

DCC 与 HER-2 mRNA 在人胃癌组织的表达^{*}

张 跃 翟 珂 李 蕊 王 鸿

(济宁市兖州区人民医院, 济宁医学院附属医院兖州院区, 济宁 272100)

摘 要 **目的** 探讨胃癌组织中 DCC 及 HER-2 mRNA 的转录水平与胃癌发生、发展及临床病理特征的关系。**方法** 采集 52 例胃癌患者的胃癌组织及癌旁正常组织, 应用 RT-PCR 的方法检测其中 DCC mRNA 与 HER-2 mRNA 的转录水平, 并分析其与胃癌发生、发展、转移的关系。**结果** 胃癌组织 DCC mRNA、HER-2 mRNA 检出率为 84.6%、28.84%。淋巴结转移阳性患者的 DCC mRNA 转录水平明显低于淋巴结转移阴性者; DCC mRNA 在 III 期、IV 期患者的转录水平明显低于 I 期、II 期者; 高分化及中分化胃癌患者 DCC mRNA 转录水平明显高于低分化(未分化)者 ($P < 0.05$)。淋巴结转移阳性患者的 HER-2 mRNA 转录水平明显高于淋巴结转移阴性者; HER-2 mRNA 在癌组织有浆膜浸润患者的转录水平明显高于无浸润浆膜者 ($P < 0.05$)。**结论** 胃癌的浸润和转移与 HER-2 和 DCC 的表达密切相关。DCC 及 HER-2 基因联合检测对胃癌的基因治疗及预后提供重要依据。

关键词 胃癌; 结直肠癌缺失基因; 人表皮生长因子受体 2; 逆转录-聚合酶链反应

中图分类号: R656.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2018)10-322-04

The preliminary study of the expression level of DCC mRNA and HER-2 mRNA in human gastric cancer tissue

ZHANG Yue, ZHAI Ke, LI Rui, WANG Hong

(Yanzhou People's Hospital, Yanzhou Hospital District of Affiliated Hospital
of Jining Medical University, Jining 272100, China)

Abstract: Objective To detect the transcriptional level of DCC mRNA and HER-2 mRNA in gastric cancer tissue and investigate its relation with the clinical pathological features. **Methods** RT-PCR method was used to detect the transcriptional level of DCC mRNA and HER-2 mRNA in 52 cases of human gastric carcinoma tissues and surrounding non-tumor gastric tissues. And the transcriptional levels of DCC mRNA and HER-2 mRNA was analyzed with gastric cancer occurrence, development and metastasis. **Results** The expression rate of DCC mRNA and HER-2 mRNA were 84.6% and 28.84% in gastric cancer tissues respectively. The transcriptional level of DCC mRNA in patients of lymph node positive metastasis was significantly lower than that of lymph node negative metastasis. The transcriptional level of DCC mRNA in stage III ~ IV patients was significantly lower than patients with stage I ~ II. The transcriptional level of DCC mRNA in patients of high-differentiated and middle-differentiated gastric carcinoma was significantly higher than that of poor-differentiated (non-differentiated) group ($P < 0.05$). However, it was significant difference that the transcriptional level of HER-2 mRNA in patients of different groups in lymph node metastasis status and the degree of invasion, with statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** The invasion and metastasis of gastric cancer are closely related to the expression of HER-2 and DCC. DCC and HER-2 gene combined detection are useful prognostic factors in patients with gastric carcinoma.

Keywords: Gastric cancer; DCC; HER-2; RT-PCR

* [基金项目] 济宁市科技计划(医药卫生)项目(2016-56-50)

胃癌是常见的恶性肿瘤之一,发病率居第 4 位、死亡率居第 2 位^[1]。胃癌与遗传、体质等内在因素以及生活习惯等外界因素有关。现已明确与胃癌发生、发展关系密切的基因有癌基因人表皮生长因子受体 2 (HER-2)、抑癌基因结直肠癌缺失基因 (deleted colorectal carcinoma, DCC) 等。目前发现 DCC 基因是最长的抑癌基因,是一种信号传递受体^[2]。目前研究表明,DCC 基因在结直肠癌等组织表达明显减少或缺失^[3],但在胃癌中的表达情况还未见报道。HER-2 基因是表皮生长因子受体家族成员,在肿瘤发生、发展中起重要作用。胃的癌变是一个多因素、多步骤、多阶段发展过程,涉及癌基因、抑癌基因、凋亡相关基因等。本文研究了胃癌与癌旁正常组织中 DCC 及 HER-2 mRNA 的转录水平,并与患者临床及病理特征进行相关性分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 1 月至 2016 年 6 月期间于山东省肿瘤医院、济宁市兖州区人民医院胃肠外科经病理诊断确诊的胃癌患者,共 52 例。其中年龄为 32 ~ 79 岁;其中年龄 ≥ 60 岁 26 例, < 60 岁 26 例;女 18 例,男 34 例。TNM 分期参见《胃癌临床实践指南》(2013 年第 2 版): I 期 12 例、II 期 6 例、III 期 22 例、IV 期 12 例。标本均取癌旁组织及癌组织,癌旁组织取距肿瘤边缘 5cm 以上,癌组织标本取自病灶中央且为非坏死组织。将标本置液氮中速冻后,迅速移入 -80℃ 冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 试剂 RNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司;引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;逆转录 PCR 试剂盒购自美国 Promega 公司;Ex Taq 酶及附带缓冲液、dNTPMix、Nuclease-Free Water、DL2000 DNA Marker、pMD19-T 载体为宝生物工程(大连)有限公司产品。

1.2.2 引物设计和合成 根据 DCC 及 HER-2 基因 mRNA 序列,利用软件 Primer BLAST (NCBI) 设计 PCR 引物如下:DCC mRNA 上游引物 5'-CACT-GCGCTTCCTCTCAGAA-3',下游引物 5'-CTGGCT-TGTGCTGTCTGGAA-3',扩增片段的长度为 215bp;HER-2 mRNA 上游引物序列为 5'-GCCCT-CATCCACCATAACAC-3',下游引物序列为 5'-

TTCCTCCACGCACTCCTG-3',扩增片段的长度为 234bp;内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 引物参考文献^[4],上游引物 5'-CCACCCATGGCAAAT-TCCATGGCA-3',下游引物 5'-TCTAGACGGCAG-GTCAGGTCCAC-3',扩增片段的长度为 589bp。

1.2.3 RT-PCR 反应 提取标本总 RNA,合成 cDNA;PCR 反应体系为 10 × Buffer 2.5 μl, dNTP 2.0 μl,上游引物 0.5 μl,下游引物 0.5 μl, ExTaq 酶 0.125 μl, cDNA 模板 3 μl, Nuclease-Free Water 定容至 25 μl;PCR 反应条件为 95℃ 预变性 5min, DCC: (94℃ 30s, 54℃ 30s, 72℃ 90s) × 32 个循环, 72℃ 终延伸 10min; HER-2: (94℃ 30s, 66℃ 30s, 72℃ 45s) × 32 个循环, 72℃ 终延伸 10min。

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,紫外透射反射仪观察目的条带,凝胶图像分析仪拍照分析。

1.3 DCC 及 HER-2 mRNA 分析

1.3.1 采用凝胶图像分析软件 AlphaView-SA 对图像进行分析处理 分别得到目的基因和 GAPDH 的积分密度值,扣除背景,得到净光密度值,然后按照下列公式分别计算目的基因 mRNA 含量。目的基因 mRNA 含量 = (目的基因净光密度值) / (GAPDH 净光密度值)

1.3.2 基因定性分析 表达阳性为目的基因扩增产物与 Mark 相对应位置出现一条亮带,反之为阴性表达。

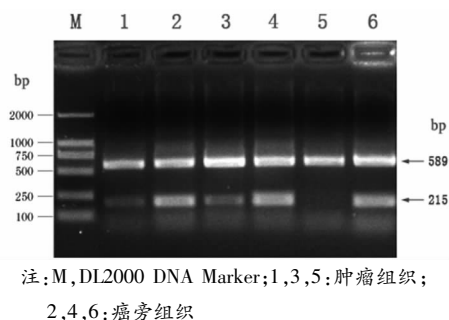
1.4 统计学方法

采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析。

2 结果

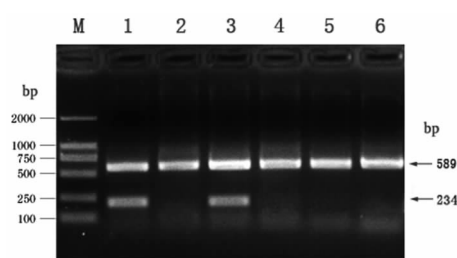
2.1 目的基因扩增结果

由图所见,在 215bp、234bp 和 589bp 处各显示电泳条带,结果证实为 DCC、HER 和 GAPDH 基因。见图 1、2。



注:M, DL2000 DNA Marker; 1, 3, 5: 肿瘤组织; 2, 4, 6: 癌旁组织

图 1 DCC mRNA RT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳



注: M: DL2000 DNA Marker; 1, 3, 5: 肿瘤组织;
2, 4, 6: 癌旁组织

图 2 HER-2 mRNA RT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

2.2 癌旁组织和胃癌组织 DCC mRNA 及 HER-2 mRNA 的表达

两者在胃癌及癌旁组织中表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1; DCC mRNA、HER-2 mRNA 在胃癌组织转录水平分别为 0.555 ± 0.087 、

950 ± 0.025 。

2.3 胃癌组织中 DCC mRNA 与 HER-2 mRNA 的转录水平与临床病理特征的关系

同一位患者以正常组织中 DCC mRNA 表达量为 1, 计算肿瘤组织中 DCC mRNA 相对表达量。详见表 2。

表 1 胃癌组织及癌旁组织中 DCC mRNA、HER-2 mRNA 的表达比较

组织类型	n	DCC mRNA		阳性率 /%	HER-2 mRNA		阳性率 /%
		阳性	阴性		阳性	阴性	
胃癌组织	52	44	8	84.6	15	37	28.84
癌旁组织	52	52	0	100.0	0	52	0
χ^2				6.635			-
P				0.006			0.000

表 2 胃癌组织中 DCC mRNA 及 HER-2 mRNA 表达与临床病理特征的关系 ($\bar{x} \pm s$)

临床病理资料	n	DCC mRNA 相对含量	<i>t</i>	<i>P</i>	HER-2mRNA 平均表达量	<i>t</i>	<i>P</i>
性别							
男	34	0.79 ± 0.12	2.746	0.089	0.98 ± 0.05	1.894	0.131
女	18	0.81 ± 0.10			0.91 ±0.04		
年龄							
<60 岁	26	0.75 ± 0.15	0.891	0.636	0.98 ± 0.06	1.922	0.127
≥60 岁	26	0.84 ± 0.09			0.90 ± 0.04		
分化程度							
高分化 + 中分化	24	1.05 ± 0.10	7.281	0.017 *	0.82 ± 0.11	2.315	0.082
低分化 + 未分化	28	0.58 ±0.05			1.01 ± 0.09		
病理分期							
I + II	18	1.21 ± 0.11	8.150	0.001 *	0.84 ±0.12	2.661	0.056
Ⅲ + Ⅳ	34	0.57 ±0.08			1.08 ±0.10		
淋巴结转移情况							
无	22	1.07 ± 0.10	6.492	0.016 *	0.79 ±0.05	5.638	0.005 *
有	30	0.59 ± 0.08			1.07 ±0.07		
浆膜浸润							
有	32	0.78 ± 0.10	0.739	0.501	1.04 ± 0.06	11.049	0.001 *
无	20	0.85 ± 0.13			0.58 ± 0.04		

注: * $P < 0.05$

3 讨论

Castets 等^[5]研究发现 DCC 蛋白可通过诱导癌细胞凋亡来抑制结、直肠恶性肿瘤的发展,从而起到预防和治疗癌症的效果。Melen 等^[6]研究表明, DCC 蛋白在配体缺乏的环境中具有诱导细胞凋亡的作用,但在配体 Netorin-1 存在时, DCC 蛋白则具有抗细胞凋亡作用。如果 DCC 基因缺失,不能编码 DCC 蛋白,细胞生长和分化发生障碍,细胞有可

能发生恶变^[7]。DCC 基因在结、直肠肿瘤细胞中表达下调,其失活的主要机制是启动子甲基化和等位基因缺失^[8]。有报道显示,在结、直肠肿瘤组织中用 PCR 直接扩增 DCC 基因某区域检测缺失率只有 29%^[9]。翟保平等^[10]发现 DCC 基因在乳腺癌组织中的阳性表达率为 38.2%,而在有淋巴结转移的乳腺癌组织中阳性表达率为 23.3%,认为 DCC 基因表达下调与乳腺癌的发生和侵袭有关。本文结果显示 52 例胃癌患者中, DCC mRNA 检出

率在癌组织中为 84.6%, 正常组织中为 100%, 正常组织明显高于胃癌组织 ($P < 0.05$), 与上述报道基本一致。说明胃癌的形成过程中出现了 DCC 基因表达缺失。

原癌基因 HER-2 通过基因扩增与过表达, 通过一定的信号转导通路, 影响细胞增殖、分化、凋亡, 使得细胞增殖加速、恶性趋强, 并有抗凋亡现象^[11]。研究发现, 在乳腺、胃、食管等恶性肿瘤组织中均检测出 HER-2 基因的过量表达。本文结果显示 HER-2 mRNA 在 52 例胃癌患者肿瘤组织检出率为 28.8%, 与上述报道基本一致。说明胃癌的形成过程中出现了 HER-2 基因过度表达, 应用 RT-PCR 的检测方法提高了基因检测的阳性率, 有望为胃癌的诊断提供依据。

DCC 基因 mRNA 在淋巴结转移阳性的转录水平明显低于淋巴结转移阴性, HER-2 基因 mRNA 在有淋巴结转移及浸润浆膜胃癌组织中的转录水平高于无淋巴结转移及浸润浆膜; 结果提示 HER-2 基因 mRNA 的过表达与 DCC 基因 mRNA 的表达下调可能促进了胃癌细胞的浸润和转移。TNM 分期的 III 期、IV 期胃癌患者中 DCC 基因 mRNA 转录水平明显低于 I 期、II 期患者 ($P < 0.005$)。在低分化(未分化)胃癌患者 DCC 基因 mRNA 的转录水平明显低于高分化及中分化胃癌患者 ($P < 0.05$), 而 HER-2 基因 mRNA 表达无相关性, 提示随着肿瘤分化程度降低、分期越晚, DCC 基因 mRNA 表达下调越明显。我们推测, HER-2 的过表达与 DCC mRNA 表达下调是胃癌恶性程度增高的标志, 但两者的相关性还有待进一步研究; 同时, 增强 DCC 基因在细胞中的表达, 有可能成为胃癌基因治疗的措施之一。人源化的 HER-2 单克隆抗体已成功用于治疗晚期乳腺癌。因此, DCC 及 HER-2 双基因联合检测在胃癌中的研究, 可以为胃癌的基因治疗提供重要依据。

参考文献:

[1] Zhang X, Xue YW. Expression of Her-2 in gastric cancer and targeted therapy [J]. Practical Oncology Journal, 2014, 28(2): 177-181.

[2] 田小英, 孙雷, 王波, 等. DCC 和 C-erbB-2 在子宫颈癌中的表达及临床意义 [J]. 中国妇幼保健, 2009, 24(32): 4592-4596.

[3] Derks S, Bosch LJ, Niessen HE, et al. Promoter CpG island hypermethylation and H3K9me3 and H3K27me3-mediated epigenetic silencing targets the deleted in colon cancer (DCC) gene in colorectal carcinogenesis without affecting neighboring genes on chromosomal region 18q21 [J]. Carcinogenesis, 2009, 30(6): 1041-1048. DOI: 10.1093/carcin/bgp073.

[4] Wang DX, Fang DC, Luo YH, et al. The study on expression of DCC gene in gastric carcinoma [J]. Immunological Journal, 1996, 12(3): 40-42.

[5] Castets M, Broutier L, Molin Y, et al. DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity [J]. Nature, 2011, 482(7386): 534-537. DOI: 10.1038/nature10708.

[6] Mehlen P, Fearon ER. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis [J]. J Clin Oncol, 2004, 22(16): 3420-3428. DOI: 10.1200/JCO.2004.02.019.

[7] 熊慧, 张阿伟, 范贵民, 等. K-RAS 和 DCC 在直肠癌中的表达及意义 [J]. 黑龙江医药科学, 2014, 37(2): 53-54.

[8] Wang XJ, Lu RZ, Zhang XJ, et al. Significance of multiple gene methylation detection in early diagnosis of colorectal cancer [J]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2013, 22(12): 1228-1230.

[9] Cawkwell L, Lewis FA, Quirke P. Frequency of allele loss of DCC, p53, RBI, WT1, NF1, NM23 and APC/MCC in colorectal cancer assayed by fluorescent multiplex polymerase chain reaction [J]. Br J Cancer, 1994, 70(5): 813-818.

[10] Ho KY, Kalle WH, Lo TH, et al. Reduced expression of APC and DCC gene protein in breast cancer [J]. Histo-pathology, 1999, 35(3): 249-256.

[11] Ménard S, Tagliabue E, Campiglio M, et al. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma [J]. J Cell Physiol, 2000, 182(2): 150-162. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(200002)182:2<150::AID-JCP3>3.0.CO;2-E.

(收稿日期 2018-04-10)

(本文编辑: 甘慧敏)