文章编号:1000-5404(2006)05-0441-03

论著

Reg Ⅳ在胃癌中的表达及其临床意义

马 华,梅 峰,马千里,张红军,周德山 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要: 目的 检测 Reg Ⅳ蛋白在人胃癌组织中的表达与分布,探讨其作为胃癌检测标志物的可能性。**方法** 免疫组织化学染色检测26例临床胃癌组织及10例正常胃组织中 Reg Ⅳ蛋白的表达。**结果** Reg Ⅳ蛋白在正常胃组织表达阴性(0/10),在胃癌组织表达阳性率为42.31%(11/26),具有显著的统计学意义($P<0.05$);Reg Ⅳ蛋白在Ⅰ/Ⅱ期胃癌中表达阴性(0/3),而在Ⅰ/Ⅱ期胃癌中表达阳性率为47.83%(11/23),二者差异有显著统计学意义($P<0.05$)。但 Reg Ⅳ蛋白的表达与胃癌分化程度及有无淋巴结转移等无明显的差异($P>0.05$)。**结论** Reg Ⅳ蛋白在胃癌中表达较高,约50%左右,主要为Ⅰ/Ⅱ期胃癌,提示 Reg Ⅳ蛋白可能与胃癌的生长侵袭等有关,作为浸润癌的病理诊断具有一定的实际意义。

关键词: 胃癌;Reg Ⅳ;免疫组织化学
中图法分类号: R341; R730.2; R735.2 **文献标识码**: A

Expression of Reg Ⅳ protein in human gastric carcinoma and its clinical significance

MA Hua, MEI Feng, MA Qian-li, ZHANG Hong-jun, ZHOU De-shan (Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Millitary Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study expression and distribution of Reg Ⅳ protein in human gastric carcinoma and the potential possibility that Reg Ⅳ protein becomes a maker of gastric carcinoma. **Methods** The immunohistochemical staining of Reg Ⅳ protein was performed in 26 specimens of human gastric carcinoma and 10 paraneoplastic specimens as controls. **Results** Reg Ⅳ protein was negative in 10 paraneoplastic specimens but positive in 11 of 26 (42.31%) cases of gastric carcinoma tissues, with statistical significance between paraneoplastic specimens and controls ($P<0.05$). Reg Ⅳ protein highly expressed in Ⅲ/Ⅳ stage of gastric carcinoma (47.83%) but not expressed in Ⅰ/Ⅱ stage, with significant difference between Ⅰ/Ⅱ and Ⅲ/Ⅳ stage ($P<0.05$). The expression of Reg Ⅳ protein was not correlated with differentiation grades, lymph node metastasis ($P>0.05$). **Conclusion** Approximately 50% of gastric carcinoma tissues overexpressed Reg Ⅳ protein, mainly in Ⅲ/Ⅳ stage, indicating Reg Ⅳ protein may be involved in growth and invasion of gastric carcinoma and can be as a maker for pathological diagnosis of gastric carcinoma.

Key words: gastric carcinoma; Reg Ⅳ protein; immunohistochemistry

胃癌的发病率为亚太地区各类恶性肿瘤之首,预后较差,居癌症死亡原因的第三位[1]。早期诊断,合理选择治疗方案及监测肿瘤复发、转移是提高胃癌患者生存率的最佳方法,然而目前尚缺乏特异性高,与胃癌生长相关的标志物。近年,研究者对胃癌进行了一系列基因表达综合分析,筛选出若干候选基因,如 Reg Ⅳ(regenerating islet-derived family, member 4)、S100 钙结合蛋白、TFF_3等[2,3],其中,Reg Ⅳ 备受关注。Reg Ⅳ为再生基因(regenerating gene,REG 或 Reg)家族最新成员,在正常胃肠道及胰腺表达水平非常低,炎症或肿瘤时,可见原位或异位高表达[4]。应用基因表达序列分析(serial analysis of gene expression,SAGE)、cDNA 芯片及定量 RT-PCR 等基因水平研究结果表明,Reg Ⅳ mRNA 在胃癌的表达频率较高,可能与胃癌的浸润及腹膜播散等有关,但 Reg Ⅳ蛋白在胃癌的表达研究报道较少[5-7]。因此,本研究采用免疫组织化学染色法检测 Reg Ⅳ蛋白在胃癌及正常胃组织中的表达,为阐明 Reg Ⅳ与胃癌的关系,探讨 Reg Ⅳ蛋白在胃癌中的作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 来自我校西南医院和新桥医院普通外科手术切除新鲜胃癌标本(26例),同一患者距肿瘤约3~5 cm的非胃癌组织(10例)。患者年龄30~77岁,平均56岁;男性14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30570983)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30570983)
作者简介:马 华(1980-),女,四川省巴中市人,硕士研究生,主要从事肿瘤微转移方面的研究。电话:(023)68752229
通讯作者:周德山,电话:(023)68752230
收稿日期:2005-11-21;**修回日期**:2005-12-06

例，女性 12 例。病理学诊断为：高分化腺癌 7 例，中分化腺癌 8 例，低分化腺癌 11 例。按国际抗癌联盟（UICC）TNM 分期标准划分：Ⅰ期 1 例，Ⅱ期 2 例，Ⅲ期 11 例，Ⅳ期 12 例。

1.1.2 主要试剂 羊抗人 Reg Ⅳ 多克隆抗体（R&D systerms）；HRP 标记兔抗羊 IgG 抗体（DAKO）；DAB（SIGMA）。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化染色 将胃癌手术标本置于冰上，经预冷的生理盐水反复冲洗后，OCT 包埋，液氮速冻，恒冷箱冰冻切片机切片，厚 7 μm，风干。Reg Ⅳ蛋白免疫组化染色为间接酶标抗体法[8]。简述如下：4% 多聚甲醛固定 15 ~ 20 min（25℃）；0.03 % H_2O_2/甲醇封闭内源性过氧化物酶 20 min（25℃），1% BSA 孵育 30 min（室温），羊抗人 Reg Ⅳ 多克隆抗体（1∶30），4 ℃，48 ~ 72 h，HRP 标记的兔抗羊 IgG 抗体（1∶100）25 ℃，90 min，0.05% Tris-HCl/ 0.05% DAB/0.01% H_2O_2（pH 7.5）显色，镜下观察，适时终止反应，终产物为棕黄色，水溶性封片剂封片；各步骤间用 PBS 充分漂洗。分别以正常羊血清代替一抗，或兔血清代替二抗作阴性对照。

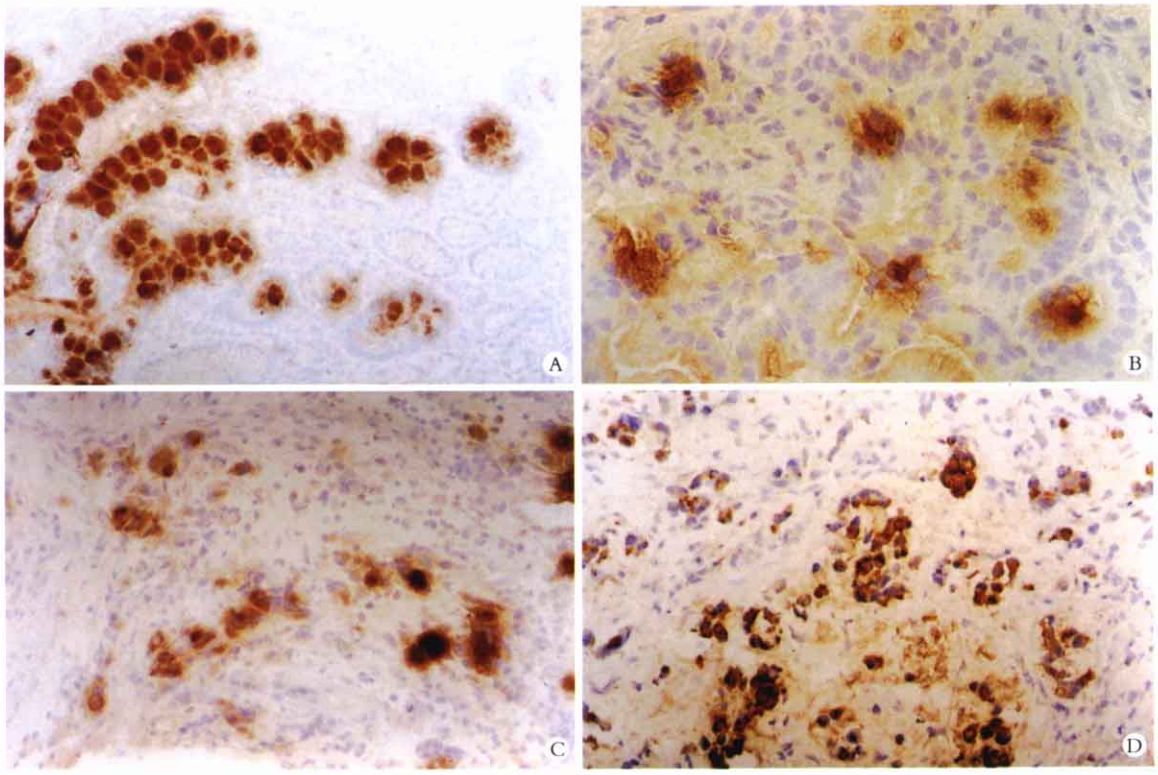
1.2.2 结果判断 Reg Ⅳ免疫组化阳性反应为细胞质着色，呈棕黄色，苏木精复染后细胞核呈蓝色。胃癌组织切片中，超过 10% 的肿瘤细胞染色，而无显著的间质细胞着色者为阳性。

1.3 统计学分析

用 SPSS 11.0 软件，Fish's 确切概率法（双侧）检验胃癌组织与正常胃组织 Reg Ⅳ蛋白表达的差异，列联表分析 Reg Ⅳ蛋白表达与临床病理因素的关联（包括 P_{uc}：不是系数，反映当用一个变量值预测另一个变量值时的误差几率）。

2 结果

光镜下，Reg Ⅳ蛋白阳性染色呈深棕色或棕黄色，位于细胞质。阳性细胞依肿瘤浸润深度可见于黏膜层、黏膜下层及肌层内等，形态为圆形、卵圆形、柱状及印戒状等。Reg Ⅳ蛋白属于分泌蛋白，在分化较好的癌腺上皮可见阳性分泌囊泡，Reg Ⅳ蛋白阳性染色产物位于分泌囊泡内、囊泡表面、腺管腔及细胞间隙等（图 1A、B）；低分化胃癌中，Reg Ⅳ蛋白阳性细胞呈弥散状排列，大量 Reg Ⅳ蛋白阳性染色位于胞外，细胞界限不清（图 1C）；此外，印戒状胃癌细胞均显示 Reg Ⅳ蛋白阳性（图 1D）。



A：高分化胃癌组织，Reg Ⅳ阳性染色位于癌细胞的分泌囊泡、管腔内及其细胞间隙 （IHC × 100）；B：中分化胃癌组织，Reg Ⅳ阳性染色位于管腔内和细胞间隙 （间接法 ×200）；C：低分化胃癌组织，可见癌细胞外有较多的 Reg Ⅳ蛋白阳性产物 （间接法 ×100）；D：印戒状胃癌，Reg Ⅳ阳性细胞聚集成团，细胞质丰富，细胞核偏向一侧 （间接法 ×100）

图 1 Reg Ⅳ蛋白在胃癌中的表达

Reg Ⅳ蛋白在胃癌组织和正常胃组织的表达差异 10 例正常胃组织 Reg Ⅳ表达均为阴性，而 26 例胃癌组织中 Reg Ⅳ蛋白阳性为 11 例（42.31%）。二者间有显著的统计学差异（$P < 0.05$）。

Reg Ⅳ蛋白与胃癌患者临床病理因素的相关性按胃癌分期，分化及有无淋巴结转移等分组，发现 Reg Ⅳ蛋白在 Ⅰ/ Ⅱ期胃癌 3 例均为阴性，而在Ⅲ/ Ⅳ期胃癌的阳性率为 47.83%（11/23），P_{uc}值为 0.05，提示其可能与胃癌的进展有关。Reg Ⅳ蛋白表达与胃癌分化及有无淋巴结转移等无显著相关（$P > 0.05$）（表 1）。

表 1　Reg Ⅳ与胃癌临床病理特征

	Reg Ⅳ		
	+	−	*P*
T			
T_1	1	1	
$T_{2/3/4}$	10(41.67%)	14	0.33
N			
N_0	1	2	
$N_{1/2/3}$	10(43.48%)	13	0.50
TNM 分期			
Ⅰ/Ⅱ	0	3	0.11
Ⅲ/Ⅳ	11(47.83%)	12	
			0.05[a]
分化程度			
中/高分化	7(46.67%)	8	
低/未分化	4(36.37%)	7	0.27

a：*P*uc，uncertainty coefficient（不定系数，在 SPSS 11.0 列联表分析中，反映当用一个变量值预测另一个变量值时的误差比率）

3　讨论

再生基因家族属钙依赖植物血凝素超家族，目前共发现成员有 4 个：Reg Ⅰ、Reg Ⅱ、Reg Ⅲ及 Reg Ⅳ，各亚型表达于不同组织，其生物学功能亦明显不同[9]。Reg 家族在糖尿病、炎症损伤及肿瘤，尤其是消化道肿瘤中的作用受到越来越多的关注。Reg Ⅳ为 Reg 家族最新成员，人的 Reg Ⅳ基因位于 1 号染色体，属于单拷贝基因，有 5 个内含子及 6 个外显子，编码 158 个氨基酸，包括 22 个氨基酸的信号肽及一个保守的钙依赖碳氢化合物识别域[10]。组织芯片研究表明，Reg Ⅳ主要在消化系统表达，包括胃、小肠、结肠及胰腺。免疫荧光与原位杂交等研究进一步证明 Reg 选择性表达于肠黏膜的神经内分泌细胞及胃黏膜的壁细胞；炎症性肠病和胃溃疡等导致的黏膜损伤、再生及化生时，Reg Ⅳ表达明显升高[4]；Reg Ⅳ在胃肠道肿瘤的发生发展中亦可能具有重要作用。尽管多种正常组织可表达非常低水平的 Reg Ⅳ，但在结直肠腺癌、腺瘤中 Reg Ⅳ的表达明显增加，且与结肠癌的分化程度、分期及淋巴结转移相关[7,11]。在前列腺癌的研究中也显示 Reg Ⅳ mRNA 过度表达，与激素抵抗性前列腺癌的进展及转移有关[12]。Reg Ⅳ亦为胃癌上调基因之一，采用 RT-PCR 检测胃癌细胞系及临床胃癌标本中的 Reg Ⅳ，发现腹膜播散的胃癌细胞系及胃癌组织高表达 Reg Ⅳ mRNA，而且，mRNA 丰度与癌细胞浸润腹膜厚度成正比，提示 Reg Ⅳ基因的高表达可能与胃癌的发生、腹膜播散及侵袭能力有关[2,6]。本研究显示正常胃组织不表达 Reg Ⅳ，而胃癌组织阳性率为 42.31%，二者差异显著，这一结果较文献[7]报道的 29.4% 高，可能与本研究利用新鲜标本冰冻切片，抗原保存较石蜡包埋好有关。此外，我们还发现 Ⅰ/Ⅱ期胃癌不表达 Reg Ⅳ蛋白，而 Ⅲ/Ⅳ期胃癌阳性率为 47.83%，提示 Reg Ⅳ蛋白可能参与胃癌的生长侵袭等过程，作为临床病理诊断浸润性胃癌的标志物具有重要的参考价值。

有关 Reg Ⅳ蛋白的生物学功能目前所知较少，Zhang 等[11]报道 Reg Ⅳ mRNA 在结直肠腺瘤-癌进程中丰度最高，认为 Reg Ⅳ过度表达可能是结直肠癌发生的早期事件。Violette 等[12]研究结肠癌耐药相关基因发现 Reg Ⅳ mRNA 过度表达可能与结肠癌细胞对 5-氟尿嘧啶和甲氨蝶呤的耐药有关；Reg Ⅳ也可能通过抑制凋亡，参与肿瘤细胞的生长。Gu 等[13]对前列腺癌的研究亦表明 Reg Ⅳ在肿瘤生长、抑制凋亡方面具有一定作用。因此，进一步探讨 Reg Ⅳ蛋白的功能可为临床应用提供重要的实验依据。

参考文献：

[1] 蔡　琳，YANG B，PARKIN D M，等. 亚太若干地区恶性肿瘤流行趋势分析[J]. 肿瘤，2004，24(5)：422－426.

[2] YASUI W，OUE N，ITO R，*et al*. Search for new biomarkers of gastric cancer through serial analysis of gene expression and its clinical implications[J]. Cancer Sci，2004，95(5)：385－392.

[3] LEE J Y，EOM E M，KIM D S，*et al*. Analysis of gene expression profiles of gastric normal and cancer tissues by SAGE[J]. Genomics，2003，82(1)：78－85.

[4] KAMARAINEN M，HEISKALA K，KNUUTILA S，*et al*. RELP，a novel human REG-like protein with up-regulated expression in inflammatory and metaplastic gastrointestinal mucosa[J]. Am J Pathol，2003，163(1)：11－20.

[5] OUE N，HAMAI Y，MITANI Y，*et al*. Gene expression profile of gastric carcinoma：identification of genes and tags potentially involved in invasion，metastasis，and carcinogenesis by serial analysis of gene expression[J]. Cancer Res，2004，64(7)：2397－2405.

[6] MIYAGAWA K，SAKAKURA C，KIN S，*et al*. Over expression of Reg Ⅳ in peritoneal dissemination of gastric cancer[J]. Gan To Kagaku Ryoho，2004，31(11)：1909－1911.

[7] OUE N，MITANI Y，AUNG P P，*et al*. Expression and localization of Reg Ⅳ in human neoplastic and non-neoplastic tissues：Reg Ⅳ expression is associated with intestinal and neuroendocrine differentiation in gastric adenocarcinoma[J]. J Pathol，2005，207(2)：185－198.

[8] 梅　峰，于　彬，马　华，等. 豚鼠空肠吻合术后 ICCs 的再生及细胞网络再形成研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(5)：376－380.

[9] IOVANNA J L，DAGORN J C. The multifunctional family of secreted proteins containing a C-type lectin-like domain linked to a short N-terminal peptide[J]. Biochim Biophys Acta，2005，1723(1－3)：8－18.

[10] HARTUPEE J C，ZHANG H，BONALDO M F，*et al*. Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel member of the human regenerating protein family：Reg Ⅳ[J]. Biochim Biophys Acta，2001，1518(3)：287－293.

[11] ZHANG Y，LAI M，LV B，*et al*. Overexpression of Reg Ⅳ in colorectal adenoma[J]. Cancer Lett，2003，200(1)：69－76.

[12] VIOLETTE S，FESTOR E，PANDREA-VASILE I，*et al*. Reg Ⅳ，a new member of the regenerating gene family，is overexpressed in colorectal carcinomas[J]. Int J Cancer，2003，103(2)：185－193.

[13] GU Z，RUBIN M A，YANG Y，*et al*. Reg Ⅳ：a promising marker of hormone refractory metastatic prostate cancer[J]. Clin Cancer Res，2005，11(6)：2237－2243.

（编辑　薛国文）