

三磷酸腺苷酶家族蛋白 2 在不同病变胃组织中的表达及其意义

季惠惠¹ 周璇² 徐进² 李海艳¹ 项锋钢^{1,2}

(青岛大学, 山东 青岛 266021 1 基础医学院病理学系; 2 附属医院病理科)

[摘要] **目的** 探讨三磷酸腺苷酶家族蛋白 2(ATAD2)在不同病变胃组织中的表达及意义。**方法** 收集 12 例新鲜胃腺癌及相应癌旁相对正常组织标本,利用实时荧光定量 PCR 方法(RT-qPCR)检测两种组织中 ATAD2 mRNA 的表达;同时应用免疫组化法检测 ATAD2 在 121 例胃腺癌及相应癌旁相对正常组织、121 例非瘤变胃组织、29 例高低级别上皮内瘤变组织中的表达情况。**结果** RT-qPCR 方法检测结果表明,与相应癌旁相对正常组织相比,新鲜胃腺癌组织中 ATAD2 mRNA 表达明显上调,差异具有统计学意义($t=4.664, P<0.01$);ATAD2 在非瘤变胃组织中均不表达,在高低级别上皮内瘤变中均为低表达,在胃腺癌组织中有 23 例(23/121)呈高表达。在胃腺癌组织中 ATAD2 的表达明显高于相应癌旁相对正常组织($z=-12.588, P<0.01$);在低级别上皮内瘤变中的表达高于非瘤变胃组织($z=-7.984, P<0.01$);在胃腺癌、高级别上皮内瘤变组织中的表达均高于低级别上皮内瘤变组织($z=-2.531, -2.285, P<0.05$);在胃腺癌与高级别上皮内瘤变、慢性萎缩性胃炎与慢性浅表性胃炎中的表达差异均不具有统计学意义($P>0.05$)。ATAD2 在胃腺癌组织中的表达与肿瘤大小、分化程度相关($\chi^2=5.506, 8.412, P<0.05$),而与病人年龄、性别、淋巴结转移、浸润深度、TNM 分期无关($P>0.05$)。**结论** ATAD2 参与了胃腺癌的发生发展过程;ATAD2 表达检测对临床判定某些胃黏膜病变性质有重要的参考价值。

[关键词] 三磷酸腺苷酶家族蛋白 2;胃肿瘤;病理学,临床;免疫组织化学

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

EXPRESSION OF ATPASE FAMILY AAA DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2 IN DIFFERENT GASTRIC LESIONS AND ITS SIGNIFICANCE JI Huihui, ZHOU Xuan, XU Jin, LI Haiyan, XIANG Fenggang (Department of Pathology, Qingdao University Basic Medicine College, Qingdao 266021, China)

[ABSTRACT] **Objective** To examine the expression of ATPase family AAA domain-containing protein 2 (ATAD2) in different gastric lesions and its significance. **Methods** A total of 12 fresh gastric adenocarcinoma specimens and the adjacent normal tissue specimens were collected, and the expression of ATAD2 mRNA was measured using quantitative real-time PCR (RT-qPCR). ATAD2 protein expression in 121 gastric adenocarcinoma and the adjacent normal tissues, 121 non-neoplastic gastric tissues, and 29 high-grade and low-grade intraepithelial neoplasia tissues were determined by immunohistochemistry (IHC). **Results** The RT-qPCR results showed that ATAD2 mRNA expression was significantly upregulated in fresh gastric adenocarcinoma tissues than in the adjacent normal tissues ($t=4.664, P<0.01$). IHC staining revealed that ATAD2 was not expressed in non-neoplastic gastric tissues, lowly expressed in high-grade and low-grade intraepithelial neoplasia tissues, and highly expressed in 23 (23/121) gastric adenocarcinoma tissues. In addition, ATAD2 protein expression was significantly higher in gastric adenocarcinoma tissues than in the adjacent normal tissues ($z=-12.588, P<0.01$), and higher in low-grade intraepithelial neoplasia tissues than in non-neoplastic tissues ($z=-7.984, P<0.01$). We also found higher ATAD2 protein expression in gastric adenocarcinoma and high-grade intraepithelial neoplasia tissues than in low-grade intraepithelial neoplasia tissues ($z=-2.531, -2.285$, respectively, both $P<0.05$). However, there was no significant difference in the level of ATAD2 expression between gastric adenocarcinoma and high-grade intraepithelial neoplasia and between chronic atrophic gastritis and chronic superficial gastritis (both $P>0.05$). Furthermore, ATAD2 expression in gastric adenocarcinoma tissues was correlated with tumor size and degree of differentiation ($\chi^2=5.506, 8.412$, respectively, both $P<0.05$), but not with age, sex, lymph node metastasis, depth of infiltration, and TNM stage ($P>0.05$). **Conclusion** ATAD2 is involved in the development and progression of gastric adenocarcinoma, and its expression may serve as a valuable marker for the clinical determination of the nature of certain gastric mucosal lesions.

[KEY WORDS] ATPase family AAA domain-containing protein 2; Stomach neoplasms; Pathology, clinical; Immunohistochemistry

胃癌是世界上消化系统常见的恶性肿瘤之一,

其较高的发病率和死亡率严重威胁人类的健康^[1], 尽管胃镜活检健康筛查逐渐普及,但是由于早期症状不明显,多数病人就诊时往往处于中晚期,预后较差。胃癌的发生、发展过程涉及一系列遗传学改变,

[收稿日期] 2018-02-17; **[修订日期]** 2018-03-22

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81502388)

[通讯作者] 周璇, Email: 18661800315 @ 163.com; 项锋钢,

Email: xiangfenggang@163.com

如众多抑癌基因的失活和癌基因的激活,但其具体的分子机制目前尚不十分清楚。目前,胃腺癌是胃恶性肿瘤中最常见的组织学类型^[2]。三磷酸腺苷酶家族蛋白 2(ATAD2)是近年来发现的一种肿瘤相关分子。已有研究显示,ATAD2 在多种恶性肿瘤中过表达,并与多种肿瘤的生存预后不良相关^[3-6]。目前,有关 ATAD2 在不同病变胃组织中表达情况的研究相对较少。本文旨在通过检测 ATAD2 在新鲜胃腺癌组织中 mRNA 水平的表达,以及 ATAD2 在不同病变胃组织中的表达情况,初步探讨其表达与胃腺癌的发生发展的关系及意义。

1 材料与方法

1.1 材料

收集青岛大学附属医院 2017 年经手术切除的新鲜胃腺癌及相应癌旁相对正常组织 12 例,2011—2012 年行手术切除的胃腺癌与相应癌旁相对正常组织(其中相应癌旁相对正常组织距肿瘤>5 cm) 121 例;另收集 121 例非瘤变胃组织(78 例慢性浅表性胃炎、43 例慢性萎缩性胃炎),16 例低级别上皮内瘤变,13 例高级别上皮内瘤变组织。所有胃腺癌病人术前均未行放射、化学药物治疗,病人年龄 38~85 岁,平均 62.7 岁。所有切片均经 2 位经验丰富的病理医生阅片复诊。本实验经青岛大学附属医院伦理委员会同意。

1.2 试剂

浓缩型鼠抗人单克隆抗体 ATAD2(1:100,英国 Abcam 公司);PV6000 免疫组化检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 实时荧光定量 PCR 法检测 ATAD2 在胃腺癌组织中的表达 用 Trizol 提取 12 例新鲜胃腺癌及相应癌旁相对正常组织总 RNA,Prime ScriptTM 反转录试剂盒(大连 Takara 公司生产)合成第一链 cDNA,以 cDNA 为模板,应用 Bio-Rad CFX96 实时荧光定量 PCR 仪器以及 SYBR Premix Ex TaqTM II 荧光定量试剂盒(大连 Takara 公司)对 ATAD2 和 β -actin 的表达水平进行检测。ATAD2 引物序列为:5'-GGAATCCCAAACCACTGGACA-3'(正义链),5'-GGTAGCGTCGTCGTAAAGCACA-3'(反义链); β -actin 的引物序列为:5'-CGCAAAGACCTGTATGCC AA-3'(正义链);5'-CACACAGAGTAC-TTGCCTC-3'(反义链)。反应条件如下:95℃预变性 30 s;随后 95℃变性 5 s,55℃退火 30 s,72℃

延伸 30 s,共进行 40 个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 ATAD2 在胃腺癌组织中的相对表达量。

1.3.2 组织微阵列构建 对 121 例胃腺癌及相应癌旁相对正常组织进行石蜡包埋、切片,苏木精-伊红(HE)染色后,由两位经验丰富的病理医生诊断阅片,并对典型的区域进行确认及标记,用孔径为 1.5 mm 细针对蜡块进行打孔,并矩形排阵于空白受体蜡块,受体蜡块经 53℃阵列融合,4 μ m 厚连续切片,HE 染色以后,对每一个组织样本行复诊质检。

1.3.3 免疫组化染色 所有标本经常规石蜡包埋、4 μ m 厚连续切片、脱蜡、水化后,采用 PV6000 法进行免疫组化染色。以体积分数 0.03 H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶,高压热抗原(1 mmol/L EDTA,pH 8.0)修复,室温冷却,PBS 冲洗 2 次以后,滴加一抗于 4℃冰箱孵育过夜,PBS 冲洗 3 次,滴加二抗,37℃孵育 20 min,PBS 冲洗 3 次,滴加 DAB 显色,苏木精复染,中性树胶封片。用已知阳性表达 ATAD2 的正常睾丸组织作为阳性对照,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4 结果判读

以在细胞核中出现棕黄色和棕褐色的颗粒为 ATAD2 阳性表达,评判标准参考相关的文献^[7-8]。按照阳性细胞所占的百分比进行评分。0 分:阳性细胞百分比<5%,1 分:阳性细胞百分比占 5%~25%,2 分:阳性细胞百分比 26%~50%,3 分:阳性细胞百分比占 51%~75%,4 分:阳性细胞百分比占 76%~100%;按照染色强度评分。0 分:无着色,1 分:浅黄色,2 分:棕黄色,3 分:棕褐色。ATAD2 免疫组化染色得分=阳性细胞所占百分比得分 \times 染色强度得分,ATAD2 免疫组化染色得分 ≤ 4 分为低表达,>4 分为高表达。

2 结 果

2.1 新鲜胃腺癌与相应癌旁相对正常组织中的 ATAD2 mRNA 表达

ATAD2 在胃腺癌与相应癌旁相对正常组织中的平均相对表达量分别为 -2.36 ± 1.21 、 -2.90 ± 1.15 ,差异具有统计学意义($t=4.664$, $P<0.01$)。

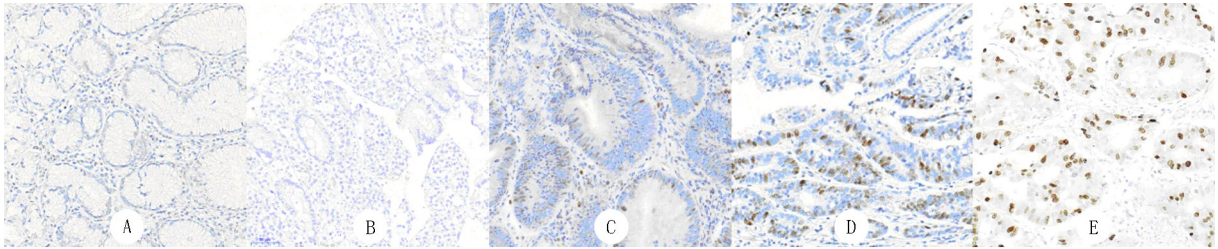
2.2 胃腺癌与相应癌旁相对正常组织中 ATAD2 蛋白的表达

ATAD2 在 121 例胃腺癌组织中有 23 例(23/121)呈高表达,而在相应癌旁相对正常组织中均不表达,两者比较差异具有统计学意义($z=-12.588$, $P<0.01$)。

2.3 不同病变胃组织中 ATAD2 蛋白的表达

ATAD2 在 121 例非瘤变的胃组织中均不表达(图 1A、B),在 16 例低级别上皮内瘤变中 8 例低表达,8 例不表达(图 1C),在 13 例高级别上皮内瘤变中 11 例低表达,2 例不表达(图 1D),在 121 例胃腺癌中有 23 例高表达,98 例低表达(20 例不表达)(图

1E)。高级别上皮内瘤变及胃腺癌组织中 ATAD2 蛋白表达与低级别上皮内瘤变组织比较明显升高($z=-2.531$ 、 -2.285 , $P<0.05$);与低级别上皮内瘤变相比,非瘤变胃组织中 ATAD2 蛋白无表达($z=-7.984$, $P<0.01$)。ATAD2 在高级别上皮内瘤变与胃腺癌组织中表达无差异($P>0.05$)。



A:慢性浅表性胃炎;B:慢性萎缩性胃炎;C:低级别上皮内瘤变;D:高级别上皮内瘤变;E:胃腺癌。PV6000 法,200 倍。

图 1 不同病变胃组织中 ATAD2 蛋白的表达情况

2.4 ATAD2 蛋白在胃腺癌中的表达及与临床病理特征的关系

ATAD2 蛋白在胃腺癌中的表达水平与肿瘤大小、分化程度相关($\chi^2=5.506$ 、 8.412 , $P<0.05$),而与病人年龄、性别、淋巴结是否转移、TNM 分期、浸润深度均无关($P>0.05$)。见表 1。

表 1 ATAD2 蛋白在胃腺癌中的表达及与临床病理特征的关系(例(χ/%))

临床病理特征	n	低表达	高表达	χ^2	P
性别					
男	91	71(78.02)	20(21.98)		
女	30	27(90.00)	3(10.00)	2.103	0.147
年龄(岁)					
<63	56	49(87.50)	7(12.50)		
≥63	65	49(75.38)	16(24.62)	2.868	0.090
分化程度					
高中分化	41	38(92.68)	3(7.32)		
低分化	80	60(75.00)	20(25.00)	5.506	0.019
肿瘤大小(d/cm)					
<5	48	45(93.75)	3(6.25)		
≥5	73	53(72.60)	20(27.40)	8.412	0.004
TNM 分期					
I ~ II	51	45(88.24)	6(11.76)		
III ~ IV	70	53(75.71)	17(24.29)	3.005	0.083
浸润深度					
T ₁	17	16(94.12)	1(5.88)		
T ₂ ~T ₄	104	82(78.85)	22(21.15)	2.213	0.137
淋巴结转移情况					
未转移	44	39(88.64)	5(11.36)		
转移	77	59(76.62)	18(23.38)	2.625	0.105

3 讨 论

ATAD2 的编码基因位于染色体 8q24.13,其表达产物 ATAD2 又称为 PRO2000 或 ANCCA,主要

包含两个结构域,一个与细胞活性相关的 ATP 酶结构域^[9-10],另一个为参与蛋白质翻译后修饰相关的溴结构域^[11]。有研究显示,ATAD2 参与调控肿瘤相关的信号转导通路,如 ATAD2 可以与 E2F 以及 Myc 相互作用,从而导致多种肿瘤的发生^[12];ATAD2 可以与 ACTR 启动子结合,参与肿瘤的发生及发展^[12]。已有研究显示,ATAD2 在卵巢癌、结直肠癌、子宫内膜癌以及肝癌等多种恶性肿瘤中呈过表达^[6,7,13],并且参与了多种肿瘤的 DNA 的复制过程^[14]。有研究证明 ATAD2 与肺癌、子宫内膜癌、肾细胞癌等恶性肿瘤的不良预后相关^[15]。

目前,关于 ATAD2 在胃腺癌中的研究相对较少,有研究通过免疫组化法仅检测其在胃癌与邻近非肿瘤组织中的表达^[16],而胃癌的发生是一个多阶段演进的过程,该研究并未检测 ATAD2 在不同病变胃组织中的表达。本文通过 RT-qPCR、免疫组化法检测显示,ATAD2 在胃腺癌中 mRNA 及蛋白水平均高于相应癌旁相对正常组织,这与黄国全等^[16]在胃癌中的研究结果相一致。另外,本文通过检测不同病变胃组织中 ATAD2 的表达水平,结果显示 ATAD2 在高级别上皮内瘤变、胃腺癌中的表达高于低级别上皮内瘤变,在低级别上皮内瘤变中的表达高于慢性浅表性及慢性萎缩性胃炎,而 ATAD2 在胃腺癌与高级别上皮内瘤变、慢性浅表性胃炎与慢性萎缩性胃炎之间的表达却没有统计学差异。已有研究显示,ATAD2 在宫颈癌、高级别上皮内病变中的表达升高,高于在宫颈正常上皮及宫颈低级别上皮内病变组织中的表达,高表达的 ATAD2 可以促进宫颈癌细胞的增殖、转移和侵袭^[17]。本文的研

究结果显示,ATAD2 在胃腺癌 mRNA 及蛋白水平表达均升高,提示 ATAD2 参与了胃腺癌的发生过程,ATAD2 蛋白在非瘤变胃组织中不表达,在低级别上皮内瘤变组织中出现了少量表达,而在高级别上皮内瘤变及胃腺癌组织中的表达明显增多,提示 ATAD2 是胃腺癌发生过程中的一个早期事件,对某些胃黏膜病变性质的判定具有重要的参考价值。

本文通过分析 ATAD2 与胃腺癌临床病理特征的关系显示,ATAD2 的表达与肿瘤的大小、分化程度相关。在低分化胃腺癌组中 ATAD2 的表达明显升高,高于在高中分化胃腺癌组中的表达,这与 KRAKSTAD 等^[18]在子宫内膜癌中的研究结果一致,该研究发现 ATAD2 在子宫内膜癌中的表达水平与子宫内膜癌的分级相关;在肿瘤直径大于 5 cm 的病人组中 ATAD2 的表达升高,高于肿瘤直径小于 5 cm 的病人组中的表达,这提示 ATAD2 参与了胃腺癌的发展过程。目前研究表明,ATAD2 可以促进多种恶性肿瘤细胞的增殖^[7,19],这提示在胃腺癌中,ATAD2 可能通过影响胃腺癌细胞的增殖过程,从而影响胃腺癌的进展。本文免疫组化结果显示 ATAD2 的表达与 TNM 分期、淋巴结转移及浸润深度无关,与黄国全等^[16]的研究结果不一致,推测与样本选取不同有关,本文的研究对象为胃腺癌,而黄国全等^[16]的研究对象为胃癌;另外,临床病理特征的分组标准也存在一定差异。目前,国内外关于 ATAD2 在胃腺癌中的研究相对较少,相关结果有待进一步验证。

综上所述,ATAD2 可能参与了胃腺癌的发生、发展过程,是胃腺癌发生过程中的一个早期事件,对某些胃黏膜病变性质的判定有重要的参考价值;ATAD2 在胃腺癌细胞中发挥的具体生物学作用及影响癌细胞生物学行为的具体分子机制,需要在以后的研究中进一步探讨。

[参考文献]

[1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016,66(2):115-132.

[2] AJANI J A, LEE J, SANO T, et al. Gastric adenocarcinoma [J]. Nat Rev Dis Primers, 2017,3:1-19.

[3] HOU M M, HUANG R, SONG Y N, et al. ATAD2 overexpression is associated with progression and prognosis in colorectal cancer[J]. Jan J Clin Oncol, 2016,46(3):222-227.

[4] HWANG H W, HA S Y, BANG H, et al. ATAD2 as a poor prognostic marker for hepatocellular carcinoma after curative resection[J]. Cancer Res Treat, 2015,47(4):853-861.

[5] KALASHNIKOVA E V, REVENKO A S, GEMO A T, et

al. ANCCA/ATAD2 overexpression identifies breast cancer patients with poor prognosis, acting to drive proliferation and survival of triple-negative cells through control of B-Myb and EZH2[J]. Cancer Res, 2010,70(22):9402-9412.

[6] WAN W N, ZHANG Y X, WANG X M, et al. ATAD2 is highly expressed in ovarian carcinomas and indicates poor prognosis[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014,15(6):2777-2783.

[7] LUO Y, YE G Y, QIN S L, et al. ATAD2 overexpression identifies colorectal cancer patients with poor prognosis and drives proliferation of cancer cells[J]. Gastroent Res Pract, 2015,2015(2015):1-8.

[8] ZHENG L, LI T R, ZHANG Y, et al. Oncogene ATAD2 promotes cell proliferation, invasion and migration in cervical cancer[J]. Oncology Reports, 2015,33(5):2337-2344.

[9] LU W J, CHUA M S, SO S K. Suppression of ATAD2 inhibits hepatocellular carcinoma progression through activation of p53-and p38-mediated apoptotic signaling [J]. Oncotarget, 2015,6(39):41722-41735.

[10] CATTANEO M, MOROZUMI Y, PERAZZA D, et al. Lessons from yeast on emerging roles of the ATAD2 protein family in gene regulation and genome organization[J]. Mol Cells, 2014,37(12):851-856.

[11] REVENKO A S, KALASHNIKOVA E V, GEMO A T, et al. Chromatin loading of E2F-MLL complex by cancer-associated coregulator ANCCA via reading a specific histone mark [J]. Mol Cell Biol, 2010,30(22):5260-5272.

[12] HSIA E Y, KALASHNIKOVA E V, REVENKO A S, et al. Deregulated E2F and the AAA+ coregulator ANCCA drive proto-oncogene ACTR/AIB1 overexpression in breast cancer [J]. Mol Cancer Res, 2010,8(2):183-193.

[13] 刘芬,王彦,李宏,等. ATAD2 在不同病变肝组织中的表达及意义[J]. 齐鲁医学杂志, 2017,32(2):158-161.

[14] MOROZUMI Y, BOUSSOUAR F, TAN M, et al. Atad2 is a generalist facilitator of chromatin dynamics in embryonic stem cells[J]. J Mol Cell Biol, 2016,8(4):349-362.

[15] WANG D, PAN Y, HAO T, et al. Clinical and prognostic significance of ANCCA in squamous cell lung carcinoma patients[J]. Arch Med Res, 2016,47(2):89-95.

[16] 黄国全,孙建华,吴泉峰. 三磷酸腺苷酶家族蛋白 2 过表达作为胃癌预后标志物可行性研究[J]. 实用医院临床杂志, 2016,13(6):29-32.

[17] 杨薇,徐梅梅,夏凤宇,等. 下调 ATAD2 表达对胃癌细胞增殖的影响及其机制探讨[J]. 山东医药, 2015,55,(8):29-30.

[18] KRAKSTAD C, TANGEN I L, HOIVIK E A, et al. ATAD2 overexpression links to enrichment of B-MYB translational signatures and development of aggressive endometrial carcinoma [J]. Oncotarget, 2015,6(29):28440-28452.

[19] WU G, LIU H, HE H, et al. miR-372 down-regulates the oncogene ATAD2 to influence hepatocellular carcinoma proliferation and metastasis[J]. BMC Cancer, 2014,14(107):1-9.