

· 临床研究 ·

## 胃癌组织中 FAF1 蛋白表达与幽门螺杆菌感染相关性研究\*

刘爱群<sup>1</sup>, 葛莲英<sup>1</sup>, 罗元<sup>2</sup>, 林思彤<sup>2</sup>

(广西医科大学附属肿瘤医院: 1. 内镜中心; 2. 病理科, 南宁 530021)

**摘要:**目的 探讨胃癌组织中 Fas 相关因子 1 (FAF1) 蛋白表达与幽门螺杆菌 (Hp) 感染之间的相关性及其可能的作用机制。方法 免疫组化检测 40 例胃癌手术标本和相应的正常胃黏膜组织中 FAF1 蛋白的表达, 脱氧核糖核酸末端转移酶介导的缺口末端标记 (TUNEL) 法检查细胞凋亡, HE、甲苯胺蓝染色和 Warthin-Starry (W-S) 银染法检测 Hp 感染。结果 在 40 例胃癌组织中 FAF1 的阳性表达率为 37.50%, 而在 40 例正常胃黏膜组织中 FAF1 阳性表达率为 72.50%, 二者差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); FAF1 蛋白表达与肿瘤浸润深度、大小、临床分期和淋巴结转移无明显相关性 ( $P > 0.05$ ), 但与胃癌的分化程度有关, 低分化胃癌组织 FAF1 阳性表达率显著低于高、中分化胃癌组织 ( $P = 0.0102$ )。FAF1 表达阴性组的胃癌细胞凋亡指数显著低于 FAF1 阳性组 ( $P = 0.0110$ )。Hp 阳性胃癌组织的 FAF1 阳性表达率明显低于 Hp 阴性者, 二者差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 胃癌的发生、发展可能与 FAF1 的低表达有关, Hp 感染可能通过下调 FAF1 蛋白的表达影响胃癌的分化和凋亡而发挥作用。

**关键词:**胃肿瘤; 螺杆菌; 幽门; Fas 相关因子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.22.011

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)22-2213-03

**Expression of FAF1 protein in gastric carcinoma and the relationship with HP infection\***Liu Aiqun<sup>1</sup>, Ge Lianying<sup>1</sup>, Luo Yuan<sup>2</sup>, Lin Sitong<sup>2</sup>

(1. Department of Endoscopy; 2. Department of Pathology, the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression of Fas associated factor 1 (FAF1) protein in gastric cancer and the relationship with Helicobacter pylori (Hp) infection, as well as its possible mechanism. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect FAF1 expression in 40 gastric cancer tissues and 40 corresponding gastric normal tissue, and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling (TUNEL) was used to detect cell apoptosis, while Helicobacter pylori infection was detected by HE staining, methylbenzene amine blue staining and Warthin-Starry silver staining (W-S) methods. **Results** FAF1 positive expression rate was 37.50% in 40 cases of gastric cancer tissues, while 72.50% in 40 cases corresponding gastric normal tissues, significant difference was found between the two groups ( $P < 0.05$ ); FAF1 protein has no significant correlation in gastric cancer patients by tumor invasion, size, clinical stage and lymph node metastasis ( $P > 0.05$ ), but the degree of tumor differentiation. FAF1 expression of low or non-differentiated gastric cancer was significantly lower than that of well-differentiated ones (73.08% vs 64.29%,  $P = 0.0102$ ). Apoptosis index was significantly lower in FAF1 negative expression group than that in FAF1 positive expression one ( $P = 0.0110$ ). FAF1 positive expression rate in Hp-positive group was significantly lower than that in Hp-negative group in gastric tissue, and there was a significant difference between the two groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Gastric carcinogenesis may be associated with low expression of FAF1, and Hp infection may contribute to the gastric carcinoma differentiation and apoptosis by down-regulating the expression of FAF1 protein.

**Key words:** stomach neoplasms; helicobacter pylori; fas-associated factor 1

胃癌是一种常见的消化道肿瘤, 有研究表明, 幽门螺杆菌 (helicobacter pylori, Hp) 感染与胃癌的发生关系密切, 被世界卫生组织确认为 I 类致癌因子。然而, 其致癌的确切机制至今还不是很清楚。有学者认为 Hp 致癌的一个重要因素与 Hp 感染后引起细胞增殖和凋亡的失衡密切相关。Fas 相关因子 1 (fas-associated factor 1, FAF1) 是新近发现的一种能够增强 Fas 诱导凋亡作用的蛋白, 且在胃癌组织中特异性低表达<sup>[1]</sup>。它与 Hp 感染的关系至今还不是很清楚, 本研究对 FAF1 在胃癌中的表达情况及其与 Hp 感染的关系进行了探讨, 并结合细胞凋亡的变化, 探讨 FAF1 在 Hp 感染致胃癌发生、发展的作用机制。

**1 资料与方法**

**1.1 一般资料** 收集 40 例广西医科大学附属肿瘤医院及广西壮族自治区人民医院 2005 年 6 月至 2006 年 4 月胃癌根治

性手术切除并有完整检查资料的胃癌患者标本, 其中男 29 例, 女 11 例, 年龄 34~78 岁, 中位 55 岁。所有病例术前均未进行放、化疗或免疫治疗。胃癌组织取自原发灶中央非坏死部分, 正常胃黏膜组织取自距离肿瘤原发灶大于或等于 5 cm 处, 所有病例均经病理检查证实。胃癌组织标本经液氮浸泡 5 min 后放入 -80 °C 冰箱低温保存。10% 中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 然后制备 4 μm 厚连续切片。分别用于 HE 染色作病理组织学检查、免疫组化染色和脱氧核糖核酸末端转移酶介导的缺口末端标记 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling, TUNEL) 法检测细胞凋亡以及 Hp 检测。

**1.2 方法**

**1.2.1 Hp 检测** (1) HE 染色: Olympus 显微镜观察, Hp 为淡紫色; (2) 甲苯胺蓝染色 (美蓝法): 组织石蜡切片, 常规脱蜡至水; 0.1% 甲苯胺蓝染 10 min, 蒸馏水漂洗; 常规脱水、透明、

\* 基金项目: 广西自然科学基金资助项目 (0728203); 博士研究生科研创新项目 (2009105981002D27)。

封片、Olympus 显微镜观察, Hp 为蓝色; (3) Warthin-Starry (W-S) 银染法: 石蜡切片, 常规脱蜡至水, 醋酸盐缓冲液漂洗; 1% 硝酸银液 55 °C 孵育 30 min; 5% 明胶 55 °C 熔化; 先混合明胶和对苯二酚液, 加 2% 硝酸银液立即倒入染色缸中, 5% 明胶、3% 对苯二酚和 2% 的硝酸银液的比例为 15:1:2; 55 °C 孵育观察切片上组织颜色变黄棕色, 立即倾去显色液, 用 55 °C 温水漂洗, 醋酸盐缓冲液漂洗; 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片, Olympus 显微镜下观察, Hp 为棕黑色。其中 3 种方法中 2 种或以上阳性者为 Hp 阳性。

**1.2.2 免疫组化检测 FAF1 蛋白表达** 采用免疫组化 SP 法进行检测, FAF1 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; SP 试剂盒及 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB) 染色试剂盒均购自福州迈新生物技术有限公司, 按 SP 试剂盒说明书操作。

**1.2.3 TUNEL 法检测细胞凋亡** 细胞凋亡原位检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; 切片按常规方法进行脱蜡及水化, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS) 漂洗 3 次, 高温修复 280 °C、30 s, 180 °C、1 min, 室温冷却, PBS 漂洗 3 次; 浸入封闭液(3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶于甲醇)中 10 min, PBS 漂洗 3 次。进入标记反应。每个样本滴加 50 μL TdT 酶反应液, 加盖玻片 37 °C 避光湿润反应 60 min。PBS 漂洗 3 次, 样本周围用吸水纸吸干。滴加 50 μL 链霉抗素蛋白工作液, 加盖玻片 37 °C 避光湿润反应 30 min, PBS 漂洗 3 次。滴加 50~100 μL DAB 工作液, 室温显色反应 10 min, PBS 漂洗 3 次。苏木精复染, 漂洗, 晾干, 封片, 观察。FAF1 和 TUNEL 阳性表达均主要为细胞核着棕黄色。结果判断标准: 选择周边 4 个视野和中间 1 个视野, 计数 500 个肿瘤细胞中的阳性细胞数, 用百分数表示, 分别作为 FAF1 细胞密度及细胞凋亡指数。免疫组化阳性反应细胞数小于 6% 或背景同阴性对照者判为阴性, 阳性反应细胞数大于或等于 6% 为阳性。所有切片由 2 名病理研究人员独立阅片、计分后取均值。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS15.0 软件进行  $\chi^2$  检验或 Fisher 精确概率法分析。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结 果

**2.1 胃癌及远癌胃黏膜组织中 FAF1 的表达** FAF1 阳性表达呈棕黄色, 主要位于细胞核内, 少数在细胞膜上亦有表达, 见封 4 图 1。40 例胃癌组织中 FAF1 阳性表达率为 37.50% (15/40)。40 例远癌胃黏膜组织中 FAF1 阳性表达率为 72.50% (29/40), 二者差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

**2.2 胃癌组织 FAF1 表达与细胞凋亡的关系** TUNEL 染色阳性信号呈棕黄色, 位于细胞核内, 浓缩的核质紧贴于核膜, 或核质呈现均匀的染色, 见封 4 图 2。FAF1 表达阴性者胃癌细胞凋亡指数 (5.44 ± 3.19)% 显著低于 FAF1 表达阳性 (12.00 ± 4.79)% , 二者差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。

**2.3 胃癌组织中 FAF1 表达与其临床病理特征的关系** FAF1 在胃癌组织中的表达与肿瘤大小、浸润深度、淋巴结转移、远处转移和临床分期无明显关系, 与胃癌细胞分化程度有关, 低分化胃癌 FAF1 的阳性表达率显著低于高、中分化胃癌 ( $\chi^2=6.539, P=0.0102$ )。

**2.4 胃癌和远癌胃黏膜组织中 FAF1 的表达与 Hp 感染的关系** Hp 常位于胃黏膜腺体隐窝处, 聚焦存在, 镜下呈蓝色、棕黑色、淡紫色短棒状, 见封 4 图 3。在 Hp 阳、阴性胃癌组织中, FAF1 表达阳性率分别为 19.05% 和 57.89% (表 2), Hp 阳性者明显低于 Hp 阴性, 二者差异有统计学意义 ( $\chi^2=9.3367, P=0.0110$ )。在 Hp 阳、阴性正常胃黏膜组织中, FAF1 表达

阳性率分别为 76.19% 及 68.42%, 二者差异无统计学意义 ( $\chi^2=0.3020, P=0.5826$ )。

表 2 FAF1 在胃癌和远癌胃黏膜组织的表达与 Hp 感染的关系 (n)

Hp 感染	胃癌组织 FAF1 蛋白表达				远癌胃黏膜组织 FAF1 蛋白表达			
	+	-	$\chi^2$	P	+	-	$\chi^2$	P
+	4	17	6.4227	0.0110	16	5	0.3020	0.5826
-	11	8			13	6		

## 3 讨 论

**3.1 胃癌组织中 FAF1 的表达** FAF1 是新近发现的 Fas 死亡信号结合体成员之一, 其 N-末端区域能与 Fas 特异性结合, 是能够增强 Fas 介导细胞凋亡的蛋白分子<sup>[2-5]</sup>, 编码一种涉及肿瘤细胞的存活和人类一些肿瘤发病的蛋白<sup>[6]</sup>。甚至在缺乏任何外来死亡信号的情况下, FAF1 过表达也会启动细胞凋亡<sup>[7]</sup>。本研究结果显示, 胃癌组织中 FAF1 的表达明显低于远癌胃黏膜组织, 进一步的研究也显示, FAF1 表达阴性组的胃癌细胞凋亡指数显著低于 FAF1 阳性组, 提示 FAF1 可看作是调控胃上皮细胞凋亡最重要的执行者之一, 在细胞凋亡信号转导启动途径中起着关键性作用, 促进恶性肿瘤的程序性细胞死亡<sup>[8-9]</sup>。同时, FAF1 在胃癌组织中的表达与胃癌细胞分化程度有关, 低分化胃癌 FAF1 的阳性表达率显著低于高、中分化胃癌, 提示胃癌演变过程中, 恶变的胃黏膜细胞的凋亡逐渐减少, 导致了胃癌的发生和发展。因此, 研究胃癌组织中的 FAF1 的表达水平的改变可望为胃癌的治疗提供一个新的靶基因, 如提高胃组织 FAF1 的表达水平, 促进恶变的胃黏膜细胞的凋亡, 减少胃癌的发生。国外研究显示, FAF1 的表达与 caspase-3 介导的细胞凋亡有关, 进一步研究二者之间的关系, 有利于进一步阐明胃癌变的发生机制<sup>[10]</sup>。

**3.2 胃癌组织中 FAF1 的表达与 Hp 感染的相关性** 鉴于 Hp 与胃癌关系的大量研究, 国际癌症研究会已将 Hp 列为胃癌的 I 类致癌原。一般认为 Hp 感染是胃癌发生、发展进程中的首要推动因子。胃癌的发生是多阶段、多基因调控的进展性过程。Hp 感染不仅能够诱导胃黏膜上皮细胞的增殖, 同时诱导其凋亡, 凋亡的增加进一步引起胃上皮细胞代偿性过度增殖, 当细胞增殖速率超过凋亡时, 细胞凋亡被抑制, 使异常细胞被清除的能力降低, 而且处于过度增殖状态的细胞更易受到致癌物质的损伤, 从而增加了 DNA 畸变的危险, 最终可能导致胃癌的发生<sup>[11-12]</sup>。本研究结果显示, 在 Hp 阳性的胃癌组织中 FAF1 的表达率明显低于 Hp 阴性胃癌组织, 而在 Hp 阳、阴性正常胃黏膜组织中, FAF1 阳性表达无明显差别, 表明 Hp 感染通过调控 FAF1 的表达使其明显下调, 使癌细胞凋亡减少, 细胞生存期延长, 细胞数量增加并进一步促进细胞增殖, 从而影响细胞凋亡与增殖的平衡, 使胃癌细胞获得恶性转化的潜能与特征, 促进了胃癌的发生、发展, 在一定程度上二者呈负相关。Hp 感染导致胃癌的途径有很多种<sup>[13-19]</sup>, 尚有待进一步研究, 而对 Hp 感染与胃癌中特异性低表达基因的研究将具有重要的意义。

## 参考文献:

- [1] Bjorling-Poulsen M, Seitz G, Guerra B, et al. The pro-apoptotic FAS-associated factor 1 is specifically reduced in human gastric carcinomas[J]. Int J Oncol, 2003, 23(4): 1015-1102.
- [2] Chu K, Niu X, Williams LT. A Fas-associated protein factor, FAF1, potentiates Fas-mediated apoptosis [J]. Proc

- Natl Acad Sci USA, 1995, 92(25): 11894-11898.
- [3] Ryu S W, Lee S J, Park M Y, et al. Fas-associated factor 1, FAF1, is a member of Fas death-inducing signaling complex[J]. J Biol Chem, 2003, 278(26): 24003-24010.
- [4] Adham I M, Khulan J, Held T. Fas-associated factor (FAF1) is required for the early cleavage-stages of mouse embryo[J]. Mol Hum Reprod, 2008, 14(4): 207-213.
- [5] Song E J, Yim S H, Kim E, et al. Human Fas-associated factor 1, interacting with ubiquitinated proteins and valosin-containing protein, is involved in the ubiquitin-proteasome pathway[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(6): 2511-2524.
- [6] Deborah A A, Craig W M, Jianming P, et al. Activated TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signaling via down-regulation of Fas-associated factor 1 in asbestos-induced mesotheliomas from Arf knockout mice[J]. PNAS, 2009, 106(9): 3420-3425.
- [7] Park M Y, Run S W, Kim K D, et al. Fas-associated factor-1 mediates chemotherapeutic-induced apoptosis via death effector filament formation[J]. Int J Cancer, 2005, 115(3): 412-418.
- [8] DeZio D, Giunta L, Corvaro M, et al. Expanding roles of programmed cell death in mammalian neurodevelopment[J]. Semin Cell Dev Biol, 2005, 16(2): 281-294.
- [9] Kuan C Y, Roth K A, Flavell R A, et al. Mechanisms of programmed cell death in the developing brain[J]. Trends Neurosci, 2000, 23(7): 291-297.
- [10] De Z D, Ferraro E, Amelio M D, et al. Faf1 is expressed during neurodevelopment and is involved in Apaf1-dependent caspase-3 activation in proneural cells[J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(11): 1780-1790.
- [11] Shajan P, Christoph B. Helicobacter pylori and gastric cancer; the causal relationship[J]. Digestion, 2007, 75(1): 25-35.
- [12] Li W Q, Zh L, Ma J L, et al. Association between genetic polymorphisms of DNA base excision repair genes and evolution of precancerous gastric lesions in a Chinese population[J]. Carcinogenesis, 2009, 30(3): 500-505.
- [13] Ladeira M S, Buene R C, Dos Santos B F, et al. Relationship among oxidative DNA damage, gastric mucosal density and the relevance of cagA, vacA and iceA genotypes of helicobacter pylori[J]. Dig Dis Sci, 2008, 53(1): 248-255.
- [14] Motohiro K, Heeseob L, Jun N, et al. Roles of gastric mucin-type O-glycans in the pathogenesis of Helicobacter pylori infection[J]. Glycobiology, 2009, 19(5): 453-461.
- [15] David F, Paola P. Gastric cancer in Japan--honing treatment, seeking causes[J]. New Engl J Med, 2008, 359(5): 448-451.
- [16] 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 等. Hp 感染者胃黏膜癌前病变细胞凋亡与 Fas 抗原表达的关系[J]. 重庆医学, 2003, 32(9): 1138-1140.
- [17] 王建旭, 冯义朝. 胃黏膜癌变过程中骨桥蛋白表达与 H. pylori 感染的关系[J]. 广东医学, 2009, 30(12): 1927-1928.
- [18] 张浩, 房殿春, 罗元辉. 幽门螺杆菌诱导胃癌细胞凋亡与 P53 状态和 bax, caspase 表达的关系[J]. 重庆医学, 2009, 38(4): 386-388.
- [19] 刘爱群, 葛连英, 罗元, 等. 胃癌变过程中 Hp 感染与凋亡基因 Survivin 表达相关性研究[J]. 山东医药, 2011, 51(1): 10-12.

(收稿日期: 2011-02-07 修回日期: 2011-07-20)

(上接第 2212 页)

- 重症急性胰腺炎诊治指南[J]. 中华外科杂志, 2007, 45(11): 727-729.
- [3] 中华医学会呼吸病学分会. 急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征的诊断标准(草案)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23(4): 203.
- [4] 崔玉军. 早期肠内营养用于重症急性胰腺炎效果观察[J]. 山东医药, 2010, 50(15): 83-84.
- [5] 王春友, 赵刚. 重症急性胰腺炎早期液体复苏治疗新策略[J]. 肝胆外科杂志, 2008, 16(4): 314-315.
- [6] Whiteside M, Lauro I, Chapman G, et al. Effect of atropine on tracheal mucociliary clearance and bacterial counts[J]. Bull Eur Physiopathol Respir, 1984, 20(4): 347-351.
- [7] George W B, Pitchumoni C S. Pathophysiology of pulmonary complications of acute pancreatitis[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(44): 7087-7096.
- [8] Shields C J, Winter D C, Redmond H P. Lung injury in acute pancreatitis; mechanisms, prevention and therapy[J]. Curr Opin Crit Care, 2001, 8(2): 158-163.
- [9] Zhao X, Andersson R, Wang X, et al. Acute pancreatitis-associated lung injury; pathophysiological mechanisms and potential future therapies[J]. Scand J Gastroenterol, 2002, 37(12): 1351-1358.
- [10] Valles J, Pobo A, Garcia-Esquirol O, et al. Excess ICU mortality attributable to ventilator-associated pneumonia: the role of early vs late onset[J]. Intensive Care Med, 2007, 33(8): 1363-1368.
- [11] 李霞, 史忠, 周坤, 等. 序贯通气治疗急性有机磷中毒所致呼吸衰竭的临床研究[J]. 重庆医学, 2008, 37(22): 2522-2523.
- [12] 龙胜泽, 秦志强, 胡克, 等. 以呼吸泵衰竭改善为切换点序贯通气治疗慢性阻塞性肺疾病呼吸衰竭的研究[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2007, 6(6): 428-432.
- [13] 刘丹, 周发春, 徐昉. 早期无创正压机械通气在治疗重症急性胰腺炎所致急性肺损伤中的应用价值研究[J]. 重庆医学, 2009, 38(20): 2528-2529.
- [14] Ucgun I, Metintas M, Moral H, et al. Predictors of hospital outcome and intubation in COPD patients admitted to the respiratory ICU for acute hypercapnic respiratory failure[J]. Respir Med, 2006, 100(1): 66-74.
- [15] 刘玲, 万东. 气管切开患者实施有创-无创序贯通气的临床观察[J]. 重庆医学, 2009, 38(20): 2535-2539.
- [16] 李景荣, 卢中秋, 李惠萍, 等. 有创-无创序贯通气治疗急性有机磷中毒致中间期肌无力综合征[J]. 中国急救医学, 2005, 25(7): 492-495.

(收稿日期: 2011-03-09 修回日期: 2011-04-22)