基础研究 文章编号:0253-3626(2009)03-0277-04

maspin mRNA 和蛋白在胃癌中的表达及意义

陈爱军[1],易永芬[2],邓 玮[3]

(重庆医科大学 1. 附属第一医院皮肤科;2. 基础医学院病理学教研室,重庆 400016;
3. 重庆市第一人民医院病理科,重庆 400011)

【摘 要】目的:研究胃癌及正常胃黏膜中 maspin 的表达,并探讨其与临床病理特征的关系。方法:应用免疫组化 S-P 法检测胃管状腺癌(30 例)、胃印戒细胞癌(30 例)、正常胃黏膜组织(20 例)中 maspin 的蛋白表达水平;同时应用半定量逆转录酶链反应(RT-PCR)检测正常胃黏膜组织和胃癌组织中 maspin mRNA 的转录水平。结果:在胃管状腺癌、胃印戒细胞癌、正常胃黏膜组织中,maspin 蛋白阳性表达率分别为 50%、46.7%、90%。正常胃黏膜组织 maspin mRNA 相对表达量明显高于胃癌组织($P<0.01$)。maspin 蛋白的表达与侵润深度、淋巴结转移相关,而与肿块的大小和 TNM 分期无关。Maspin mRNA 的水平和蛋白的表达影响胃癌的润深度、淋巴结转移,而对肿块的大小和 TNM 分期无影响。结论:maspin 基因的蛋白和 mRNA 在胃癌中表达下调可能在胃癌的发生发展中起着重要的作用,maspin 的表达可能对胃癌的侵润转移具有抑制作用。

【关键词】胃癌;Maspin;免疫组织化学;逆转录聚合酶链反应

【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-05

The clinical-pathogical significance and the expression of maspin mRNA and protein in human gastric carcinoma

CHEN Ai-jun, et al

(*Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of maspin mRNA and protein in gastric cancer and the relationship between clnical pathological parameters. In order to explore their roles in tumorigenesis and progression of gastric cancer.*Methods*: Immunohistochemistry SP method was used to detemine expression of maspin in gastric adenocarcinoma, signet-ring cell carcinoma and normal gastric mucosa. The reverse transcriptase PCR was carried out to detect the level of maspin mRNA from the above mentioned 30 gastric adenocarcinoma and 20 normal samples. *Results*: The expression rate of maspin protein was 50% in gastric adenocarcinoma ,46.7% in signet-ring cell carcinoma, and 90% in normal gastric mucosa , respectively. The relative transcription level of maspin mRNA in normal gastric mucosa was higher than that in gastric adenocarcinoma .Maspin protein expression was significantly related to the depth of invasion and lymph node metastasis of gastric carcinoma, but did not relate to tumor size and TNM staging. The relative mRNA transcription level of maspin significantly correlated with the lymph node metastasis and the depth of invasion of carcinoma, but did not relate to TNM staging or tumor size. *Conclusion*: Down-regulated expression of maspin play an important role in gastric tumor. It may have inhibitory effects on invasion and metastasis of gastric tumor. Maspin might be objective indicator for pathobiological behaviors of gastric tumor.

【Key words】Gastric cancer; Maspin gene; Immunohistochemistry; RT-PCR

maspin 基因是丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族中的一种,研究显示,它在多种肿瘤中都具有抑制肿瘤活性的作用,且在肿瘤细胞的运动、侵袭,以及新生肿瘤血管形成等各个环节都发挥着重要的作用[1-3]。本研究应用免疫组化 S-P 染色法,检测 maspin 蛋白在胃管状腺癌、胃印戒细胞癌及正常胃黏膜组织中的表达;同时通过半定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)检测 maspin mRNA 在胃癌组织及正常胃黏膜组织中的含量,分析了 maspin 基因与胃癌的病理分型、分期、淋巴结转移等临床病理特征的关系,旨在探讨他们在胃癌发生发展中的生物学意义及相关的分子病理学机制。

作者介绍:陈爱军(1973-),男,博士,主治医师,
研究方向:皮肤肿瘤病理的研究。

通讯作者:易永芬,女,教授,E-mail:yiyongfen1953@yahoo.com.cn

基金项目:重庆市教委资助项目(040310)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本采集 收集本校附属第一医院 2004年 11 月至 2005 年 8 月手术切除（术前未化疗）的胃癌组织 60 例，其中胃管状腺癌 30 例，印戒细胞癌 30 例，正常胃黏膜组织 20 例（取自胃癌手术切除标本的正常切缘，切缘经组织学证实无癌组织侵润）；胃癌中肿块直径≥4 cm 36 例，<4 cm 24 例；侵及黏膜及黏膜下层者 8 例，侵及肌层者 13 例，侵及浆膜层者 39 例；有局部淋巴结转移者 36 例，无淋巴结转移者 24 例。按国际抗癌联盟 TNM 组织学分期标准：0~Ⅰ期 24 例，Ⅱ~Ⅳ期 36 例。一部分标本用 10%甲醛固定 24 h，常规石蜡包埋，连续切片（5 μm），用于免疫组织化学实验；另一部分置于灭菌的锡箔纸内，投入液氮罐内，随后放入深低温（-80℃）冰箱中保存备用，用于 RT-PCR 实验。

1.1.2 主要试剂 maspin 即用型鼠抗人单克隆抗体为美国 Neomaker 公司产品；SP 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司；Trizol、RNA 酶抑制剂、寡聚脱氧核苷 Oligo（dT）18、PCR 试剂盒、DNA 标准均为美国 Promega 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 检测 maspin mRNA 的表达 总 RNA 用 Trizol 提取，然后逆转录合成 cDNA 第 1 链。maspin 引物序列：上游 5'-CACTGGGCAATGTCCTCTTC-3'，下游 5'-TGGTCTGGTCG TTCACACTG-3'；β-actin 引物序列：上游 5'-ATTCCTATGTGGG CGACGAG-3'，下游 5'-AGAGGCGTACAGGGATAGCA-3'；按以下反应条件在 PCR 仪上进行扩增：94℃预变性 5 min，94℃复性 45 s，59℃退火 40 s，72℃延伸 40 s，共 35 个循环，72℃总延伸 5 min。PCR 产物在 1.5%的琼脂糖凝胶电泳中电泳，70 V 20 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，计算 maspin 产物与 β-actin 产物的比值为 maspin mRNA 在组织中表达的相对量。

1.2.2 免疫组化检测 maspin 蛋白的表达 采用免疫组化 S-P 法，maspin 为即用型抗体，稀释到 1∶100，PBS 代替一抗作阴性对照。maspin 蛋白定位于细胞质，以细胞质内出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。按阳性细胞所占百分比，并结合染色强度来计算评分，染色强度：0 为阴性，1 为弱阳性，2 为强阳性；阳性细胞数 0、<1%、<10%、<1/3、<2/3、>2/3 的积分分别为 0、1、2、3、4、5；两项之和 0~2 分为阴性（-），3~5 分为阳性（+），6~8 分为强阳性（++）。

1.3 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 χ^2 检验分析胃癌组织中 maspin 蛋白表达的免疫组化结果，Fisher 精确计算法分析 maspin 蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系，RT-PCR 结果进行 t 检验。

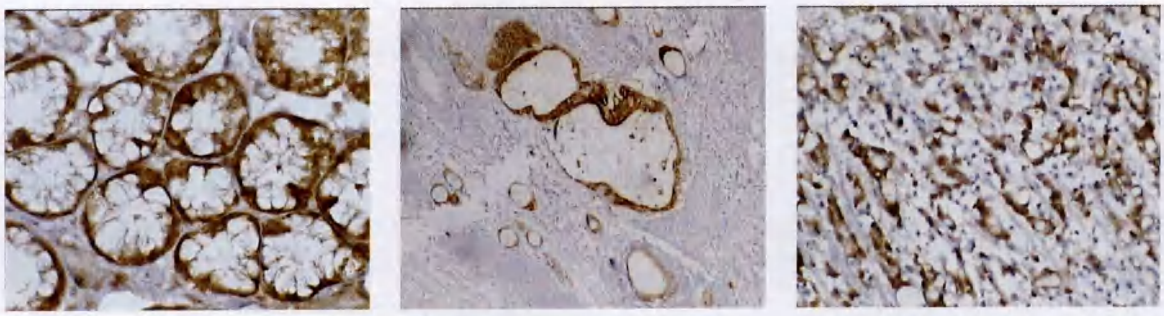
2 结 果

2.1 胃癌组织中 maspin 蛋白的表达

maspin 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（图 1）。在胃管状腺癌中 maspin 阳性表达率为 50%（15/30），其中 9 例（+），6 例（++），强阳性率为 20%（6/30）；胃印戒细胞癌中 maspin 阳性表达率为 46.7%（14/30），其中 10 例（+），4 例（++），强阳性率为 13.3%（4/30）；正常胃黏膜组织中 maspin 阳性表达率为 90%（18/20），其中 5 例（+），13 例（++），强阳性率为 65%（13/20）。正常胃黏膜组织中 maspin 阳性表达率和阳性表达强度明显高于胃管状腺癌和胃印戒细胞癌（$P<0.05$），而胃管状腺癌和胃印戒细胞癌之间 maspin 阳性表达率无统计学意义（$P>0.05$）。

2.2 maspin 蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系

maspin 的阳性表达率与肿瘤的大小、TNM 分期无明显关系（$P>0.05$），而浸润深度与 maspin 的阳性表达率有相关性，侵及黏膜和黏膜下、肌层、浆膜层者阳性率分别为 75%（6/8）、61.5%（8/13）、38.5%（15/39），三者间差异有统计学意义（$P<0.05$）。无淋巴结转移者 maspin 的阳性表达率为 66.6%（16/24），有淋巴结转移者为 36.1%（13/36），前者明显高于后



A. 正常胃黏膜的阳性表达（×400）；B. 胃管状腺癌的强阳性表达（×200）；C. 胃印戒细胞癌的强阳性表达（×400）

图 1 免疫组化法观察 maspin 在正常胃黏膜组织、胃癌组织中的表达（S-P）

者($P<0.05$,表 1)。

2.3 正常胃黏膜组织与胃癌组织中 maspin mRNA 表达

本组正常胃黏膜组织 20 例,光密度比值(maspin/β-actin)为(0.793 3±0.320 2);而胃癌组织(管状腺癌和印戒细胞癌一共 30 例)的光密度比值为(0.527 8±0.147 7)。胃癌组织 maspin mRNA 相对表达量显著低于正常组织($P=0.002<0.01$,表 2,图 2)。

2.4 胃癌组织中的 maspin mRNA 表达与临床病理特征的关系

胃癌组织无淋巴结转移者 maspin mRNA 相对表达量显著高于有淋巴结转移者($P<0.01$)。浸润深度达黏膜及黏膜下的 maspin mRNA 相对表达量显著高于浸润深度达浆膜层($P<0.01$)。maspin mRNA 相对表达量对肿瘤的大小和 TNM 分期无影响(表3、图 3)。

3 讨 论

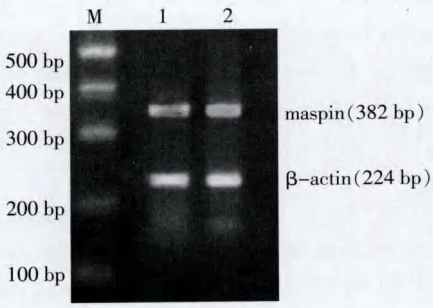
maspin 基因是一种新发现的丝氨酸蛋白酶抑制剂,它是常染色体基因,位于 18q21.3~q23 上,此位点被称为是丝氨酸蛋白酶抑制剂集落。研究表

表 1 胃癌组织 maspin 蛋白表达与临床病理特征的关系

	肿块大小		侵润深度			淋巴结转移		TNM 分期	
	<4 cm	≥4 cm	黏膜、黏膜下	达肌层	达浆膜层	无	有	0~Ⅰ期	Ⅱ~Ⅳ期
n	24	36	8	13	39	24	36	24	36
maspin	13	16	6	8	15	16	13	13	16

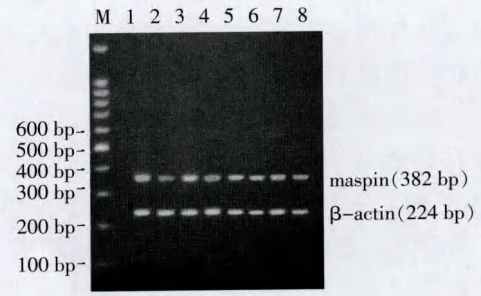
表 2 正常胃黏膜组织和胃癌组织中 maspin mRNA 的表达

	例数	Maspin/β-actin	P
正常胃黏膜	20	0.793 3 ± 0.320 2	$P=0.002<0.01$
胃癌组织	30	0.527 8 ± 0.147 7	



M. DNA 标准;1. 胃癌组织;2. 正常胃黏膜组织

图 2 胃癌组织和正常胃黏膜组织中 maspin mRNA 的表达



M. DNA 标准;1. 浸润达黏膜及肌层;2. 浸润达浆膜层 3. 无淋巴结转移;4. 有淋巴结转移;5. 肿瘤直径大于 4 cm;6. 肿瘤直径小于 4 cm;7. TNM 0~Ⅰ期;8. Ⅱ~Ⅳ期

图 3 不同临床病理特征的胃癌组织中 maspin mRNA 的表达

表 3 胃癌组织中的 maspin mRNA 表达与临床病理特征的关系

临床病理特征	例数		maspin/β-actin	*P* 值
肿瘤直径	<4 cm	12	0.559 9 ± 0.108 9	0.340
	≥4 cm	18	0.506 4 ± 0.168 3	
侵润深度	达黏膜及肌层	19	0.591 2 ± 0.117 3	0.001
	达浆膜层	11	0.418 4 ± 0.132 9	
淋巴结转移	无	17	0.593 5 ± 0.135 8	0.003
	有	13	0.442 0 ± 0.123 1	
TNM 分期	0~Ⅰ期	14	0.538 7 ± 0.132 1	0.712
	Ⅱ~Ⅳ期	16	0.518 3 ± 0.163 8	

明,maspin 在多种正常细胞如乳腺、阴道、前列腺、皮肤的上皮细胞中高表达[4,5],而在癌细胞如口腔鳞癌、乳腺癌中表达下调或缺失[6,7],且 maspin 在肿瘤的浸润转移的各个环节中起着重要的作用:maspin 能改变细胞表面粘合素的结构增强细胞对细胞外基质的粘附能力,影响细胞内的信号传导,使细胞向更良性表型转化[8]; maspin 能有效阻止内皮细胞对血管生长因子的反应, 抑制内皮细胞的生长,阻止其形成管道状结构,使肿瘤微血管的密度减少[9], maspin 这一作用主要是依赖-NH_2 端的活性部位,此外 maspin-NH_2 端结构还可与Ⅰ、Ⅲ型胶原结合,增加细胞的粘附能力,阻止肿瘤细胞的转移和血管形成[10];最近的研究表明 maspin 还可以通过调节小 G 蛋白 Rac1 和 PAK1(p21-活性激酶)的活性来抑制细胞的运动,通过磷酰肌醇-3 激酶和细胞外信号调节激酶途径来调节细胞的黏附[11]。

本实验检测了正常胃黏膜和胃癌中 maspin 蛋白及其 mRNA 的表达水平,从蛋白表达和基因转录水平探讨 maspin 基因在肿瘤浸润和转移中的作用。我们的结果显示胃癌 maspin mRNA 相对表达量显著低于正常胃黏膜;蛋白水平研究亦表明,总趋势是正常胃黏膜中 maspin 蛋白的阳性表达率明显高于胃管状腺癌和胃印戒细胞癌,但由于肿瘤的异质性少数病例亦出现强阳性表达,而胃管状腺癌和胃印戒细胞癌之间的阳性表达率无显著差异。提示 maspin 可能在胃癌的发生发展中有一定的抑癌作用,而转录水平的表达下调可能是 maspin 在肿瘤组织中表达下调的原因之一,在胃癌细胞增殖过程中,maspin 转录活性减弱导致 maspin 蛋白产物减少,抑癌功能下调,从而使得肿瘤发生浸润、转移。maspin 蛋白和 mRNA 的下调可能与启动子的甲基化、染色体的自身浓缩和转录因子失活有关。有作者认为,表达 maspin 基因的正常细胞,其 maspin 启动子是非甲基化的,在癌细胞中 maspin 的启动子出现 cytosine 甲基化,maspin 启动子甲基化能阻止具有正向调节作用的转录因子如 P53、Ets、Ap1 对其相应位点的识别和结合,但应用甲基化抑制剂后,maspin 重新表达[11]。也有作者报道,正常上皮细胞中去除 Ets 位点后,maspin 活性降低 50%,说明 Ets 可上调 maspin 的表达,但在肿瘤细胞中 Ets 丧失此活性;Ets 还可和 Ap1 协同作用,激活启动子转录,而在癌细胞中 Ets 和 Ap1 正调节作用减弱,maspin 表达降低[12]。而Zou 等[13]研究指出,在肿瘤中常有 18q 的缺失,而maspin 基因正位于此臂上,因此染色体臂的缺失可能是导致 maspin 表达降低的原因之一。

本研究显示胃癌中 maspin 的表达与肿瘤的大小、TNM 分期无关,与淋巴结转移和侵润深度有关,随着胃癌侵润深度增加、淋巴结的转移 maspin 蛋白和 mRNA 表达下调, 这提示 maspin 作为肿瘤转移抑制基因在胃癌的侵润和转移中起着重要的抑制作用。有研究表明所有 maspin 蛋白高表达患者无一例出现淋巴结转移[14],且缺乏 maspin 表达者生存率明显下降。Machtens 等[15]对前列腺癌患者随访中发现,maspin 为阴性或下调患者中 58%发生转移,而 maspin 稳定表达患者中仅 18%发生局部复发或转移,其生存率明显高于前者,maspin 可用于对前列癌的预后的预测。但 maspin 与胃癌的预后的关系未见报道,本实验显示胃癌中 maspin 表达低者淋巴结转移率高,侵润程度深。提示 maspin 可作为判断预后的指标之一。

参 考 文 献

[1] Weiguo Zhang, Nathalie Cella, Heidi Y. Shi, et al. Maspin Mediates Increased Tumor Cell Apoptosis upon Induction of the Mitochondrial Permeability Transition[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(5): 1737-1748.

[2] Michael L. Cher, Hector R. Biliran, Jr., et al. Maspin expression inhibits osteolysis, tumor growth, and angiogenesis in a model of prostate cancer bone metastasis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(13): 7847-7852.

[3] 梁启廉,陈小东,王三明,等. VEGF 和抑痛基因 masRin 在胃癌组织中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(4): 1416-1418.

[4] Toillon RA, Lagadec C, Page A, et al. Proteomics Demonstration That Normal Breast Epithelial Cells Can Induce Apoptosis of Breast Cancer Cells through Insulin-like Growth Factor-binding Protein-3 and Maspin [J]. Mol Cell Proteomics, 2007, 6(7): 1239-1247.

[5] Nash J W, Bhardwaj A, Wen P, et al. Maspin is useful in the distinction of pancreatic adenocarcinoma from chronic pancreatitis: a tissue microarray based study[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2007, 15(1): 59-63.

[6] Song S Y, Son H J, Kim M H, et al. Prognostic significance of maspin expression in human gastric adenocarcinoma[J]. Hepatogastroenterology, 2007, 54(75): 973-976.

[7] Friedrich M G, Toma M I, Petri S, et al. Expression of Maspin in non-muscle invasive bladder carcinoma: correlation with tumor angiogenesis and prognosis adenocarcinoma[J]. Eur Urol, 2004, 45(6): 737-743.

[8] Odero-Marah VA, Khalkhali-Ellis Z, Chunthapong J, et al. Maspin regulates different signaling pathways for motility and adhesion in aggressive breast cancer cells adenocarcinoma[J]. Cancer Biol Ther,

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)03-0281-04

肾细胞癌组织与正常组织中 VEGF165b 的差异表达及其意义

姜翠苹,王德林,彭 波
（重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016）

【摘 要】目的:研究血管内皮生长因子 165b(Vascular endothelial growth factor 165b,VEGF165b)在肾细胞癌(Renal cell carcinoma,RCC)组织和正常组织中的表达情况,初步探讨其与肾细胞癌发生发展的关系。方法:(1)用 S-P 免疫组化法检测 30 例肾细胞癌组织和 29 例正常肾组织中 VEGF165b 蛋白的表达情况;(2)用 RT-PCR 法分别检测 32 例肾细胞癌组织和 30 例正常肾组织中 VEGF165b mRNA 的表达情况。结果:(1)正常肾组织中 VEGF165b 蛋白表达率为 96.55%(28/29),肾细胞癌组织中 VEGF165b 蛋白的表达率为 20.00%(6/30),表达差异有统计学意义($P<0.05$)。(2)正常肾组织中 VEGF165b mRNA 阳性表达率为 93.33%(28/30),肾细胞癌组织中 VEGF165b mRNA 的阳性表达率为 18.75%(6/32),具有统计学意义($P<0.05$)。结论:VEGF165b 在肾细胞癌组织中的表达低于正常肾组织的表达,这种表达差异可能与肾癌发生、发展的机制有关。

【关键词】肾肿瘤;VEGF165b;免疫组织化学;逆转录 - 聚合酶链反应(RT-PCR)
【中国图书馆分类法分类号】R737.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-09

The differential expression of VEGF165b in the renal cell carcinoma and normal renal tissues and its clinical significance

JIANG Cui-ping, et al
(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the differential expression of VEGF165b in the renal cell carcinoma (RCC) and normal renal tissues and its role in the development of RCC. *Methods*: S-P immunohistochemistry was used to detect the expression of VEGF165b protein in 30 specimens of paraffin-embedded RCC tissues and 29 specimens of paraffin-embedded normal renal tissues. RT-PCR was performed to detect the expression of VEGF165b mRNA in 32 specimens of fresh RCC tissues and 30 specimens of fresh normal renal tissues. *Results*: Among 29 of normal renal tissues, 28 specimens had positive expression of VEGF165b protein, with the positive rate of 96.55% (28/29) that was significantly higher than 20.00% (6/30) in RCC tissues ($P<0.05$). The positive rate of VEGF165b mRNA in normal renal tissues was 93.33%(28/30), while that of RCC tissues was only 18.75% (6/32). The positive expression rate of VEGF165b mRNA in RCC tissues was significantly lower than that in normal renal tissues ($P<0.05$). *Conclusion*: VEGF165b might play a role in inhibiting development of RCC. Vascular endothelial growth factor 165b,

【Key words】Kidney neoplasms; Vascular endothelial growth factor 165b; Immunohistochemistry; Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

作者介绍:姜翠苹(1980-),女,硕士,
研究方向:泌尿系肿瘤,女性泌尿系疾病。
通讯作者:王德林,男,副教授,E-mail: dlwangws@sina.com。
基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(CSTC2005BB5033)。

2003,2(4):398-403.

[9] Milde-Langosch K, Roder H, Andritzky B, et al. The role of the AP-1 *transcription factors* c-Fos, FosB, Fra-1 *and* Fra-2 *in the invasion* process of mammary carcinomas[J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 86(2): 139-152.

[10] Blacque OE, Worrall DM. Evidence for a direct interaction between the tumor suppressor serpin, maspin, and types Ⅰ and Ⅲ collagen[J]. J Biol Chem, 2002, 277(13): 10783-10788.

[11] Ito R, Nakayama H, Yoshida K, et al. Loss of maspin expression is associated with development and progression of gastric carcinoma with p53 abnormality[J]. Oncol Rep, 2004, 12(5): 985-990.

[12] Zhang M, Magit D, Sager R. Expression of maspin in prostate cells is regulated by a positive ets element and a negative hormonal responsive element site recognized by androgen receptor[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(11): 5673-5678.

[13] Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, et al. Maspin, *a serpin with* tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells[J]. Science, 1994, 263(5146): 526-529.

[14] Xia W, Lau YK, Hu MC, et al. High tumoral maspin expression is associated with improved survival of patients with oral squamous cell carcinoma[J]. Oncogene, 2000, 19(20): 2398-2403.

[15] Machtens S, Serth J, Bokemeyer C, et al. Expression of the p53 and Maspin protein in primary prostate cancer correlation with clinical features [J]. Int J Cancer, 2001, 95(5): 337-342.

(责任编辑:关蕴良)