

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.27.004

SALL4 基因在胃癌组织中的表达及临床意义*

郭勇¹,唐永梁²,杨俊涛²,张鑫³,刘蕾⁴

(1. 重庆市长寿区人民医院普外科 401220; 2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所肝胆外科, 重庆 400042; 3. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科, 重庆 400042; 4. 第三军医大学药学院, 重庆 400038)

[摘要] **目的** 检测人类婆罗双树样基因-4(SALL4)在胃癌组织中的表达及其与胃癌生物学行为的关系。**方法** 采用逆转录 PCR(RT-PCR)、Western blot 和免疫组织化学方法检测 91 例胃癌组织和 37 例正常胃黏膜中 SALL4 的表达,分析 SALL4 与胃癌临床病理特征之间的关系。**结果** SALL4 在胃癌组织中阳性表达率为 74.7%,显著高于正常胃黏膜组织阳性表达率 18.9% ($P < 0.05$),而且随着胃癌分化程度的降低,SALL4 的阳性率和表达强度逐渐增高;胃癌组织 SALL4 mRNA 和蛋白的表达水平均显著高于正常胃黏膜组织,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);在胃癌组织中 SALL4 的阳性表达与肿瘤淋巴结转移 ($P = 0.001$)、分化程度 ($P = 0.029$) 和浸润深度 ($P = 0.050$) 密切相关。**结论** SALL4 基因在胃癌组织中高表达,与淋巴结转移、分化程度和浸润深度密切相关,可能在胃癌发生、发展中起重要的作用。

[关键词] 胃肿瘤;免疫组织化学;SALL4

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)27-3756-03

Expression and clinical significance of SALL4 expression in gastric carcinoma tissues*

Guo Yong¹, Tang Yongliang², Yang Juntao², Zhang Xin³, Liu Lei⁴

(1. Department of General Surgery, People's Hospital of Changshou, Chongqing 401220, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 3. Department of General Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 4. College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** To study the expression and clinical significance of the SALL4 in human gastric carcinoma tissues. **Methods** The expression of SALL4 in 91 samples of gastric carcinoma and 37 samples of normal gastric tissues was detected by RT-PCR, Western blot and immunohistochemistry, and its relationship with the clinical data were analyzed statistically. **Results** The positive expression rate of SALL4 in gastric carcinoma (74.7%) was significantly higher than that (18.9%) in normal gastric mucosa tissues ($P < 0.05$). Moreover, with the decreased with the differentiation of gastric carcinoma, the positive expression rate of SALL4 was increased. The expression of SALL4 mRNA and protein in gastric carcinoma tissues were significantly higher than that in normal gastric tissues ($P < 0.050$). The expression levels of SALL4 were relevant to lymph node metastasis ($P = 0.001$), infiltration depth ($P = 0.029$) and the differentiation degree of gastric carcinoma ($P = 0.050$). **Conclusion** SALL4 was highly expressed in gastric cancer tissues and relevant to lymph node metastasis, infiltration depth and the differentiation degree, which may have play an important role in the development of gastric cancer.

[Key words] gastric neoplasms; immunohistochemistry; SALL4

胃癌是临床常见恶性肿瘤之一,居全球肿瘤发病率的第 4 位,居我国发病率第 2 位^[1-2]。胃癌早期无明显症状,大部分患者在诊断时已是晚期,错失最佳的治疗时机。因此,寻找胃癌新的肿瘤标记物,具有重要的科学意义和医学价值。人类婆罗双树样基因-4(SALL4)是一种新发现的癌基因,多项研究表明,SALL4 不仅是胚胎干细胞的特异标记物,而且在乳腺癌、前列腺癌、急性髓性白血病等多种肿瘤中均有表达^[3-5]。目前,国内外尚未有关于 SALL4 在胃癌中的相关研究。本研究通过逆转录 PCR(RT-PCR)、Western blot 和免疫组织化学的方法,检测 SALL4 基因和蛋白在胃癌中的表达情况,并阐明其与临床病理学参数之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科 2011~2013 年手术切除胃癌标本 91 例,其中,男 62

例,女 29 例,平均年龄 52 岁。肿瘤直径大于 5 cm 56 例,小于或等于 5 cm 35 例;淋巴结转移 61 例,无淋巴结转移 30 例,远处转移 23 例;癌旁组织 37 例,取自胃癌手术切端正常组织。本研究所有病例均经病理学检查确诊,术前未接受过化学治疗及放射治疗,并经过本院伦理委员会批准,获得患者的知情同意。

1.2 仪器与试剂 全封闭脱水机(德国 Leica 1010),全自动切片机(德国 Leicarm 2245),全自动染色机(Leicaauto Stainer XL),显微镜(日本 Olympus pm-20)及 Olympus pm-C35DX 成像系统。LightCycler 定量 PCR 扩增仪(瑞士 Roche),Tanon 凝胶图像分析系统(上海天能)。TaKaRa RNAliso 试剂,逆转录 PCR(RT-PCR)试剂盒, DNA Marker, 逆转录试剂和 PCR 试剂(北京中杉),SALL4 兔抗人多克隆抗体(Abcam)。其他试剂购自江苏碧云天生物技术研究所。

* 基金项目:国家自然青年科学基金资助项目(81402013)。 作者简介:郭勇(1981—),硕士,主治医师,主要从事消化道肿瘤方面的研究。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学法 SALL4 检测采用免疫组织化学 SP 法,严格按照说明书操作。采用德国 IECIA 图像分析仪进行图像分析,SALL4 免疫阳性物质定位于细胞核,呈棕色颗粒样。半定量判定:根据染色强度,依次为无色(0 分)、淡黄色(1 分)、棕黄色(2 分)、棕褐色(3 分);染色范围(染色细胞所占的百分比):阳性细胞小于 5%(0 分),5%~25%(1 分),>25%~50%(2 分),>51%~75%(3 分),>75%(4 分)。最后按染色强度与阳性细胞之积为免疫组织化学的结果,<2 分为(-),2~4 分为(+),5~8 分为(++),9~12 分为(+++)。

1.3.2 RT-PCR 取 100 mg 胃癌组织,采用 Trizol 法提取总 RNA,以 RNA 为模板,将 RNA 逆转录成 cDNA。反应条件为:37 °C 15 min,85 °C 5 s,4 °C 1 s。引物由碧云天公司合成,SALL4 引物序列为:5'-TCG ATG GCC AAC TTC CTT C-3',5'-GAG CGG ACT CAC ACT GGA GA-3',PCR 产物为 142 bp。以 β -actin 为内参,循环扩增条件:94 °C 5 min,94 °C 30 s,SALL4(61 °C)/ β -actin(55 °C),退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,38 个循环,72 °C 5 min。PCR 扩增产物在 3% 琼脂糖凝胶中电泳,采用凝胶图像扫描系统对扩增产物的电泳条带进行吸光度(A)检测,计算出 SALL4 与 β -actin 的 A 比值,结果以 SALL4/ β -actin 表示。

1.3.3 Western blot 组织匀浆后,加入含有苯甲基磺酰氟(PMSF)的 RIPA 裂解液,冰上裂解 40 min。4 °C,12 000 r/min 离心 10 min,将上清液移至新管,采用 BCA 法测蛋白浓度。分别配制 10% 分离胶与 5% 浓缩胶,每孔上样 30 μ g,恒压电泳。将蛋白电转移到 PVDF 膜后,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。将目的条带孵育在 β -actin 和 SALL4 一抗中 4 °C 过夜。次日室温孵育二抗 1 h,曝光检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件分析,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料采用 χ^2 检验,等级资料采用秩和检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

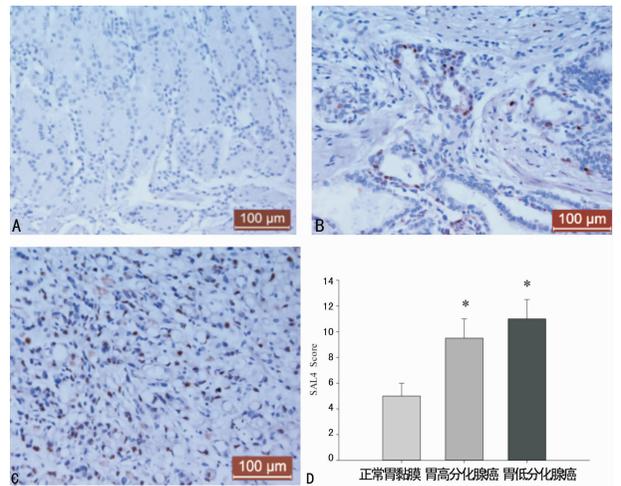
2.1 SALL4 免疫组织化学结果 在胃癌组织中,SALL4 表达较强,主要定位于细胞核,呈棕色颗粒样;在正常胃黏膜组织中 SALL4 表达较弱,棕色颗粒较小,SALL4 在胃癌组织中阳性表达率为 74.7%(68/91),显著高于正常胃黏膜组织阳性表达率 18.9%(7/37),差异有统计学意义($P < 0.05$)。随着胃癌分化程度的降低,SALL4 的阳性率和表达强度逐渐增高。见图 1。

表 1 胃癌组织中 SALL4 的表达与临床病理参数的关系[n(%)]

病理参数	n	SALL4 阳性	χ^2	P
年龄			0.002	0.961
≤ 65	57	45(78.9)		
> 65	34	23(67.6)		
性别			0.030	0.862
男	62	46(74.2)		
女	29	22(75.8)		
浸润深度			2.929	0.050
T ₁ /T ₂	27	17(62.9)		
T ₃ /T ₄	64	51(79.6)		

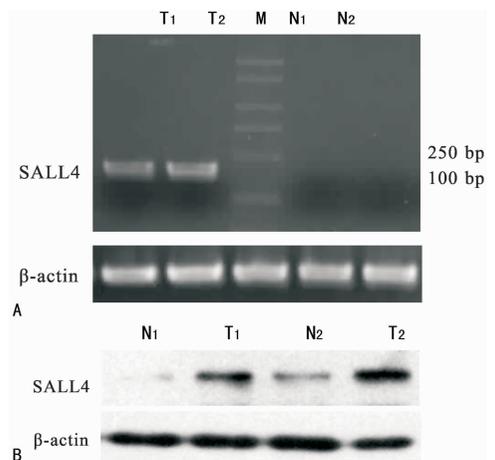
续表 1 胃癌组织中 SALL4 的表达与临床病理参数的关系[n(%)]

病理参数	n	SALL4 阳性	χ^2	P
淋巴结转移			10.844	0.001
N ₀	30	16(53.3)		
N ₁ /N ₂ /N ₃	61	52(85.2)		
远处转移			2.438	0.118
M ₀	68	48(70.6)		
M ₁	23	20(86.9)		
分化程度			4.743	0.029
中、高分化	58	39(67.2)		
低分化	33	29(87.8)		
肿瘤大小			0.445	0.505
≤ 5 cm	35	26(74.3)		
> 5 cm	56	42(75.0)		



A:正常胃黏膜;B:胃高分化腺癌;C:胃低分化腺癌;D:SALL4 组化评分。* : $P < 0.05$,与正常胃黏膜比较。

图 1 SALL4 在正常胃黏膜、胃高分化腺癌和胃低分化腺癌中的表达



A:SALL4 mRNA 比较;B:SALL4 蛋白比较,T:肿瘤组织;N:正常胃黏膜组织。

图 2 SALL4 在正常胃黏膜和胃癌中 mRNA 和蛋白的表达水平

2.2 SALL4 mRNA 和蛋白的表达水平 RT-PCR 结果表明 SALL4 位于 142 bp, 胃癌组织中条带亮度显著高于正常胃黏膜组织, 见图 2; 灰度扫描结果显示, 胃癌组织 SALL4 mRNA (3.15 ± 0.42) 表达水平高于正常胃黏膜组织 (0.27 ± 0.08) ($P < 0.05$)。Western blot 结果同样表明, 胃癌组织中 SALL4 蛋白的表达量显著高于正常胃黏膜组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。

2.3 SALL4 与胃癌临床病理参数的关系 SALL4 在有淋巴结转移组的表达率为 85.2%, 高于无淋巴结转移组的表达率 53.3% ($P = 0.001$); SALL4 在中高分化组的表达率为 67.2%, 高于低分化组的表达率 87.8% ($P = 0.029$); SALL4 在浸润深度 T₁/T₂ 组的表达率为 62.9%, 高于浸润深度 T₃/T₄ 组表达率 79.6% ($P = 0.050$); SALL4 表达率与年龄、性别、远处转移和肿瘤大小等病理参数无关, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

3 讨论

胃癌的发病机制尚未完全阐明, 其中涉及癌基因 (ras, c-myc, C-erb-2 等) 和抑癌基因 (p21, p53 等) 的改变, 上述基因表达的变化对胃癌的生物学行为和预后均有影响^[6-8]。SALL4 是一种新发现的癌基因, 定位于人类染色体 20q13, 属于 SALL 基因家族成员, 含有 4 个外显子, 为 C2H2 锌指蛋白转录因子, 编码 SALL4A 和 SALL4B 两种异构体蛋白, 表达于细胞核^[9-10]。

近年来发现, SALL4 基因的表达可激活 Wnt、Bmi-1 和 Pten 等通路, 在早期胚胎发育和维持胚胎干细胞自我更新中发挥重要作用, 而且 SALL4 在血液系统恶性肿瘤中异常表达, 可能与白血病的发生、发展有密切关系^[4,11]。在具有干细胞特性的肝癌亚型中, SALL4 表达与预后差密切相关, 基因表达分析显示 SALL4 + 肝癌细胞中, “干性”相关基因富集, 提示 SALL4 是具有侵袭表型的干/祖样肝癌细胞的分子标志^[12]。在肠道肿瘤中, Forghanifard 等^[13]研究发现, SALL4 在结直肠癌组织中的表达比正常组织高出 2 倍多, 并且与淋巴结转移密切相关, 提示 SALL4 可能是一个新的肿瘤转移的分子标志^[13]。

本研究通过 RT-PCR 和 Western blot 方法检测 SALL4 在胃癌组织和正常胃黏膜组织中基因和蛋白的表达水平, 发现胃癌组织中 SALL4 mRNA 和蛋白水平均显著高于正常胃黏膜组织 ($P < 0.05$)。免疫组织化学结果显示, SALL4 在胃癌组织中阳性表达率为 74.7% (68/91), 显著高于正常胃黏膜组织阳性表达率 18.9% (7/37), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。随着胃癌分化程度的降低, SALL4 的阳性率和表达强度逐渐增高, 说明 SALL4 可能与胃癌的分化程度相关。本研究中, SALL4 的表达与胃癌的浸润深度、淋巴结转移、分化程度密切相关, 与胃癌患者的年龄、性别、肿瘤大小无关 ($P > 0.05$)^[4]。这与其他作者等在宫颈癌组织中的研究部分一致, 张铭等^[14]研究发现 SALL4 在宫颈癌组织中高表达, 与宫颈癌的分化相关, SALL4 的表达可能对宫颈癌的发生发展有重要作用。

综上所述, SALL4 在胃癌组织中表达增加, 而且与胃癌的分化程度呈负相关, 进一步分析发现 SALL4 的阳性表达与浸润深度、淋巴结转移密切相关。因此, 检测胃癌组织中 SALL4 蛋白的表达有助于胃癌的诊断及预后判断, 但其具体的作用机

制尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Peng JJ, Xiao P, Xu JB, et al. Clinicopathological features and trend changes of gastric carcinoma in Southern China [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(15): 4401-4406.
- [2] Zhu X, Li J. Gastric carcinoma in China: Current status and future perspectives (Review) [J]. *Oncol Lett*, 2010, 1(3): 407-412.
- [3] Yang J, Gao C, Chai L, et al. A novel SALL4/OCT4 transcriptional feedback network for pluripotency of embryonic stem cells [J]. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10766.
- [4] Yang J, Chai L, Fowles TC, et al. Genome-wide analysis reveals Sall4 to be a major regulator of pluripotency in murine-embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(50): 19756-19761.
- [5] Gao C, Kong NR, Chai L. The role of stem cell factor SALL4 in leukemogenesis [J]. *Crit Rev Oncog*, 2011, 16(1/2): 117-127.
- [6] Lin Z, Zhang C, Zhang M, et al. Targeting cadherin-17 inactivates Ras/Raf/MEK/ERK signaling and inhibits cell proliferation in gastric cancer [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85296.
- [7] Liu X, Yu H, Cai H, et al. Expression of CD24, p21, p53, and c-myc in alpha-fetoprotein-producing gastric cancer: Correlation with clinicopathologic characteristics and survival [J]. *J Surg Oncol*, 2014, 109(8): 859-864.
- [8] Sanaat Z, Halimi M, Ghojzadeh M, et al. Immunohistochemical analysis of p53, Ki-67, CD44, HER-2/neu expression patterns in gastric cancer, and their association with one year survival in North-West of Iran [J]. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 2013, 7(3): 15-20.
- [9] Firor AE, Jares A. Nuclear localization of SALL4: a stemness transcription factor [J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(10): 1522-1523.
- [10] Jones B. Liver cancer: SALL4—a cancer marker and target [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(8): 426.
- [11] Lim CY, Tam WL, Zhang J, et al. Sall4 regulates distinct transcription circuitries in different blastocyst-derived stem cell lineages [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5): 543-554.
- [12] Yakaboski E, Jares A, Ma Y. Stem cell gene SALL4 in aggressive hepatocellular carcinoma: a cancer stem cell-specific target [J]. *Hepatology*, 2014, 60(1): 419-421.
- [13] Forghanifard MM, Moghbeli M, Raecissadati R, et al. Role of SALL4 in the progression and metastasis of colorectal cancer [J]. *J Biomed Sci*, 2013, 20(3): 6.
- [14] 张铭, 张一鸣, 左伟, 等. 干细胞标志物 SALL4 在宫颈癌中的表达研究 [J]. *重庆医学*, 2014, 43(3): 285-287