		29	
>5	19		29	
肿瘤部位		0.030		0.158
下1/3	37		17	
中1/3	23		26	
上1/3	17		15	
分化程度		0.054		0.358
高中分化	3		6	
低分化	74		52	
T分期		0.013		0.369
T1	3		2	
T2	0		1	
T3	2		4	
T4	72		51	
N分期		0.174		<0.001
N0	19		12	
N1	15		3	
N2	17		15	
N3	26		28	

2.4 患者预后生存分析

预后单因素分析结果显示性别、年龄、肿瘤大小与及肿瘤部位与胃癌患者的预后无关($P>0.05$), 而分化程度($P=0.004$)、肿瘤浸润T分期($P<0.001$)、淋巴结转移N分期($P<0.001$)、CPEB4表达($P=0.006$)及VEGF-C表达($P=0.002$)与胃癌患者的预后相关

(表2)。Cox多因素分析结果显示分化程度($HR=4.719$, $P=0.033$)、N分期($HR=1.411$, $P<0.001$)、CPEB4表达($HR=0.571$, $P=0.015$)与VEGF-C表达($HR=0.636$, $P=0.042$)是胃癌患者的独立预后因素(表3)。进一步分析发现CPEB4和VEGF-C阴性表达预后明显好于阳性表达患者(图3)。

表2 胃癌患者预后单因素分析

Table 2 Univariate analysis of gastric cancer patients

因素	5年生存率/%	单因素分析	
		χ^2	P
性别		1.253	0.263
男	42.2		
女	50.0		
年龄/岁		0.035	0.853
≤ 60	41.5		
>60	43.1		
肿瘤大小/cm		0.896	0.334
≤ 5	45.7		
>5	34.8		
肿瘤部位		1.840	0.398
下1/3	50.0		
中1/3	35.8		
上1/3	39.4		
分化程度		8.405	0.004
高中分化	61.1		
低分化	39.3		
T分期		17.753	<0.001
T1	90.0		
T2	100.0		
T3	71.4		
T4	34.5		
N分期		48.264	<0.001
N0	72.7		
N1	52.4		
N2	37.9		
N3	10.7		
CPEB4表达		7.525	0.006
阴性	55.6		
阳性	31.2		
VEGF-C表达		9.981	0.002
阴性	53.7		
阳性	25.9		

表3 胃癌患者预后多因素分析

Table 3 Multivariate analysis of gastric cancer patients

因素	回归系数	标准误	Wald 值	自由度	P	相对危险度
分化程度	1.552	0.728	4.538	1	0.033	4.719
T 分期	0.658	0.349	3.561	1	0.059	1.932
N 分期	0.334	0.077	19.935	1	<0.001	1.411
CPEB4 表达	-0.561	0.231	5.879	1	0.015	0.571
VEGF-C 表达	-0.452	0.222	4.133	1	0.042	0.636

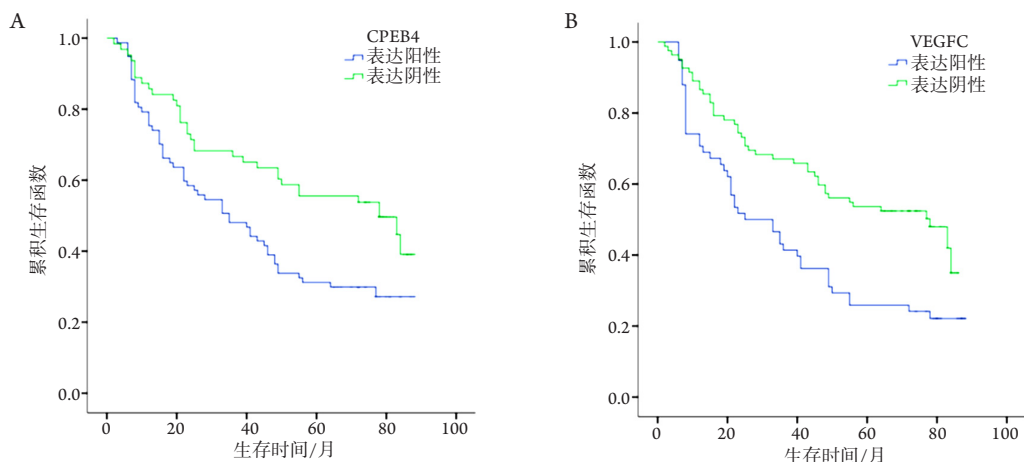


图3 CPEB4, VEGF-C阴性表达患者与阳性表达患者生存期的比较

Figure 3 Survival curve of gastric cancer patients according to stage subgroup of CPEB4 and VEGF-C expression (negative or positive)

(A) CPEB4 阴性表达患者预后好于CPEB4 阳性表达患者; (B) VEGF-C阴性表达患者预后好于VEGF-C阳性表达患者。

(A) Survival curve of gastric cancer patients according to stage subgroup of CPEB4 expression (negative or positive); (B) Survival curve of gastric cancer patients according to stage subgroup of VEGF-C expression (negative or positive).

3 讨论

CPEB蛋白家族是具有序列特异性的RNA结合蛋白, 含有RNA识别基序和锌指结构。CPEB4是CPEB蛋白家族之一。目前研究^[8]认为CPEB4高表达有助于肿瘤的生长、血管形成、迁移、侵袭和转移。一项脑星形细胞瘤的研究^[9]发现相较于正常组织, CPEB4在肿瘤组织中呈明显的高表达, 且其表达与病理分级、肿瘤大小、颅内高压症和癫痫症状等肿瘤特性具有相关性。有学者^[10]在乳腺癌中发现CPEB4在乳腺浸润性导管癌组织中高表达, 进一步结合临床因素分析发现高表达的CPEB4与低级别的肿瘤分化程度和淋巴结转移密切相关。万仁辉等^[7]研究发现CPEB4蛋白在结直肠癌组织中高表达, 结合预后分析发现CPEB4表达是预后独立因素, 临床上可检测CPEB4表达预测结直肠癌

患者预后。本研究发现CPEB4蛋白在胃癌细胞株中表达明显高于正常黏膜组织, 且阳性表达的CPEB4与浸润程度、肿瘤大小、胃癌部位相关, 推测CPEB4蛋白可能参与胃癌的浸润, 阳性表达CPEB4患者胃癌生物学特性较差。

VEGF-C是VEGF家族重要的成员之一, 其可能在淋巴结转移中发挥重要作用, 并且目前认为其是淋巴结转移的标志之一。而目前对于VEGF-C促进淋巴结转移的机制仍存在争议, 大多数学者认为VEGF-C与其特异性靶点EGFR-3结合, 导致下游SHc磷酸化, 进而活化ERK1和ERK2, 进而导致淋巴管上皮细胞发生转移和淋巴细胞的增生。目前在多种恶性肿瘤发现VEGF-C的高表达^[11-12]。高表达的VEGF-C是多种肿瘤预后不良因素。Morita等^[13]在头颈部鳞癌细胞株中发现VEGF-C高表达, 且VEGF-C在低分化癌中较高

分化癌高表达。本研究同样发现胃癌细胞株中 VEGF-C 蛋白表达水平明显高于正常胃黏膜细胞株, 且淋巴结转移越多, 肿瘤越大, VEGF-C 阳性率越高, 结合 VEGF-C 与淋巴结密切相关, 推测 VEGF-C 可能在胃癌淋巴结转移中发挥作用。

预后多因素分析发现 CPEB4 和 VEGF-C 是胃癌患者的预后独立因素, 同 N 分期一起预测胃癌患者的预后, 进一步分析发现 CPEB4 和 VEGF-C 低表达患者预后差于 CPEB4 和 VEGF-C 高表达患者, 结合 CPEB4 表达和 VEGF-C 表达呈正相关, 推测 CPEB4 阳性和 VEGF-C 阳性表达胃癌患者肿瘤生物学特性较差, 两者在胃癌发生发展中相互作用, 更易于转移和浸润。临床上通过检测 CPEB4 与 VEGF-C 蛋白表达有助于鉴别高危胃癌患者, 从而选择合适的治疗方案。

本研究发现 CPEB4 与 VEGF-C 在胃癌细胞中高表达, 且 CPEB4 与 VEGF-C 为预后独立因素, 可作为预后预测指标, 将来进一步通过扩大样本量及分子基础研究进一步阐明 CPEB4 与 VEGF-C 在胃癌发生发展中的作用机制。

参考文献

- Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009[J]. *CA Cancer J Clin*, 2009, 59(4): 225-249.
- 孙杨, 王先成, 方柏荣, 等. ANGPTL4 基因调控黑色素瘤细胞醛缩酶 A 表达水平的机制[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2015, 40(8): 851-857.
SUN Yang, WANG Xiancheng, FANG Borong, et al. Angiotensin-like 4 modulates aldolase A expression in human melanoma cell in a PKC dependent manner[J]. *Journal of Central South University. Medical Sciences*, 2015, 40(8): 851-857.
- Tsai LY, Chang YW, Lee MC, et al. Biphasic and stage-associated expression of CPEB4 in hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155025.
- Sun HT, Wen X, Han T, et al. Expression of CPEB4 in invasive ductal breast carcinoma and its prognostic significance[J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 8: 3499-506.
- Bernaudin JF, Kambouchner M, Lacave R. Lymphatic vascular system, development and lymph formation. Review[J]. *Rev Pneumol Clin*, 2013, 69(2): 93-101.
- Yang LP, Fu LC, Guo H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor C correlates with lymphatic vessel density and prognosis in human gastroesophageal junction carcinoma[J]. *Onkologie*, 2012, 35(3): 88-93.
- 万仁辉, 温宜清, 吕勇, 等. CPEB4 在结直肠癌组织中表达及其与预后的关系[J]. *消化肿瘤杂志(电子版)*, 2016, 8(3): 171-175.
WAN Renhui, WEN Yiqing, LÜ Yong, et al. CPEB4 expression and relationship with clinicopathology and prognosis in colorectal cancer[J]. *Journal of Digestive Oncology. Electronic Version*, 2016, 8(3): 171-175.
- Shin J, Salameh JS, Richter JD. Impaired neurodevelopment by the low complexity domain of CPEB4 reveals a convergent pathway with neurodegeneration[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29395.
- Hu W, Yang Y, Xi S, et al. Expression of CPEB4 in human glioma and its correlations with prognosis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(27): e979.
- Lu R, Zhou Z, Yu W, et al. CPEB4 promotes cell migration and invasion via upregulating Vimentin expression in breast cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 489(2): 135-141.
- Hong KD, Lee Y, Kim BH, et al. Expression of GLI1 correlates with expression of lymphangiogenesis proteins, vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3, in colorectal cancer[J]. *Am Surg*, 2013, 79(2): 198-204.
- Yu P, Tung JK, Simons M. Lymphatic fate specification: an ERK-controlled transcriptional program[J]. *Microvasc Res*, 2014, 96: 10-15.
- Morita Y, Morita N, Hata K, et al. Cyclooxygenase-2 expression is associated with vascular endothelial growth factor-c and lymph node metastasis in human oral tongue cancer[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2014, 117(4): 502-510.

本文引用: 田伟峰, 郎小梅. CPEB4 和 VEGF-C 在胃癌中表达及其临床意义[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(9): 1833-1839. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.011

Cite this article as: TIAN Weifeng, LANG Xiaomei. The value of CPEB4 and VEGF-C expression in patients with gastric cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(9): 1833-1839. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.011