

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20180698

肝内胆管癌 TRIM44、基质金属蛋白酶 9 蛋白的表达及临床意义

彭睿¹, 黄晓勇², 蔡加彬², 柯爱武², 施国明², 柏斗胜^{1,3*}

1. 中南大学湘雅二医院, 长沙 410000

2. 复旦大学附属中山医院肝癌研究所, 上海 200032

3. 江苏省苏北人民医院, 扬州 225001

[摘要] **目的:**探讨 TRIM44 和基质金属蛋白酶 9(MMP9)蛋白在肝内胆管癌(ICC)中的表达及临床意义。**方法:**采用免疫组织化学法检测 87 例 ICC 患者肿瘤组织 TRIM44、MMP9 蛋白的表达,进一步分析两者表达与患者临床病理指标及预后的相关性;采用 Spearman 相关性分析探讨 TRIM44 和 MMP9 表达的相关性;采用 Kaplan-Meier 法和 Cox 风险回归模型分析 TRIM44、MMP9 表达对患者预后的影响。**结果:**ICC 肿瘤组织 TRIM44、MMP9 蛋白呈过表达状态,且 TRIM44 与 MMP9 表达正相关($P < 0.001$)。TRIM44 与淋巴结转移显著相关($P = 0.014$);MMP9 与肿瘤大小、AFP 水平与淋巴结转移显著正相关($P < 0.05$),两者同时过表达提示患者预后不良。**结论:**ICC 组织 TRIM44 和 MMP9 呈过表达,且二者密切相关;两者同时高表达提示 ICC 患者预后不良。

[关键词] TRIM44;基质金属蛋白酶 9;肝内胆管癌;预后

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A

Expression and clinical significance of TRIM44 and MMP9 in intrahepatic cholangiocarcinoma

PENG Rui¹, HUANG Xiao-yong², CAI Jia-bin², KE Ai-wu², SHI Guo-ming², BAI Dou-sheng^{1,3*}

1. The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410000, Hunan, China

2. Institute of Liver Cancer, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 20032, China

3. The Subei People's Hospital, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and clinical significance of TRIM44 and MMP9 in intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC). **Methods:** The expression of TRIM44 and MMP9 in 87 ICC patients were analyzed by immunohistochemistry. And the clinical significance of TRIM44 and MMP9 were investigated by Kaplan-Meier and Cox regression models. **Results:** The expressions of TRIM44 and MMP9 were upregulated in tumor tissues of ICC. TRIM44 was positively associated with MMP9 expression in ICC ($P < 0.001$). TRIM44 expression was significantly correlated with the lymph node metastasis ($P = 0.014$), and MMP9 was significantly correlated with the tumor size, AFP concentration, and lymph node metastasis ($P < 0.05$). Simultaneous overexpression of TRIM44 and MMP9 suggested poor prognosis of ICC patients. **Conclusions:** TRIM44 and MMP9 are overexpressed in ICC and are closely related to each other. The high expressions of both suggest poor prognosis of ICC patients.

[Key Words] TRIM44; MMP9; ICC; prognosis

肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)是一种起源于胆管上皮细胞的肿瘤,在原发性肝脏肿瘤发病率中排名第二^[1]。近年来,我国 ICC 发病率逐年升高,由于 ICC 起病隐匿,侵袭转移能力强,且缺乏有效的早期诊断标志物,除早期手术外其他治疗效果有限,患者中位生存期时间短且易转移复发^[2-3]。因此,探讨 ICC 复发及转移过程中

的分子机制,筛查新的关键分子,对于 ICC 肿瘤治疗及预后改善有重要临床意义。

TRIM44 是 Triple motif (TRIM) 三基序蛋白家族成员之一,该家族成员结构各异、功能不同,但主要为 E3 泛素连接酶^[4]。TRIM 家族成员功能涉及细胞分化、细胞增殖、细胞免疫等^[5-6]。研究表明:TRIM44 在肺癌^[7]、前列腺癌^[8]、甲状腺癌^[9]、食管

[收稿日期] 2018-06-22 **[接受日期]** 2018-07-17

[基金项目] 江苏省“六大人才高峰”项目(2014-WSW-076)。Supported by “Six Talents Summit” Project of Jiangsu Province (2014-WSW-076)。

[作者简介] 彭睿,硕士。E-mail: pr84439246@163.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 0514-87373385; E-mail: drbaidousheng@163.com

癌^[10]、肝癌^[11]中高表达且表现为促癌作用,但是在 ICC 中的表达及临床意义不明。

基质金属蛋白酶 9(MMP9)是基质金属蛋白酶家族成员之一,又称为明胶酶 B,其大多数时候是无活性的前体蛋白,在细胞外蛋白酶修饰后才被活化。其作用主要是降解Ⅳ型、Ⅴ型胶原蛋白^[12],参与许多生理过程,如胚胎发育、组织分化等,也与诸多疾病密切相关,包括炎症和肿瘤^[13]。在肿瘤中,MMP9 降解基底膜和细胞外的Ⅳ型、Ⅴ型胶原蛋白,直接导致肿瘤细胞突破基底膜,促进肿瘤细胞侵袭、转移^[14],并且在肝癌和胰腺癌中可作为预后指标^[15]。我们的前期研究^[16]发现 TRIM44 可通过 ERK1/2 信号途径促进 ICC 细胞的侵袭转移。而 ERK1/2 信号在 MMP9 表达中发挥重要作用^[17-18]。因此,本研究拟探讨 TRIM44 和 MMP9 在 ICC 中的表达及其相关性,并分析两者在 ICC 患者预后中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 组织来源及患者资料 2002~2009 年复旦大学附属中山医院收治的 87 例 ICC 患者肿瘤及癌旁组织入选本研究。所有患者都进行了完整的手术切除,并有明确的病理诊断和 5 年随访资料。本研究获得了复旦大学附属中山医院医学伦理委员会审核批准。所有患者均知情同意。

1.2 免疫组织化学染色测定蛋白表达 87 例患者的肿瘤组织芯片由上海芯超公司制作,取芯片 60℃ 高温烘烤 1 h,二甲苯脱蜡 2 次,每次 10 min,分别用 95%、85%、75%无水乙醇梯度水化,每步骤 5 min,然后用 PBS 清洗,切片滴加 3%过氧化氢孵育 30 min;之后将芯片放入煮沸的 EDTA (pH=8.0)的抗原修复液中 20 min,然后用 5%的胎牛血清白蛋白(BSA)封闭 1 h,分别滴加一抗 TRIM44(Proteintech, 11511-1-AP, 1:400),MMP9(Abcam, ab76003, 1:2000),4℃孵育 12 h;第 2 天洗去一抗并使用属兔通用二抗室温孵育 1 h,DAB 显色;镜检观察至深棕色不变后放入清水终止反应,苏木精染核 1 min,1%盐酸乙醇分色,反蓝;最后无水乙醇脱水,二甲苯透明风干,中性树胶封片拍照。TRIM44 和 MMP9 阳性评分标准参照文献^[16,19-20]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件,组间资料用 χ^2 检验,Kaplan-Meier 法分析生存曲线,单因素和多因素分析采用 Cox 风险回归模型,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 ICC 肿瘤及癌旁组织 TRIM44、MMP9 蛋白的表达 结果表明:TRIM44 蛋白主要表达于细胞质(图 1A),TRIM44 在 ICC 肿瘤中表达水平较癌旁组织更高($P<0.05$),且 TRIM44 在癌组织中表达异质性明显;MMP9 蛋白主要表达于细胞质,在间质中少量表达(图 1B),癌组织明显高于癌旁组织($P<0.05$),且在不同癌组织中表达差异明显。

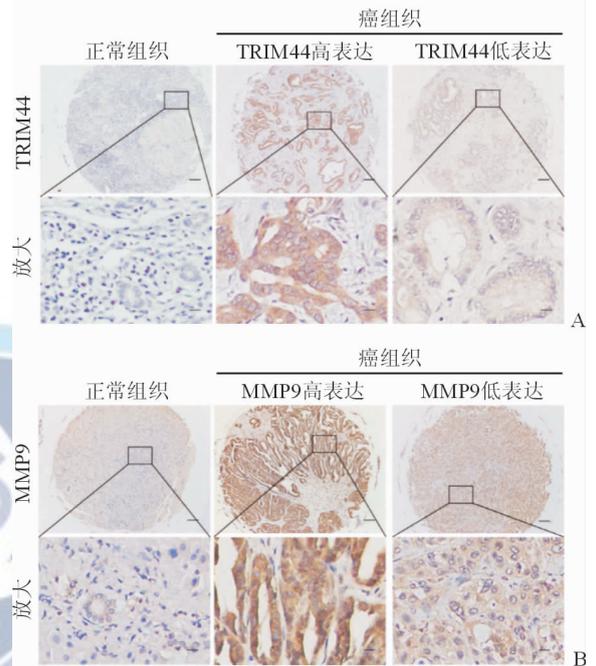


图 1 ICC 及癌旁组织 TRIM44、MMP9 蛋白的表达

A:TRIM44 在 ICC 组织中的表达;B:MMP9 在 ICC 组织中的表达。Original magnification:×40(原图),×200(放大)

2.2 ICC 组织 TRIM44、MMP9 蛋白表达的相关性 结果(图 2)表明:ICC 组织 TRIM44、MMP9 蛋白表达存在异质性;87 例患者 ICC 组织中 TRIM44、MMP9 蛋白表达的阳性强度正相关($r^2=0.4126, P<0.001$)。

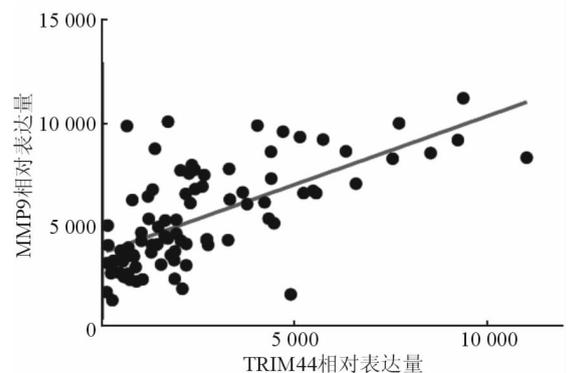


图 2 ICC 组织 TRIM44、MMP9 蛋白表达的相关性

2.3 ICC组织 TRIM44、MMP9 蛋白表达与患者预后的关系 结果显示:TRIM44 表达高的 ICC 患者($n=36$)生存率明显低于 TRIM44 低表达患者($n=51$),复发率则高于低表达组(图 3A、3B, $P=0.017$ 、 $P=0.001$)。与此同时,MMP9 表达高的患者($n=40$)生存率更低,复发率更高(图 3C、3D, $P<0.001$)。将两个指标合并分析(图 3E、3F, $P<0.001$),将患者分为 3 组,第 1 组为两者均高表达组

($n=19$),第 2 组为两者均低表达组($n=30$),剩余为第 3 组($n=38$)。结果显示两者均低表达组的总体生存率高于其他两组($P<0.001$),而第 3 组和第 1 组之间差异无统计学意义($P=0.099$)。在累计复发率方面,两者均低表达组患者的复发率明显低于其余两组($P<0.001$),两者均高表达组的复发率较第 3 组更高($P=0.026$)。

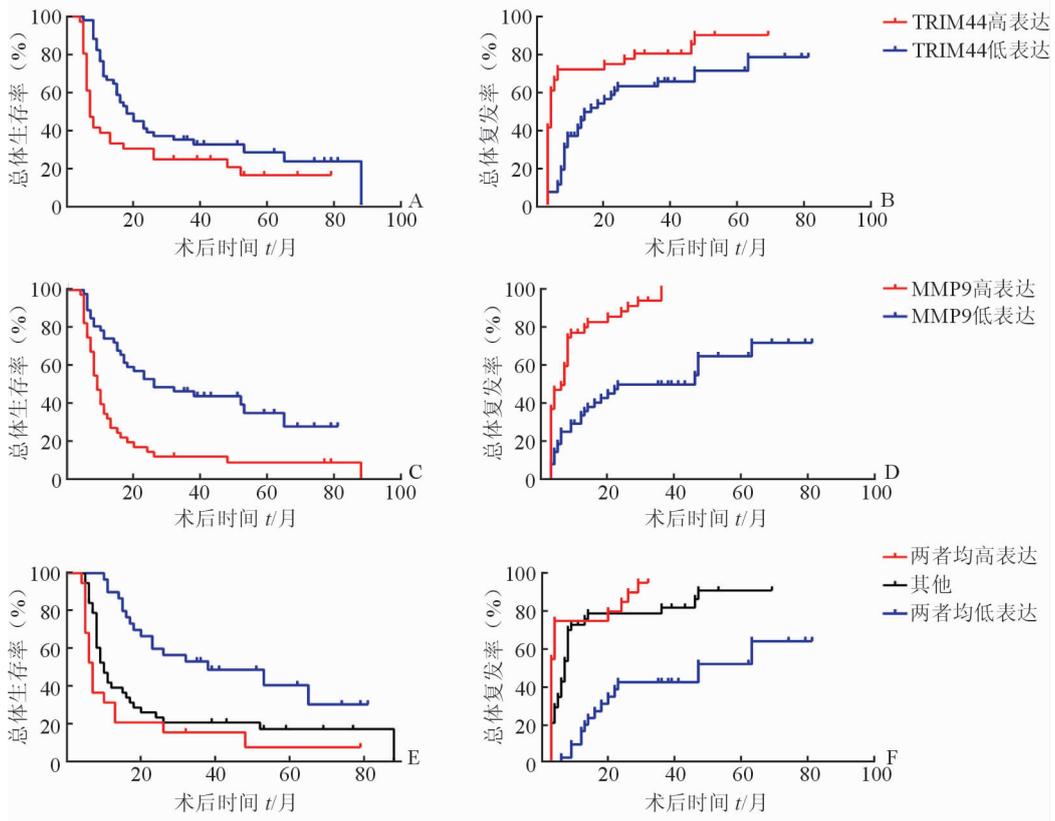


图 3 ICC 组织 TRIM44、MMP9 蛋白表达与患者预后的相关性分析

A: TRIM44 表达与 ICC 患者总体生存率的关系,高表达组患者预后差($P=0.017$);B: TRIM44 表达与 ICC 患者术后复发的关系,高表达组患者复发率高($P=0.001$);C: MMP9 高表达的患者生存率更低($P<0.001$);D: MMP9 高表达患者复发率更高($P<0.001$);E: 两者均低表达患者生存率更高;F: 两者均高表达患者复发率更高

2.4 TRIM44、MMP-9 表达与 ICC 患者临床病理因素相关性分析 结果(表 1)表明:TRIM44 表达高低与淋巴结转移密切相关($P=0.014$),MMP9 的表达与肿瘤大小($P=0.007$)、AFP 水平($P=0.02$)、淋巴结转移密切相关($P=0.012$)。

2.5 ICC 患者预后影响因素分析 结果(表 2)表明:肿瘤大小(直径 <5 cm vs ≥ 5 cm)、肿瘤个数

(单个 vs 多个)、淋巴结转移(无 vs 有)、癌栓(无 vs 有)、肝硬化(无 vs 有)、肿瘤分化(低 vs 高)、TRIM44 表达(低 vs 高)、MMP9 表达(低 vs 高)、两者共同表达(1 组 vs 2 组和 3 组)是影响 ICC 患者总体生存率和复发率的因素。多因素分析结果显示 TRIM44 蛋白表达、MMP9 蛋白表达及两者共同表达是影响 ICC 患者累计复发率的独立预后因素。

表1 TRIM44、MMP9 蛋白表达与 ICC 患者

临床病理因素相关性分析

变量	TRIM44			MMP9		
	高表达	低表达	P 值	高表达	低表达	P 值
性别			0.576			0.273
男性	17	21		20	18	
女性	19	30		20	29	
年龄			0.132			0.302
≥53 岁	20	20		16	24	
<53 岁	16	31		24	23	
HBsAg			0.877			0.335
阳性	22	32		27	27	
阴性	14	19		13	20	
CA19-9			0.199			0.433
≥37 ng/mL	26	30		24	32	
<37 ng/mL	10	21		16	15	
AFP			0.188 ^a			0.020 ^{a*}
≥20 ng/mL	7	4		9	2	
<20 ng/mL	29	47		31	45	
肿瘤大小(直径)			0.105 ^a			0.007 ^{a*}
≥5 cm	32	37		37	32	
<5 cm	4	14		3	15	
有无包膜			0.985			0.127
有	29	41		35	35	
无	7	10		5	12	
肿瘤个数			0.267 ^a			1.000 ^a
单个	31	48		36	43	
多个	5	3		4	4	
淋巴结转移			0.014 [*]			0.012 [*]
有	12	6		13	5	
无	45	24		27	42	
癌栓			0.301			0.077
有	8	7		10	5	
无	28	44		30	42	
肝硬化			0.199			0.217
有	10	21		17	14	
无	26	30		23	33	
肿瘤分化			0.163			0.165
高	15	29		17	27	
低	21	22		23	20	

^aFisher 精确检验; AFP: 甲胎蛋白; HBsAg: 乙肝表面抗原; CA19-9: 糖类抗原 19-9. * P<0.05

3 讨论

近年来 ICC 的发病率日渐升高,由于该肿瘤异质性强,早期诊断困难,手术外有效的治疗手段较少。针对 ICC 的诊断和治疗研究一直是临床上的热点^[21-22]。本研究探讨 TRIM44 和 MMP9 蛋白在 ICC 肿瘤中的表达情况,发现 TRIM44 和 MMP9 在肿瘤组织的表达普遍高于其对应的癌旁组织,并且两者表达正相关,进一步研究结果显示两者高表达均与患者的淋巴结转移密切相关。TRIM44 和 MMP9 同时高表达的患者生存率更低,复发率更高,两者共同低表达的患者生存率较高,总体复发率更低,并且为独立的复发因素。

TRIM44 作为 TRIM 家族成员,是一种特殊的泛素化酶,涉及多种病理生理过程^[23]。既往研究显示 TRIM44 在肿瘤常呈过表达情况,并且可通过 AKT-NF- κ B 信号通路促进肿瘤发生发展^[7,11,24]。我们的前期研究中发现 TRIM44 也可以影响 ERK1/2 信号通路^[16]。另外我们前期报道 UHRF2 在 ICC 中的表达及作用,尽管该分子也能作为潜在的 ICC 诊断标志物,但本研究考虑 MMP9 和肿瘤侵袭转移密切相关,而前期研究也认为 TRIM44 和肿瘤侵袭转移有关。因此,本研究进一步分析了 TRIM44、MMP9 表达的相关性,结果显示 TRIM44 和 MMP9 表达正相关。结果提示 TRIM44 可能和 MMP9 表达有着密切关系,未来研究拟在 TRIM44 干扰和过表达的细胞株内验证 MMP9 的表达水平,并且通过免疫共沉淀法检测两者是否有直接相互作用关系。

表2 ICC 患者 Cox 回归单因素及多因素分析

变量	总体生存				累计复发			
	单因素	多因素		单因素	多因素		P 值	
	P 值	HR	95%CI	P 值	P 值	HR		95%CI
性别(男 vs 女)	0.961			NA	0.742			NA
年龄(<53 岁 vs ≥53 岁)	0.452			NA	0.308			NA
HBsAg(阴性 vs 阳性)	0.740			NA	0.366			NA
CA19-9(<37 ng/mL vs ≥37 ng/mL)	0.388			NA	0.314			NA
AFP(<20 ng/mL vs ≥20 ng/mL)	0.240			NA	0.764			NA
肿瘤大小(直径<5 cm vs ≥5 cm)	0.025			NS	0.006			NS
有无包膜(无 vs 有)	0.268			NA	0.139			NA
肿瘤个数(单个 vs 多个)	0.007			NS	0.002			NS
淋巴结转移(无 vs 有)	0.007			NS	0.001			NS
癌栓(无 vs 有)	0.031			NS	0.030			NS
肝硬化(无 vs 有)	0.429			NS	0.652			NA
肿瘤分化(低 vs 高)	0.043			NS	0.037			NS
TRIM44 表达(低 vs 高)	0.022	1.898	0.904~3.984	0.09	0.003	2.628	1.227~5.628	0.013
MMP9 表达(低 vs 高)	<0.001	2.855	1.465~5.563	0.002	<0.001	4.460	2.175~9.144	<0.001
两者共同表达(1 组 vs 2 组和 3 组)	0.002	0.717	0.266~1.932	0.510	<0.001	2.523	1.192~4.421	0.020

AFP: 甲胎蛋白; HBsAg: 乙肝表面抗原; CA19-9: 糖类抗原 19-9; NA: no adapt; NS: no significance

综上所述,TRIM44 和 MMP9 在 ICC 肿瘤中的表达上调显示其与 ICC 肿瘤发展密切相关,联合两者表达情况可为 ICC 患者复发和预后评估提供参考。

参考文献

- [1] 国际肝胆胰学会中国分会;中华医学会外科学分会肝脏外科学组, Hepatic Surgery Group, Chinese Society of Surgery, Chinese Medical Association. 胆管癌诊断与治疗——外科专家共识[J]. 临床肝胆病杂志, 2015,31(1):12-16.
- [2] RAZUMILAVA N, GORES G J. Cholangiocarcinoma[J]. Lancet, 2014,383(9935):2168-2179.
- [3] RIZVI S, KHAN S A, HALLEMEIER C L, et al. Cholangiocarcinoma-evolving concepts and therapeutic strategies[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018,15(2):95-111.
- [4] HATAKEYAMA S. TRIM family proteins; roles in autophagy, immunity, and carcinogenesis [J]. Trends Biochem Sci, 2017,42(4):297-311.
- [5] REYMOND A, MERONI G, FANTOZZI A, et al. The tripartite motif family identifies cell compartments[J]. EMBO J, 2001,20(9):2140-2151.
- [6] OZATO K, SHIN D M, CHANG T H, et al. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity[J]. Nat Rev Immunol,2008,8(11):849-860.
- [7] XING Y, MENG Q, CHEN X, et al. TRIM44 promotes proliferation and metastasis in non-small cell lung cancer *via* mTOR signaling pathway [J]. Oncotarget, 2016, 7 (21): 30479-30491.
- [8] TAN Y, YAO H, HU J, et al. Knockdown of TRIM44 inhibits the proliferation and invasion in prostate cancer cells [J]. Oncol Res, 2017,25(8):1253-1259.
- [9] ZHOU Z, LIU Y, MA M, et al. Knockdown of TRIM44 inhibits the proliferation and invasion in papillary thyroid cancer cells through suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2017,96:98-103.
- [10] ONG C A, SHANNON N B, ROSS-INNES C S, et al. Amplification of TRIM44: pairing a prognostic target with potential therapeutic strategy[J]. J Natl Cancer Inst, 2014, 106(5). pii:dju050.
- [11] ZHU X, WU Y, MIAO X, et al. High expression of TRIM44 is associated with enhanced cell proliferation, migration, invasion, and resistance to doxorubicin in hepatocellular carcinoma [J]. Tumour Biol, 2016, 37 (11): 14615-14628.
- [12] ALI F T, ABD EL-AZEEM E M, HAMED M A, et al. Redox dysregulation, immuno-inflammatory alterations and genetic variants of BDNF and MMP-9 in schizophrenia; Pathophysiological and phenotypic implications[J]. Schizophr Res, 2017,188:98-109.
- [13] KIM Y M, KU M J, SON Y J, et al. Anti-metastatic effect of cantharidin in A549 human lung cancer cells[J]. Arch Pharm Res, 2013,36(4):479-484.
- [14] GROBLEWSKA M, SIEWKO M, MROCZKO B, et al. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2012,50(1):12-19.
- [15] MÄÄTTÄ M, SOINI Y, LIAKKA A, et al. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and membrane type 1-MMP in hepatocellular and pancreatic adenocarcinoma; implications for tumor progression and clinical prognosis [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6 (7): 2726-2734.
- [16] PENG R, ZHANG P F, ZHANG C, et al. Elevated TRIM44 promotes intrahepatic cholangiocarcinoma progression by inducing cell EMT *via* MAPK signaling [J]. Cancer Med, 2018,7(3):796-808.
- [17] ADHIKARY S, KOCIEDA V P, YEN J H, et al. Signaling through cannabinoid receptor 2 suppresses murine dendritic cell migration by inhibiting matrix metalloproteinase 9 expression[J]. Blood,2012,120(18):3741-3749.
- [18] JIA Y L, SHI L, ZHOU J N, et al. Epimorphin promotes human hepatocellular carcinoma invasion and metastasis through activation of focal adhesion kinase/extracellular signal-regulated kinase/matrix metalloproteinase-9 axis [J]. Hepatology,2011,54(5):1808-1818.
- [19] 曾海英, 彭睿, 黄晓勇, 等. 肝内胆管细胞癌中 E3 泛素化连接酶 UHRF2 的表达及临床意义 [J]. 中国临床医学, 2018,25(1):9-12.
- [20] PENG R, HUANG X, ZHANG C, et al. Overexpression of UHRF2 in intrahepatic cholangiocarcinoma and its clinical significance[J]. Onco Targets Ther, 2017,10:5863-5872.
- [21] JUSAKUL A, CUTCUTACHE I, YONG C H, et al. Whole-genome and epigenomic landscapes of etiologically distinct subtypes of cholangiocarcinoma [J]. Cancer Discov, 2017,7(10):1116-1135.
- [22] CHAISAINGMONGKOL J, BUDHU A, DANG H, et al. Common molecular subtypes among Asian hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma [J]. Cancer Cell, 2017,32(1):57-70.
- [23] URANO T, USUI T, TAKEDA S, et al. TRIM44 interacts with and stabilizes terf, a TRIM ubiquitin E3 ligase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009,383(2):263-268.
- [24] KAWABATA H, AZUMA K, IKEDA K, et al. TRIM44 is a poor prognostic factor for breast cancer patients as a modulator of NF- κ B signaling [J]. Int J Mol Sci,2017,18(9), pii: E1931.