

【临床研究】

通信作者:汪涛(1973-),男,湖北武汉人,硕士,副主任医师,研究方向:胃肠肿瘤;E-mail:286300206@qq.com

胃癌属消化系统恶性肿瘤,患者预后差,病死率高。研究表明,胃癌的发生、发展与多种抑癌基因失活及原癌基因激活而引起的细胞生物行为学改变有关,是一个多因素、多基因、多阶段动态演变的过程^[1]。对影响胃癌病情进展的相关因素进行分析将有助于胃癌的防治。同源转录因子2(cognate transcription factor 2, CDX2)属于尾型同源盒基因家族中的一员,其对消化道上皮黏膜发育有重要的调控作用^[2]。正常情况下,CDX2在食管、胃及其他组织中极少表达。但近年相关研究显示,CDX2可诱导胃黏膜肠化生,并最终导致胃黏膜分化异常,进一步发展为胃癌^[3]。环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在胃癌发生及转移过程中起重要作用^[4]。核因子- κ B(nuclear factor - κ B, NF- κ B)具有促进炎症发生、抗凋亡作用,直接参与细胞周期调控,激活的NF- κ B可促进细胞增殖^[5],促进肿瘤的增生及转移^[6]。目前关于CDX2、COX-2及NF- κ B在胃癌发生和发展过程中的作用及其相关性研究较少。本研究旨在分析CDX2、COX-2及NF- κ B在胃癌发生和发展过程中的作用及其相互关系,以期对胃癌的早期防治提供指导。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2012年1月至2013年12月咸宁市中心医院行内镜活检及手术治疗的胃黏膜组织样本106例,男85例,女21例,年龄18~78岁,平均(53.62±5.36)岁。根据病理组织检查结果,其中正常胃黏膜组织标本30例,癌前病变组织标本42例(不典型增生12例,肠化生30例),胃癌组织标本34例。胃癌患者活组织检查前均未接受过化学治疗和放射治疗。组织标本应用体积分数10%中性甲醛固定,石蜡包埋、脱水,切片备用。

1.2 试剂和仪器 Trizol试剂盒(美国Invitrogen公司),反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒(日本TAKA-PA公司),达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、D-Hank's液、胰蛋白酶(美国Gibco公司),NF- κ B p65单克隆抗体(美国Sigma公司),鼠抗人CDX2、兔抗人COX-2单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 胃黏膜组织中CDX2、COX-2、NF- κ B mRNA表达测定 采用RT-PCR测定胃黏膜组织中CDX2、COX-2、NF- κ B mRNA表达,设计针对人CDX2、COX-2、NF- κ B的PCR探针序列以及荧光检测引物,选择人GAPDH作为内参,并采用Trizol试

剂盒提取RNA,反转录聚合酶链式反应实验严格按照试剂盒操作说明进行。CDX2上游引物:5'-AGAGCGGCATGAAGAAGGAGTG-3', CDX2下游引物:5'-GAAATGGGAGAAGGTAGTGTCAA-3'; COX-2上游引物:5'-GAAGAAACCTTAAGGAGTG-3', COX-2下游引物:5'-AGGAGGTTCAAGGTCCTTC-3'; NF- κ B上游引物:5'-GAACCTTTAATTCCGGAGTG-3', NF- κ B下游引物:5'-CTTTAAACCTCCAATCCTTC-3'。分别以CDX2、COX-2、NF- κ B mRNA颈环反转录引物进行RNA反转录,反应条件为:42℃反转录30 min, 95℃变性2 min, 55℃ 15 s, 72℃ 30 s以及95℃ 30 s反复循环扩增,并在退火阶段收集荧光信号,并记录每个反应管中荧光信号到达预设阈值时所经历的循环数,并计算CDX2 mRNA、COX-2 mRNA及NF- κ B mRNA相对表达量。CDX2、COX-2、NF- κ B mRNA相对表达量=目的基因/内参基因。

1.3.2 免疫组织化学染色检测胃黏膜组织中CDX2、COX-2及NF- κ B蛋白表达 将样本组织剪碎后采用D-Hank's试剂液进行冲洗,并加入1 g·L⁻¹的脱氧核糖核酸酶I与2.5 g·L⁻¹胰蛋白酶混合液,并在37℃中孵化60 min,以彻底分解细胞质,使CDX2、COX-2及NF- κ B蛋白能彻底释出,并在含有小牛血清的DMEM培养基中终止消化。样液反复吹打后过滤,弃上清液,并用D-Hank's液洗涤2次,再次离心5 min,弃上清液,留置沉淀物,采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法测定NF- κ B表达,采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶法测定胃黏膜组织中CDX2、COX-2的表达。

1.4 结果判定 每张切片随机选取5个的高倍视野(×400)记录阳性细胞百分率,阴性(-):阳性着色细胞<5%;弱阳性(+):阳性着色细胞5%~25%;阳性(++):阳性着色细胞26%~50%;强阳性(+++):阳性着色细胞>50%。CDX2、NF- κ B以细胞核中出现棕黄色颗粒为阳性表达;COX-2以细胞膜或细胞质中出现棕黄色颗粒为阳性表达。

1.5 统计学处理 应用SPSS 17.0软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验和LSD- t 法;计数资料以率表示,采用 χ^2 检验;等级资料采用Spearman等级相关性分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同胃黏膜组织中CDX2、COX-2及NF- κ B mRNA表达比较 结果见表1。胃癌组织和癌前病变组织中CDX2、COX-2、NF- κ B mRNA的表达显著

高于正常胃黏膜组织($P < 0.05$),胃癌组织中 COX-2、NF-κB mRNA 的表达显著高于癌前病变组织($P < 0.05$),胃癌组织中 CDX2 mRNA 的表达显著低于癌前病变组织($P < 0.05$)。

2.2 不同胃黏膜组织中 CDX2、COX-2 及 NF-κB 蛋白阳性表达比较 结果见表 2。胃癌组织和癌前病变组织中 CDX2、COX-2、NF-κB 蛋白阳性表达率显著高于正常胃黏膜组织($P < 0.05$),胃癌组织中 COX-2、NF-κB 蛋白阳性表达率显著高于癌前病变组织($P < 0.05$),胃癌组织中 CDX2 蛋白阳性表达率显著低于癌前病变组织($P < 0.05$)。

表 2 不同胃黏膜组织中 CDX2、COX-2 及 NF-κB 蛋白阳性表达比较

Tab.2 Comparison of the expressions of CDX2,COX-2 and NF-κB protein in different gastric mucosa tissues

组织类型	n	CDX2					COX-2					NF-κB				
		-/例	+/例	+/+例	+/+/例	阳性/例(%)	-/例	+/例	+/+例	+/+/例	阳性/例(%)	-/例	+/例	+/+例	+/+/例	阳性/例(%)
正常胃黏膜组织	30	28	2	0	0	2(6.67)	27	2	1	0	3(10.00)	27	2	1	0	3(10.00)
癌前病变组织	42	4	0	0	0	38(90.47) ^a	26	4	8	4	16(38.09) ^a	24	5	5	8	18(42.86) ^a
胃癌组织	34	10	8	9	7	24(70.59) ^{ab}	12	10	8	4	22(64.71) ^{ab}	9	8	8	9	25(73.53) ^{ab}

注:与正常胃黏膜组织比较^a $P < 0.05$;与癌前病变组织比较^b $P < 0.05$ 。

2.3 CDX2、COX-2 及 NF-κB 与胃癌临床病理特征的关系 结果见表 3。CDX2 表达与胃癌临床分期、分化程度有关($P < 0.05$),而与患者性别、年龄、肿瘤

表 1 不同胃黏膜组织中 CDX2、COX-2 及 NF-κB mRNA 表达比较

Tab.1 Comparison of the expressions of CDX2, COX-2 and NF-κB mRNA in different gastric mucosa tissues

($\bar{x} \pm s$)				
组织类型	n	CDX2 mRNA	COX-2 mRNA	NF-κB mRNA
正常胃黏膜组织	30	0.012 ± 0.004	0.018 ± 0.003	0.017 ± 0.005
癌前病变组织	42	1.865 ± 0.248 ^a	1.312 ± 0.238 ^a	1.452 ± 0.169 ^a
胃癌组织	34	1.192 ± 0.025 ^{ab}	1.912 ± 0.026 ^{ab}	1.936 ± 0.018 ^{ab}
F		3.452	3.339	3.612
P		0.021	0.028	0.015

注:与正常胃黏膜组织比较^a $P < 0.05$;与癌前病变组织比较^b $P < 0.05$ 。

直径、淋巴结转无关($P > 0.05$);COX-2 和 NF-κB 表达与临床分期、分化程度、肿瘤直径及淋巴结转移有关($P < 0.05$),而与患者性别、年龄无关($P > 0.05$)。

表 3 CDX2、COX-2 和 NF-κB 表达与胃癌临床病理特征的关系

Tab.3 Relationship between CDX2,COX-2,NF-κB expression and clinical pathological characteristics of gastric cancer

临床病理特征	n	CDX2				COX-2				NF-κB			
		阴性/例	阳性/例	χ ²	P	阴性/例	阳性/例	χ ²	P	阴性/例	阳性/例	χ ²	P
性别													
男	18	5	13	0.024	0.876	7	11	0.083	0.785	5	13	0.043	0.886
女	16	5	11			5	11			4	12		
年龄/岁													
<60	22	7	15	0.001	0.902	8	14	0.080	0.809	6	16	0.069	0.796
≥60	12	3	9			4	8			3	9		
肿瘤直径/cm													
<5	20	6	14	0.075	0.845	2	18	11.051	0.000	9	11	6.412	0.000
≥5	14	4	10			10	4			0	14		
分化程度													
高分化	16	2	14	5.844	0.000	2	14	5.120	0.002	9	7	11.032	0.000
低分化	18	8	10			10	8			0	18		
淋巴结转移													
是	20	6	14	0.076	0.845	3	17	6.734	0.000	2	18	4.876	0.000
否	14	4	10			9	5			7	7		
TNM 分期													
Ⅱ期	10	1	9	11.442	0.000	8	2	13.128	0.000	6	4	10.109	0.000
Ⅲ期	12	2	10			3	9			3	9		
Ⅳ期	12	7	5			1	11			0	12		

2.4 CDX2、COX-2h 和 NF-κB 的关系 CDX2 与 COX-2($r = -0.326, P = 0.002$)、NF-κB($r = -0.412, P = 0.000$)表达呈负相关,COX-2 与 NF-κB 表达呈正相关($r = 0.385, P = 0.000$)。

3 讨论

目前,胃癌的发病机制尚不明确,但普遍认为环境因素、生物因素、化学因素、物理因素等均可导致

多种抑癌基因失活及原癌基因激活,引起机体细胞生物学行为发生一系列的改变,从而引发癌症^[7]。尽管国内外对胃癌的研究已取得一定进展,但目前胃癌的预后仍不理想^[8-9]。CDX2、COX-2 及 NF- κ B 与胃癌的发生及发展有密切的关系,关于三者在胃癌中的相互作用及关系的研究较少。本研究通过对 CDX2、COX-2 及 NF- κ B 在胃癌组织中的表达及相互关系进行分析,旨在进一步明确胃癌的发病机制,寻找早期防治胃癌的措施,降低胃癌的发病率及病死率。

本研究结果显示,胃癌癌前病变组织中 CDX2 mRNA 表达量及其蛋白阳性表达率显著高于正常胃黏膜组织,提示 CDX2 可引起胃正常黏膜组织细胞肠化生。此外,本研究发现,癌前病变组织中 CDX2 表达水平高于胃癌组织,且其表达强度随着胃癌组织分化程度的增加而减弱,表明 CDX2 表达水平下调可能与胃癌的发生、发展密切相关。AZIZ 等^[10]研究发现,CDX2 基因突变与胃癌的发生、进展关系密切,这与本研究结果一致。本研究结果显示,CDX2 阳性表达率与胃癌的临床分期、分化程度有关,从而推断 CDX2 可作为胃癌预后的评价指标。

COX-2、NF- κ B 与细胞增殖及凋亡过程关系密切,二者在胃癌发生、发展过程中起重要的调控作用。MA 等^[11]研究显示,与正常胃黏膜组织相比,胃癌组织中 COX-2、NF- κ B 表达水平显著升高,且随着患者临床分期的增加,其表达强度显著增强。本研究结果显示,COX-2、NF- κ B 在胃癌组织中的表达水平显著高于正常胃黏膜组织及癌前病变组织。因此,抑制 COX-2、NF- κ B 表达水平对阻断胃黏膜癌变具有重要作用。本研究结果显示,COX-2 及 NF- κ B 阳性表达率与胃癌临床分期、分化程度、肿瘤直径及淋巴结转移有关,表明 COX-2、NF- κ B 高表达可促进肿瘤生长及侵袭,可作为胃癌病情进展的预测指标,通过阻断 COX-2 及 NF- κ B 表达可能会防治胃癌的发生和发展。

赵梅莘等^[12]研究发现,COX-2 启动子中包含 2 个 NF- κ B 结合位点,并证实 COX-2 在胃癌及肝癌中受 NF- κ B 调控。ZHANG 等^[13]将 CDX2 转染进入胰腺癌细胞系后发现,CDX2 可抑制 NF- κ B 诱导的荧光素酶基因表达。本研究发现,CDX2 与 COX-2、NF- κ B 表达水平呈负相关,COX-2 与 NF- κ B 表达水

平呈正相关。由此可以推断,胃癌的发病机制可能与 CDX2 表达水平下降促进 COX-2 及 NF- κ B 表达水平升高有关,但目前关于这一信号通路的作用机制还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 冯焕然,段巨洪,武文杰,等.胃癌患者血清炎症因子水平检测的临床意义[J].新乡医学院学报,2014,31(4):284-286.
- [2] 苏帅,陈鑫,姜葵,等. CDX2 COX-2 和 NF- κ B 在胃癌和癌前病变中的表达和意义[J].中国肿瘤临床,2013,40(22):1387-1390.
- [3] SONG X, CHEN H X, WANG X Y, et al. H. pylori-encoded CagA disrupts tight junctions and induces invasiveness of AGS gastric carcinoma cells via Cdx2-dependent targeting of Claudin-2[J]. *Cell Immunol*, 2013, 286(1/2):22-30.
- [4] LEE K H, CHOI E Y, KOH S A, et al. IL-1 β -stimulated urokinase plasminogen activator expression through NF- κ B in gastric cancer after HGF treatment[J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(5):2123-2130.
- [5] 刘忠强,王晓琴,王慧卿,等.核转录因子 kappaB 通路在血小板源性生长因子诱导大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用[J].中华实用儿科临床杂志,2013,28(22):1739-1742.
- [6] 吴锐,王晓通,谢玉波,等. Cdx2-siRNA 对胃癌 MGC-803 细胞黏附能力的影响[J].中华实验外科杂志,2011,28(12):2151.
- [7] YAN L H, WANG X T, YANG J, et al. Reversal of multidrug resistance in gastric cancer cells by CDX2 downregulation[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(26):4155-4165.
- [8] WU X L, CHENG B, LI P Y, et al. MicroRNA-143 suppresses gastric cancer cell growth and induces apoptosis by targeting COX-2[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(43):7758-7765.
- [9] 牛海静,陈鑫,王邦茂,等.胃黏膜肠化生中 CDX2 及 SOX2 的表达及其甲基化状态[J].中华内科杂志,2011,50(5):426-427.
- [10] AZIZ F, QIU Y. The role of anti-LeY antibody in the down regulation of MAPKs/COX-2 pathway in gastric cancer[J]. *Curr Drug Targets*, 2014, 15(4):469-476.
- [11] MA J, LIU J, WANG Z, et al. NF-kappaB-dependent microRNA-425 upregulation promotes gastric cancer cell growth by targeting PTEN upon IL-1 β induction[J]. *Mol Cancer*, 2014, 13(1):40.
- [12] 赵梅莘,丁士刚,刘琳娜,等.胃癌患者术前胃镜活检组织 CDX2 表达与预后的关系[J].中华全科医学,2012,10(3):345-347.
- [13] ZHANG J, KOU Y B, ZHU J S, et al. Knockdown of HMGB1 inhibits growth and invasion of gastric cancer cells through the NF- κ B pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(4):1268-1276.

(本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)