

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00786

• 短篇论著 •

胃腺癌组织再生基因蛋白Ⅳ的表达及临床意义

杨德生¹, 康玉华¹, 李福春², 孙珠蕾³, 胡军红⁴, 索智敏^{1*}

1. 河南大学淮河医院消化内科, 开封 475000
2. 河南大学淮河医院超声科, 开封 475000
3. 河南大学淮河医院病理科, 开封 475000
4. 河南大学淮河医院普通外科, 开封 475000

[摘要] **目的** 探讨再生基因蛋白Ⅳ (regenerating gene type Ⅳ, Reg Ⅳ)在胃腺癌发生发展中的可能价值及意义。
方法 采用S-P免疫组织化学技术测定63例胃腺癌及相应的癌旁正常组织中Reg Ⅳ及磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、Akt蛋白的表达;分析胃癌患者不同临床病理特征下Reg Ⅳ、PI3K、Akt蛋白的表达差异,并分析胃癌组织Reg Ⅳ蛋白与PI3K、Akt蛋白表达的相关性。
结果 63例胃腺癌组织中Reg Ⅳ、PI3K、Akt蛋白的阳性表达率为50.7% (32/63)、68.3% (43/63)、60.3% (38/63),均高于癌旁正常组织19.0% (12/63)、20.6% (13/63)、9.5% (6/63),差异有统计学意义($P<0.05$)。不同肿瘤分化程度间Reg Ⅳ蛋白表达差异有统计学意义($P<0.05$);不同肿瘤分化程度、浸润深度、淋巴结转移与否、临床分期间PI3K蛋白表达差异有统计学意义($P<0.05$);淋巴结转移与否胃癌组织Akt蛋白表达差异有统计学意义($P<0.05$)。胃腺癌组织中Reg Ⅳ蛋白与PI3K、Akt表达正相关($r_s=0.284, 0.305, P<0.05$),PI3K蛋白与Akt蛋白表达正相关($r_s=0.423, P<0.05$)。
结论 Reg Ⅳ高表达与胃腺癌发展相关,PI3K/Akt信号通路的激活可能参与其中。

[关键词] 再生基因蛋白Ⅳ;胃肿瘤;腺癌;磷脂酰肌醇3-激酶;Akt;免疫组织化学

[中图分类号] R 735.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)07-0786-05

Expression of regenerating gene type Ⅳ in human gastric adenocarcinoma tissues and the clinical significance

YANG De-sheng¹, KANG Yu-hua¹, LI Fu-chun², SUN Zhu-lei³, HU Jun-hong⁴, SUO Zhi-min^{1*}

1. Department of Gastroenterology, Huaihe Hospital of Henan University, Kaifeng 475000, Henan, China
2. Department of Ultrasound, Huaihe Hospital of Henan University, Kaifeng 475000, Henan, China
3. Department of Pathology, Huaihe Hospital of Henan University, Kaifeng 475000, Henan, China
4. Department of General Surgery, Huaihe Hospital of Henan University, Kaifeng 475000, Henan, China

[Abstract] **Objective** To investigate the role of regenerating gene type Ⅳ (Reg Ⅳ) in the development and progression of gastric adenocarcinoma. **Methods** S-P immunohistochemistry method was used to detect the expression of Reg Ⅳ, PI3K, and Akt proteins in 63 gastric adenocarcinoma specimens and the corresponding tumor-adjacent normal tissues. **Results** The positive expression rates of Reg Ⅳ, PI3K and Akt proteins in 63 gastric adenocarcinoma tissues were 50.7% (32/63), 68.3% (43/63) and 60.3% (38/63), respectively, being significantly higher than those in the tumor-adjacent normal tissues (19.0% [12/63], 20.6% [13/63], and 9.5% [6/63], respectively, $P<0.05$). Reg Ⅳ expression was significantly correlated with the differentiation degree of gastric adenocarcinoma ($P<0.05$) and PI3K protein expression was significantly correlated with the differentiation degree, infiltrative depth, TNM stage and lymph node metastasis of gastric adenocarcinoma ($P<0.05$). Akt protein expression was significantly correlated with lymph node metastasis ($P<0.05$). We also found that Reg Ⅳ protein expression was positively correlated with PI3K and Akt expression ($r_s=0.284, 0.305, P<0.05$), and PI3K expression was positively correlated with Akt protein expression ($r_s=0.423, P<0.05$). **Conclusion** Reg Ⅳ overexpression is associated with the progression of gastric adenocarcinoma, which may involve activation of PI3K/Akt signaling pathway.

[收稿日期] 2013-11-05 **[接受日期]** 2014-05-19

[基金项目] 开封市科技发展计划项目(110341)。Supported by the Key Science and Technology Project of Kaifeng (110341).

[作者简介] 杨德生, 硕士, 主治医师。E-mail: hdyds1@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0371-23906894, E-mail: kfszm@163.com

[Key words] regenerating gene type IV; stomach neoplasms; adenocarcinoma; phosphatidylinositol-3-kinase; Akt; immunohistochemistry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(7): 786-790]

再生基因 (regenerating gene, Reg) 蛋白家族是钙依赖性凝集素超家族, 高表达于部分胃肠道肿瘤, 参与肿瘤细胞的增殖和分化, Reg IV 是其中一个新成员^[1]。既往研究^[2-3]表明: Reg IV 在 Crohn 病和溃疡性结肠炎表达, 并与大肠癌的恶性潜能和大肠腺瘤的恶性转化相关, 且其能够通过增强 Akt、Bcl-2、Bcl-x_L 及 survivin 的表达, 维持大肠癌细胞的存活^[4], 但目前关于其在胃腺癌中的可能作用及机制尚不明确。因此, 本研究采用免疫组织化学染色技术检测胃癌及癌旁正常组织中 Reg IV 蛋白的表达差异, 分析其与磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、Akt 蛋白表达的相关性, 探讨 Reg IV 在胃癌发生发展中的可能意义及机制, 为进一步深入研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 一般资料 河南大学淮河医院普通外科 2010 年 1 月至 2012 年 1 月手术切除的新鲜胃腺癌标本 63 例, 均经 H-E 染色病理证实, 所有患者术前均未接受放疗或化疗, 并排除其他脏器恶性肿瘤。选取同一病例的癌旁切缘正常组织 63 例作为对照组。63 例胃腺癌患者, 男 33 例, 女 30 例; 年龄 28~77 岁, 平均 (46.8±3.9) 岁; 高、中、低分化腺癌分别为 15 例、22 例和 26 例; 淋巴结转移 43 例, 无转移 20 例; 按 TNM 分期标准, I 期 9 例, II 期 15 例, III 期 18 例, IV 期 21 例; 按浸润深度分为 T₁ 11 例, T₂ 14 例, T₃ 15 例, T₄ 23 例。

1.2 免疫组织化学染色 浓缩型鼠抗人单克隆抗体 Reg IV、PI3K、Akt 及免疫组化试剂盒, DAB 试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。免疫组化 S-P 法染色: 取厚 4 μm 石蜡切片, 常规脱蜡、水化后, 采用电炉加热煮沸修复抗原; Reg IV 与 PI3K、Akt 蛋白单克隆抗体均按 1:100 稀释, 操作参照产品说明书, 以磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作为阴性对照。用已证实的 Reg IV、PI3K、Akt 染色阳性胃腺癌切片作阳性对照。

1.3 结果判断 根据免疫组化染色程度及阳性细胞数来计算免疫组化染色评分。染色程度: 0 为阴

性, 1 为弱阳性, 2 为中等阳性, 3 为强阳性; 阳性细胞数: 无阳性细胞计为 0 分, 阳性细胞 1%~25% 计为 1 分, 阳性细胞 25%~50% 计为 2 分, 阳性细胞大于 50% 计为 3 分。两者之和为 3~6 分者评为免疫组化染色阳性。结果判定在双盲法下进行, 每张切片由两名高年资病理科主治医师独立判断, 不一致时交高年资主任医师仲裁并重新计数。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件包, 计数资料应用率或比表示, 两组率的比较采用 χ^2 检验, 等级资料的比较采取非参数检验的秩和检验, 双变量相关关系分析采用 Spearman 相关分析, 检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 胃腺癌组织 Reg IV、PI3K、Akt 蛋白的表达 免疫组化结果 (图 1) 表明: 63 例胃腺癌组织中, Reg IV 蛋白阳性表达率 50.7% (32/63), 其阳性表达部位为胞质; PI3K 的阳性表达率 68.3% (43/63), 阳性表达部位为胞质; Akt 的阳性表达率 60.3% (38/63), 阳性表达部位主要在胞质, 部分在胞核, 均呈强阳性过度表达现象。癌旁正常组织中, Reg IV、PI3K、Akt 蛋白均为弱阳性低表达, 阳性表达率分别为 19.0% (12/63)、20.6% (13/63)、9.5% (6/63)。两组间表达差异有统计学意义 ($\chi^2 = 13.969$ 、28.929、35.761, P 值均 < 0.05)。

2.2 胃腺癌不同临床病理特征下 Reg IV 及其受体的表达 结果 (表 1) 表明: 不同肿瘤分化程度间 Reg IV 蛋白表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 不同肿瘤分化程度、浸润深度、淋巴结转移与否、临床分期间 PI3K 蛋白表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 淋巴结转移与否胃癌组织 Akt 蛋白表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 胃腺癌组织 Reg IV 及其受体蛋白表达的相关性分析 配对资料的 Spearman 相关分析显示: 胃腺癌组织中 Reg IV 蛋白与 PI3K、Akt 表达正相关 ($r_s = 0.284$ 、 0.305 , $P < 0.05$), PI3K 蛋白与 Akt 蛋白表达正相关 ($r_s = 0.423$, $P < 0.05$)。

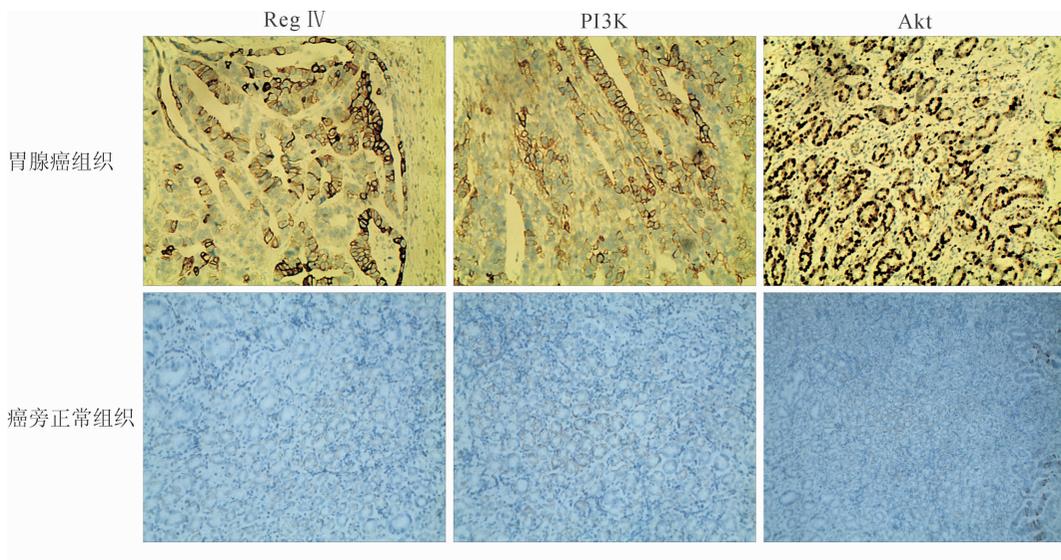


图 1 胃腺癌组织及癌旁正常组织 Reg IV、PI3K、Akt 蛋白的表达(S-P 法)

胃腺癌组织 Reg IV 及其受体阳性表达,而癌旁正常组织弱阳性表达. Original magnification: ×200

表 1 胃腺癌不同临床病理特征下 Reg IV 及其受体的表达

病理特征	N	Reg IV 阳性表达 n(%)	P 值	PI3K 阳性表达 n(%)	P 值	Akt 阳性表达 n(%)	P 值
分化程度							
高分化	15	4(26.7)	0.007	7(46.7)	0.011	6(40.0)	0.186
中分化	22	10(45.5)		14(63.6)		15(68.2)	
低分化	26	18(69.2)		22(84.6)		17(65.4)	
淋巴结转移							
有	43	23(53.5)	0.530	33(76.7)	0.034	31(72.1)	0.005
无	20	9(45.0)		10(50.0)		7(35.0)	
浸润深度							
T ₁	11	5(45.5)	0.414	4(36.4)	0.002	6(54.5)	0.321
T ₂	14	6(42.9)		8(57.1)		9(64.3)	
T ₃	15	8(53.3)		11(73.3)		9(60.0)	
T ₄	23	13(56.5)		20(87.0)		14(60.9)	
TNM 分期							
I 期	9	4(44.4)	0.637	3(33.3)	0.005	5(55.6)	0.599
II 期	15	7(46.7)		9(60.0)		8(53.3)	
III 期	18	10(55.6)		13(72.2)		12(66.7)	
IV 期	21	11(52.4)		18(85.7)		13(61.9)	

3 讨论

人 Reg IV 基因位于 1 号染色体上^[5-6],可在各种正常组织中表达,如胃、大肠、小肠和胰腺,但其表达水平较癌组织中要低得多^[7]。Violette 等^[8]研究表明,Reg IV 在大肠肿瘤(特别是在黏液癌)有较高表达。Oue 等^[7]采用定量 PCR 技术测定胃癌组织

Reg IV 基因的表达显著高于正常组织。Reg IV 的抗凋亡特性与大肠癌的进展和胃癌化疗耐药性密切相关^[9],Reg IV 有望成为一个标记高度恶性潜力的生物学标记物^[10-11]。本研究发现,Reg IV 在胃腺癌中高表达,显著高于癌旁正常组织,且与肿瘤分化程度相关,但与肿瘤临床分期、有无淋巴结转移、浸润深度等因素无关,提示 Reg IV 可能参与了胃腺癌的发

展,值得深入研究。

PI3K 是脂质激酶家族的一个成员,已被证明在调节细胞增殖、黏附、生存和活力等方面发挥了关键作用^[12]。PI3K 蛋白是细胞内信号转导的关键酶,能够磷酸化磷脂酰肌醇的肌醇环 3-位上的羟基基团,是人类肿瘤最常见的激活途径之一^[13-15]。PI3K 非常适合于药物干预,是目前肿瘤治疗最具潜力的靶标。本研究发现,胃腺癌组织 PI3K 蛋白阳性表达率显著高于癌旁正常组织,且与肿瘤分化程度、浸润深度、淋巴结转移、临床分期正相关,与既往报道结果^[16]类似。Akt 蛋白属于蛋白激酶 B 族,是 PI3K 信号通路上游和下游的中心节点^[17-20]。Akt 蛋白在肿瘤发生发展过程中通过多种信号通路被激活^[18-19,21],参与了肿瘤的发生和发展^[17]。本研究表明,胃腺癌组织 Akt 蛋白高表达,显著高于癌旁正常组织,且与淋巴转移相关,与文献报道^[16,22]类似,提示 Akt 参与了胃腺癌的发展。

目前对于 Reg Ⅳ激活的信号转导通路知之甚少。Kuniyasu 等^[23]发现 Reg Ⅳ可提高抗凋亡基因 Bcl-2、Bcl-x_L、survivin 的表达,且 Reg Ⅳ基因高效转染 MKN28 和 TMK1 胃癌细胞后可促进 Akt 磷酸化和 EGFR 磷酸化,而细胞的数量和侵袭能力未得到增长和增强。Takehara 等^[24]研究认为 Reg Ⅳ可能通过 PI3K/Akt 信号通路刺激胰腺癌细胞的生长。本研究发现,Reg Ⅳ与 PI3K、Akt 蛋白在胃腺癌中的表达均呈正相关,进一步从蛋白水平证实了上述观点。PI3K 和 Akt 蛋白作为 PI3K/Akt 信号系统的两个关键酶,为信号转导系统的上下游关系。本研究结果显示,PI3K 和 Akt 蛋白的表达在胃腺癌组织中正相关,与既往报道相符^[16]。限于研究时限及经费来源,本研究未能同期行基因水平研究,存在不足,后续研究会进一步补充。

综上所述,本研究从蛋白水平证实 Reg Ⅳ高表达与胃腺癌分化程度相关,PI3K/Akt 信号通路的激活可能参与其中,为后续基于 Reg Ⅳ蛋白的肿瘤靶向治疗研究奠定了基础。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Li A, Crimmins D L, Luo Q, Hartupee J, Landt Y, Ladenson J H, et al. Expression of a novel regenerating gene product, Reg Ⅳ, by high density fermentation in *Pichia pastoris*: production, purification, and characterization[J]. *Protein Expr Purif*, 2003, 31: 197-206.
- [2] Nanakin A, Fukui H, Fujii S, Sekikawa A, Kanda N, Hisatsune H, et al. Expression of the REG Ⅳ gene in ulcerative colitis[J]. *Lab Invest*, 2007, 87: 304-314.
- [3] Zhang Y, Lai M, Lv B, Gu X, Wang H, Zhu Y, et al. Overexpression of Reg Ⅳ in colorectal adenoma[J]. *Cancer Lett*, 2003, 200: 69-76.
- [4] Bishnupuri K S, Luo Q, Murmu N, Houchen C W, Anant S, Dieckgraefe B K. Reg Ⅳ activates the epidermal growth factor receptor/Akt/AP-1 signaling pathway in colon adenocarcinomas[J]. *Gastroenterology*, 2006, 130: 137-149.
- [5] Broekaert D, Eyckerman S, Lavens D, Verhee A, Waelput W, Vandekerckhove J, et al. Comparison of leptin- and interleukin-6-regulated expression of the rPAP gene family: evidence for differential co-regulatory signals[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2002, 13: 78-85.
- [6] Nata K, Liu Y, Xu L, Ikeda T, Akiyama T, Noguchi N, et al. Molecular cloning, expression and chromosomal localization of a novel human REG family gene, REG Ⅲ[J]. *Gene*, 2004, 340: 161-170.
- [7] Oue N, Hamai Y, Mitani Y, Matsumura S, Oshimo Y, Aung P P, 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: 2397-2405.
- [8] Violette S, Festor E, Pandrea-Vasile I, Mitchell V, Adida C, Dussaulx E, et al. Reg Ⅳ, a new member of the regenerating gene family, is overexpressed in colorectal carcinomas[J]. *Int J Cancer*, 2003, 103: 185-193.
- [9] Bishnupuri K S, Luo Q, Korzenik J R, Henderson J O, Houchen C W, Anant S, et al. Dysregulation of Reg gene expression occurs early in gastrointestinal tumorigenesis and regulates anti-apoptotic genes[J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5: 1714-1720.
- [10] Pankova-Kholmyansky I, Arber N. Reg Ⅳ can serve for early diagnosis and therapy[J]. *Cancer Biol Ther*, 2007,

- 6:123-124.
- [11] Oue N, Mitani Y, Aung P P, Sakakura C, Takeshima Y, Kaneko M, 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: 185-198.
- [12] Bowles D W, Jimeno A. New phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors for cancer [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2011, 20: 507-518.
- [13] Guillermet-Guibert J, Bjorklof K, Salpekar A, Gonella C, Ramadani F, Bilancio A, et al. The p110 β isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110 γ [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 8292-8297.
- [14] Dbouk H A, Pang H, Fiser A, Backer J M. A biochemical mechanism for the oncogenic potential of the p110 β catalytic subunit of phosphoinositide 3-kinase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 19897-19902.
- [15] Edling C E, Selvaggi F, Buus R, Maffucci T, Di Sebastiano P, Friess H, et al. Key role of phosphoinositide 3-kinase class IB in pancreatic cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16: 4928-4937.
- [16] 邹绍静, 陈兆峰, 李敏, 姬瑞, 路红, 郭庆红, 等. PI3K/AKT2 在胃癌组织表达及其与临床病理特征和生存期的关系 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2011, 26: 346-350.
- [17] Kirkegaard T, Witton C J, Edwards J, Nielsen K V, Jensen L B, Campbell F M, et al. Molecular alterations in AKT1, AKT2 and AKT3 detected in breast and prostatic cancer by FISH [J]. *Histopathology*, 2010, 56: 203-211.
- [18] Altomare D A, Testa J R. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer [J]. *Oncogene*, 2005, 24: 7455-7464.
- [19] Chin Y R, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer [J]. *Cell Signal*, 2009, 21: 470-476.
- [20] Shaw R J, Cantley L C. Ras, PI3K and mTOR signaling controls tumour cell growth [J]. *Nature*, 2006, 441: 424-430.
- [21] Bellacosa A, Kumar C C, Di Cristofano A, Testa J R. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting [J]. *Adv Cancer Res*, 2005, 94: 29-86.
- [22] Zhang H Y, Tao H M, Chen H T. Expression and clinical significance of epidermal growth factor receptor and protein kinase B in gastric carcinoma [J]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, 2011, 14: 140-142.
- [23] Kuniyasu H, Oue N, Sasahira T, Yi L, Moriwaka Y, Shimomoto T, et al. Reg IV enhances peritoneal metastasis in gastric carcinomas [J]. *Cell Prolif*, 2009, 42: 110-121.
- [24] Takehara A, Eguchi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Kasugai T, Hosokawa M, et al. Novel tumor marker REG4 detected in serum of patients with resectable pancreatic cancer and feasibility for antibody therapy targeting REG4 [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97: 1191-1197.

[本文编辑] 贾泽军