

· 临床研究 ·

非甾体类抗炎药 NAG-1 在胃癌中表达及意义

聂胜峰¹, 兰斌^{2△}, 张军², 曾志峰¹, 丁洁³(1. 江西省新余市人民医院普外科 338000; 2. 福建医科大学附属第一医院
胃肠外科二区 350005; 3. 江西省新余市人民医院检验科 338000)

摘要:目的 研究非甾体类抗炎药活化基因-1(NAG-1)在胃癌组织中的表达及其与临床病理特征的关系。方法 采用 RT-PCR 和免疫组化检测 76 例胃癌组织及其相应正常组织 NAG-1 的表达。结果 胃癌组织的 NAG-1 蛋白的表达程度显著低于正常组织($\chi^2=47.186, P<0.05$)。NAG-1 蛋白在胃癌组织中的表达与患者的细胞分化程度有关($\chi^2=7.506, P<0.05$)。而与性别、淋巴结转移、临床分期期间的差异无统计学意义($P>0.05$)。RT-PCR 结果显示 NAG-1 mRNA 在胃癌组织中的相对含量显著低于正常胃黏膜组织。NAG-1 mRNA 在高、中分化胃癌中的相对含量显著高于低、未分化($P<0.05$)。而与淋巴结转移、临床分期、浸润深度差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 NAG-1 基因在胃癌组织中的表达下降,可能参与胃癌的发生、发展过程。

关键词:胃癌; 逆转录聚合酶链反应; 免疫组织化学; 非甾体抗炎药活化基因-1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.26.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)26-2647-02

Expression of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 in human gastric cancer tissue and its significance

Nin Sheng feng¹, Lan Bin², Zhang Jun², Zeng Zhi feng¹, Ding Jie³(1. Department of General Surgery, The Xinyu City People's Hospital of Jiangxi Province, Xinyu, Jiangxi 338000, China;
2. Department of Gastrointestinal Surgery, First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350005, China;
3. Department of Medical Lab, The xinyu City People's Hospital of Jiangxi Province, Xinyu, Jiangxi 338000, China)

Abstract: Objective To study the expression of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 in human gastric cancer and its relationship with the clinical staging, differentiation degree, and lymphatic metastasis of gastric cancer. **Methods** The expression of NAG-1 was detected by semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain Reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry(IHC) in the cancer tissues and corresponding adjacent normal tissues in 76 gastric cancer patients. **Results** Immunohistochemistry showed the expression of NAG-1 protein in the cancer tissues was lower than that in the normal tissues ($\chi^2=47.186, P<0.05$); and the expression was relationship with differentiation degree($\chi^2=7.506, P<0.05$), but the expression was not associated with the depth of tumor invasion, lymph node metastasis, and clinical stage(all $P>0.05$). The result of RT-PCR showed that NAG-1 mRNA expression in gastric cancer tissue significantly was lower than that in normal tissues($P<0.05$). NAG-1mRNA expression in well and moderately differentiated cancer cells was significantly higher than those of poorly and non-differentiated cancer cells($P<0.05$), the expression was not associated with the depth of tumor invasion, lymph node metastasis, and clinical stage($P>0.05$). **Conclusion** Decreased expression of NAG-1 in human gastric cancer, and it may play an important role in the tumorigenesis of gastric cancer.

Key words: gastric neoplasms; reverse transcriptase polymerase chain reaction; immunohistochemistry; NAG-1

胃癌在中国的发病率居各种恶性肿瘤之首,年病死率约为 25 万~10 万^[1-2]。因此,其病因和预防是迫切有待解决的课题。有研究表明,非甾体类抗炎药活化基因-1(NAG-1)在多种肿瘤中具有抑制肿瘤活性的作用,且在肿瘤细胞转移、侵袭,以及新生肿瘤血管形成等环节都发挥重要作用。本研究中,通过检测 NAG-1 蛋白及 mRNA 在胃癌组织和正常黏膜组织中的表达水平,分析 NAG-1 基因与胃癌病理分型、分期、淋巴结转移等临床病理特征的关系,旨在探讨胃癌发生、发展中的生物学意义及相关的分子病理学机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2009 年 3 月至 2010 年 5 月新余市人民医院外科手术切除(术前均未进行化疗、放疗及其他抗癌治疗)的胃癌标本 76 例。其中男 61 例,女 16 例,年龄 28~85 岁,平均(62.00±11.08)岁,肿瘤浸润至浆膜及以下 39 例,浆膜外有 37 例,有局部淋巴结转移 62 例,未发生转移 14 例。高、中分

化 39 例,低分化、未分化为 37 例。根据国际抗癌联盟(international union against cancer, UICC)标准,Ⅰ~Ⅱ期 36 例,Ⅲ~Ⅳ期 40 例。另取相应的距离肿瘤边缘大于或等于 5 cm 处的正常胃黏膜组织作为对照。用于免疫组化的组织标本取出后,迅速用体积分数为 10%的中性甲醛溶液固定,常规包埋,4 μm 厚切片。所有标本均经苏木精-伊红(hatmatoxylin, HE)染色,经病理检查证实。用于 RT-PCR 的标本置于灭菌的锡箔纸内,液氮保存。

1.2 主要试剂 兔抗人 GDF15(NAG-1)多克隆抗体(美国 Abcam 公司, ab14586),免疫组织化学试剂盒(福建迈新生物技术有限公司); Trizol、逆转录试剂盒、PCR 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 检测 NAG-1 mRNA 的表达 RNA 提取和 cDNA 第 1 链合成按说明书上操作步骤进行。NAG-1 引物序列上游: 5'-

△ 通讯作者, Tel:13705006909; E-mail: whitelanbin@126.com。

CAG TCG GAC CAA CTG CTG GCA-3',下游:5'-TGA GCA CCA TGG GAT TGT AGC-3', β -actin 引物序列上游:5'-CGG GAA ATC GTG CGT GAC-3',下游:5'-TGG AAG GTG GAC AGC GAG G-3';按以下反应条件在 PCR 仪上进行扩增:94 °C 预变性 5 min,94 °C 复性 45s,62 °C 退火 45 s,72 °C 延长 1 min,共 36 个循环,72 °C 总延伸 5 min。PCR 产物进行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,100 V 25 min 后,在长波紫外灯下观察、照相。电泳结果用 Quantity One 分析系统进行电泳条带分析,NAG-1 产物与 β -actin 产物的比值为 NAG-1 mRNA 在组织中表达的相对量。

1.3.2 检测 NAG-1 蛋白的表达 采用免疫组化 SP 法,NAG-1 为即用型抗体,稀释到 1:800,PBS 代替一抗作阴性对照。操作按说明书进行。参照 Birner 等^[3]的半定量评定方法,根据阳性细胞染色强度和阳性细胞所占百分比计分:无着色,即阴性者评为 0 分;着色弱,但明显强于阴性对照者为 1 分;染色清晰者为 2 分;染色强者为 3 分。阳性细胞数 >10%~50% 者为 2 分,>50%~80% 者为 3 分,>80% 者为 4 分。两项评分之和小于 3 分为阴性, ≥ 3 分为阳性。

1.4 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行统计学数据分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间比较采用 χ^2 检验和 t 检验, $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

胃癌组织中 NAG-1 蛋白的表达 光镜显微镜下观察可见 NAG-1 蛋白主要表达于正常胃黏膜的腺上皮细胞和胃癌细胞的细胞质,呈棕黄色。见表 1,插 IV 图 1。NAG-1 蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系见表 2,插 IV 图 2。正常胃黏膜组织与胃癌组织中 NAG-1 mRNA 表达见表 3,插 IV 图 3。

表 1 胃癌组织和正常胃黏膜组织中 NAG-1 蛋白的表达比较

组别	n	阳性	阴性
正常胃黏膜组织	76	68	8
胃癌组织	76	27*	49

*: $P < 0.05$,与正常胃黏膜组织比较。

表 2 胃癌组织中的 NAG-1 蛋白表达与临床病理特征的关系

项目	n	NAG-1 蛋白		阳性表达率 (%)
		-	+	
肿瘤部位胃底及贲门	21	13	8	38.09
胃体	14	6	8	57.14
胃窦及幽门	34	23	11	32.35
淋巴结转移				
无转移	14	7	7	50
有转移	62	42	20	32.78
组织分化				
高、中分化	27	14	13*	48.14
低、未分化	49	40	9	18.17
浸润深度				
浆膜层及以下	39	26	13	33.33
浆膜外	37	23	14	37.83

续表 2 胃癌组织中的 NAG-1 蛋白表达与临床病理特征的关系

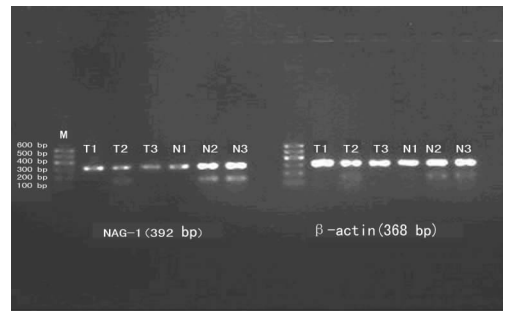
项目	n	NAG-1 蛋白		阳性表达率 (%)
		-	+	
肿瘤大小				
<4 cm	42	23	19	45.23
≥ 4 cm	34	16	18	52.94
TNM 分期				
I~II 期	36	23	13	36.11
III~IV 期	40	26	14	35

*: $P < 0.05$,与低、未分化比较。

表 3 胃癌组织和正常胃黏膜组织中 NAG-1mRNA 的表达水平比较

组别	n	NAG-1/ β -actin
正常胃黏膜组织	76	0.905 9 \pm 0.0 751
胃癌组织	76	0.556 3 \pm 0.2 181*

*: $P < 0.05$,与正常胃黏膜比较。



M: Mark; T1、T2、T3: 胃癌组织; N1、N2、N3: 为正常胃黏膜组织
图 3 胃癌组织和正常胃黏膜组织中 NAG-1mRNA 的表达

3 讨论

NAG-1 属转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- β) 超家族的一成员,是由 Beak 等^[4]用消减杂交法首先在入结肠癌细胞 HCT-116 中获得的非甾体类抗炎药 (nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs) 诱导表达的基因。有研究表明,NAG-1 在胎盘和前列腺癌中表达高^[5],而在结肠癌中较正常肠组织表达显著下降。也有研究显示,NAG-1 作为一种抑癌基因,能够抑制乳腺癌和肺癌的形成,诱导肿瘤细胞凋亡^[6-7]。

本研究结果显示,胃癌组织中的 NAG-1 含量显著低于正常胃黏膜组织 ($P < 0.05$)。NAG-1 不仅在胃癌组织中减少,而且与肿瘤的分化程度成反比,在分化程度高的肿瘤组织中,表达量明显高于分化差的。结果与 Kim 等^[8]研究结果相一致。有研究发现,NAG-1 参与胃癌的发生、发展过程,可能在胃癌的侵袭和转移中起重要作用,它可能成为早期诊断,判断肿瘤进展程度,侵袭、转移能力和预后的重要指标。目前对 NAG-1 在肿瘤组织中的表达是如何减少,使其具有抑制肿瘤的机制尚存争议。有研究认为,可能是通过与 p53 作用实现。NAG-1 作为 p53 下游的一个靶基因,其表达以依赖 p53 的方式调节^[9]。结肠癌中突变型 p53 可导致 NAG-1 的表达下降,然而,在缺乏突变型 p53 的肿瘤组织中 NAG-1 表(下转第 2651 页)

- [4] 姚海木, 吴学思, 张靖, 等. 血红蛋白氧合酶-1/一氧化碳通路参与辛伐他汀抗高血压诱发的大鼠心肌肥厚[J]. 生理学报, 2006, 58(2): 116-123.
- [5] Takahashi T, Morita K, Akagi R, et al. Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target in oxidative tissue injuries [J]. *Curr Med Chem*, 2004, 11(12): 1545-1561.
- [6] 邓俊, 向贵平, 黄骥. HO-1/CO 与 NOS/NO 系统在动脉粥样硬化中的作用及其相关性研究[J]. 重庆医学, 2006, 35(23): 2146-2150.
- [7] Yet SF, Layne MD, Liu X, et al. Absence of heme oxygenase-1 exacerbates atherosclerotic lesion formation and vascular remodeling [J]. *FASEB*, 2003, 17(12): 1759-1761.
- [8] Wang LJ, Lee TS, Lee FY, et al. Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesion [J]. *Am J Pathol*, 1998, 152(3): 711-720.
- [9] Ishikawa K, Sugawara D, Wang XP, et al. Heme oxygenase-1 inhibits atherosclerotic lesion formation in ldl-receptor knockout mice [J]. *Circ Res*, 2001, 88(5): 306-512.
- [10] Okada K, Wangpoengtrakul C, Tanaka T, et al. Curcumin and especially tetrahydrocurcumin ameliorate oxidative stress-induced renal injury in mice [J]. *J Nutr*, 2001, 131(8): 2090-2095.
- [11] Manikandan P, Sumitra M, Aishwarya S, et al. Curcumin modulates free radical quenching in myocardial ischaemia in rats [J]. *Intern J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(10): 1967-1980.
- [12] Nan B, Yang H, Yan S, et al. C-reactive protein decreases expression of thrombomodulin and endothelial protein C receptor in human endothelial cells [J]. *Surgery*, 2005, 138(2): 212-222.
- [13] Arafa HM. Curcumin attenuates diet-induced hypercholesterolemia in rats [J]. *Med Sci Monit*, 2005, 11(7): 228-234.
- [14] Pae HO, Jeong GS, Jeong SO, et al. Roles of heme oxygenase-1 in curcumin-induced growth inhibition in rat smooth muscle cells [J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(3): 267-277.
- [15] 张英, 黄维义, 万英. 姜黄素诱导血红蛋白氧合酶-1 表达抗大鼠主动脉平滑肌细胞增殖作用的研究 [J]. 临床心血管病杂志, 2008, 24(6): 444-446.
- [16] Jeong GS, Oh GS, Pae HO, et al. Comparative effects of curcuminoids on endothelial heme oxygenase-1 expression; ortho-methoxy groups are essential to enhance heme oxygenase activity and protection [J]. *Exp Mol Med*, 2006, 31, 38(4): 393-400.
- [17] Balogun E, Hoque M, Gong P, et al. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element [J]. *Biochem J*, 2003, 371(Pt3): 887-895.

(收稿日期: 2011-04-10 修回日期: 2011-05-15)

(上接第 2648 页)

达亦减少, 分析原因可能与多机制参与 NAG-1 的表达有关。

总之, 对 NAG-1 表达的研究可成为治疗胃癌的一个新的化学预防靶标, 也提示对 NAG-1 蛋白的进一步研究可能有助于未来抗肿瘤药物的开发。

参考文献:

- [1] 吴在德. 外科学[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 460.
- [2] 徐国宝, 李涛, 于霞, 等. 胃癌肝转移危险因素的相关性分析[J]. 重庆医学, 2010, 39(6): 420-423.
- [3] Bimer P, Schindl M, Obennair A, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor is a marker for an unfavorable prognosis in early stage invasive cervical [J]. *Cancer*, 2000, 60(7): 4693-4696.
- [4] Baek SJ, Kim KS, Nixon JB, et al. Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF- β superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities [J]. *Mol Pharmacol*, 2001, 59(4): 901-908.
- [5] Thomas R, True LD, Lange PH, et al. Placental bone morphogenetic protein (PLAB) gene expression in normal, premalignant and malignant human prostate cancer: relation to tumor development and progression [J]. *Cancer*, 2001(13), 93: 47-52.
- [6] Kathy V, Su Y, Henry G, et al. 1,1-Bis(3-indolyl)-1-(p-substituted phenyl) methanes inhibit proliferation of estrogen receptor-negative breast cancer cells by activation of multiple pathways [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 109(6): 273-283.
- [7] Kadara H, Schroeder CP, Lotan D, et al. Induction of GDF-15/NAG-1/MIC-1 in human lung carcinoma cells by retinoid-related molecules and assessment of its role in apoptosis [J]. *Cancer Biol/Ther*, 2006, 5(5): 518-522.
- [8] Kim K, Baek SJ, Flake GP, et al. Expression and regulation of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) in human and mouse tissue. [J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(2): 1388-1398.
- [9] Julie AK, Scott M, James RL, et al. p53 controls prostate-derived factor/macrophage inhibitory cytokine/NSAID-activated gene-1 expression in response to cell density, DNA damage and hypoxia through diverse mechanisms [J]. *Cancer Letters*, 2009, 277(1): 38-47.

(收稿日期: 2011-04-22 修回日期: 2011-05-24)