

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00148

• 论 著 •

XAB2 基因表达下调与胃癌发生的关系

蔡 慧¹, 常文军², 韩一芳², 顾立强¹, 马立业^{1*}, 曹广文^{2*}

1. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433
2. 第二军医大学基础部流行病学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察胃癌组织 XAB2 基因及蛋白表达的变化, 探讨其与胃癌发生发展的可能关系。**方法** 选取 34 例胃癌患者的肿瘤组织及癌旁正常组织, 采用 real-time RT-PCR 技术检测 XAB2 mRNA 的表达; 采用免疫组化方法检测胃癌组织、癌旁正常组织、胃炎组织 XAB2 蛋白的表达; 分析不同临床病理指标下胃癌组织 XAB2 蛋白的表达差异。**结果** 胃癌组织 XAB2 mRNA 表达显著低于癌旁正常组织 ($P < 0.01$), 且在胃癌进展早期 (I + II 期) 即明显下降。免疫组化检测显示: 胃癌组织中 XAB2 蛋白表达的阳性率为 50.0% (17/34), 明显低于配对癌旁正常组织 82.4% (28/34) 和胃炎组织 91.1% (31/34), 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 而后二者间无统计学差异。胃癌组织 XAB2 蛋白表达与胃癌分化程度正相关 ($P = 0.041$), 与肿瘤浸润深度、肿瘤大小负相关 ($P = 0.019, 0.027$); 在不同性别、年龄、肿瘤部位、有无淋巴结转移、TNM 分期间无统计学差异。**结论** XAB2 低表达可能与胃癌发生、进展密切相关, 值得深入研究以利于临床胃癌诊治。

[关键词] XAB2 蛋白; 胃肿瘤; 组织阵列分析; 差异表达

[中图分类号] R 735.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)02-0148-04

Decreased XAB2 expression and gastric cancer

CAI Hui¹, CHANG Wen-jun², HAN Yi-fang², GU Li-qiang¹, MA Li-ye^{1*}, CAO Guang-wen^{2*}

1. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Epidemiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the changes of XAB2 mRNA and protein expression in gastric cancer tissues, so as to discuss its possible relationship with the development of gastric cancer. **Methods** XAB2 mRNA expression in 34 gastric cancer tissues and the matched adjacent normal tissues was examined by real-time RT-PCR. Meanwhile, tissue biochip and immunohistochemistry were employed to examine XAB2 protein expression in gastric cancer tissues, matched adjacent normal tissues, and gastritis tissues. The expression of XAB2 in different tissues and its clinical significance was analyzed. **Results** XAB2 mRNA expression in the gastric cancer tissues was significantly lower than that in corresponding adjacent normal tissues ($P < 0.01$), and the expression level was greatly decreased at early stage of gastric cancer (stage I + II). Immunohistochemical examination showed that the positive rate of XAB2 gene was significantly lower in gastric cancer tissues (50.0%, 17/34) than those in the adjacent tissues (82.4%, 28/34) and gastritis tissues (91.1%, 31/34, $P < 0.01$), with no significant differences found between the latter two tissues. The XAB2 protein expression in gastric cancer tissues was positively correlated to tumor differentiation ($P = 0.041$) and negatively with tumor infiltration and size ($P = 0.019$ and $P = 0.027$, respectively). XAB2 expression was not associated with patients' sex, age, tumor position, lymph node metastasis or TNM stages ($P > 0.05$). **Conclusion** The lower XAB2 expression might be closely associated with the development and progression of gastric cancer, and further studying may benefit the diagnosis and therapy of gastric carcinoma patients.

[Key words] XAB2 protein; stomach neoplasms; tissue array analysis; differential expression

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(2):148-151]

[收稿日期] 2009-12-09 **[接受日期]** 2010-01-15

[基金项目] 上海市公共卫生“三年行动”计划(08GWZX0201, 08GWZX0101), 上海市科技创新行动计划(09DZ1950101). Supported by the “Three-year G&D Program” on Shanghai Public Health Affairs(08GWZX0201, 08GWZX0101) and Science and Technology Innovation Program of Shanghai(09DZ1950101).

[作者简介] 蔡 慧, 硕士生. E-mail: caihuish@163.com

* 通讯作者 (Corresponding authors). Tel: 021-81873337, E-mail: malydr@163.com; Tel: 021-81871060, E-mail: gcao@smmu.edu.cn

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,其病死率在消化道肿瘤中占首位,但其发病机制仍不明确,可能是多基因共同作用的结果^[1-2]。手术切除仍是目前早中期胃癌首选的治疗方式,而早诊断、早治疗是降低胃癌病死率的关键^[3-4]。XAB2 蛋白(xeroderma pigmentosum group A-binding protein 2)由 855 个氨基酸组成,包括 15 个四联重复肽序列,主要参与基因转录前剪切、转录及转录偶联 DNA 修复,与转录偶联修复特异性蛋白 CSA、CAB 及 RNA 聚合酶 II 起协同作用,与 p53 引起的细胞凋亡及细胞周期阻滞相关^[5-6]。

我们的前期生物信息学分析筛选结果显示,胃癌肿瘤细胞 XAB2 基因表达较正常细胞显著下调,可能与胃癌发生相关^[7]。为进一步验证其生物学分析结果,本研究观察了胃癌组织及配对正常或胃炎组织中 XAB2 mRNA 及蛋白的表达情况,并观察不同临床病理指标下胃癌组织 XAB2 蛋白的表达差异,探讨 XAB2 蛋白表达变化与胃癌发生、发展的关系,为胃癌的临床诊治提供可能的作用靶标。

1 材料和方法

1.1 标本来源及患者资料 选择第二军医大学长海医院普通外科 2007 年 11 月至 2009 年 7 月手术切除经病理证实的胃癌标本 34 例,男 20 例,女 14 例,年龄 32~84 岁,平均(60.4±12.4)岁。所有患者术前均未行放化疗,取原发肿瘤组织、癌旁正常组织(距原发癌 5 cm 以上)、胃炎组织。新鲜组织切取后于液氮冻存后送实验室-80℃冰箱保存。组织芯片由上海芯超生物科技有限公司制备。

样本包括高分化腺癌 14 例(41.1%),中分化腺癌 9 例(26.5%),低分化腺癌 11 例(32.4%)。浸润深度为:侵及黏膜、黏膜肌层 11 例,侵及肌层、浆膜层 13 例,侵出浆膜外 10 例。部位为:贲门部 11 例,胃体 10 例,胃窦部 13 例。TNM 分期: I + II 期 16 例, III + IV 期 18 例。肿瘤大小计有: <8 cm 11 例, ≥8 cm 23 例。

1.2 主要试剂及仪器 TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司;RNA 反转录试剂盒购自 Promega 公司;DNase I、rTaqDNA 聚合酶、2×SYBR Premix Ex Taq 购自 TaKaRa 公司;Reverse Transcription System 试剂盒购自 Invitrogen 公司。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。Dako 抗体稀释液、EnVision™+HRP 鼠工作液、Dako 液体 DAB+

底物系统购自丹麦 Dako 公司,H-E 染色试剂盒购自 Sigma 公司。鼠抗人 XAB2 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司。Lightcycle480 实时定量 PCR 仪购自罗氏公司。

1.3 实时定量 RT-PCR 检测 XAB2 mRNA 表达

1.3.1 总 RNA 提取及反转录 组织总 RNA 提取按 Invitrogen 公司 TRIzol 试剂盒说明书操作完成,紫外分光光度仪 UV7504 上对所提取 RNA 进行纯度鉴定和定量。取 2 μg RNA 为模板,按 Reverse-Transcription System 说明进行反转录。

1.3.2 RT-PCR 反应 XAB2 引物:F-5-CCC CCA AAA TAT GCC AAG ACC T-3,R-5-TGC TCG TCC GAC AGC ACC TC-3,反应温度为 57℃。分别以原发癌组织、正常癌旁组织的反转录产物稀释 10 倍后,取 2 μl 作为模板,反应体系(18 μl)包括 10 μl SYBR Premix Ex Taq,1 μl PCR 引物 5 μmol/L,7 μl H₂O。每孔样本重复 2 孔。加好样的 96 孔板放入 Lightcycle480 实时定量 PCR 仪,按设定程序启动扩增过程。反应程序为 95℃ 30 s 热启动,然后 95℃ 15 s,57℃ 退火 15 s,72℃ 延伸 30 s,共 40 个循环,72℃ 单次检测荧光。PCR 反应完成后,以 0.2℃ 间隔从 70℃ 升温至 95℃ 进行熔解曲线分析,以确定扩增产物的特异性。PCR 结束后应用 Lightcycle480 实时定量 PCR 仪中的相对定量软件,以 GAPDH 为参考基因,采用 E-method 法进行相对定量^[8],目标基因及参考基因的扩增效率的计算采用稀释的模板预先进行定量扩增,并根据模板稀释倍数与样本扩增的 Ct 值来制作标准曲线,然后根据标准曲线来计算基因的实际扩增效率。

1.4 免疫组化法检测胃癌组织 XAB2 蛋白的表达 组织芯片:石蜡切片常规脱蜡至水,行免疫组化和 H-E 染色(对照用)。免疫组织化学采用 EnVision 二步法,工作浓度 1:75,具体步骤参考说明书进行。结果判断:每高倍镜视野阳性细胞数 <1% 计 0 分,2%~25% 计 1 分,26%~50% 计 2 分,51%~75% 计 3 分,>75% 计 4 分。染色强度:无黄色或棕黄(胞质)或棕褐色(胞核)为 0 分,浅黄色或浅棕色为 1 分,黄色/棕黄或棕褐色为 2 分,深棕黄色或深棕褐色为 3 分。两者分值相乘计入总分,0~1 分为阴性(-),2~4 分为弱阳性(+),5~8 分为阳性(++),9~12 分为强阳性(+++)

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件,RT-PCR 结果与 GAPDH 内参结果进行 log₂ 转换后,运

用配对 *t* 检验检测上下调关系;免疫组化结果采用秩和检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实时定量 RT-PCR 检测结果 结果(图 1)表明:原发癌组织 XAB2 表达较正常组织显著下调($P < 0.01$),在 I+II 期样本即明显下降($P < 0.01$),但 III+IV 期样本差异无统计学意义($P = 0.172$)。

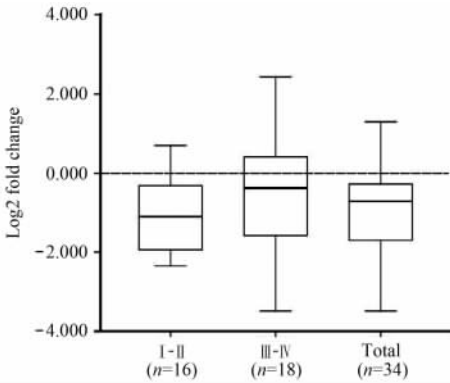


图 1 原发癌组织 XAB2 mRNA 表达的下调倍数

Fig 1 Down-regulation of XAB2 mRNA expression in primary cancer tissues

Y-axis shows the log2 fold changes of up-regulation or down-regulation multiples (> 0 means up-regulated, < 0 means down-regulated). X-axis shows the XAB2 expression of different stages. Each box from top to bottom represents the maximum, third quartile, median, first quartile and minimum of the log2 fold change, respectively

2.2 免疫组化染色检测结果 XAB2 蛋白表达阳性表达主要定位于胞核及胞质(图 2),统计学分析结果(表 1)表明:胃癌组织 XAB2 蛋白阳性表达率低于癌旁正常组织、胃炎组织($P < 0.01$),后二者间 XAB2 蛋白阳性表达差异无统计学意义。

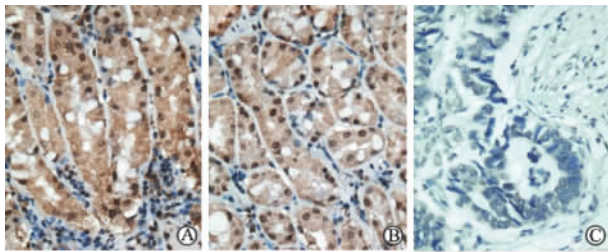


图 2 癌旁正常组织、胃炎组织、原发癌组织中 XAB2 蛋白的表达

Fig 2 Expression of XAB2 protein in gastric cancer, tumor-adjacent, and gastritis tissues

A: Tumor-adjacent tissues; B: Gastritis tissues; C: Gastric cancer tissues. Original magnification: $\times 400$

2.3 胃癌组织不同临床病理指标下 XAB2 蛋白的表达 结果(表 2)表明:胃癌组织 XAB2 蛋白表达与

胃癌分化程度正相关($P = 0.041$),与肿瘤浸润深度、肿瘤大小负相关($P = 0.019$ 、 $P = 0.027$),与淋巴结转移无相关性($P = 0.500$),与肿瘤 TNM 分期亦无相关性($P = 0.125$)。I + II 期胃癌 XAB2 阳性表达 43.8%,较 III + IV 期 61.1%低,但无统计学差异,提示在胃癌进展早期阶段 XAB2 表达即有显著下调。

表 1 不同胃组织中 XAB2 蛋白的表达

Tab 1 Expression of XAB2 protein in different tissues

Item	Gastritis tissue	Tumor-adjacent tissue	Gastric cancer tissue
The ratio of positive cells			
<1%	2	5	16
2%-25%	3	3	4
26%-50%	2	4	3
51%-75%	7	7	3
>75%	20	15	8
Intensity			
No staining	2	6	17
Weak staining	9	9	13
Moderate staining	23	19	4
Strong staining	0	0	0
Total score			
0-1	3	6	17
2-4	11	10	16
5-8	20	18	1
9-12	0	0	0

表 2 不同临床病理指标下 XAB2 蛋白表达情况

Tab 2 Expression of XAB2 protein under different clinical pathological conditions

Item	n	-	+	Positive rate(%)	P value
Sex					0.512
Male	14	7	7	50	
Female	20	10	10	50	
Age					0.174
≤ 40	3	3	0	0	
40-60	15	6	9	60	
>60	16	8	8	50	
Tumor grade					0.041
High	14	4	10	71.4	
Middle	9	4	5	55.6	
Low	11	9	2	18.2	
Tumor position					0.477
Cardia	11	4	7	63.6	
Corpus	10	5	5	50	
Antrum	13	8	5	38.5	
TNM stage					0.732
I + II	16	9	7	43.8	
III + IV	18	8	10	55.6	

续表

Item	n	-	+	Positive rate(%)	P value
Lymph node metastasis					0.500
No	15	9	6	40	
Yes	19	8	11	57.9	
Tumor size d/cm					0.027
<8	11	2	9	81.8	
≥8	23	15	8	34.8	
Depth of infiltration					0.019
Mucosa	11	2	9	81.8	
Serous membrane	13	7	6	46.2	
Penetrate-serous membrane	10	8	2	20	

3 讨论

晚期胃肿瘤不能行根治性手术及肿瘤转移是目前胃癌治疗失败和患者死亡的主要原因,肿瘤复发仍然是困扰临床的问题之一^[9]。早期诊断、早期治疗是目前肿瘤治疗的难点。Fachin 等^[10]用低剂量的 γ 射线在体外照射人正常淋巴细胞,结果发现与转录密切相关的 XAB2 基因呈现下调,同时其他已证实的相关致癌或抑癌基因呈现不同程度上调和下调。Lord 等^[11]研究发现,与 DNA 修补密切相关的 DDB1 和 XAB2 在肿瘤发生、发展中起关键作用,进一步证明该途径能有效抑制同源重组引起的 DNA 损伤,从而维持基因稳定和细胞正常发育。我们的前期研究利用生物信息学方法通过基因芯片从原位癌和癌旁组织中筛选差异表达基因,发现胃癌肿瘤细胞 XAB2 基因表达较正常细胞显著下调,可能与胃癌发生相关^[7]。XAB2 可能通过与 HLA-B 相互作用,影响胃癌的进展和复发^[12]。

本研究发现胃癌组织 XAB2 基因表达下调,并在 I + II 期患者即出现显著下调;免疫组化结果与基因检测结果基本一致,说明在胃癌进展早期 XAB2 有特异性下调。胃癌组织 XAB2 蛋白表达与临床病理指标的相关性分析结果表明:胃癌组织中 XAB2 蛋白表达水平与胃癌分化程度正相关,与肿瘤浸润深度、肿瘤大小负相关,提示 XAB2 与胃癌发

生发展密切相关,随着肿瘤进展,XAB2 的低表达或缺失表达可能是胃癌发生、发展的重要分子生物学标志,但具体机制不明,仍有待进一步实验证实。

[参考文献]

- [1] Mori M, Shimada H, Gunji Y, Matsubara H, Hayashi H, Nimura Y, et al. S100A11 gene identified by in-house cDNA microarray as an accurate predictor of lymph node metastases of gastric cancer[J]. *Oncol Rep*, 2004, 11: 1287-1293.
- [2] Fukui R, Nishimori H, Hata F, Yasoshima T, Ohno K, Nomura H, et al. Metastases-related genes in the classification of liver and peritoneal metastasis in human gastric cancer[J]. *J Surg Res*, 2005, 129: 94-100.
- [3] Leung W K, Wu M S, Kakugawa Y, Kim J J, Yeoh K G, Goh K L, et al. Screening for gastric cancer in Asia: current evidence and practice[J]. *Lancet Oncol*, 2008, 9: 279-287.
- [4] He R B, Chen J Q. Pre-operative chemotherapy for gastric cancer[J]. *J Int Med Res*, 2009, 37: 1259-1266.
- [5] Nakatsu Y, Asahina H, Citterio E, Rademakers S, Vermeulen W, Kamiuchi S, et al. XAB2, a novel tetra-tricopeptide repeat protein involved in transcription-coupled DNA repair and transcription[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 34931-34937.
- [6] Fousteri M, Mullenders L H. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells; molecular mechanisms and biological effects[J]. *Cell Res*, 2008, 18: 73-84.
- [7] Chang W, Ma L, Lin L, Gu L, Liu X, Cai H, et al. Identification of novel hub genes associated with liver metastasis of gastric cancer[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125: 2844-2853.
- [8] Tellmann G. The E-Method: a highly accurate technique for gene-expression analysis[J]. *Nat Methods*, 2006, 21: 1-11.
- [9] Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis[J]. *Semin Oncol*, 2002, 29(6 Suppl 16): 15-18.
- [10] Fachin A L, Mello S S, Sandrin-Garcia P, Junta C M, Donadi E A, Passos G A, et al. Gene expression profiles in human lymphocytes irradiated *in vitro* with low doses of gamma rays[J]. *Radiat Res*, 2007, 168: 650-665.
- [11] Lord C J, McDonald S, Swift S, Turner N C, Ashworth A. A high-throughput RNA interference screen for DNA repair determinants of PARP inhibitor sensitivity[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2008, 7: 2010-2019.
- [12] Ueda Y, Ishikawa K, Shiraishi N, Yokoyama S, Kitano S. Clinical significance of HLA class I heavy chain expression in patients with gastric cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2008, 97: 451-455.

[本文编辑] 贾泽军