

PHLPP2在胃癌中的表达及其临床意义探讨

杨东杰^{1,2&}, 王志雄^{1,2&}, 徐建波^{1,2}, 吴晖^{1,2}, 李广华^{1,2}, 张信华^{1,2}, 蔡世荣^{1,2}, 陈创奇^{1,2}, 王昭^{1,2*}, 何裕隆^{1,2,3*} (1.中山大学附属第一医院 胃肠外科中心; 2.中山大学胃癌诊治研究中心; 3.中山大学附属第七医院 消化医学中心)

【摘要】 目的 探讨 PHLPP2 在癌旁正常胃黏膜、胃癌原发灶和淋巴结转移灶中的表达差异。并分析 PHLPP2 表达水平和胃癌病人临床病例特征和总生存时间的关系。方法 应用免疫组化方法检测 PHLPP2 在 221 例胃癌原发灶、30 癌旁正常组织和 175 例淋巴结转移灶中的表达情况, 并统计分析 PHLPP2 表达与胃癌临床病理特征及其对生存预后的关系。结果 癌旁正常胃黏膜、胃癌原发灶和淋巴结转移灶中的 PHLPP2 的阳性表达率分别为: 70.0%、31.3% 和 18.3%, 组间差异均有统计学意义 (31.3% vs. 70.0%, 18.3% vs. 70.0%, 31.3% vs. 18.3%, P 值均 <0.001); 并且, PHLPP2 的表达与远处转移和 TNM 分期存在显著相关性; PHLPP2 阳性表达的胃癌患者 5 年生存率为 57%, 阴性表达胃癌患者 5 年生存时间仅为 35%, 差别有统计学意义, $P=0.03$ 。多因素生存分析发现 PHLPP2 是胃癌的独立预后因素 (HR 0.56, 95%CI 0.37~0.85, $P=0.006$)。结论 PHLPP2 在胃癌及转移淋巴结中呈低表达, PHLPP2 阴性与肿瘤远处转移及更差的预后相关。PHLPP2 蛋白有可能成为胃癌预后预测的标志物。

【关键词】 PHLPP2; 胃癌; 5 年生存率

Negative PHLPP2 expression predicts poor prognosis of patients with gastric cancer YANG Dong-jie^{1,2&}, WANG Zhi-xiong^{1,2&}, XU Jian-bo^{1,2}, WU Hui^{1,2}, LI Guang-hua^{1,2}, ZHANG Xin-hua^{1,2}, CAI Shi-rong^{1,2}, CHEN Chuang-qi^{1,2}, WANG Zhao^{1,2*}, HE Yu-long^{1,2,3*}. 1. The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University; 2. Zhongshan University Center for Diagnosis and Treatment of Gastric Cancer; 3. Center for Digestive Medicine, The Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University

【Abstract】 Objective To detect the expression of PHLPP2 (PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase 2) in primary gastric tumors and to explore its impact on the prognosis. **Methods** Expression of PHLPP2 was assessed by Western Blot and immunohistochemistry method in patients with gastric cancer. Survival analysis according to PHLPP2 expression was calculated. **Results** The expression of PHLPP2 protein in primary gastric cancer tissues is downregulated compared with adjacent normal stomach mucosa tissues. The positive rates of PHLPP2 protein in primary gastric cancer tissues and metastatic lymph nodes were significantly lower than in normal stomach mucosa tissues (31.3% vs 70.0%, 18.3% vs 70.0%, both $P < 0.001$). The 5-year overall survival rates of patients with or without PHLPP2 expression were 57% and 35%, respectively ($p=0.003$). Moreover, PHLPP2 was an independent prognostic factor for OS of gastric cancer patients (HR 0.56, 95%CI 0.37~0.85, $P=0.006$). **Conclusions** Our data suggests that the loss of PHLPP2 expression occurred in gastric cancer and is correlated with poor prognosis, which can be a potential prognosis predictor of patients with gastric cancer.

【Key words】 PHLPP2; Gastric Cancer; 5-year Overall Survival

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81672333); 中山大学 5010 临床研究项目(2010006); 广东省自然科学基金(2016A030310155; 2017A030313577)

& 共同第一作者: 杨东杰和王志雄

* 共同通信作者: 王昭, E-mail: drzhaowang@163.com;

何裕隆, E-mail: ylh@medmail.com.cn.

1 引言

胃癌是最常见的人类恶性肿瘤之一, 世界范围内, 每年有新发胃癌病例超过 100 万^[1]。尽管在过去的几十年中, 胃癌的诊断和治疗取得了进展, 但胃癌仍然是世界上癌症相关死亡率的第三大原

因。肿瘤复发和转移是胃癌治疗失败的主要原因。虽然,国内外许多研究已经发现很多分子标志物(例如 HER2, E-cadherin, VEGFR, PRL-3, SLP-2等)可用于预测胃癌的预后^[2-6]。但是,到目前为止能够运用于临床的还很少。因此,迫切需要寻找更加有效的胃癌预后标志物或治疗靶标。

PHLPP(PH结构域富含亮氨酸的重复蛋白磷酸酶)是一种新型蛋白磷酸酶家族,属于 Ser / Thr 蛋白磷酸酶的 PP2C(蛋白磷酸酶 2C)。PHLPP 家族的磷酸酶包含三种变体,PHLPP1 α , PHLPP1 β 和 PHLPP2。PHLPP1 α 和 PHLPP1 β 是来自相同基因的剪接变体^[7]。PHLPP 在许多人类癌症中起肿瘤抑制剂的作用。PHLPP 是增强细胞运动性以及癌症转移的主要调节因子,并且在多种人类肿瘤中低表达。有研究已经证明,PHLPP 可通过抑制促存活激酶 AKT, PKC, RAF1 或激活促凋亡激酶 Mst1 来抑制多种肿瘤细胞的生长、增殖、存活和迁移^[8]。在多种人类肿瘤中(例如:结肠癌、前列腺癌、CLL、胰腺癌等等)都发现了 PHLPP1 的表达下降^[12-16]。在既往研究中,本课题组也发现 PHLPP1 在胃癌中呈现低表达。而 PHLPP2 是 PHLPP 的新成员,2007 年由 John Brognard 首次描述^[17]。PHLPP2 的低表达在一些人类癌症中也有报道,其中包括结肠直肠癌、前列腺癌和胶质瘤等^[12,18,19]。研究还证明 PHLPP2 是通过去磷酸化 Akt, PKC, RAF1 或 IKK β 发挥肿瘤抑制作用^[10,18,20,21]。例如,John Brognard 报道称 PHLPP2 可通过特异性去磷酸化 Akt 来调节乳腺癌细胞的凋亡和细胞周期^[17]。作为 PHLPP 的新成员,PHLPP2 的功能仍有很多需要揭开谜题。据我们所知,目前没有关于 PHLPP2 在人胃癌中研究的报道。在本研究中,我们旨在通过免疫组织化学方法评估胃癌患者中 PHLPP2 的表达状态,并探讨 PHLPP2 蛋白表达水平在预测胃癌预后中的作用。

2 资料与方法

2.1 病人信息 在本研究中,我们回顾性分析了中山大学附属第一医院胃肠外科从 2005 年至 2007 年的胃癌数据库;根据以下纳入标准:①接受了胃切除手术和经组织学证实的胃腺癌;②无同步或异时性其他癌症;③未接受术前化疗和/或放疗。共纳入了共 221 名胃癌患者。由 161 名男性和 60 名女性组成,中位年龄为 60 岁(范围:23~81

岁)。在 221 例患者中,根据 NCCN 胃癌指南,66 例患者接受了标准的术后化疗。原发肿瘤的最大直径分类为 ≤ 40 mm 且 > 40 mm;肿瘤分化类型分为中-高分化和低分化两组;根据美国癌症联合委员会(AJCC)的第六版肿瘤节点转移(TNM)分期系统确定每位患者的 TNM 分期。221 例纳入病人的术后石蜡病理标本来源于中山大学附属第一医院病理科。最后,本研究得到了中山一院伦理委员会的同意,每位患者均签署了知情同意书。

2.2 免疫组化 手术标本经 4%中性甲醛溶液固定 24 小时、石蜡包埋、连续 4 μ m 切片。然后采用免疫组化(SP)进行染色,试验过程严格按试剂盒说明书进行,主要步骤为:经脱蜡、高压锅热抗原修复(5 min),过氧化氢清除内源性过氧化物酶活性,山羊血清封闭,滴加一抗 PHLPP2 于 4 $^{\circ}$ C 过夜(1:100 稀释,Abcam 公司,美国),滴加山羊抗鼠/兔二抗(GTVision;上海,中国)37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,最后 DAB 显色、苏木素复染、封片。

2.3 免疫组化结果判定 分别由两位病理专业人员独立阅片后进行结果核对,不一致者共同读片后确定。具体方法:根据阳性细胞显色的比例及染色强度,做半定量判定。按染色强度评分:未着色或与背景一致为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,黄褐色为 3 分。按阳性细胞占全部细胞的比例并记分:阳性细胞个数/全部滋养细胞百分比, $< 9\%$ 为 0 分, $10\% \sim 25\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 为 2 分, $51\% \sim 75\%$ 为 3 分, $> 75\%$ 为 4 分。然后将两种评分相乘分为 4 级:0 分为阴性(-),1~3 分为弱阳性(+),4~6 分为阳性(++),6 分以上为强阳性(+++)。最后将结果分为阴性和阳性(包括后三组情况)两组。

2.4 统计学分析 本研究结果均采用 SPSS 13.0 统计学软件(芝加哥,美国)进行数据处理,率的比较采用卡方检验,生存曲线用 Kaplan-Meier 方法和 log-rank 检验;生存分析使用 COX 单因素和多因素方法。均以 $P < 0.05$ 作为有无统计学差异判断标准。

3 结果

3.1 PHLPP2 在胃癌中的表达及其和临床病例特征的关系 IHC 结果显示在 30 个正常胃黏膜组织中,21 个病例呈现 PHLPP2 表达阳性。相比之下,PHLPP2 在胃癌原发灶中的阳性表达率为

31.2%,显著低于癌旁正常组织(69/221 vs. 21/30, $P < 0.001$)。这221胃癌病例中共有175例有淋巴结转移。PHLPP2在175个转移淋巴结中的阳性表达率为18.3%(3/175),显著低于原发性胃癌病变(18.3%, $P < 0.001$,表1和图1)。我们的数据证明,胃组织中PHLPP2的表达水平显著低于相应的非癌组织。此外,结果表明PHLPP2表达缺失可能与胃癌淋巴结转移有关。

表1 PHLPP2在胃癌原发灶和转移淋巴结中的表达

组织	病例数	PHLPP2		P
		阴性[例(%)]	阳性[例(%)]	
原发灶	221	152(68.7)	69(31.3)	<0.001
淋巴结转移灶	175	143(81.7)	32(18.3)	

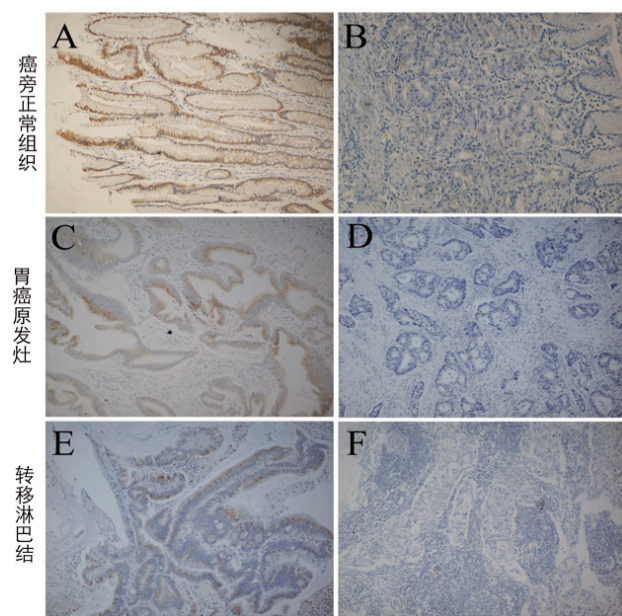


图1 PHLPP2:免疫组织化学染色(200×)。在正常胃组织(A),原发性胃癌(C)和转移性淋巴结(E)中阳性PHLPP2表达。PHLPP2在正常胃黏膜(B),原发性胃癌(D)和转移性淋巴结(F)中的表达阴性

本研究还分析了PHLPP2表达与患者临床病理特征的相关性,包括年龄、性别、肿瘤大小、浸润深度、N分期、TNM分期、分化程度、远处转移、术前血清CEA、手术类型和辅助化疗。如表2所示,原发性胃癌中PHLPP2的表达与胃癌患者的远处转移和TNM分期密切相关(表2,均 $P < 0.05$),提示PHLPP2的下调可能和胃癌的进展相关。

3.2 PHLPP2表达和胃癌生存预后的关系 221名患者的5年总生存率为42%,原发肿瘤中PHLPP2阳性患者的5年总生存率为57%,而PHLPP2阴性组仅为35%。如图2a所示,在原发性

肿瘤中具有阳性PHLPP2表达的患者的存活曲线显著长于具有阴性PHLPP2表达的患者($P = 0.003$)。为进一步探讨PHLPP2对5年总生存率的影响是否与临床分期相关,根据TNM分期进行亚组分析。亚组分析表明,在TNM III/IV期组中,PHLPP2阳性患者的5年总生存率时间优于PHLPP2阴性患者($P < 0.001$,图2c)。然而,TNM分期I/II组的差异无显著性($P = 0.467$,图2b)。

表2 PHLPP2表达水平和临床病例特征的关系

临床特征	病例数	阴性[例(%)]	阳性[例(%)]	P
年龄				0.051
≤60岁	127	94(74.0)	33(26.0)	
>60岁	94	58(61.7)	36(38.3)	
性别				0.061
男	161	105(65.2)	56(34.8)	
女	60	47(78.3)	13(21.7)	
分化				0.465
中-高分化	57	37(64.9)	20(35.1)	
低分化	164	115(70.1)	49(29.9)	
N分期				0.142
N0	46	29(63.0)	17(37.0)	
N1	37	24(64.8)	13(35.2)	
N2	59	37(62.7)	22(37.3)	
N3	79	62(78.5)	17(21.5)	
T分期				0.058
T1	17	10(58.8)	7(41.2)	
T2	21	15(71.4)	6(28.6)	
T3	154	101(65.6)	53(34.4)	
T4	29	26(89.7)	3(10.3)	
M分期				0.013*
M0	169	109(64.5)	60(35.5)	
M1	52	43(82.7)	9(17.3)	
肿瘤大小				0.480
≤4cm	94	63(67.0)	31(33.0)	
>4cm	127	89(70.0)	38(30.0)	
TNM				<0.001*
I	28	17(60.1)	11(39.9)	
II	33	26(78.8)	7(21.2)	
III	73	38(52.0)	35(48.0)	
IV	87	71(81.6)	16(18.4)	
CEA				0.574
<5 μg/L	205	142(69.3)	63(30.6)	
≥5 μg/L	16	10(62.5)	6(37.5)	
手术方式				0.158
根治术	198	133(67.2)	65(32.8)	
姑息术	23	19(82.6)	4(7.4)	
辅助化疗				0.448
是	155	109(64.8)	46(35.2)	
否	66	43(51.7)	23(48.3)	

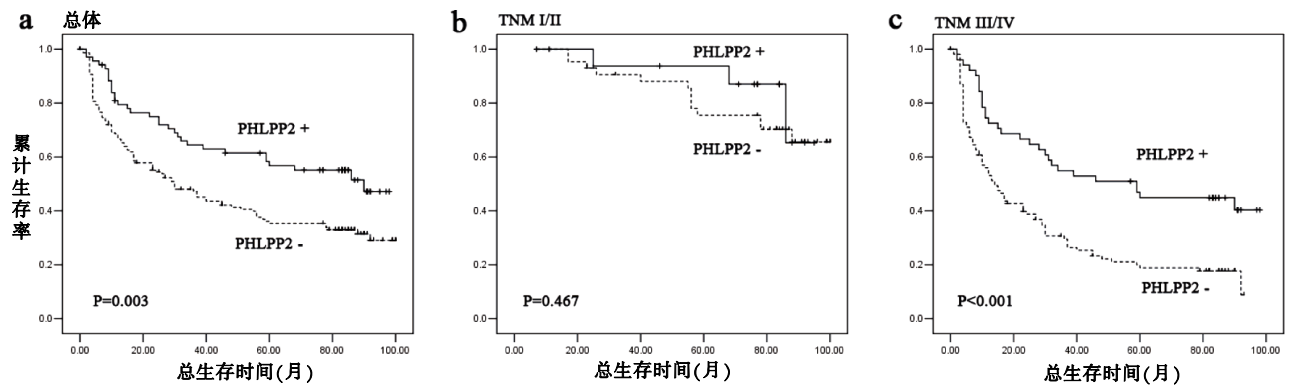


图2 生存分析。(a)PHLPP2表达阳性的患者总生存时间较表达阴性患者长,差别有统计学意义($P=0.003$)。根据TNM进行分层分析:(b)TNM分期I/II期的胃癌中,PHLPP2表达阳性的患者总体生存率高于阴性表达患者,但这种差别无统计学意义($P=0.467$);(c)TNM分期III/IV期的胃癌中,PHLPP2表达阳性的患者总体生存率明显高于阴性表达患者,差别有统计学意义($P<0.001$)

在COX单变量分析中,我们证明总生存率与PHLPP2、肿瘤大小、T分期、N分期、远处转移、分化以及手术类型显著相关(表3)。此外,多变量分析用于评估单变量分析中显示的统计学显著变量。PHLPP2表达是胃癌患者总生存率的重要独立预后因素(HR 0.56, 95% CI 0.37~0.85, $P=0.006$)。结果显示肿瘤大小、N分期以及远处转移是胃癌患者总生存率的独立预后因素(表3)。

4 讨论

PHLPP2(PH结构域富含亮氨酸的重复蛋白磷酸酶2)被认为是肿瘤抑制因子。研究证实PHLPP2可以使其下游底物如Akt, PKC, RAF1或IKK β 去磷酸化,导致它们失活。例如,Liu J等^[12]证明PHLPP2可通过使Akt的疏水基去磷酸化来增加细胞凋亡和抑制结肠癌细胞增殖,导致Akt的活性降低。此外,PHLPP2蛋白的低表达在许多肿瘤中发现。我们发现PHLPP2在68.7%的患者样品中表达呈阴性,与邻近的正常组织相比,胃癌中PHLPP2蛋白水平显著降低。我们的结果还表明:与原发胃癌相比转移淋巴结中胃癌PHLPP2表达更低,提示PHLPP2可能在胃癌淋巴结转移中发挥关键作用(表1,图2)此外,PHLPP2在原发胃癌中的表达水平与胃癌患者的远处转移和TNM分期密切相关(表2)。所有这些结果表明PHLPP2可能在胃癌的进展中发挥作用。PHLPP2影响胃癌转移的分子机制尚不清楚,需要进一步的研究。

为了阐述PHLPP2的预测价值,我们探讨了

表3 单因素和多因素Cox分析

	单因素		多因素	
	HR (95%CI)	P值	HR (95%CI)	P值
年龄	0.87(0.62~1.23)	0.432		
性别	1.61(1.06~2.65)	0.057		
T分期				
T1	-			
T2	0.82(0.26~2.63)	0.729		
T3	2.49(1.08~5.69)	0.031		
T4	8.44(3.43~20.75)	<0.001		
N分期				
N0	-		-	
N1	2.04(0.95~4.40)	0.069	1.99(0.92~4.29)	0.080
N2	2.86(1.44~5.70)	0.003	2.41(1.18~4.89)	0.015
N3	9.00(4.72~17.16)	<0.001	5.17(2.59~10.35)	<0.001
M分期	5.21(3.55~7.65)	<0.001	3.58(2.35~5.43)	<0.001
分化	1.80(1.17~2.76)	0.007		
血清CEA	1.31(0.71~2.44)	0.389		
PHLPP2	0.56(0.37~0.83)	0.004	0.56(0.37~0.85)	0.006
肿瘤大小	2.56(1.76~3.72)	<0.001	1.60(1.06~2.41)	0.025
手术方式	2.91(1.78~4.78)	<0.001		
化疗	1.15(0.77~1.62)	0.568		

PHLPP2在患者样本中的表达与5年总生存率的关联。我们的数据表明,PHLPP2阴性表达与5年总生存率减少之间存在显著相关性。PHLPP2阴性表达的患者的5年总生存率低于PHLPP2表达阳性的患者(图2a)。此外,亚组分析表明,TNM III/IV期病人中,PHLPP2表达阴性患者的5年总生存率低于PHLPP2阳性表达的患者($P<0.001$,图2b),而在TNM分期I/II期患者中则差别无统计学意义($P=0.467$,图2c)。结果提示PHLPP2蛋白的缺失可能在后期阶段影响胃癌的预后。此外,

Cox 多变量分析结果提示 PHLPP2 是胃癌的独立预后因素。所有这些结果支持 PHLPP2 在胃癌中起抑制肿瘤进展的作用。

总之, PHLPP2 在胃癌及转移淋巴结中呈低表达, PHLPP2 阴性与肿瘤远处转移及更差的预后相关。PHLPP2 蛋白有可能成为胃癌预后预测的标志物。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011,61(2): 69-90.
- [2] Wang S, Zheng G, Chen L, et al. Effect of HER-2/neu over-expression on prognosis in gastric cancer: a meta-analysis [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011,12(6): 1417-1423.
- [3] Xing X, Tang YB, Yuan G, et al. The prognostic value of E-cadherin in gastric cancer: a meta-analysis [J]. *Int J Cancer*, 2013,132(11): 2589-2596.
- [4] Hirashima Y, Yamada Y, Matsubara J, et al. Impact of vascular endothelial growth factor receptor 1, 2, and 3 expression on the outcome of patients with gastric cancer [J]. *Cancer Sci*, 2009,100(2): 310-315.
- [5] Wang Z, Cai SR, He YL, et al. Elevated PRL-3 expression was more frequently detected in the large primary gastric cancer and exhibits a poor prognostic impact on the patients [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009,35(8): 1041-1046.
- [6] Liu D, Zhang L, Shen Z, et al. Increased levels of SLP-2 correlate with poor prognosis in gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2013,16(4): 498-504.
- [7] O'Neill AK, Niederst MJ, Newton AC. Suppression of survival signalling pathways by the phosphatase PHLPP [J]. *FEBS J*, 2013,280(2): 572-583.
- [8] Gao T, Furnari F, Newton AC. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth [J]. *Mol Cell*, 2005,18(1): 13-24.
- [9] Gao T, Brognard J, Newton AC. The phosphatase PHLPP controls the cellular levels of protein kinase C [J]. *J Biol Chem*, 2008,283(10): 6300-6311.
- [10] Li X, Stevens PD, Liu J, et al. PHLPP is a negative regulator of RAF1, which reduces colorectal cancer cell motility and prevents tumor progression in mice [J]. *Gastroenterology*, 2014,146(5): 1301-1312.
- [11] Qiao M, Wang Y, Xu X, et al. Mst1 is an interacting protein that mediates PHLPPs' induced apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2010,38(4): 512-523.
- [12] Liu J, Weiss HL, Rychahou P, et al. Loss of PHLPP expression in colon cancer: role in proliferation and tumorigenesis [J]. *Oncogene*, 2009,28(7): 994-1004.
- [13] Chen M, Pratt CP, Zeeman ME, et al. Identification of PHLPP1 as a tumor suppressor reveals the role of feedback activation in PTEN-mutant prostate cancer progression [J]. *Cancer Cell*, 2011,20(2): 173-186.
- [14] O'Hayre M, Niederst M, Fecteau JF, et al. Mechanisms and consequences of the loss of PHLPP1 phosphatase in chronic lymphocytic leukemia (CLL) [J]. *Leukemia*, 2012,26(7): 1689-92.
- [15] Nitsche C, Edderkaoui M, Moore RM et al. The Phosphatase PHLPP1 Regulates Akt2, Promotes Pancreatic Cancer Cell Death, and Inhibits Tumor Formation [J]. *Gastroenterology*, 2012,142(2): 377-387.
- [16] Wang Z, Shu H, Wang Z, et al. Loss expression of PHLPP1 correlates with lymph node metastasis and exhibits a poor prognosis in patients with gastric cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2013,108(7): 427-432.
- [17] Brognard J, Sierceki E, Gao T, et al. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms [J]. *Mol Cell*, 2007,25(6): 917-931.
- [18] Agarwal NK, Zhu X, Gagea M, et al. PHLPP2 suppresses the NF-kappaB pathway by inactivating IKKbeta kinase [J]. *Oncotarget*, 2014,5(3): 815-823.
- [19] Liao WT, Li TT, Wang ZG, et al. microRNA-224 Promotes Cell Proliferation and Tumor Growth in Human Colorectal Cancer by Repressing PHLPP1 and PHLPP2 [J]. *Clin Cancer Res*, 2013,19(17): 4662-4672.
- [20] Brognard J, Newton AC. PHLPPing the switch on Akt and protein kinase C signaling [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2008,19(6): 223-230.
- [21] Li X, Stevens PD, Yang H, et al. The deubiquitination enzyme USP46 functions as a tumor suppressor by controlling PHLPP-dependent attenuation of Akt signaling in colon cancer [J]. *Oncogene*, 2013,Jan 24;32(4):471-478.