

骨桥蛋白、淋巴细胞活化基因-3、Dickkopf 相关蛋白 1 在胃癌组织中的表达及与临床病理特征的相关性

顾磊,肖婕,文斐

[鄂东医疗集团黄石市中心医院(湖北理工学院附属医院)病理科,黄石 435000]

[摘要] **目的** 探讨骨桥蛋白(OPN)、淋巴细胞活化基因-3(sLAG-3)、Dickkopf 相关蛋白 1(DKK-1)在胃癌组织中的表达及临床病理特征。**方法** 选取 160 例胃癌患者,分析 OPN、sLAG-3、DKK-1 表达同患者临床病理特征之间的关系,并对比三者在胃癌组织、癌旁组织以及正常胃黏膜组织当中的阳性表达情况。**结果** OPN 蛋白在胃癌组织当中的表达同分化程度、淋巴结转移、浸润深度以及胃癌分期等存在显著相关性($P < 0.05$); sLAG-3 在胃癌组织当中的表达同患者的胃癌分期、浸润深度以及分化程度等存在显著相关性($P < 0.05$); DKK-1 蛋白在胃癌组织当中的表达同分化程度、淋巴结转移、浸润深度以及胃癌分期等存在显著相关性($P < 0.05$);胃癌组织当中 OPN、sLAG-3 以及 DKK-1 表达阳性率显著高于癌旁组织以及正常胃黏膜组织($P < 0.05$)。**结论** OPN、sLAG-3、DKK-1 表达与胃癌分期、浸润深度以及淋巴结转移等因素存在密切联系,能够评估患者的病情及预后质量。

[关键词] 胃肿瘤;基因表达调控;骨桥蛋白质;病理状态,体征和症状

中图分类号:R735.2 文献标识码:A DOI:10.3969/J.issn.1672-6790.2018.05.021

Correlation research on the clinical expressions of OPN, sLAG-3 and DKK-1 in the gastric cancer tissues with its clinical pathological features Gu Lei, Xiao Jie, Wen Fei (Department of Pathology, Huangshi Central Hospital of Edong Healthcare, Huangshi 435000, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the correlation of the expressions of OPN, sLAG-3 and DKK-1 in the gastric cancer tissues with its clinical pathological features. **Method** 160 gastric cancer patients were selected. The correlation of the clinical expressions of OPN, sLAG-3 and DKK-1 with its clinical pathological features were analyzed; the positive rate of OPN, sLAG-3 and DKK-1 in the gastric cancer tissues, para-carcinoma tissues and normal gastric mucosa tissues was compared. **Result** In the gastric cancer tissues, the clinical expressions of OPN had an obvious correlation with the differentiated degree, lymphatic metastasis, infiltration depth and clinical staging of gastric cancer ($P < 0.05$); in the gastric cancer tissues, the clinical expressions of sLAG-3 had an obvious correlation with the clinical staging of gastric cancer, infiltration depth and differentiated degree ($P < 0.05$); in the gastric cancer tissues, the clinical expressions of DKK-1 had an obvious correlation with the differentiated degree, lymphatic metastasis, infiltration depth and clinical staging of gastric cancer ($P < 0.05$); the positive rate of OPN, sLAG-3 and DKK-1 in the gastric cancer tissues was significantly higher than that of para-carcinoma tissues and normal gastric mucosa tissues ($P < 0.05$). **Conclusion** In the gastric cancer tissues, the expressions of OPN, sLAG-3 and DKK-1 have a close correlation with the clinical staging of gastric cancer, infiltration depth and lymphatic metastasis, which it is helpful to evaluate the patient's illness conditions and clinical prognosis.

[Keywords] Stomach neoplasms; Gene expression regulation; Osteopontin; Pathological conditions, signs and symptoms

胃癌是临床上比较常见的一种恶性肿瘤,患者的死亡率以及发病率都位居消化系统肿瘤的首位。当前情况下,胃癌患者的具体作用机制仍然不够明

确。不过胃癌转移侵袭是患者预后较差的风险因素^[1]。肿瘤标志物作为肿瘤细胞恶化过程当中表达癌基因生成的活性物质,在患者血液、体液以及肿

基金项目:湖北省黄石市医疗卫生科技计划项目(HSYL2015000081)

作者简介:顾磊,主治医师,Email:gulei610@163.com

瘤组织当中都可以检出,良性组织或者是正常组织当中不表达或者是低表达,所以医务人员可以通过检测肿瘤标志物表达来判断患者病情^[2]。本研究通过检验骨桥蛋白(OPN)、淋巴细胞活化基因-3(sLAG-3)、Dickkopf 相关蛋白 1(DKK-1)在胃癌组织当中的表达,分析其同患者病理特征之间的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取2016年1月至2017年2月我院收治的胃癌患者160例,其中男101例,女59例;年龄范围22~69岁,年龄(35.4 ± 2.6)岁;病程范围2~13年,病程(8.1 ± 0.4)年。

1.2 纳入与排除标准 纳入标准:患者经过病理学检查确诊属于胃癌;年龄超过18岁;经过CT或者超声胃镜检查进行TNM分期;均进行切除手术治疗。排除标准:患者存在恶性肿瘤病史;合并其他肿瘤;曾进行免疫治疗或者化疗;合并严重肝肾功能障碍;合并凝血功能障碍;妊娠哺乳期女性。患者均知情同意本研究,并且本研究通过医院伦理委员会审核。

1.3 方法

1.3.1 标本来源 患者手术过程当中切取胃癌组织以及正常胃黏膜组织(距离患者的肿瘤边缘要超过5cm)。切取之后放入液氮并且使用冰箱进行冷冻保存。

1.3.2 OPN检测 主要试剂为鼠抗人OPN抗体以及SP免疫试剂盒(北京金桥生物公司生产)。具体检测步骤方面,应用免疫组织化学法进行,标本使用10%的甲醛进行固定,石蜡包埋固定之后,3 μm 切片。染色步骤根据免疫试剂盒的说明书严格进行操作,应用PBS替代一抗进行阴性对照,用已经证实的OPN染色阳性切片当作阳性对照^[3]。

1.3.3 sLAG-3检测 sLAG-3表达的检测方面应用固相夹心酶联免疫法(ELISA法)进行,具体操作步骤严格根据试剂盒的说明书进行操作。首先将标准品依次进行倍比稀释,相应的试剂根据说明依次进行稀释。加样过程当中分别设置空白孔、标准孔以及待检测的样品孔,其中样品孔设置为复孔。确定之后依次添加不同浓度50 μL 的标准品以及稀释之后的样品,在常温条件下持续孵育60 min。之后弃去液体并且依次添加50 μL 的检测溶液A,在常温条件下持续孵育60 min之后洗板。甩尽板内液体的液体之后使用洗涤液反复冲洗反应板,在厚吸水纸上面反复拍干,之后,洗涤2次并且添加50 μL 检测溶液B,持续孵育60 min。反复洗板3次之后

每孔添加30 μL 的底物溶液,在室温条件下避光显色20 min。之后每孔添加30 μL 的终止液,震荡混匀确保颜色从蓝色逐渐转变为黄色。使用酶标仪在350 nm的波长检测各孔吸光度(OD值)。将标准品当中的OD值当作横坐标,标准品的浓度当作纵坐标,从而绘制标准曲线,应用标准曲线法来判断样品浓度^[4]。

1.3.4 DKK-1检测 检测使用的试剂为兔抗人GSK-3 β 抗体(上海斯信科技公司生产),兔抗人DKK-1抗体为(上海由谊忠联公司生产),兔抗人 β -catenin抗体、SP免疫试剂盒及DAB显色剂(北京金桥生物公司生产),光学显微镜以及DP70图像采集系统为日本奥林巴斯公司生产。具体检测步骤方面,取患者的石蜡包埋标本,连续制成3 μm 的切片,常规脱蜡之后使用微波进行抗原的修复,使用3%的过氧化氢溶液从而阻断标本当中存在的过氧化物酶活性。应用正常山羊血清进行封闭,为各个标本分别滴加一抗兔抗人兔抗人GSK-3 β 抗体、兔抗人DKK-1抗体以及兔抗人 β -catenin抗体,常温条件下持续孵育62 min之后依次添加山羊抗兔二抗,并且应用辣根酶来标记蛋白素。DAB进行显色之后应用苏木精完成复染,之后分别进行脱水、透明以及封固处理。上述实验步骤当中,PBS替代一抗当作阴性对照,使用阳性切片当作阳性对照。

1.4 观察指标 染色程度评分方面:0分为无着色,1分为浅黄色,2分为棕黄色,3分为棕褐色。细胞比例评分方面,0分为阳性细胞的占比低于10%,1分是阳性细胞的占比在10%~25%之间,2分是阳性细胞的占比在25%~50%之间,3分是阳性细胞的占比超过50%。将染色评分以及比例评分相加得到综合评分,其中<2分为阴性(-),2~3分为疑似阳性(+),4~5分为阳性(++),6分为强阳性(+++),后两者判断属于阳性表达^[5]。

对比患者胃癌组织、癌旁组织以及正常胃黏膜组织当中OPN、sLAG-3、DKK-1表达情况,同时分析三者同患者年龄、性别、分化程度、浸润深度、TNM分期以及淋巴结转移与否等病理特征的关系^[6]。

1.5 统计学处理 采用SPSS 18.0分析数据,观测数据均为计数资料。常规计数资料比较应用 χ^2 检验,等级计数资料比较应用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组织当中OPN、sLAG-3以及DKK-1表达

阳性对比 胃癌组织当中 OPN、sLAG-3 以及 DKK-1 表达阳性率显著高于癌旁组织以及正常胃黏膜组织 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 不同组织当中 OPN、sLAG-3 以及 DKK-1 表达阳性对比(例)

部位	例数	OPN	sLAG-3	DKK-1
正常胃黏膜组织	160	2	6	4
癌旁组织	160	11	9	10
胃癌组织	160	34 ^{ab}	35 ^{ab}	28 ^{ab}
χ^2 值		38.540	34.069	24.423
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:OPN 为骨桥蛋白,sLAG-3 为淋巴细胞活化基因-3, DKK-1 为 Dickkopf 相关蛋白 1, 下表同; 两两比较为分割卡方检验, 与癌旁组织比较,^a $P < 0.05$; 与正常胃黏膜组织比较,^b $P < 0.05$

2.2 OPN 蛋白在胃癌组织当中的表达 OPN 蛋白在胃癌组织当中的表达同分化程度、淋巴结转移、浸润深度以及胃癌分期等有显著关联关系 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 OPN 蛋白在胃癌组织当中的表达(例)

项目	例数	-	+	++	+++	Uc 值	P 值
年龄						0.818	0.413
≥60 岁	76	41	20	9	6		
<60 岁	84	54	11	10	9		
性别						1.140	0.254
男	94	63	11	14	6		
女	66	37	15	8	6		
分化						3.467	0.001
高中分化	70	32	20	9	9		
低分化	90	65	14	9	2		
淋巴结转移						3.835	<0.001
无	60	24	20	10	6		
有	100	75	9	8	8		
浸润深度						4.226	<0.001
黏膜下层-肌层	64	30	15	9	10		
肌层-浆膜层	96	74	13	9	0		
TNM 分期						4.198	<0.001
I、II 期	68	26	22	13	7		
III、IV 期	92	69	9	8	6		

注:秩和检验

2.3 sLAG-3 蛋白在胃癌组织当中的表达 sLAG-3 在胃癌组织当中的表达同患者的胃癌分期、浸润深度以及分化程度等有显著的关联关系 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 sLAG-3 蛋白在胃癌组织当中的表达(例)

项目	例数	-	+	++	+++	Uc 值	P 值
年龄						0.083	0.934
≥60 岁	76	44	18	8	6		
<60 岁	84	51	12	11	10		
性别						1.252	0.210
男	94	60	12	16	6		
女	66	35	14	9	8		
分化						4.528	<0.05
高中分化	70	29	22	10	9		
低分化	90	66	13	8	3		
淋巴结转移						2.936	>0.05
无	60	22	15	16	7		
有	100	36	25	22	17		
浸润深度						5.134	<0.05
黏膜下层-肌层	64	35	10	10	9		
肌层-浆膜层	96	71	12	13	0		
TNM 分期						5.226	<0.05
I、II 期	68	23	23	14	8		
III、IV 期	92	65	10	9	8		

注:秩和检验

2.4 DKK-1 蛋白在胃癌组织当中的表达 DKK-1 蛋白在胃癌组织当中的表达同分化程度、淋巴结转移、浸润深度以及胃癌分期等存在显著的关联关系 ($P < 0.05$), 见表 4。

表 4 DKK-1 蛋白在胃癌组织当中的表达(例)

项目	例数	-	+	++	+++	χ^2 值	P 值
年龄						1.296	>0.05
≥60 岁	76	44	18	10	4		
<60 岁	84	58	12	8	6		
性别						2.351	>0.05
男	94	66	14	12	2		
女	66	36	16	6	8		
分化						4.819	<0.05
高中分化	70	34	18	10	8		
低分化	90	68	12	8	2		
淋巴结转移						5.013	<0.05
无	60	26	22	8	4		
有	100	76	8	10	6		
浸润深度						6.224	<0.05
黏膜下层-肌层	64	32	14	8	10		
肌层-浆膜层	96	70	16	10	0		
TNM 分期						5.194	<0.05
I、II 期	68	30	20	12	6		
III、IV 期	92	72	10	6	4		

注:秩和检验

3 讨论

胃癌是我国比较常见的一种恶性肿瘤,转移以及侵袭是影响患者预后的关键因素。相关研究的结果表明,一半以上的胃癌患者在药物治疗以及手术治疗之后,仍然死于肿瘤转移或者是复发问题^[7]。近年来分子生物学技术持续进步,为胃癌转移以及侵袭的分子学研究提供了基础,研究人员在此基础上探索同胃癌转移存在联系的分子标志物,从而及时预测并且综合评估患者的预后,为临床治疗提供可靠指导。本研究结果显示,胃癌组织 OPN、sLAG-3 以及 DKK-1 表达阳性率显著高于癌旁组织以及正常胃黏膜组织 ($P < 0.05$)。OPN 富含唾液酸,最早发现于骨基质当中,后续在人体的肾脏、消化道以及胎盘当中发现。因为 OPN 能在骨基质以及细胞之间发挥桥梁作用,所以被成为骨桥蛋白^[8]。OPN 蛋白属于细胞因子的一种,同时又是非胶原成分,含有同细胞黏附存在联系的 RGD (精氨酸-天冬氨酸) 序列,并且可以借助于同受体以及整合素的结合刺激信号,诱导细胞迁移以及增殖,参与到炎症反应以及组织修复等过程^[9]。临床检验结果显示 OPN 在肺癌以及卵巢癌等肿瘤当中的表达显著上升,并且可以同受体结合来刺激肿瘤细胞的分化、增殖或者是浸润。在人体的消化系统当中,OPN 主要存在于黏液细胞以及上皮细胞当中,并且同胃癌发生以及发展存在密切联系。本研究结果显示,OPN 蛋白在胃癌组织当中的表达同分化程度、淋巴结转移、浸润深度以及胃癌分期等存在显著相关性 ($P < 0.05$)。有研究人员对比胃癌患者以及健康人员的 OPN 含量,胃癌患者血清当中的 OPN 水平明显高于健康人群,同时集中在 50 ~ 100 $\mu\text{g/L}$,这提示 OPN 高含量同胃癌发生有显著正相关^[10]。

sLAG-3 属于免疫球蛋白,能够发挥免疫调节作用。研究结果显示,在 ADAM10 等蛋白酶类的影响下,LAG3 的细胞膜表面跨膜区域肽链会出现断裂,胞外位置脱落并且转化成为可溶性的 LAG-3 也就是 sLAG-3。sLAG-3 可以同细胞分子互相作用,强化树突状细胞,并且在此基础上激活 CD4⁺ 以及 CD8⁺ 细胞,达到抑制肿瘤细胞的效果^[11]。本研究结果发现,sLAG-3 在胃癌组织当中的表达同患者的胃癌分期、浸润深度以及分化程度等存在显著相关性 ($P < 0.05$)。胃癌患者 sLAG-3 的整体含量明显低于对照组,并且推测其含量的下降会影响到 T 细

胞的激活,加大了癌细胞免疫逃逸,使得胃癌患者的病情恶化。

DKK-1 属于分泌蛋白家族,可以同 Wnt-蛋白复合结合,从而影响到后者形成三聚体复合物,进一步抑制 Wnt 信号通路。研究人员发现 DKK1 对于 Wnt 信号通路的影响同恶性肿瘤病情的发生发展存在联系,并且能够刺激癌细胞的侵袭以及增殖^[12]。本研究结果显示,DKK-1 蛋白在胃癌组织当中的表达同分化程度、淋巴结转移、浸润深度以及胃癌分期等存在显著相关性 ($P < 0.05$)。研究人员分析胃癌患者的 DKK-1 表达,结果显示其表达水平要明显高于健康人群。这提示 DKK-1 的高表达能够刺激胃癌的发生。综合以上分析可以发现,胃癌患者组织当中的 OPN 水平以及 DKK-1 水平明显上升,同时 sLAG-3 水平明显下降,提示三者可以用来诊断患者并且评估患者病情的严重程度。

病理检查是胃癌患者临床诊断的金标准,常用的指标包括分化程度以及 TNM 分期等。通过分析不同分化程度以及不同 TNM 分期患者胃癌组织当中的 OPN、sLAG-3 以及 DKK-1 水平,结果表明 I 期、II 期患者以及高中分化患者的 OPN、DKK-1 水平明显低于 III 期、IV 期患者以及低未分化患者,同时 sLAG-3 水平明显高于 III 期、IV 期患者以及低未分化患者。这就表明三项指标可以用来评估患者分化程度以及分期状况。细胞凋亡可以说是程序性死亡的正常步骤,也是人体实现异质细胞清除的作用途径。胃癌病情恶化的过程当中,OPN、sLAG-3 以及 DKK-1 水平出现波动,会影响到细胞凋亡的过程,从而给病情发展创造条件,需要引起医务人员的重视,在治疗过程当中动态监测三者表达的变化,在此基础上合理调整治疗方案。

综上所述,OPN、sLAG-3、DKK-1 表达与胃癌分期、浸润深度以及淋巴结转移等因素存在密切联系,能够评估患者的病情及预后质量。

参考文献

- [1] 刘玉芳. 胃癌患者的血清 LAG-3、DKK-1 含量测定及其与临床病理特征的相关性[J]. 海南医学院学报, 2017, 23(7): 1005-1008.
- [2] 许汝娟. 术前替吉奥联合区域动脉灌注化疗栓塞对局部进展期胃癌恶性程度的影响[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(14): 1573-1576.
- [3] 卢起飞, 张展飞, 王小花, 等. 胃癌患者血清 DKK-1 水平变化及意义[J]. 山东医药, 2016, 56(40): 69-71.
- [4] 邬继云, 孟健. 血管内皮生长因子-C 及其受体-3 在胃