

TRAF4在胃癌组织中的表达及意义

刘辉琦, 李菊英, 刘杰, 王生兰

■背景资料

TRAF4是一个新的具有调节细胞周期和基因转录功能的P70S6丝苏氨酸激酶的结合作用, 具有抑制Fas诱导细胞凋亡及激活NF- κ B、JNK等信号通路的功能, 在多数肿瘤中表达上调, 但在部分肿瘤中表达下调, 且核浆定位情况目前仍存在一定的争议。

刘辉琦, 刘杰, 王生兰, 青海大学医学院病理生理教研室 青海省西宁市 810001

李菊英, 青海大学医学院病理教研室 青海省西宁市 810001
刘辉琦, 硕士, 讲师, 主要从事肿瘤标志物方面的研究。

青海大学医学院中青年科技基金资助项目, No. qy-2008-03
作者贡献分布: 此课题由刘辉琦、李菊英及王生兰设计; 研究过程由刘辉琦与李菊英操作完成; 数据分析由刘辉琦与刘杰完成; 论文写作由刘辉琦与王生兰完成。

通讯作者: 王生兰, 教授, 810001, 青海省西宁市昆仑路16号, 青海大学医学院病理生理教研室. zlw6996@163.com

电话: 0971-6104094

收稿日期: 2010-10-26 修回日期: 2010-12-30

接受日期: 2011-01-06 在线出版日期: 2011-02-08

Significance of TRAF4 protein expression in gastric carcinoma

Hui-Qi Liu, Ju-Ying Li, Jie Liu, Sheng-Lan Wang

Hui-Qi Liu, Jie Liu, Sheng-Lan Wang, Department of Pathophysiology, Medical College of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai Province, China

Ju-Ying Li, Department of Pathology, Medical College of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai Province, China

Supported by: the Youth Science Foundation of the Medical College of Qinghai University, No. qy-2008-03

Correspondence to: Professor Sheng-Lan Wang, Department of Pathophysiology, Medical College of Qinghai University, 16 Kunlun Road, Chengzhong District, Xining 810001, Qinghai Province, China. zlw6996@163.com
Received: 2010-10-26 Revised: 2010-12-30

Accepted: 2011-01-06 Published online: 2011-02-08

Abstract

AIM: To investigate the correlation between the expression of tumor necrosis factor receptor-associated factor 4 (TRAF4) protein and tumor onset and evolution in gastric carcinoma.

METHODS: Tissue microarray was used to detect the expression of TRAF4 in 45 gastric carcinoma specimens, 45 tumor-adjacent tissue specimens, and 10 normal gastric tissue specimens. Cell apoptosis in TRAF4-positive gastric carcinoma specimens and normal gastric tissue specimens was detected by TUNEL assay.

RESULTS: TRAF4 was expressed in both the cytoplasm and nucleus in normal gastric tissue and gastric carcinoma. The positive rate of cyto-

plasmic TRAF4 expression was 80% in normal gastric tissue, 93.3% in dysplasia, and 95.6% in gastric carcinoma ($P > 0.05$). The positive rate of nuclear TRAF4 expression was significantly higher in normal gastric tissue than in gastric carcinoma (70.0% vs 35.6%, $P < 0.05$), in highly differentiated carcinoma than in poorly differentiated carcinoma (71.4% vs 26.1%, $P < 0.05$), and in gastric carcinoma without lymphatic metastasis than in that with lymphatic metastasis (52.4% vs 20.8%, $P < 0.05$). The apoptosis rate in TRAF4-positive normal gastric tissue was significant higher than that in gastric carcinoma (75% vs 37.2%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The nuclear expression of TRAF4 in gastric carcinoma is suppressed. Decreased nuclear expression of TRAF4 was positively correlated with tumor differentiation but negatively with tumor metastasis in gastric carcinoma.

Key Words: Gastric carcinoma; Tumor necrosis factor receptor-associated factor 4; Immunohistochemistry; Apoptosis

Liu HQ, Li JY, Liu J, Wang SL. Significance of TRAF4 protein expression in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 374-378

摘要

目的: 探讨肿瘤坏死因子受体相关因子4(TRAF4)在胃癌发生、发展中的作用。

方法: 应用组织芯片采用免疫组织化学法检测10例正常胃组织、45例胃癌及癌旁组织中TRAF4的表达, TUNEL法检测TRAF4阳性胃癌及正常胃组织中细胞凋亡。

结果: TRAF4在正常胃组织中呈浆、核阳性表达。其浆阳性率在正常胃组织(80%)、不典型增生(93.3%)和胃癌(95.6%)中逐渐增高, 但差异无统计学意义。而核阳性率在正常胃组织中高于胃癌(70.0% vs 35.6%, $P < 0.05$), 在高分化胃癌中高于低分化胃癌(71.4% vs 26.1%, $P < 0.05$), 在无淋巴转移胃癌中高于伴有淋巴转移(52.4% vs 20.8%, $P < 0.05$)。TRAF4表达阳

■同行评议者

陈国忠, 副主任医师, 广西中医学院第一附属医院消化内科

性正常胃组织细胞凋亡百分率高于胃癌组织(75% vs 37.2%, $P < 0.05$).

结论: TRAF4在胃癌中具有较低核表达, 且其核表达与胃癌分化程度呈正相关, 与胃癌转移呈负相关, 同时可能抑制胃癌凋亡.

关键词: 胃癌; 肿瘤坏死因子受体相关因子-4; 免疫组织化学; 凋亡

刘辉琦, 李菊英, 刘杰, 王生兰. TRAF4在胃癌组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(4): 374-378
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/374.asp>

0 引言

胃癌是我国常见病和多发病, 位居消化系统肿瘤之首. 近年来, 发病率和死亡率不断升高, 每年胃癌新发病例及死亡率分别占全部恶性肿瘤的17%和20%^[1-3]. 青海是我国胃癌高发区, 其死亡率在全国最高^[4], 严重威胁着本地居民的健康. 胃癌是一类多基因疾病, 癌基因的活化是促使肿瘤发生的关键因素之一, 但抑癌基因的失活在肿瘤发生、发展过程中可能起着更加重要的作用^[5-8].

肿瘤坏死因子受体相关因子(tumor necrosis factor receptor associated factor, TRAF)家族成员是一大类在哺乳动物中发现的遗传学上保守的胞内接头蛋白^[9], 能直接或间接与多种TNF和IL-1/Toll-like受体家族成员结合^[10], 激活转录因子NF- κ B和JNK通路, 从而影响细胞的生存、增殖、分化和死亡, 并参与多个生物学过程的调控^[11,12]. 目前为止, 在哺乳动物中已发现7种TRAF蛋白: TRAF1-TRAF7. 研究报道TRAF4在肺癌、乳腺癌、直肠癌、膀胱癌、卵巢癌等大多数人类肿瘤中均高表达, 且主要定位于胞质, 部分肿瘤如肺癌、乳腺癌等存在浆核定位或单独核定位, 且定位与肿瘤的侵袭性等生物学特性相关^[13]. 本研究主要应用胃癌组织芯片通过免疫组织化学方法检测TRAF4在正常胃组织、癌旁组织及胃癌组织中的表达情况, 并检测正常胃组织、胃癌组织中的凋亡情况以初步探讨TRAF4在胃癌中表达的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌组织芯片购自西安艾丽娜生物科技有限公司, 货号BC01114. 芯片100点(胃癌45例, 癌旁组织45例, 正常组织10例, 每例1点). 胃癌中腺癌44例, 印戒细胞癌1例, II期37例, III期

8例. 非典型增生中轻度32例, 中度11例, 重度2例. TRAF4兔抗人多克隆抗体(SC-10776)购自美国Santa Cruz公司. SP超敏试剂盒(PV-9000), DAB酶底物显色试剂盒(ZLT-9018)及辣根酶标记第二抗体(ZB-2301)购自北京中杉金桥生物技术有限公司. 凋亡试剂盒购自Roche公司(Cat. No. 11684817910, 北京中杉金桥生物技术有限公司分装).

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色: 常规脱蜡水化, 以0.01 mol CB(pH6.0)高压2 min修复抗原, 滴加3% H₂O₂-甲醇封闭内源性过氧化物酶(室温10 min), 第一抗体(1:20, 4℃过夜), 滴加酶标抗鼠/兔聚合物(室温孵育30 min), DAB显色, 蒸馏水洗终止显色, 苏木素复染、水洗、分化后充分水洗返蓝, 常规脱水透明, 中性树胶封片. PBS代替一抗作阴性对照.

1.2.2 凋亡检测: 二甲苯脱蜡, 100%、95%、90%、85%、80%梯度水化, 滴加蛋白酶K于37℃温箱内消化30 min, 滴加新鲜配置3%甲醛过氧化氢封闭液(室温封闭10 min). 滴加新鲜配置的TdT酶反应标记60 min, 阴性对照组不加TdT酶. 滴加终止工作液30 min终止反应, DAB显色, 苏木素复染, 中性树胶封片.

1.2.3 结果判定: (1)免疫组织化学结果判定: TRAF4判定标准参见邢传平等^[14]的免疫组织化学反应结果的判断标准, 即阳性细胞数 $\leq 25\%$ 为(+), 25%-50%为(++), $> 50\%$ 为(+++), 无阳性细胞(-); 再结合染色强度, 浅黄色为(+), 棕黄色(++), 棕褐色(+++), 无着色细胞为(-). 两者合二为一进行分析判断, 取阳性细胞 $> 50\%$, 即一半以上研究细胞阳性判断为最高级(+++); (2)凋亡结果判定: 以细胞核阳性为判定标准^[15]. 在相同组织切片5个高倍视野记数各组间阳性细胞百分比, 凋亡细胞阳性率 $< 5\%$ 为(-), 5%-25%(+), 25%-50%(++), $> 50\%$ (+++).

统计学处理 采用SPSS13.0统计分析软件, TRAF4在胃癌组织中的表达及凋亡采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义, $P < 0.01$ 为有显著统计学意义.

2 结果

2.1 TRAF4在胃癌组织中的表达 TRAF4表达于正常胃组织上皮细胞和胃癌组织细胞胞质和核内(图1). TRAF4的浆阳性表达率在胃不典型增生中高于正常胃组织, 但差异无统计学意义

■ 相关报道
Glauner等研究表明, 全长度的TRAF4转染入HeLa细胞后定位于胞质, 而突变型的TRAF4主要定位于胞核, 进一步研究证实, 可能是某种结合蛋白影响了TRAF4的浆核定位.

■创新盘点

本研究利用组织芯片对胃癌组织中TRAF4的表达、核浆定位情况进行了研究,探讨了TRAF4与胃癌生物学行为及凋亡之间可能存在的联系。

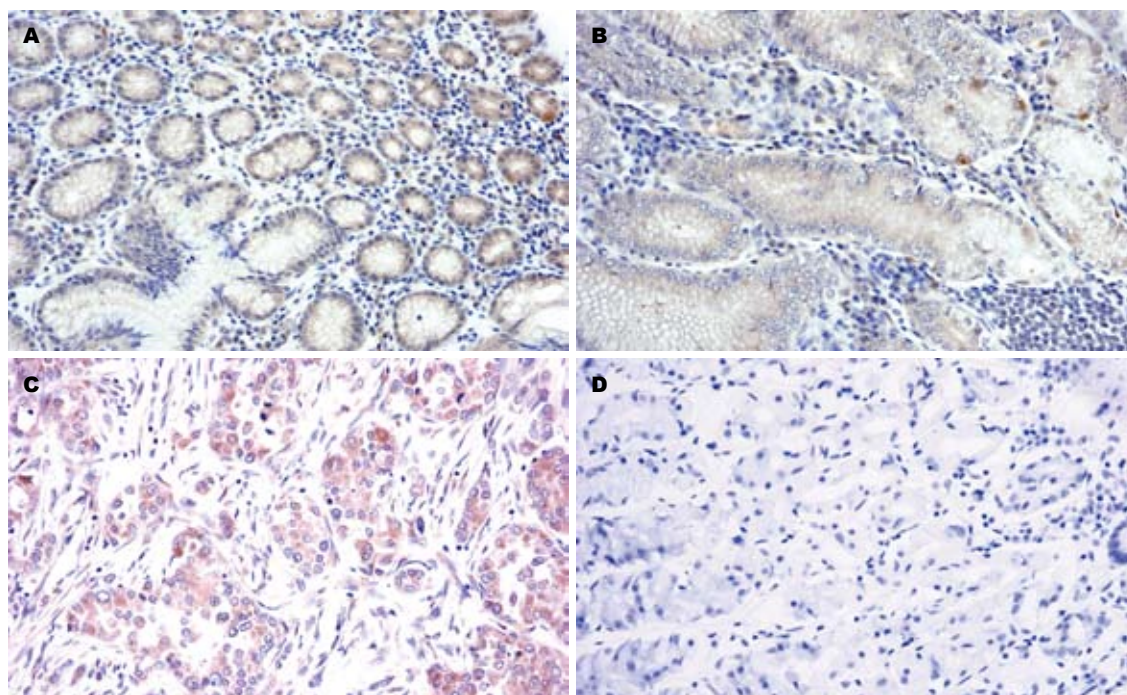


图1 TRAF4在胃癌组织中的表达(SP × 200). A: 正常胃组织的胞质及胞核; B: 增生胃组织的胞质及胞核; C: 胃癌组织的胞质; D: 阴性对照.

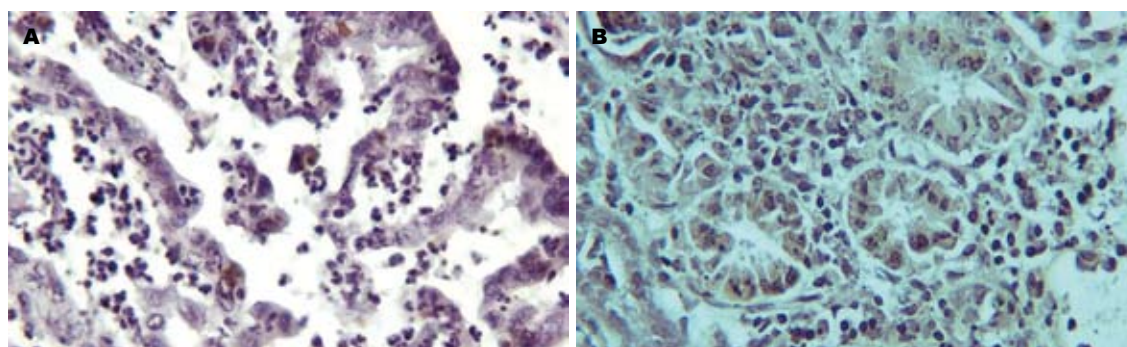


图2 TRAF4表达阳性正常细胞及胃癌细胞凋亡(SP × 200). A: 胃癌组织; B: 正常胃组织.

($P>0.05$). 在胃癌组织中的浆阳性表达率高于正常胃组织, 但差异无统计学意义($P>0.05$). 在胃癌组织中的浆阳性表达率高于胃不典型增生, 但差异无统计学意义($P>0.05$, 表1).

TRAF4在正常胃组织中的核阳性表达率高于胃不典型增生, 但差异无统计学意义($P>0.05$), 在正常胃组织中的核阳性表达率明显高于胃癌组织($P<0.05$). 在胃不典型增生组织中的核阳性表达率高于胃癌组织, 但差异无统计学意义($P>0.05$), TRAF4核表达与胃癌的发生呈负相关(表1).

TRAF4在高分化胃癌组织中的核阳性表达率高于中分化胃癌组织, 但差异无统计学意义($P>0.05$), 在中分化胃癌组织中的核阳性表达率高于低分化胃癌组织, 但差异无统计学意义

($P>0.05$), 在高分化胃癌组织中的核阳性表达率明显高于低分化胃癌组织($P<0.05$). TRAF4核表达与胃癌分化程度正相关(表2).

TRAF4在无淋巴转移的胃癌组织中的核阳性表达率明显高于有淋巴转移的胃癌组织($P<0.05$). TRAF4核表达与胃癌淋巴转移负相关(表3).

2.2 TRAF4表达阳性在正常胃组织, 胃癌组织中细胞凋亡 TRAF4表达阳性正常组织及胃癌组织中均有凋亡(图2), 但正常胃组织中凋亡百分率显著高于胃癌组织($P<0.05$, 表4).

3 讨论

TRAF4是一个新的具有调节细胞周期和基因转录功能的P70S6丝苏氨酸激酶的结合作用子, 具有抑

表 1 TRAF4在各组织中的表达

	<i>n</i>	胞质					胞核	
		-	+	++	+++	阳性率(%)	+	阳性率(%)
正常胃组织	10	2	5	2	1	80.0	7	70.0
不典型增生组织	45	3	21	14	7	93.3	26	57.8
胃癌组织	45	2	22	15	6	95.6	16	35.6 ^a

^a*P*<0.05 vs 正常胃组织.

表 2 TRAF4在不同分化程度胃癌组织中的表达

	<i>n</i>	胞核		
		-	+	阳性率(%)
高分化	7	2	5	71.4
中分化	15	10	5	33.3
低分化	23	17	6	26.1 ^a

^a*P*<0.05 vs 高分化胃癌组织.

表 3 TRAF4在胃癌是否伴淋巴结转移中的表达

	<i>n</i>	胞核		
		-	+	阳性率(%)
有淋巴结转移	24	19	5	20.8 ^a
无淋巴结转移	21	10	11	52.4

^a*P*<0.05 vs 无淋巴结转移胃癌组织.

制Fas诱导细胞凋亡的功能^[16]. 此外, TRAF4还能充当E3泛素连接酶的角色并通过作用于糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体胞质区TRAF结合位点, 诱导NF-κB、JNK等信号转导通路的激活^[17-19]. 在胚胎时期, TRAF4通过与MEKK4结合激活JNK信号转导通路^[20].

近年研究显示TRAF4和一些复合体参与了内皮细胞迁移, 通过细胞迁移在肿瘤中的重要作用, 可以推断TRAF4的上调表达可能参与并/或促进肿瘤形成^[13]. 据统计, TRAF4可穿梭于不同细胞间隙, 他能出现在胞质中, 也能通过跨膜蛋白或膜依赖蛋白的联系进入到细胞膜中, 同时还可能与其他跨膜蛋白发生联系^[21,22]. Glauner等^[23]研究表明, 全长度的TRAF4转染入HeLa细胞后定位于胞质, 而突变型的TRAF4主要定位于胞核, 进一步研究证实, 可能是某种结合蛋白影响了TRAF4的浆核定位. 但目前对于TRAF4在肿瘤中的定位尚存争议, 如Régnier等^[24]通过原位杂交等方法发现TRAF4 mRNA高表达于乳腺癌

表 4 TRAF4表达阳性在胃癌、正常组织中的凋亡

	TRAF4阳性	凋亡		
		-	+	凋亡率(%)
正常组织	8	2	6	75.0
胃癌组织	43	27	16	37.2 ^a

^a*P*<0.05 vs 正常组织.

组织中, 且定位于胞核并提出TRAF4可能是一种核蛋白的观点. 相反, Krajewska等^[25]通过免疫组织化学方法研究认为TRAF4蛋白高表达于正常乳腺组织, 定位于导管上皮细胞胞质, 而在浸润性导管癌和原位癌中阳性表达率很低. 国内代文博等^[26]研究发现TRAF4表达于正常乳腺组织, 呈浆、核阳性, 在乳腺癌中具有较低核表达, 且其核表达与乳腺癌侵袭性呈负相关.

胃癌免疫组织化学结果显示, TRAF4在正常胃组织中表达于腺上皮细胞, 呈浆、核阳性, 在胃癌组织中的浆表达与正常胃组织及胃不典型增生无明显差异, 但核表达则明显降低, 而TRAF4在低分化胃癌中的核表达明显低于高分化胃癌, 说明TRAF4核表达与胃癌分化程度呈正相关, 同时TRAF4在伴有淋巴转移胃癌中的核表达明显低于无淋巴转移胃癌, 表明TRAF4核表达同时与胃癌转移呈负相关, 这提示TRAF4可能通过核表达量的改变影响胃癌的分化、转移等生物学行为, 但其在胃癌中核表达明显降低的机制尚不清楚.

胃癌的发生不仅与抑癌基因失活有关, 还与细胞增生、凋亡抑制等因素有关^[27,28], 而诱导肿瘤细胞凋亡也是治疗方向之一^[29,30]. TRAF4阳性胃癌及正常组织凋亡检测显示, 正常组织中的凋亡高于胃癌组织, 但TRAF4在胃癌组织中的浆表达与正常胃组织无明显差异, 而核表达则明显降低, 这提示TRAF4核表达的下调可能会抑制

■应用要点

本研究初步探讨了TRAF4在胃癌发生、发展中的作用, 有望对胃癌发生的分子机制的进一步研究及分子诊断提供理论基础.

■同行评价

本文创新性较好, 具有较好的科学价值。

凋亡, 其机制可能是在胃癌中存在某种TRAF4结合蛋白或某种因子影响了TRAF4的核定位, 并进而影响到细胞凋亡, 这需要进一步研究。

总之, 本实验结果初步表明, TRAF4表达于正常胃组织, 呈浆、核阳性。TRAF4在胃癌中具有较低核表达, 且其核表达与胃癌分化程度呈正相关, 与胃癌转移呈负相关, 并且核表达的下调可能会抑制胃癌细胞的凋亡, 从而促进了胃癌的发生、发展。

4 参考文献

- 1 Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 17-20
- 2 周琦, 张琼, 魏来. 联合检测CA19-9、CEA、CA72-4、MG-Ag对胃癌的诊断价值. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 2698-2701
- 3 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249
- 4 赵久达, 李豪, 曹成珠, 贺菊香, 耿派力. 1962例胃癌流行病学分析. *现代预防医学* 2008; 35: 439-440
- 5 Waki T, Tamura G, Sato M, Terashima M, Nishizuka S, Motoyama T. Promoter methylation status of DAP-kinase and RUNX3 genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. *Cancer Sci* 2003; 94: 360-364
- 6 Kim TY, Lee HJ, Hwang KS, Lee M, Kim JW, Bang YJ, Kang GH. Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. *Lab Invest* 2004; 84: 479-484
- 7 Osaki M, Moriyama M, Adachi K, Nakada C, Takeda A, Inoue Y, Adachi H, Sato K, Oshimura M, Ito H. Expression of RUNX3 protein in human gastric mucosa, intestinal metaplasia and carcinoma. *Eur J Clin Invest* 2004; 34: 605-612
- 8 邱秀琴, 石巍. 胃癌相关抑癌基因甲基化研究进展. *国际病理科学与临床杂志* 2008; 28: 395-398
- 9 Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)-a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev* 1998; 12: 2821-2830
- 10 张万巧, 王建. 胞内接头蛋白TRAFs家族. *生命科学* 2008; 20: 611-617
- 11 Aggarwal BB. Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB. *Ann Rheum Dis* 2000; 59 Suppl 1: i6-i16
- 12 苏剑东, 吴灵飞. NF-κB与细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1411-1416
- 13 Camilleri-Broët S, Cremer I, Marmey B, Comperat E, Viguié F, Audouin J, Rio MC, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Régnier CH. TRAF4 overexpression is a common characteristic of human carcinomas. *Oncogene* 2007; 26: 142-147
- 14 邢传平, 刘斌, 董亮. 免疫组织化学标记结果的判断方法. *中华病理学杂志* 2001; 30: 318
- 15 朱长乐, 赖仁胜. 原位细胞凋亡检测改良方法的比较. *实用医技杂志* 2007; 17: 2294-2296
- 16 Fleckenstein DS, Dirks WG, Drexler HG, Quentmeier H. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 4 is a new binding partner for the p70S6 serine/threonine kinase. *Leuk Res* 2003; 27: 687-694
- 17 He JQ, Saha SK, Kang JR, Zarnegar B, Cheng G. Specificity of TRAF3 in its negative regulation of the noncanonical NF-kappa B pathway. *J Biol Chem* 2007; 282: 3688-3694
- 18 辛利军. TRAF: 一种重要的接头分子. *国外医学·免疫学分册* 2002; 25: 143-146
- 19 Esparza EM, Arch RH. TRAF4 functions as an intermediate of GTR-induced NF-kappaB activation. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 3087-3092
- 20 Abell AN, Johnson GL. MEKK4 is an effector of the embryonic TRAF4 for JNK activation. *J Biol Chem* 2005; 280: 35793-35796
- 21 江鹏程. TRAF4及其相关蛋白Eg5与肿瘤的关系. *医学信息(中旬刊)* 2010; 5: 1970-1971
- 22 Kedinger V, Rio MC. TRAF4, the unique family member. *Adv Exp Med Biol* 2007; 597: 60-71
- 23 Glauner H, Siegmund D, Motejadedd H, Scheurich P, Henkler F, Janssen O, Wajant H. Intracellular localization and transcriptional regulation of tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 4 (TRAF4). *Eur J Biochem* 2002; 269: 4819-4829
- 24 Régnier CH, Tomasetto C, Moog-Lutz C, Chenard MP, Wendling C, Basset P, Rio MC. Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor-associated protein family, which is expressed in breast carcinoma. *J Biol Chem* 1995; 270: 25715-25721
- 25 Krajewska M, Krajewski S, Zapata JM, Van Arsdale T, Gascoyne RD, Berern K, McFadden D, Shabaik A, Hugh J, Reynolds A, Clevenger CV, Reed JC. TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues. *Am J Pathol* 1998; 152: 1549-1561
- 26 代文博, 郑英伟, 米小轶, 刘楠, 林红, 闫俊. TRAF4蛋白在乳腺癌组织中的表达及意义. *癌症* 2007; 26: 1095-1098
- 27 Tritz R, Hickey MJ, Lin AH, Hadwiger P, Sah DW, Neuwelt EA, Mueller BM, Kruse CA. FAPP2 gene downregulation increases tumor cell sensitivity to Fas-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 383: 167-171
- 28 Benchabane H, Ahmed Y. The adenomatous polyposis coli tumor suppressor and Wnt signaling in the regulation of apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 2009; 656: 75-84
- 29 刘永衡, 孙桂芝, 张培彤. 中药诱导人胃癌MGC-803细胞凋亡研究近况. *天津中医药* 2009; 26: 522-523
- 30 吴昊, 李薇, 葛红梅, 刘平. 芍药苷抑制NF-κB的活性促进人胃癌细胞凋亡. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2008; 28: 161-165

编辑 李薇 电编 何基才