DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.05.012


论著

文章编号:1000-5404(2004)05-0402-03

# NHE1蛋白在胃癌和胃癌前病变中的表达及临床意义

滕小春[1],刘海峰[1],刘永生[2],段 丽[2],王国安[1],何俊堂[1] ([1]第三军医大学西南医院全军消化内科中心,重庆 400038;[2]重庆市第八人民医院,重庆 400015)

提 要:目的 检测NHE1蛋白在胃癌和胃癌前病变中的表达情况,初步探讨NHE1蛋白在胃粘膜癌变过程中的变化规律及其临床意义。方法 采用免疫组织化学方法检测NHE1蛋白在胃癌和胃癌前病变中的表达,其中正常胃粘膜15例,慢性萎缩性胃炎15例,肠上皮化生15例,异型增生8例,胃癌40例。结果 15例正常胃粘膜无表达,15例慢性萎缩性胃炎中有2例表达,阳性率为13.33%,15例肠上皮化生中有3例表达,阳性率为20.00%,8例异型增生中有2例表达,阳性率为25.00%,40例胃癌中有33例表达,阳性率为82.50%,胃癌与正常胃粘膜和各型胃癌前病变相比,具有显著性差异($P<0.01$)。结论 NHE1蛋白在胃癌的表达显著高于正常胃粘膜和胃癌前病变,可能与胃癌的发生、生长、转移有着密切的关系。

关键词:NHE-1蛋白;胃肿瘤;癌前病变
中图法分类号:R341;R730.23;R735.2 文献标识码:A

# Expression of $Na^+$-$H^+$ exchanger-1 in gastric carcinoma and precancerous lesion and its clinical significance

TENG Xiao-chun[1], LIU Hai-feng[1], LIU Yong-sheng[2], DUAN Li[2], WANG Guo-an[1], HE Jun-tang[1] ([1]Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]No. 8 People's Hospital, Chongqing 400015, China)

**Abstract:** **Objective** To detect the expression of $Na^+$-$H^+$ exchanger-1 (NHE1) protein in gastric carcinoma and precancerous lesion for the purpose of understanding the changes of NHE1 protein expression in the course of gastric cancer development and its clinical significance. **Methods** The NHE1 protein expression in 15 cases of normal gastric mucosa, 15 cases of chronic atrophic gastritis, 15 cases of intestinal metaplasia, 8 cases of abnormal hyperplasia, and 40 cases of gastric carcinoma was detected by immunohistochemical method. **Results** No expression of NHE1 was found in the 15 normal gastric mucosa. NHE1 expression was found in 2 cases out of the 15 cases of chronic atrophic gastritis (13.33%), 3 out of 15 cases of intestinal metaplasia (20.00%), 2 out of 8 cases of abnormal hyperplasia (25.00%), and 33 out of 40 cases of gastric carcinoma (82.50%). Compared with that in normal gastric mucosa and precancerous lesion, NHE1 increased significantly in gastric carcinoma ($P<0.01$). **Conclusion** The significantly increased NHE1 expression in gastric carcinoma and precancerous lesion may be closely associated with the genesis, development, and metastasis of gastric carcinoma.

**Key words:** NHE-1 protein; gastric neoplasm; precancerous lesion

胞膜离子交换蛋白$Na^+$-$H^+$交换泵($Na^+$-$H^+$ exchanger, NHE)是存在于所有真核细胞的一种跨膜蛋白。自1989年Sardet实验室成功克隆人类NHE1cDNA以来[1],到目前为止,人们已知NHE有7个亚型,分别命名为NHE1~7,他们在结构上相似,功能上相关,共同构成膜交换蛋白的一个基因家族[2]。不同的亚型,其数量不同,分布各异。NHE1定位在质膜上,主要存在于人类,是一种管家基因,定位于1P35.36座位上,mRNA为3.8 kb。存在于所有组织中,对氨氯吡咪(amiloride)高度敏感。NHE是细胞内pH值(Intracellular pH, pHi)调节的一种重要要机制之一。pHi稳定是维持细胞正常功能的前提,当细胞内出现酸化时,随着酸化程度的加深,细胞可出现凋亡和坏死[3]。近年来研究表明,NHE在肿瘤细胞中的活性和mRNA表达

基金项目:第三军医大学科研基金资助项目(2002)
Supported by the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (2002)
作者简介:滕小春(1970-),男,四川省阆中市人,硕士研究生,主治医师,主要从事胃癌发病机制方面的研究。电话:(023)65399049
通信作者:刘海峰,电话:(023)68754678
收稿日期:2003-05-01;修回日期:2003-09-21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

水平明显增高, 与肿瘤的发生有着密切的关系。NHE1 在胃癌和胃癌前病变中的表达变化情况少见文献报道。本研究采用免疫组化的方法对不同胃粘膜病变中的 NHE1 蛋白表达情况进行检测, 探讨 NHE1 蛋白在胃粘膜癌变过程中的变化规律及其临床意义。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

90 例组织标本均取自我院 2000－2002 年胃镜活检标本及手术标本, 其中胃癌 40 例, 男 29 例, 女 11 例, 平均年龄 58.5 岁。慢性萎缩性胃炎 15 例, 男 9 例, 女 6 例, 平均年龄 43.7 岁。肠上皮化生 15 例, 男 8 例, 女 7 例, 平均年龄 47.4 岁。异型增生 8 例, 男 5 例, 女 3 例, 平均年龄 52.8 岁。正常胃粘膜 15 例, 男 8 例, 女 7 例, 平均年龄 36.8 岁。胃镜活检标本均取自胃窦部, 胃癌标本均为胃远端癌, 所有标本均经 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋, 4 μm 厚连续切片, 并经 HE 染色病理诊断证实。

### 1.2　方法

NHE1 蛋白表达的检测采用 S-P 法。S-P 试剂盒及 DAB 购自北京中山生物公司, 抗人 NHE1 抗体抗由加拿大 Noel 博士惠赠。其余试剂均为国产分析纯。染色方法参照试剂盒说明进行。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。主要实验步骤: 石蜡切片常规脱蜡至水。3% $H_2O_2$ 孵育 5 min, 以消除内源性过氧化物酶活性。蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min。10% 正常山羊血清封闭, 室温 10 min。倾去血清, 加入 1∶250 抗 NHE1 抗体, 4 ℃过夜。PBS 冲洗, 5 min × 3 次。滴加生物素标记的二抗, 37 ℃孵育 10 min。PBS 冲洗, 5 min× 3 次。滴加辣根酶标记的链霉卵白素, 37 ℃孵育 10 min。PBS 冲洗, 5 min× 3 次。DAB 显色。自来水充分冲洗。复染, 透明脱水, 封片。

### 1.3　结果评定

评定方法为定位定性法, 光学显微镜下观察组织切片的显色反应, NHE1 蛋白阳性反应物质呈棕黄色, 主要位于细胞膜及细胞质内, 细胞核不着色。数 5 个以上高倍视野, 不少于 500 个细胞, 计数阳性细胞并以百分数表示。标本无阳性反应细胞、阳性反应细胞少于 10% 或背景同空白对照为阴性, 阳性反应细胞> 10% 为阳性。

### 1.4　统计学处理

统计阳性标本例数, 计算阳性率, 用 $\chi^2$ 检验。

## 2　结果

NHE1 蛋白在正常胃粘中无表达, 在胃癌和癌前病变(慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生、异型增生)中有不同程度的表达。40 例胃癌组织中, NHE1 蛋白在 33 例中有不同程度的表达表达, 阳性率为 82.50%(图 1)。15 例慢性萎缩性胃炎中有 2 例 NHE1 蛋白表达呈阳性, 阳性率为 13.33%。15 例肠上皮化生中有 3 例表达呈阳性, 阳性率为 20.00%。8 例异型增生中有 2 例表达呈阳性, 阳性率为 25.00%。15 例正常胃粘膜中 NHE1 蛋白无表达。NHE1 蛋白在胃癌组织中表达率显著高于胃癌前病变及正常胃粘膜组织, 具有显著性差异($P<0.01$), 见表 1。

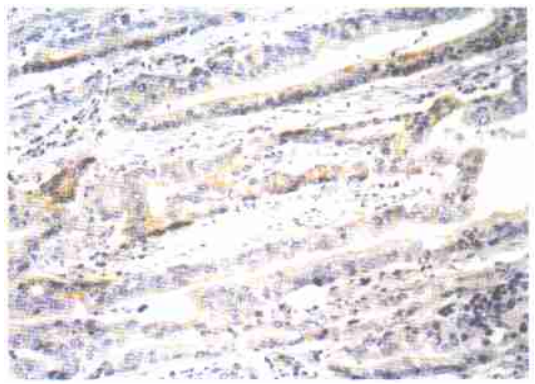


图 1　NHE-1 蛋白在胃癌细胞膜中的表达　(S-P× 200)

**Fig 1　Expression of NHE1 protein in cell membrane of gastric carcinoma cells**　(S-P× 200)

表 1　NHE1 蛋白在胃癌和癌前病变中的表达情况

**Tab 1　Expression of NHE1 in gastric carcinoma and precancerous lesion**

| Type of lesion | *n* | NHE1 positive expression | |
|---|---|---|---|
| | | *n* | percentage (%) |
| Normal gastric mucosa | 15 | 0 | 0.00 |
| Chronic atrophic gastritis | 15 | 2 | 13.33 |
| Intestinal epidermal metaplasia | 15 | 3 | 20.00 |
| Dysplasia | 8 | 2 | 25.00 |
| Gastric carcinoma | 40 | 33 | 82.50 * |

*: $P<0.01$, *vs* precancerous lesion and normal gastric mucosa

## 3　讨论

肿瘤细胞糖酵解优势, 导致肿瘤细胞产生大量的乳酸和 $H^+$。长期以来, 人们一直认为肿瘤细胞内 pH 比正常细胞更偏酸性, 但用核磁共振波谱等技术证明肿瘤细胞内 pH 为中性或偏碱性, pHi 为 7.0～7.2, 而细胞间 pH: 为 6.5～7.0, 这种 pH 值内高外低的形成主要是由于细胞膜 NHE 的激活和 mRNA 表达增加, 从而使肿瘤细胞进行强大的 $Na^+$-$H^+$ 交换, 将大部分 $H^+$ 泵出细胞外, 形成肿瘤细胞组织间液的酸性环境, 保持肿瘤细胞内 pH 为中性或偏碱性, 从而使肿瘤细胞免遭凋亡[4,5]。因此, 肿瘤细胞应当存在某种机制将胞内大量的酸性产物排出细胞外, 以维持内环境稳定及糖酵解运作。目前已经明确胞膜离子交换蛋白 $Na^+$-$H^+$ 交换泵 ($Na^+$-$H^+$ exchanger, NHE)是细胞内 pH 值(Intracellular pH, pHi)调节的主要机制之一, 肿瘤细胞通过上调 NHE 的表达, 阻止细胞内酸化, 得以维持抗凋亡生长的特性。

胃癌的发生是一个长期的、多阶段的、多基因改变的复杂的过程, 是遗传和环境因素以协同或序贯的方式引起遗传物质 DNA 损伤、突变, 同时伴多个癌基因激活和肿瘤抑制基因失活, 是正常细胞不断增生、转化而形成的。目前对肿瘤细胞 NHE1 基因的研究主要在癌细胞株进行, 例如在人肝癌细胞株 HepG2 中, 已检测到 NHE1 mRNA 的转录拷贝数比正常肝细胞显著增高[6], 而在组织中研究较少。本实验采用免

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

疫组化的方法研究结果显示,NHE1 蛋白在胃癌中的表达程度明显高于胃癌前病变及正常胃粘膜。在慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生、异型增生部分可检测到 NHE1 活性的表达,随着病变程度的增加,NHE1 蛋白表达亦有增加的趋势,提示 NHE1 活化的细胞,可能是一种癌前细胞。NHE1 蛋白在胃癌组织中表达显著高于胃癌前病变及正常胃粘膜组织,提示人胃癌细胞通过上调 NHE1 的表达,增加胞膜上 NHE1 的数量分布,从而加强 $Na^+$-$H^+$ 交换,将大部分 $H^+$ 排出胞外,这可能是其在体内条件下细胞内 pH 调节的主要分子机制之一,这样不仅能防止细胞内酸化,也导致了细胞外 pH 的降低和酸性微环境的形成[7],可能对胃癌的抗凋亡生长特性是有利的,因为癌细胞的 NHE1 向胞外异常大量地排出 $H^+$,使交界的正常细胞长期处于不利生存条件之下,同时癌细胞强大的 $Na^+$-$H^+$ 交换耗费了过多的能量,进一步加速其对糖分的夺取和无氧糖酵解的运作,使正常细胞越来越难以竞争生长。据此,我们认为人胃癌细胞具有很强的 pHi 调解能力,NHE1 蛋白的超表达可能是其重要调节机制之一,并与胃癌的发生有着密切的关系。

NHE 是调节 pHi 的重要膜蛋白,其功能、结构、活性调节、转录逐渐被人们认识。近几年来,围绕 NHE1 为靶点的研究,引起人们的广泛兴趣,其目的是开发一种新的 NHE1 抑制剂,为肿瘤治疗提供新的方法。因此对胃癌细胞 NHE1 的研究,将为胃癌的基因治疗奠定理论基础,具有重要的理论意义和实践意义。

## 参考文献:


[1] Sardet C, Counillon L, Franchi A, *et al*. Growth factors induce the phosphorylation of the $Na^+/H^+$ antiporter aglycoprotein of 110 KD[J]. Science, 1990, 247(4993): 723—726.

[2] Putney L K, Denker S P, Barber D L. The changing face of the $Na^+/H^+$ exchanger: NHE1: Structure, regulation, and cellular actions[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002, 42(1): 527—552.

[3] Furlong I J, Ascaso R, Lopez-Rivas A, *et al*. Intracellular acidification induces apoptosis by stimulating ICE-like protease activity[J]. J Cell Sci, 1997, 110(Pt 5): 653—661.

[4] Lee A M, Jane R, Nanna K, *et al*. Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE1 compared with nontransformed astrocytes[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 278(4): C676—C688.

[5] Stephan J R, Antonia B, Valentina A, *et al*. Phosphoinositide 3-kinase is involved in the tumor-specific activation of human breast cancer cell $Na^+/H^+$ exchanger, motility, and invasion induced by serum deprivation[J]. J Biol Chem, 2000, 275(8): 9331—9339.

[6] Strazzabosco M, Poci C, Spirli C, *et al*. Intracellular pH regulation in hep G2 cells: effects of epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and insulinlike growth factor-II on $Na^+$-$H^+$ exchange activity[J]. Hepatology, 1995, 22(2): 588—597.

[7] Boyer M J, Barnard W, Hedcey D W, *et al*. Regulation of intracellular pH in subpopulations of cells derived from spheroids and solid tumours[J]. Br J Cancer, 1993, 68(5): 890—897.


(编辑 陈聪连)

(上接 401 页)

体:右眼视力 0.04,光定位准,矫正无帮助,双眼压 18 mmHg。左眼未见异常。右眼前房 Tyn(+),虹膜节段性后粘连,玻璃体混浊(+++),大片团块状白色成形混浊,眼底看不清。全身各项辅助检查正常。入院诊断考虑:右眼全葡萄膜炎。静脉给予大剂量地塞米松抗炎治疗,病情无好转。入院第 14 天行右眼玻璃体切割术以及玻璃体细菌、真菌涂片和培养检查。术中见玻璃体大量白色脓球状渗出,视网膜菲薄,多处裂孔,后极部脓苔沉积并有机化膜附着,视乳头条索粘连,黄斑放射状渗出水肿。行右眼玻璃体切割+视网膜复位+光凝、冷凝+惰性气体填充术。术后诊断右眼眼内炎,性质不明。术后予静脉抗炎、抗细菌治疗。玻璃体细菌、真菌涂片和培养检查均为阴性。术后第 2 天,发现右眼出现新的裂孔,复发视网膜脱离,再次行右眼视网膜复位+硅油填充术。术后第 9 天,右眼视力 0.02,光定位准,玻璃体腔透明,网膜平复,出院。

## 讨论

内源(或转移)性眼内炎,是由经血流达到眼部的感染源引起的。致病菌可来自远处的感染病灶或全身败血症。内源性眼内炎与某些明确的特异性诱发因素有关,如:血液透析,经静脉补充营养,静脉用药,各种不同的免疫抑制剂和大面积外科手术。这些因素的共同点是几乎都有真菌或细菌性污染源,且合并有免疫状态遭受损害[1]。但全身情况良好,无远处感染灶及全身败血症,仅有近期静脉用药史而无其它诱发因素的内源性眼内炎极为少见,除 2001 年易长贤等[2] 报道 1 例外未见其它类似报道。在此类内源性眼内炎的发病原因中,近期可疑的静脉用药,是可能的污染源。内源性眼内炎以真菌感染多见[3]。明确区别细菌性和真菌性眼内炎,有赖于病原学检查,但临床上由于种种原因,病原学检查往往出现假阴性。以上 2 例玻璃体液微生物检查阴性,单从临床表现也难以确定眼内炎性质,但我们还是考虑为细菌性眼内炎,理由如下:①患者没有真菌性眼内炎的易感因素,未发现全身其它部位真菌感染灶以及虚弱体质。②玻璃体涂片和培养均为阴性,而在大剂量抗生素治疗下细菌检查阴性完全可能。③术后抗生素及激素治疗有效,更支持细菌性眼内炎诊断。从以上两例看来,对于原因不明的全葡萄膜炎,尤其对激素等治疗不敏感时,应当考虑到内源性眼内炎的可能,及时行相应检查及治疗。

关键词:内源性眼内炎;静脉用药
中图法分类号:R771.2 文献标识码:B

## 参考文献:


[1] Fred M, Wilson II 著. 曾平 译. 眼内炎的病因及其预防[J]. 国外医学眼科学分册, 1988, 12: 107—111.

[2] 易长贤, 徐晓瑞, 欧杰雄, 等. 双眼内源性化脓性眼内炎的诊断与治疗[J]. 罕少疾病杂志, 2001, 8(3): 1—3.

[3] Brod R D, Flynn H W, Clarkson J G, *et al*. Endogenous Candida endophthalmitis: Management without intravenous amphotericin B[J]. Ophthalmology, 1990, 97: 666.


(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net