

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.13.022

## DNA 去甲基化酶 TET2 在胃癌细胞低表达与肿瘤转移的相关性

郭 严,雷增杰,王 斌,陈东风

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科,重庆 400042)

**[摘要]** 目的 探讨 DNA 去甲基化酶 TET2 和 E-钙黏蛋白(E-cad)在胃癌组织的表达及临床意义。方法 收集该院行手术切除的胃癌标本 100 例,采用免疫组化技术检测胃癌组织中 TET2 和 E-cad 的表达,并分析其与患者临床病理特征及预后的关系。结果 TET2 和 E-cad 在胃癌组织高表达率分别为 24%(24/100),26%(26/100),显著低于癌旁黏膜 82.8%(21/29),65.5%(19/29)( $P<0.05$ )。TET2 和 E-cad 在 TNM III 期、发生淋巴结转移的胃癌组织表达率明显降低( $P<0.05$ )。TET2 或 E-cad 低表达组患者总生存率和无转移生存率明显低于高表达组( $P<0.05$ )。胃癌组织中 TET2 与 E-cad 表达呈显著正相关( $P<0.01$ )。结论 TET2 与 E-cad 表达呈正相关,胃癌细胞 TET2 低表达与胃癌转移有密切关系,提示预后不良。

**[关键词]** 胃肿瘤;TET2;E-钙黏蛋白

**[中图分类号]** R735.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)13-1790-04

### Low expression of DNA demethylation enzyme TET2 is tightly associated with metastasis of gastric cancer

Guo Yan, Lei Zhenjie, Wang Bin, Chen Dongfeng

(Department of Gastroenterology, Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of DNA demethylation enzyme TET2 and E-cadherin in gastric cancer tissue and their clinical significance. **Methods** The expressions of TET2 and E-cadherin protein in gastric cancer tissue specimens from 100 operatively treated patients in our hospital were examined by immunohistochemical staining. Their correlation with several clinicopathological characteristics and prognosis was analyzed. **Results** The high expression rates of TET2 and E-cadherin in gastric cancer tissue were 24%(24/100) and 26%(26/100) respectively, which were significantly lower than 82.8%(21/29) and 65.5%(19/29) in the adjacent normal mucosa( $P<0.05$ ). The expression rates of TET2 and E-cadherin in the gastric cancer tissue with TNM stage III and lymph node metastasis were significantly decreased ( $P<0.05$ ). The total survival rate and the non-metastasis survival rate in the TET2 or E-cadherin low expression group was significantly lower than those in the TET2 or E-cadherin high expression group( $P<0.05$ ). The TET2 expression was positively correlated with the expressions of E-cadherin in the gastric cancer tissue( $P<0.01$ ). **Conclusion** The TET2 expression is positively correlated with the expressions of E-cadherin. The low expression of TET2 is closely related with gastric cancer metastasis, which indicates the poor prognosis.

**[Key words]** stomach neoplasms; ten eleven translocation 2; E-cadherin

胃癌是临床常见恶性肿瘤之一,其侵袭转移性强,发病率和死亡率居我国第 2 位<sup>[1]</sup>。肿瘤进展伴随基因组异常甲基化改变,新近发现 DNA 去甲基化酶 TET(ten eleven translocation)蛋白家族调控 DNA 主动去甲基化,可能调控肿瘤进展。血液系统肿瘤中存在 TET 蛋白家族成员 TET2(ten eleven translocation 2)基因突变<sup>[2-4]</sup>,乳腺癌等实体肿瘤中 TET2 蛋白催化产物 5hmC 丰度降低<sup>[5]</sup>,表明 TET2 可能在肿瘤进展中发挥重要作用。上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)是肿瘤细胞浸润转移的关键始动步骤。EMT 导致上皮细胞极性消失, E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-cad)表达降低,细胞间黏附减退,呈现成纤维细胞样表型,侵袭和运动能力增强,但目前尚不清楚 TET2 是否参与 EMT,是否与肿瘤细胞转移特性相关。本研究检测 TET2 在胃癌组织中的表达情况,分析其表达及与 EMT 标志物 E-cad 表达的相关性,分析 TET2 与肿瘤转移的关系,探讨 TET2 在胃癌侵袭转移中可能的作用。

### 1 材料与与方法

**1.1 材料** 收集 2001 年 2 月至 2005 年 12 月本院行手术切

除的胃癌标本 168 例。所有患者术后存活时间为 6~143 个月,中位生存期为 57.2 个月。以发现胃癌后第 1 次手术时间为基线,分别进行电话及信件随访患者的生存状态、用药或化疗情况、检查结果、康复情况、肿瘤复发时间等。选取随访资料完整病例 100 例,其中男 73 例,女 27 例;年龄 31~78 岁,中位年龄 58.7 岁。肿瘤直径小于或等于 5 cm 的有 75 例,大于 5 cm 的有 25 例。按国际抗癌联盟(UICC)的 TNM 标准, I 期 23 例, II 期 41 例, III 期 36 例(表 1)。患者术前未实施辅助化疗及放疗。

**1.2 方法** 手术切除胃癌组织标本,10%甲醛固定,石蜡包埋,制成组织芯片。5  $\mu$ m 连续切片 4 张,2 张用于免疫组化 SP 法分别检测 TET2、E-cad,1 张 HE 染色,1 张用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。兔抗人 TET2 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司,兔抗人 E-cad 单克隆抗体、PV-6000 染色试剂盒、DAB 酶底物染色剂等均购自北京中杉生物技术有限公司。光学显微镜下采用二级计分法结果判断。(1)阳性细胞百分率计分:随机选择 5 个视野( $\times 200$ ),计算阳性细胞百分比,

无阳性细胞为 0 分, <10% 为 1 分, 10%~50% 为 2 分, >50% 为 3 分。(2)染色强度计分: 阳性颗粒为淡黄色计 1 分, 黄色或深黄色计 2 分, 黄褐色计 3 分。1、2 项评分相乘, ≥3 分者为高表达, <3 分者为低表达。

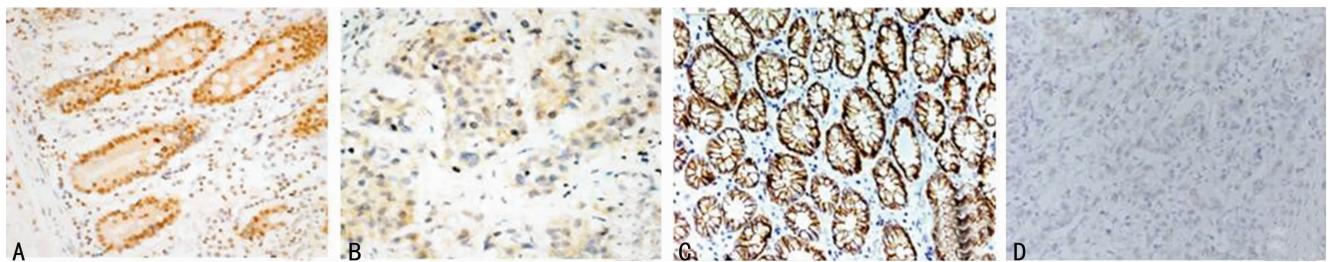
**1.3 统计学处理** 使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计数资料采用  $\chi^2$  检验, 两种蛋白之间的相关性采用 Spearman 等级相关分析, 总体生存率用 Kaplan-Meier 方法计算,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 胃癌组织低表达 TET2、E-cad 蛋白** TET2 主要表达在细胞核, 在 29 例癌旁组织中高表达 21 例(82.8%), 在胃癌组织中表达下降或缺失, 在 100 例胃癌组织中高表达仅有 24 例, 占 24.0%(图 1A、B), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。E-cad 主要表达在细胞膜, 在癌旁组织中高表达率为 65.5%(19/29),

在胃癌组织中高表达率为 26.0%(26/100)(图 1C、D), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。这些数据提示, TET2、E-cad 在胃癌组织中表达下降。

**2.2 肿瘤细胞 TET2、E-cad 表达丰度与胃癌临床病理特征密切相关** TET2 在不同性别、年龄的胃癌组织中的表达无明显差异( $P > 0.05$ ), 而与肿瘤直径、分化、淋巴结转移、TNM 分期的表达有统计学意义( $P < 0.05$ )。肿瘤直径大于 5 cm 的胃癌组织, TET2 表达比肿瘤直径小于 5 cm 的胃癌组织明显下降( $P < 0.05$ )。随着肿瘤分化程度的下降, TET2 表达降低, 低分化胃癌患者中, TET2 表达存在不同程度的缺失。TNM III 期和淋巴结转移的胃癌组织中 TET2 表达率明显下降(表 1)。E-cad 在不同年龄、性别、不同直径的胃癌组织中的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 但在低分化、TNM III 期、淋巴结转移的胃癌组织中 E-cad 表达率明显下降( $P < 0.05$ ), 见表 2。



A: TET2 在胃癌癌旁组织中的表达; B: TET2 在胃癌组织中的表达; C: E-cad 在胃癌癌旁组织中的表达; D: E-cad 在胃癌组织中的表达。

图 1 免疫组化检测 TET2、E-cad 在胃癌及癌旁组织中的表达(SABC×200)

表 1 TET2、E-cad 的表达与胃癌临床病理特征的关系[n(%)]

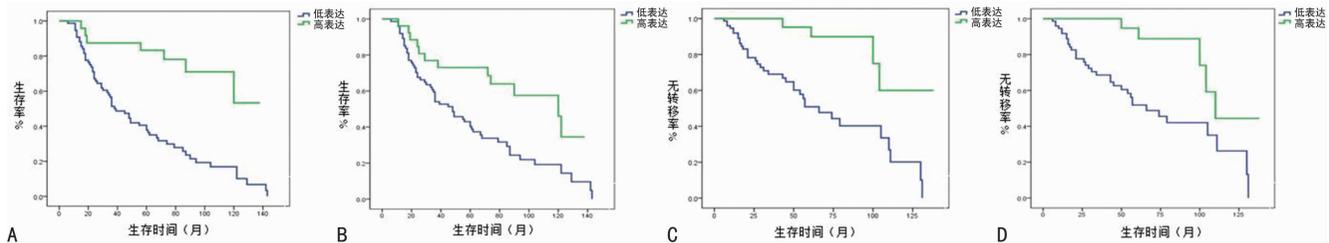
组别	TET2			P	E-cad			P
	n	低表达	高表达		n	低表达	高表达	
年龄(岁)				0.707				0.436
≤60	55	41(74.5)	14(25.5)		55	39(70.9)	16(29.1)	
>60	45	35(77.8)	10(22.2)		45	35(77.8)	10(22.2)	
性别				0.435				0.300
男	73	54(74.0)	19(26.0)		73	52(71.2)	21(28.8)	
女	27	22(81.5)	5(18.5)		27	22(81.5)	5(18.5)	
肿瘤直径(cm)				0.033				0.188
≤5	75	53(70.7)	22(29.3)		75	53(70.7)	22(29.3)	
>5	25	23(92.0)	2(8.0)		25	21(84.0)	4(16.0)	
分化程度				0.003				0.001
高分化	9	3(33.3)	6(66.7)		9	2(22.2)	7(77.8)	
中分化	36	26(72.2)	10(27.8)		36	28(77.8)	8(22.2)	
低分化	55	47(85.5)	8(14.5)		55	44(80.0)	11(20.0)	
TNM 分期				0.001				0.022
I	23	11(47.8)	12(52.2)		23	12(52.2)	11(47.8)	
II	41	35(85.4)	6(14.6)		41	32(78.0)	9(22.0)	
III	36	30(83.3)	6(16.7)		36	30(83.3)	6(16.7)	
淋巴结转移				0.034				0.041
未转移	52	35(67.3)	17(32.7)		59	34(65.4)	18(34.6)	
转移	48	41(85.4)	7(14.6)		41	40(83.3)	8(16.7)	

**2.3 胃癌细胞低表达 TET2、E-cad 与胃癌不良预后相关** 进

一步分析 TET2、E-cad 的表达与胃癌预后的关系, Kaplan-

Meier 分析的结果显示:胃癌组织中 TET2、E-cad 的高表达组总生存率均高于其低表达组 ( $P < 0.05$ ), 见图 2A~C。分析 TET2 与胃癌临床病理特征之间的关系发现, TET2 与胃癌淋巴结转移相关, 其表达均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 推测 TET2 表达可能参与胃癌的转移。所以, 进一步运用 Kaplan-Meier 观察 TET2 表达与胃癌无转移生存率之间的关系。分析发现

胃癌组织中 TET2、E-cad 的高表达组无转移生存率高于其低表达组 ( $P < 0.05$ ), 见图 2D。COX 比例风险模型多因素分析 (表 2) 提示 TNM 分期、TET2 可以作为独立预后因素 ( $P < 0.05$ ), 而年龄、性别、淋巴结转移、肿瘤分化以及 E-cad 表达不是独立的预后因素 ( $P > 0.05$ )。



A~B: TET2、E-cad 的高表达组与低表达组总生存曲线; C~D: TET2、E-cad 的高表达组与低表达组无转移生存曲线。

图 2 TET2、E-cad 表达在胃癌患者中的生存曲线

表 2 胃癌各临床因素与总生存率的多因素分析

指标	总生存率	
	风险比 (95% CI)	P
年龄(岁)		0.072
≤ 60 vs. > 60	1.57 (0.96~2.58)	
性别		0.755
男性 vs. 女性	1.11 (0.59~2.07)	
淋巴结转移		0.337
未转移 vs. 转移	0.69 (0.33~1.47)	
分化		0.051
高中分化 vs. 低分化	1.68 (1.00~2.83)	
TNM 分期		0.001
I + II vs. III	3.90 (1.80~8.48)	
Tet2 表达		0.007
低表达 vs. 高表达	0.30 (0.12~0.72)	
E-cad 表达		0.670
低表达 vs. 高表达	0.86 (0.42~1.73)	

**2.4 胃癌组织中 TET2 与 E-cad 蛋白表达水平呈显著正相关性** Spearman 等级相关分析各因素间的相关性, 如表 3 所示: 在 TET2 低表达的胃癌组织中, E-cad 低表达为 90.5% (67/74), E-cad 高表达为 9.5% (7/74)。在 TET2 高表达的胃癌组织中, E-cad 高表达为 65.4% (17/24), E-cad 低表达为 34.6% (9/24)。二者呈显著正相关 ( $r = 0.574, P < 0.01$ )。这些结果提示 TET2 丢失与胃癌细胞 EMT 可能存在密切关系。

表 3 TET2 与 E-cad 在胃癌表达中的相关性分析

E-cad	TET2			r	P
	n	低表达	高表达		
低表达	74	67 (90.5%)	7 (9.5%)	0.574	< 0.01
高表达	24	9 (34.6%)	17 (65.4%)		
合计	100	84	16		

### 3 讨论

DNA 的胞嘧啶 5-甲基化是一种重要的表观遗传学修饰, 它在生物发育和基因调节中发挥着重要的作用<sup>[6]</sup>。研究表明, DNA 胞嘧啶甲基化在特定位点生成的 5-甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine, 5mc) 可经 DNA 去甲基化酶 TET 蛋白羟化后生成 5-羟甲基胞嘧啶 (5-hydroxymethylcytosine, 5hmc)。TET 蛋白家族有 3 位成员, 分别是 TET1、TET2、TET3<sup>[7]</sup>。另外, TET 蛋白还可以氧化 5mc 或 5hmc, 从而将其转化为 5-甲酰胞嘧啶 (5-formylcytosine, 5fc) 和 (或) 5-羧基胞嘧啶 (5-carboxylcytosine, 5caC)<sup>[8]</sup>。这说明 TET 蛋白家族成员通过修饰 DNA 甲基化参与生物的生长及发育。

近年来, TET2 在肿瘤发生过程中的作用成为研究热点。TET2 在骨髓增生异常综合征、红细胞增多症、原发性血小板增多症、骨髓纤维化、母细胞性浆细胞样树突细胞瘤中发生突变<sup>[3-4]</sup>。Yang 等<sup>[5]</sup>发现, TET2 在其他上皮来源性肿瘤, 如: 乳腺癌、肝癌中的表达都较正常组织降低。在本实验中, 与癌旁组织相比, TET2 在胃癌中表达下降或缺失, 高表达率仅为 24% (24/100) ( $P < 0.05$ ), 其表达与胃癌大小 ( $P = 0.033$ )、分化 ( $P = 0.003$ )、淋巴结转移 ( $P = 0.001$ ) 及 TNM 分期 ( $P = 0.034$ ) 之间存在着显著统计学关联, 进一步证实了 TET2 蛋白参与了胃癌的发生、发展, 并可能与胃癌的增殖、侵袭和转移有关。

本实验研究还表明, E-cad 在胃癌中表达下调, 而 E-cad 的下调是 EMT 的重要生物学特征。大量研究表明, EMT 是上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物学过程。E-cad 阴性细胞的运动能力明显增强, 从而导致肿瘤侵袭、转移。本研究发现, E-cad 在胃癌组织中的表达较正常胃黏膜显著下降, 并在低分化、TNM III 期和有淋巴结转移的胃癌患者中表达下降或缺失 ( $P < 0.05$ ), 与既往在其他肿瘤中的研究报道一致。

进一步分析 TET2 与 EMT 关键指标 E-cad 相关性, 作者发现, TET2 与 E-cad 在胃癌组织中的表达呈显著正相关 ( $P < 0.001$ )。Su 等<sup>[9]</sup>研究发现, 敲除正常乳腺上皮细胞株 MCF-10A 中的 TET2 基因可以促使 EMT 发生, 说明 TET2 可以通过下调 E-cad 的方式进一步促进胃癌的转移能力。而 TET2

与 E-cad 之间可能存在着密切关系,其发生机制可能是 TET2 突变影响 H3K9 去甲基化,从而调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,促进细胞增殖,抑制凋亡,诱导 EMT 发生<sup>[10-11]</sup>。

本研究显示 TET2 和 E-cad 的低表达与患者生存率下降有关( $P < 0.05$ ),其低表达患者无转移生存率更低( $P < 0.05$ ),多因素分析也证实 TET2 可以作为胃癌的独立预后指标,提示 TET2 蛋白是胃癌预后的重要影响因素之一。

综上所述,TET2 在低分化、TNM III 期、有淋巴结转移的胃癌组织中的表达率明显降低,其低表达预示着淋巴结转移及更差的预后。TET2 与 EMT 重要因子 E-cad 之间存在着显著正相关,说明其共同参与了胃癌的侵袭和转移。TET2 这一新的肿瘤相关因子,可作为胃癌预后判断的评价因素,还能为胃癌的治疗提供新的靶点。但是,TET2 如何调控 EMT 参与肿瘤侵袭转移的分子机制尚不明确,也是下一步研究的重点。

### 参考文献

- [1] 金锦莲,吴发明,周海燕,等. microRNA-219-2-3 在胃癌中的表达及其作用机制初探[J]. 重庆医学,2014,43(15): 1729-1731.
- [2] Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis[J]. Leukemia, 2009, 23(5):905-911.
- [3] Makishima H, Jankowska AM, McDevitt MA, et al. CBL, CBLB, TET2, ASXL1, and IDH1/2 mutations and additional chromosomal aberrations constitute molecular events in chronic myelogenous leukemia[J]. Blood, 2011, 117(21):e198-206.
- [4] Jardin F, Ruminy P, Parmentier F, et al. TET2 and TP53 mutations are frequently observed in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm[J]. Br J Haematol, 2011, 153(3): 413-416.
- [5] Yang H, Liu Y, Bai F, et al. Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation[J]. Oncogene, 2013, 32(5): 663-669.
- [6] Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics[J]. Nat Rev Genet, 2008, 9(6):465-476.
- [7] Loenarz C, Schofield CJ. Oxygenase catalyzed 5-methylcytosine hydroxylation[J]. Chem Biol, 2009, 16(6): 580-583.
- [8] He YF, Li BZ, Li Z, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA[J]. Science, 2011, 333(6047):1303-1307.
- [9] Su JS, Laura P, Min SS, et al. MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET family dependent chromatin remodeling[J]. Cell, 2013, 154(2):311-324.
- [10] Mancini M, Veljkovic N, Leo E, et al. Cytoplasmic compartmentalization by Bcr-Abl promotes TET2 loss-of-function in chronic myeloid leukemia[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(8):2765-2774.
- [11] 赵佳晖,姜永光,罗勇. Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在肿瘤 EMT 现象中的作用研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2008, 28(2):190-194.
- (收稿日期:2014-10-18 修回日期:2015-02-09)

(上接第 1789 页)

- a meta-analysis [J]. Clin Exp Rheumatol, 2014, 32(1): 11-21.
- [5] Pruijn GJ, Wiik A, van Venrooij WJ. The use of citrullinated peptides and proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(1):203.
- [6] 黄晶,林花,王永新,等. 抗环瓜氨酸肽抗体、抗角蛋白抗体、抗核周因子抗体和类风湿因子联合检测在老年类风湿关节炎诊断中的意义[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(10):1362-1363.
- [7] 王梅芳. 角蛋白抗体和类风湿因子检测在类风湿关节炎诊断中的临床意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(4): 802-803.
- [8] 冯超,李昕怡,王佑娟,等. 类风湿关节炎关节的早期诊断及健康管理[J]. 现代预防医学, 2009, 36(6):1196-1198.
- [9] 谢其冰,尹耕. 三种自身抗体在类风湿关节炎诊断及关节侵蚀预测中的价值[J]. 四川大学学报:医学版, 2009, 40(3):508-512.
- [10] Vittecoq O, Incaugarat B, Jouen-Beades F, et al. Autoantibodies recognizing citrullinated rat filaggrin in an ELISA using citrullinated and non-citrullinated recombinant proteins as antigens are highly diagnostic for rheumatoid arthritis[J]. Clin Exp Immunol, 2004, 135(1): 173-180.
- [11] Biesen R, Burmester GR, Hiepe F. Rheumatoid factor or antinuclear antibodies as incidental finding [J]. Internist (Berl), 2014, 55(10):1157-1164.
- [12] 张新刚,张晓莉,蒋莉,等. 类风湿因子、抗环瓜氨酸多肽抗体和抗角蛋白抗体联合检测在类风湿关节炎诊断中的价值[J]. 中国医科大学学报, 2012, 41(12):1130-1133.
- [13] 方勇飞,牟方祥,王欢,等. 血清葡萄糖 6-磷酸异构酶在类风湿关节炎诊断中的意义[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(8):732-734.
- [14] 许福亮,张霞,王云海. 抗环瓜氨酸肽抗体、葡萄糖 6-磷酸异构酶及类风湿因子的检测及对类风湿关节炎的诊断价值[J]. 免疫学杂志, 2012, 28(8):710-712.
- [15] 张新刚,蒋莉,张晓莉,等. 4 种血清标记物在类风湿关节炎诊断中的应用[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(4): 538-541.
- (收稿日期:2014-09-28 修回日期:2015-02-17)