

文章编号 1006-8147(2015)04-0287-04

论著

候选抑癌基因 RASSF6 在胃癌组织中的表达及其与临床病理特征的关系

刘新兰¹, 李淑璟², 张海霞²

(1.宁夏医科大学总医院肿瘤医院肿瘤内科, 银川 750004; 2.宁夏医科大学研究生院, 银川 750004)

摘要 目的:探讨候选抑癌基因 RASSF6 在胃癌组织中的表达及其与临床病理特征的关系。方法:采用组织微阵列技术,通过免疫组化 SP 法检测 100 例胃癌组织和癌旁正常组织中 RASSF6 的表达,实时荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 法检测 20 例新鲜胃癌组织和癌旁正常组织中 RASSF6mRNA 及蛋白的表达情况。结果:(1)胃癌组织中 RASSF6 阳性表达率明显低于癌旁正常组织(31.0% vs 76.0%, $P < 0.05$),胃癌组织中 RASSF6mRNA 和蛋白表达水平明显低于癌旁正常组织(3.949 ± 0.816 vs 4.522 ± 0.685 和 1.589 ± 2.237 vs 5.723 ± 1.939 , P 均 < 0.05)。 (2)RASSF6 在胃癌组织中的表达与胃癌分化程度、浸润深度、淋巴结转移及胃癌分期差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。结论: RASSF6 可能是胃癌中新的抑癌基因,其表达缺失与胃癌的发生和进展有关。

关键词 胃癌; RASSF6; 临床病理特征

中图分类号 R735.2

文献标志码 A

Expressions of RASSF6 in gastric cancer and its association with clinicopathologic feature

LIU Xin-lan¹, LI Shu-jing², ZHANG Hai-xia²

(1.Department of Oncology, Cancer Hospital, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2.Graduate School, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Abstract Objective: To detect the expression of RASSF6 in gastric cancer, and to explore its association with clinicopathologic feature.

Methods: Using tissue microarray technology, the expressions of RASSF6 in the gastric cancers and the adjacent normal tissue were analyzed by immunohistochemistry($n=100$). Using real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot, the expressions of RASSF6 mRNA and protein levels in the gastric cancers and the adjacent normal tissues were analyzed($n=20$). **Results:** (1) RASSF6 was decreased in gastric cancer tissues as compared to the adjacent normal tissues(31.0% vs 76.0%, $P < 0.05$). RASSF6 mRNA and protein were decreased in gastric cancer tissues as compared to the adjacent normal tissues (3.949 ± 0.816 vs 4.522 ± 0.685 and 1.589 ± 2.237 vs 5.723 ± 1.939 , all of $P < 0.05$). (2) The expression of RASSF6 was associated with the differentiation degree, infiltration depth, lymph node metastasis and gastric cancer points, and significant differences were found ($P < 0.05$). **Conclusion:** RASSF6 may be a new tumor suppressor gene in gastric cancer tissue. The loss expression of RASSF6 is associated with occurrence and development of gastric cancer.

Key words gastric cancer; RASSF6; clinicopathologic feature

肿瘤的形成是多基因病变的过程,其发生发展与抑制细胞突变和异常增殖的抑癌基因功能失活密切相关。RASSF6 近年来在多种肿瘤中被发现和证实是潜在的抑癌基因,但在胃癌中罕见报道。本研究应用组织微阵列通过免疫组化 SP 法、实时荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 法检测候选抑癌基因 RASSF6 在胃癌组织中的表达情况,分析它们与胃癌临床病理特征的关系,探讨 RASSF6 是否为胃癌的抑癌基因。

1 资料与方法

1.1 标本来源及处理 选取在宁夏医科大学总医院手术并经病理证实的胃癌及癌旁正常组织标本各

100 例,其中 80 份为 2010 年 1 月-2013 年 3 月的胃癌及癌旁正常组织石蜡标本,20 份为 2013 年 4 月-6 月新鲜胃癌及癌旁正常组织标本,新鲜标本以无菌手术器械剪取癌组织和距癌灶 5 cm 的癌旁组织,所有标本切取后分为 2 份,一份放入经 0.1%DEPC(焦磷酸酯)水处理过的冻存管内,置-80℃冰箱冻存;另一份经 10%中性福尔马林溶液固定常规石蜡包埋、切片。所有患者术前未接受任何放、化疗等抗肿瘤治疗。男性 67 例,女性 33 例;年龄: < 60 岁 35 例, ≥ 60 岁 65 例;肿瘤大小: < 3 cm 的 38 例, ≥ 3 cm 的 62 例;汉族 61 例,少数民族 39 例;分化程度:高分化 19 例,中分化 24 例,低分化 57 例;浸润深度:黏膜及黏膜下 22 例,肌层 23 例,浆膜及浆膜外 55 例;有淋巴结转移者 53 例,无淋巴结转移者 47 例;TNM 分期按照 2010 年国际抗癌联盟(UICC)公布的标

基金项目 宁夏自然科学基金项目资助(NZ11271)

作者简介 刘新兰(1968-),女,主任医师,教授,硕士,研究方向:实体瘤的化疗和基础研究, E-mail:liuxinlan@cscsco.org.com。

准: I 期 32 例, II 期 14 例, III 期 46 例, IV 期 8 例。

1.2 组织微阵列技术免疫组化 SP 法 兔抗人 RASSF6 多克隆抗体 1:200 稀释, 购自美国 Abcam 公司, DAB 等试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 制备孔径为 3 mm 的含有 52 个组织芯的组织芯片, 连续制成 4 μ m 厚切片若干张, 进行 SP 法免疫组化染色。每例标本选 4 张切片, 1 张用于 HE 染色, 其余 3 张用于 IHC 染色, 实验步骤按试剂盒说明书进行, 严格控制实验条件。用已知阳性的肝癌组织切片作为阳性对照, PBS 作为阴性对照。结果依照 Fromowitz 综合计分法, 将细胞着色强度与阳性着色细胞所占百分比二者结合判定, 细胞着色强度: 不着色计 0 分; 淡黄色计 1 分; 棕黄色计 2 分; 棕褐色计 3 分。二者积分相加: 0~1 分为阴性, ≥ 2 分为阳性。阳性细胞百分数为 10 个视野阳性细胞的平均数占这 10 个视野中细胞数的百分比: $<5\%$ 计 0 分; $5\% \sim 25\%$ 计 1 分; $26\% \sim 50\%$ 计 2 分; $51\% \sim 75\%$ 计 3 分; $>75\%$ 计 4 分。

1.3 实时荧光定量 RT-PCR 提取新鲜胃癌组织及对应癌旁正常组织的总 RNA, 并逆转录为 cDNA 后扩增和分析。采用 β -actin 为内参照, RASSF6 和 β -actin RNA 引物序列由上海生物工程有限公司设计合成, RASSF6 上、下游引物分别为: 5c-AGCTGCCAGTTCCTTGGAATG-3c、5c-AGGCCAGACAGCTCTGATGT-3c; β -actin 上、下游引物分别为: 5c-CCACGGCTGCTTCCAGCTCC-3c、5c-GGACTCCATGCCAGGAAGGAA-3c。反应条件为 25 μ L 的反应体系, 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 至 4 $^{\circ}$ C 终止。实验数据用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行处理。

1.4 Western blot 液氮中取出组织后裂解液裂解, 同时加蛋白酶及磷酸酶抑制剂, BCA 法测蛋白浓度, 100 $^{\circ}$ C 5 min 变性蛋白, 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转 PVDF 膜 25V30 min, 以含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 室温封闭 1 h, 加 RASSF6 一抗 (1:500)、内参照 GAPDH 一抗 (1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 过夜; 二抗 (1:5 000) 室温 1 h, 显影后凝胶成像系统扫描, 并用图像分析软件进行定量分析。

1.5 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件处理数据。计数资料采用 χ^2 检验, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验, Spearman 相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织微阵列技术免疫组化 SP 法

2.1.1 RASSF6 的表达与胃癌临床病理特征的关系

胃癌组织中 RASSF6 的表达在分化程度、浸润深度、淋巴结转移及胃癌临床分期差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 RASSF6 的表达与胃癌临床病理特征的关系

Tab1 Expressions of RASSF6 in gastric cancer and its association with clinicopathologic feature

临床病理因素	例数	RASSF6 表达			P
		阳性/n	阳性率/%		
性别	男	67	47	70.1	0.723
	女	33	22	66.7	
年龄/岁	<60	35	28	80.0	0.081
	≥ 60	65	41	63.1	
肿瘤大小/cm	<3	38	22	57.8	0.060
	≥ 3	62	47	75.8	
民族	汉族	61	42	68.9	0.968
	少数民族	39	27	69.2	
分化程度	低	24	10	41.7	0.043*
	中	19	9	47.4	
	高	57	12	21.1	
浸润深度	T ₁	22	2	9.1	0.045**
	T ₂	23	11	47.8	
	T ₃	55	18	32.7	
淋巴结转移	有	53	10	18.9	0.005 [#]
	无	47	21	44.7	
胃癌分期	I 期	32	14	43.8	0.034 ^{##}
	II 期	14	3	21.4	
	III 期	46	17	37.0	
	IV 期	8	2	25.0	

RASSF6 分化程度比较, * $P < 0.05$; RASSF6 浸润深度比较, ** $P < 0.05$

RASSF6 淋巴结转移比较, [#] $P < 0.05$; RASSF6 胃癌分期比较, ^{##} $P < 0.05$

2.1.2 胃癌组织及癌旁正常胃黏膜组织中 RASSF6 的表达 RASSF6 阳性染色主要定位于胃癌细胞的细胞浆和细胞核, 呈深棕色颗粒状 (图 1), 100 例胃癌组织中 RASSF6 阳性表达率为 31.0%, 明显低于癌旁正常胃黏膜组织中的阳性表达率 76.0%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。

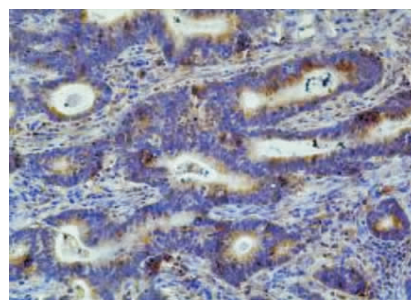


图 1 胃癌组织中 RASSF6 的表达 (SP $\times 200$)

Fig 1 Expressions of RASSF6 in gastric cancer (SP $\times 200$)

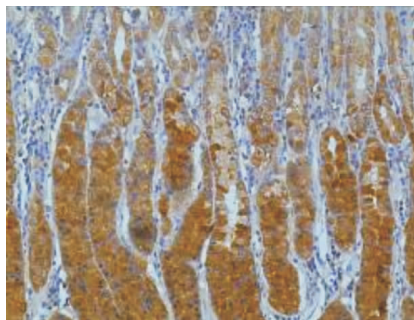


图2 正常胃黏膜中 RASSF6 的表达(SP×200)

Fig 2 Expressions of RASSF6 in adjacent normal tissues(SP×200)

2.2 实时荧光定量 RT-PCR 法 20 例胃癌组织中 RASSF6mRNA 的表达量明显低于癌旁正常组织,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 RASSF6mRNA 在胃癌组织和癌旁正常组织中的表达

Tab 2 Expressions of RASSF6 mRNA levels in the gastric cancers and the adjacent normal tissues

组别	例数	RASSF6
胃癌组织	20	3.949 ± 0.816
癌旁正常胃黏膜组织	20	4.522 ± 0.685

2.3 Western blot 法 20 例胃癌组织中 RASSF6 蛋白的表达量为 1.589 ± 2.237 ,明显低于癌旁正常胃组织中的表达 5.723 ± 1.939 ,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3、图 4。

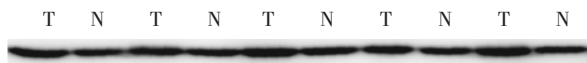


图3 GAPDH 在胃癌组织及癌旁正常组织中的表达(T 为胃癌组织、N 为正常组织)

Fig 3 Expressions of GAPDH in the gastric cancers and the adjacent normal tissues

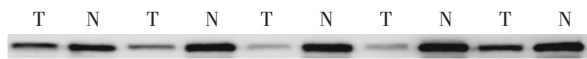


图4 RASSF6 在胃癌组织及癌旁正常组织中的表达(T 为胃癌组织、N 为正常组织)

Fig 4 Expressions of RASSF6 in the gastric cancers and the adjacent normal tissues

3 讨论

胃癌仍是全球范围内因癌死亡的第二位原因^[1],在我国其发病率和死亡率也居各种消化系统恶性肿瘤之首。主要原因是临床上诊断分析缺乏特异的肿瘤标志物,早期诊断率低。因此寻找与胃癌早期诊断和治疗相关的新的基因已成为目前胃癌研究的重点内容。近年来有学者认为 RASSF6 基因可能是胃癌新的候选抑癌基因,其在胃癌发生发展过程中的作用值得深入研究。

RASSF6 是 Ras 相关结构域家族(RASSFs)新成

员之一,位于染色体 4q13.3,含 13 个外显子,有 3 个转录本(RASSF6A~RASSF6C)^[2-3],该家族是 2000 年由 Dammann 等^[4]首次发现并命名,参与不同的细胞内机制如凋亡、细胞周期控制、微管稳定性等,一些还表现出抑制肿瘤的功能^[2,5-6]。有研究发现 RASSF6 可在 HeLa、MCF-7 和 HepG2 等细胞株中检测到,但在原发性乳腺癌、甲状腺癌组织中表达减少^[7-9],因此推测 RASSF6 可能在肿瘤形成中起作用^[8-9]。

本研究采用组织微阵列技术,通过免疫组织化学方法检测 RASSF6 在 100 例胃癌组织及癌旁正常胃组织中的表达,结果发现 RASSF6 在胃癌组织中的阳性表达率为 31.0%,明显低于其在正常胃组织中的表达(76.0%),差异有统计学意义。为了进一步证实 RASSF6 在胃癌中的表达差异,笔者又通过实时荧光定量 RT-PCR 及 Western blot 方法检测了 20 例新鲜胃癌及癌旁正常胃黏膜组织中 RASSF6 mRNA 及蛋白的表达情况,结果同样发现在胃癌组织中 RASSF6mRNA 及蛋白表达量均明显低于癌旁正常胃组织,这与免疫组化结果相一致。因此推测 RASSF6 可能是胃癌中新的抑癌基因,其表达缺失可能导致肿瘤更易向恶性表型发展。经过上述的验证后笔者又对 RASSF6 蛋白阳性表达与胃癌临床病理特征的关系进行了分析,其结果显示,RASSF6 表达与胃癌的分化程度、浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期有关,而与性别、年龄、肿瘤大小及民族无关,这与文献报道^[7,10]相一致。提示 RASSF6 在胃癌的发生、进展和浸润转移过程中发挥了负性调控的作用。

综上,RASSF6 在胃癌中可能为新的抑癌基因。其表达缺失可促进胃癌的发生发展,也可致肿瘤更易向恶性表型发展。在胃癌早期进行 RASSF6 失表达的检测,可能为胃癌的早期筛查和诊断提供有利的生物学信息。虽然 RASSF6 的具体作用机制目前尚不明确,但相信随着对 RASSF6 基因的深入研究,会对其在肿瘤中的作用有一个更全面的认识。

参考文献:

- [1] Peng Z, Wei D, Wang L, et al. RUNX3 inhibits the expression of vascular endothelial growth factor and reduces the angiogenesis, growth, and metastasis of human gastric cancer[J]. Clin Cancer Res, 2006,12(21):6386
- [2] van der Weyden L, Adams D J. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis [J]. Biochim Biophys Acta, 2007,1776(1):58
- [3] Kaira K, Sunaga N, Tomizawa Y, et al. Epigenetic inactivation of the RAS-effector gene RASSF2 in lung cancers[J]. Int J Oncol, 2007,31(1):169
- [4] Dammann R, Li C, Yoon J H, et al. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor

- locus 3p21.3[J]. Nat Genet, 2000,25(3):315
- [5] Richter A M, Pfeifer G P, Dammann R H. The RASSF incancer; fromepigenetic silencing to functional characterization[J]. Biochim Biophys Acta, 2009,1796(2):114
- [6] Ikeda M, Hirabayashi S, Fujiwara N, et al. Ras-association domain family protein 6 induces apoptosis via both caspase-dependent and caspase-independent pathways[J]. Exp Cell Res, 2007,313(7):1484
- [7] Allen N P, Donninger H, Vos M D, et al. RASSF6 is a novel member of the RASSF family of tumor suppressors[J]. Oncogene, 2007,26(42):6203
- [8] Zientek-Targosz H, Kunnev D, Hawthorn L, et al. Transformation of MCF-10A cells by random mutagenesis with frameshift mutagen ICR191: A model for identifying candidate breast -tumor suppressors[J]. Mol Cancer, 2008,7:51
- [9] Calvisi D F, Ladu S, Gorden A, et al. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC[J]. Gastroenterology, 2006, 130(4):1117
- [10] Wen Y, Wang Q, Zhou C, et al. Decreased expressionof RASSF6 is a novel independent prognostic marker of a worse outcome in gastric cancer patients after curative surgery[J]. Ann Surg Oncol, 2011,18(13):3858

(2014-12-11 收稿)

文章编号 1006-8147(2015)04-0290-02

个例报道

急性肺栓塞误诊 1 例

张厚高¹,刘 寅²

(1.天津医科大学研究生院,天津 300070;2.天津市胸科医院 CCU 科,天津 300222)

关键词 肺栓塞;ST 段抬高;误诊

中图分类号 R655.3

文献标志码 B

1 病例资料

患者男性、70 岁,于入院前 2 h 无明显诱因突发心前区疼痛,肩背部放射痛,伴大汗、胸闷、憋气,因症状持续不缓解就诊于我院。心电图示:窦性心动过速,AVR 导联 ST 段抬高 0.4 mV,Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、AVF 及 V3-6 导联 ST 段压低 0.2~0.4 mV(图 1)。实验室检验:肌红蛋白 354 ng/mL;肌钙蛋白 0.05 ng/mL;D-二聚体 1 690 ng/mL。查体:血压 100/60 mmHg,SO₂ 95%(鼻导管吸氧),双肺叩清,双肺呼吸音清,可闻及干啰音,心率 115 次/min,心律齐,未闻及杂音,腹软,肝脾未及,双下肢无水肿。考虑急性非 ST 段抬高性心肌梗死,左主干受累。急诊冠脉造

影检查未见冠脉明显病变(图 2)。患者术中双鼻道吸氧,血氧仍偏低,查血气分析:pH 7.318,PaCO₂ 26.1 mmHg,PaO₂ 62.3 mmHg。床旁心脏超声:左房 36 mm,左室 56 mm;右房 35 mm,右室 14 mm;左室射血分数 55%~60%,肺动脉收缩压 40~45 mmHg,左室腔略大,各瓣膜活动正常,左心功能正常,主动脉内径正常,怀疑肺栓塞可能。考虑患者血流动力学不稳定,暂不宜行肺动脉 CT 检查,与家属商议后于导管室行肺动脉造影见右肺动脉血栓影(图 3),急性肺栓塞诊断明确,呼吸科会诊后建议行肺动脉溶栓治疗,但患者突发呼吸循环衰竭,抢救无效死亡。



图 1 患者急诊 ECG

作者简介 张厚高(1989-),男,硕士在读,研究方向:心血管内科;通信作者:刘寅, E-mail:Liuyin2088@163.com。