

胃癌中硒结合蛋白-1 的表达及其临床病理学意义

张锦 董卫国 林军

【摘要】 目的 检测硒结合蛋白 1 (SBP1) 在胃癌细胞系 SGC7901、BGC823、正常胃黏膜上皮细胞系 GES-1、胃癌组织以及正常胃黏膜组织中的表达水平,分析其表达变化与胃癌临床病理因素之间的联系,探讨其作为胃癌标记物的可能性。**方法** 回顾性分析 2006 年至 2007 年武汉大学中南医院收治的 135 例胃癌患者的临床资料,利用免疫组织化学染色法对胃癌组织及 16 例正常胃黏膜组织中 SBP1 蛋白表达部位及水平进行测定,并进行半定量评分。Western blot 和 RT-PCR 检测细胞系 SGC7901、BGC823、GES-1 中 SBP1 蛋白和 mRNA 的表达水平。组间比较采用单因素方差分析,SBP1 表达强度与临床病理因素的关系采用 χ^2 检验。**结果** SBP1 mRNA 在胃癌细胞系 BGC823、SGC7901 中的表达分别为 0.120 ± 0.020 、 0.133 ± 0.015 ,显著低于其在正常胃黏膜上皮细胞系 GES-1 中的表达 (0.907 ± 0.015) ($F = 2106.462$, $P < 0.05$)。胃癌细胞系 BGC823、SGC7901 中的 SBP1 蛋白表达分别为 0.253 ± 0.015 、 0.273 ± 0.015 ,显著低于其在正常胃黏膜上皮细胞系 GES-1 中的表达水平 (0.877 ± 0.025) ($F = 1026.758$, $P < 0.05$)。3 例胃癌组织中 SBP1 呈强免疫反应,而 16 例正常胃黏膜中 SBP1 呈强免疫反应。SBP1 蛋白表达减少与胃癌患者临床分期相关 ($\chi^2 = 12.629$, $P < 0.05$),而与患者的性别、年龄、肿瘤组织学分型、分化程度、浸润深度以及淋巴结转移无关 ($\chi^2 = 2.142$, 0.860 , 1.838 , 5.001 , 4.858 , 1.994 , $P > 0.05$)。**结论** SBP1 表达减少可以作为一种胃癌诊断的新指标。SBP1 下调在胃癌发生及进展中可能发挥着重要作用。

【关键词】 胃肿瘤; 硒结合蛋白-1; 免疫组织化学

Expression and clinical significance of selenium binding protein 1 in gastric cancer ZHANG Jin*, DONG Wei-guo, LIN Jun. * Department of Gastroenterology, People's Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China
Corresponding author: LIN Jun, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China, Email: linjun64@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To detect the expression of selenium binding protein 1 (SBP1) in gastric cancer cell line SGC7901, BGC823, normal gastric epithelial cell line GES-1, gastric cancer tissues and normal gastric tissues, explore the relationship between SBP1 and pathologic features, and discuss the feasibility of SBP1 as a diagnostic marker of gastric cancer. **Methods** The clinical data of 135 patients with gastric cancer who were admitted to Zhongnan Hospital of Wuhan University from 2006 to 2007 were retrospectively analyzed. The expression of SBP1 in the gastric cancer tissues and 16 cases of normal gastric tissues were detected by immunohistochemistry. The mRNA and protein expressions of SBP1 of SGC7901, BGC823 and GES-1 were determined by Western blot and RT-PCR. All data were analyzed by using chi-square test and one-way analysis of variance. **Results** The mRNA expressions of SBP1 in BGC823 and SGC7901 were 0.120 ± 0.020 and 0.133 ± 0.015 , respectively, which were significantly lower than 0.907 ± 0.015 in GES-1 ($F = 2106.462$, $P < 0.05$). The protein expression of SBP1 in BGC823 and SGC7901 were 0.253 ± 0.015 and 0.273 ± 0.015 , respectively, which were significantly lower than 0.877 ± 0.025 in GES-1 ($F = 1026.758$, $P < 0.05$). A strong positive reaction of SBP1 was observed in 3 cases of gastric cancer tissues and 16 cases of normal gastric tissues. The decrease of the protein expression of SBP1 was correlated with clinical stages of the patients ($\chi^2 = 12.629$, $P < 0.05$), rather than the sexes, ages, tumor histological types, tumor differentiation, infiltration depths and lymph node metastasis ($\chi^2 = 2.142$, 0.860 , 1.838 , 5.001 , 4.858 , 1.994 , $P > 0.05$). **Conclusions** The decrease of SBP1 expression could be used as a marker in diagnosing gastric cancer. Down-regulation of SBP1 expression may play an important role in the genesis and prognosis of gastric cancer.

【Key words】 Gastric neoplasms; Selenium binding protein 1; Immunohistochemistry

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2010.06.011

基金项目: 湖北省卫生计划基金资助项目 (XJ4D01)

作者单位: 430060 武汉大学人民医院消化内科 (张锦、董卫国); 430071 武汉大学中南医院消化内科 (林军)

通信作者: 林军, Email: linjun64@yahoo.com.cn

硒是一种具有显著抗癌效应的物质。它以硒代半胱氨酸的形式参与多种蛋白质的翻译,这些蛋白质在细胞防御和激素调节中具有非常重要的作用^[1]。近几年研究发现硒结合蛋白(selenium binding protein, SBP)是一种与其他含硒蛋白质不同的特殊蛋白质^[2]。目前已知的 SBP 基因家族包括 SBP1、SBP2、SBP3。多项研究结果表明 SBP1 下调与肿瘤快速进展有关^[3-6]。为了探讨 SBP1 在胃癌发生、发展中的作用,本研究检测正常胃黏膜上皮细胞系 GES-1、胃癌细胞系、正常胃黏膜组织以及胃癌组织中 SBP1 的表达,并进一步分析其表达水平与胃癌临床病理因素之间的关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源

2006 年至 2007 年在武汉大学中南医院接受手术的胃癌患者 135 例,男 82 例,女 53 例;年龄 34 ~ 79 岁,平均年龄 60 岁。所有患者经病理检查诊断证实并有完整的病例资料,术前未进行放疗或化疗。胃癌组织经 40% 甲醛固定、石蜡包埋。按胃癌协作组制定的有关胃癌大体分型、组织学分型和临床病理分期等规范进行严格的病理诊断并判断肿瘤转移情况。经胃镜活组织检查取正常胃黏膜组织 16 例。中分化胃癌细胞系 SGC7901、低分化胃癌细胞系 BGC823 以及正常胃黏膜上皮细胞系 GES-1 均购自中国科学院上海细胞库,并培养于 RPMI 1640 细胞培养液(购自美国 Sigma 公司)中,对数生长期传代培养。

1.2 方法

1.2.1 蛋白的制备:细胞经预冷的 PBS(10 mmol/L, pH 7.2 ~ 7.3)漂洗 3 次后,平均每 10^6 个细胞加入含 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟化物的细胞裂解液(购自江苏碧云天生物技术研究)1 ml,冰上充分裂解,离心。吸取上清液,BSA 法检测蛋白含量后 -20°C 冻存备用。

1.2.2 RT-PCR 检测:Trizol 试剂一步法提取总 RNA。利用紫外分光光度仪和琼脂糖凝胶电泳检测所得 RNA,进行浓度、纯度及完整性分析。SBP1 及内参照 β -肌动蛋白的引物经 GenBank 检索,利用 Primer Express 1.5 软件设计,引物购自上海生工生物工程技术服务有限公司。SBP1 引物序列为:SBP1-F:5'-TCAGATGATCCAGCTCAGCCT-3',SBP1-R:5'-TCAC-AGAGCCTTCCCTGATGA-3',产物长度为 109 bp。 β -肌动蛋白引物序列为: β -肌动蛋白-F:5'-GTTTCGTTTCCGCTGTTA-3'。 β -肌动蛋白-R:5'-TTTCTCCCTCTTGCCATC-3',产物长度为 373 bp。扩增按以下条件

进行:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 终末延长 7 min。PCR 产物加样于 1.2% 琼脂糖凝胶中,电泳后在紫外灯下观察电泳条带,并进行吸光度扫描及拍照。

1.2.3 Western blot 检测:将蛋白与等量含有 MTT 的 2 $\times$ SDS 上样缓冲液混匀后,100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水中变性 5 min,每孔上样 20 μl ,每个蛋白标本同时上 2 个孔,分别检测目的蛋白和内参照。电泳后将凝胶上的蛋白转至 PVDF 膜,5% 的脱脂牛奶 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。次日将膜取出用 TBST 洗 3 次,每次 15 min,一抗为抗 SBP1 抗体(购自日本 MBL 公司),用封闭缓冲液稀释(1:500),室温孵育 2 h。二抗为辣根过氧化物酶标记的抗鼠抗体,室温孵育 1 h。DAB 显色,拍照并利用 BandScan 5.0 软件进行分析。

1.2.4 免疫组织化学染色:将组织蜡块 4 μm 连续冷冻切片。严格按照 SP 超敏试剂盒说明书进行染色。

1.2.5 结果判断:遵循双盲原则,由另一组工作人员完成结果判读。显微镜下观察 SBP1 蛋白在胃癌细胞中的表达部位,免疫组织化学评分(immunohistochemical score, IHS)结合阳性细胞百分比及阳性细胞染色强弱两个方面进行:a 为阳性细胞百分比(无阳性细胞记 0 分,阳性细胞占 1% ~ 10% 记 1 分,11% ~ 50% 记 2 分,51% ~ 80% 记 3 分,81% ~ 100% 记 4 分);b 为阳性细胞染色强弱(阴性记 0 分,弱阳性记 1 分,中度阳性记 2 分,强阳性记 3 分)。a、b 两项乘积即为该例组织的 HIS。分值 9 ~ 12 为强免疫反应,5 ~ 8 为中等免疫反应,0 ~ 4 为弱免疫反应。

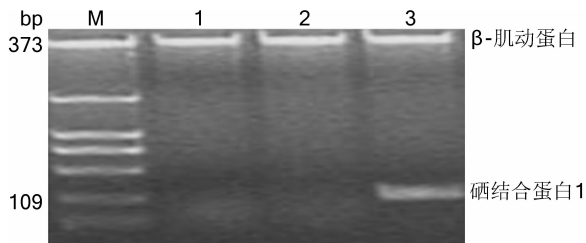
1.3 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,SBP1 表达强度与临床病理因素的关系采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SBP1 在胃癌细胞系及正常胃黏膜上皮细胞系中的表达

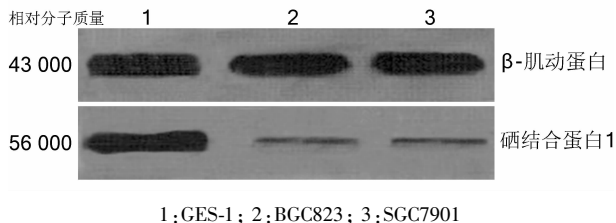
RT-PCR 检测结果显示,SBP1 mRNA 在胃癌细胞系 BGC823、SGC7901 中表达分别为 0.120 ± 0.020 、 0.133 ± 0.015 ,两组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。SBP1 mRNA 在正常胃黏膜上皮细胞系 GES-1 中表达为 0.907 ± 0.015 ,与胃癌细胞系比较,差异有统计学意义($F = 2106.462, P < 0.05$)。见图 1。



M:Marker; 1:SGC7901; 2:BGC823; 3:GES-1

图1 RT-PCR 检测 SBP1 mRNA 在胃癌细胞系及正常胃黏膜上皮细胞系中的表达情况

Western blot 检测结果显示,胃癌细胞系 BGC823、SGC7901 中 SBP1 蛋白表达分别为 0.253 ± 0.015 、 0.273 ± 0.015 , 两组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但显著低于正常胃黏膜上皮细胞系 GES-1 中 SBP1 蛋白的表达水平 (0.877 ± 0.025) ($F = 1026.758$, $P < 0.05$)。见图 2。

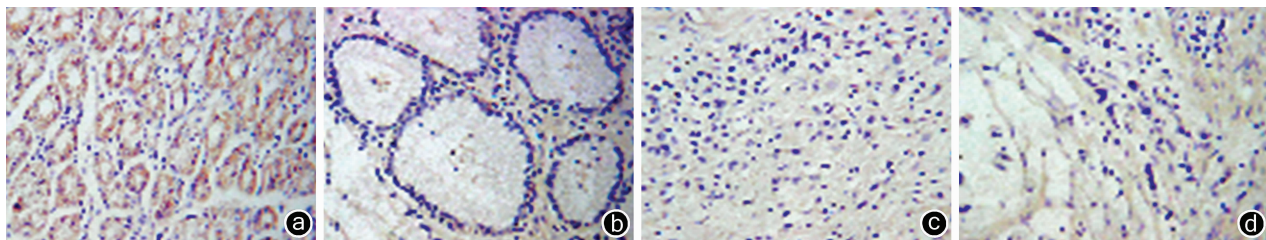


1:GES-1; 2:BGC823; 3:SGC7901

图2 Western blot 检测 SBP1 蛋白在胃癌细胞系及正常胃黏膜上皮细胞系中的表达情况

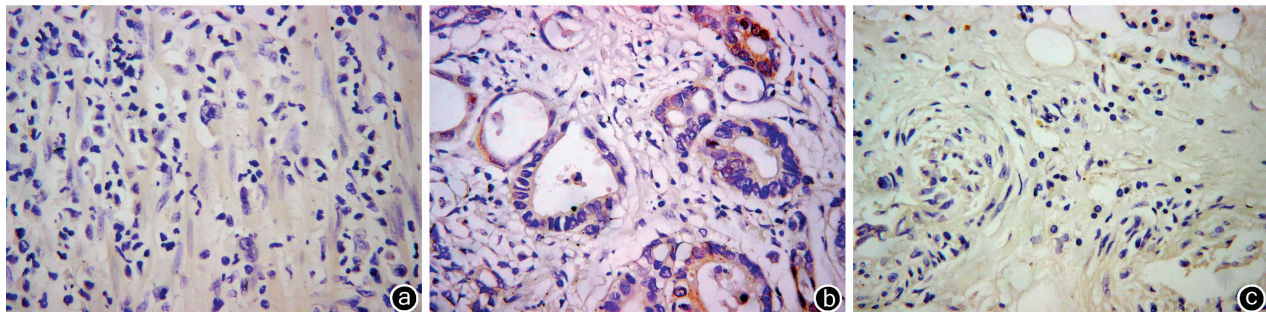
2.2 SBP1 在胃癌及正常胃黏膜组织中的表达

135 例胃癌组织中, 110 例 SBP1 呈弱免疫反应,



a:SBP1 在正常胃黏膜细胞胞质及胞核中表达丰富; b:SBP1 在乳头管状腺癌组织中表达减少; c:SBP1 在印戒细胞癌中表达减少; d:SBP1 在黏液腺癌中表达减少

图3 SBP1 在正常胃黏膜组织及不同组织学类型的胃癌组织中的表达 SP×200



a:SBP1 在低分化胃腺癌中表达减少; b:SBP1 在中分化胃腺癌中表达减少; c:SBP1 在高分化胃腺癌中表达减少

图4 SBP1 在不同分化程度的胃腺癌组织中的表达 SP×400

22 例呈中等免疫反应, 3 例呈强免疫反应, 而 16 例正常胃黏膜组织均呈强免疫反应(图 3, 4)。免疫组织化学染色结果显示, SBP1 在正常胃黏膜细胞的胞质及胞核内表达丰富, 而在生发中心、结缔组织等部位表达很弱(图 3a)。

2.3 胃癌组织中 SBP1 表达与临床病理因素的关系

SBP1 表达减少与患者的性别、年龄、肿瘤浸润深度及淋巴结转移情况无关。SBP1 表达水平在高、中、低分化癌组织中差异无统计学意义。乳头管状腺癌、印戒细胞癌及黏液腺癌中 SBP1 表达均明显减少, 但 3 者比较差异无统计学意义。SBP1 在不同临床分期的胃癌组织的表达差异有统计学意义, IV 期胃癌组织中 SBP1 呈弱免疫反应的例数更多。见表 1。

3 讨论

目前, 由于缺少用于诊断和监测疾病进展的特异、敏感的生物标记, 临床上绝大多数胃癌患者诊断时已经处于进展期, 5 年生存率非常低^[7]。而现在临床上最常用的胃癌标记物 CEA 和 CA19-9 敏感性不高, 特异性不强。有研究结果证实 SBP1 在多种肿瘤组织或细胞系中表达减少或缺失, 但是 SBP1 在胃癌中的表达情况以及 SBP1 与胃癌临床病理因素的关系还不清楚^[3-6]。因此, 进一步研究将有助于提高 SBP1 作为早期胃癌诊断的生物标记的可能性。

表 1 胃癌组织中 SBP1 表达与临床病理因素的关系(例)

SBP1 表达情况	例数	男	女	年龄(岁)		浸润深度		组织学分型			分化程度			淋巴结转移		临床分期			
				≥60	<60	黏膜及 黏膜下层	肌层及 浆膜层	乳头管 状腺癌	印戒 细胞癌	黏液 腺癌	高	中	低	有	无	I	II	III	IV
弱免疫反应	110	65	45	66	44	20	90	77	19	14	9	30	71	77	33	12	27	50	21
中等免疫反应	22	14	8	13	9	6	16	14	4	4	3	9	10	12	10	8	7	5	2
强免疫反应	3	3	0	1	2	2	1	2	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0
χ ² 值		2.142		0.860		4.858		1.838			5.001			1.994		12.629			
P 值		>0.05		>0.05		>0.05		>0.05			>0.05			>0.05		<0.05			

我们利用 Western blot 检测胃癌细胞系 SGC7901、BGC823 及正常胃黏膜上皮细胞系 GES-1 中 SBP1 的表达情况,结果显示两种分化的胃癌细胞系中,SBP1 表达均显著降低,而 GES-1 中 SBP1 表达丰富。RT-PCR 检测结果也显示 SBP1 mRNA 在 SGC7901 和 BGC823 中表达缺失,而在 GES-1 中强免疫表达。我们推测,SBP1 表达下调是正常胃黏膜上皮细胞转变为胃癌细胞的重要分子生物学事件。SBP1 可能在维持正常胃黏膜上皮的形态及功能上具有非常重要的意义。

本研究结果显示,胃癌组织中 SBP1 的表达与患者的性别、年龄、肿瘤浸润深度以及淋巴结转移情况均无关。Chen 等^[8]的研究结果表明,肺癌中 SBP1 表达减少与肿瘤分化程度有关,低分化肺癌中 SBP1 显著减少,与中分化及高分化的肺癌比较差异明显。而在结直肠癌和卵巢癌中,SBP1 表达减少与肿瘤分化程度并无明显关系^[4-5]。我们的研究结果表明,在不同分化程度的胃癌组织及细胞系中 SBP1 表达均减少,不同分化组之间差异无统计学意义。这种结论的不一致,可能是由于组织特异性引起的。另外,本研究中各个临床分期的胃癌组织中 SBP1 的表达情况存在明显差异,Ⅳ期胃癌组织中 SBP1 减少更明显。结合现有的研究,我们推测 SBP1 表达减少或缺失不仅与胃癌的发生密切相关,它可能在胃癌的恶性进展中也发挥十分重要的作用。

目前,SBP1 在肿瘤中表达减少的机制以及其受到的调节情况尚不清楚。新近研究指出结肠癌组织及细胞系中 SBP1 启动子呈现超甲基化状态。利用 5-氮杂-2-脱氧胞苷酸使 SBP1 启动子脱甲基不仅增加了启动子的活力,同时还抑制了 SBP1 的表达^[9]。此前有报道指出前列腺癌细胞系中 SBP1 的表达被雄性激素抑制,推测 SBP1 的表达可能受到了若干转录因子的调节^[10]。SBP1 可能是以硒元素依赖性方式,通过泛素化/去泛素化作用介导的蛋白降解通路在体内发挥作用^[11]。这也再次验证了硒元素

本身对 SBP1 表达的调节。SBP1 可能参与了硒元素介导的抗癌效应。由于 SBP1 中的硒元素并非以硒代半胱氨酸形式结合,它是与传统含硒蛋白质不同的一类特殊蛋白。因此,不同细胞系中 SBP1 是否有相同的表达情况,以及控制这种转录下调的机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] Papp LV, Lu J, Holmgren A, et al. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal*,2007,9(7):775-806.

[2] Ogasawara Y, Lacourciere GM, Ishii K, et al. Characterization of potential selenium-binding proteins in the selenophosphate synthetase system. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2005,102(4):1012-1016.

[3] Kim H, Kang HJ, You KT, et al. Suppression of human selenium-binding protein 1 is a late event in colorectal carcinogenesis and is associated with poor survival. *Proteomics*,2006,6(11):3466-3476.

[4] Huang KC, Park DC, Ng SK, et al. Selenium binding protein 1 in ovarian cancer. *Int J Cancer*,2006,118(10):2433-2440.

[5] Brown LM, Helmke SM, Hunsucker SW, et al. Quantitative and qualitative differences in protein expression between papillary thyroid carcinoma and normal thyroid tissue. *Mol Carcinog*,2006,45(8):613-626.

[6] Stammer K, Edassery SL, Barua A, et al. Selenium-Binding Protein 1 expression in ovaries and ovarian tumors in the laying hen, a spontaneous model of human ovarian cancer. *Gynecol Oncol*,2008,109(1):115-121.

[7] 曹晖,卞育海.可切除进展期胃癌先行化疗还是先行手术. *中华消化外科杂志*,2009,8(5):334-337.

[8] Chen G, Wang H, Miller CT, et al. Reduced selenium-binding protein 1 expression is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas. *J Pathol*,2004,202(3):321-329.

[9] Pohl NM, Tong C, Fang W, et al. Transcriptional regulation and biological functions of selenium-binding protein 1 in colorectal cancer In vitro and in nude mouse xenografts. *PLoS One*,2009,4(11):e7774.

[10] Dong Y, Lee SO, Zhang H, et al. Prostate specific antigen expression is down-regulated by selenium through disruption of androgen receptor signaling. *Cancer Res*,2004,64(1):19-22.

[11] Jeong JY, Wang Y, Sytkowski AJ. Human selenium binding protein-1 (hSP56) interacts with VDU1 in a selenium-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*,2009,379(2):583-588.

(收稿日期: 2010-05-22)

(本文编辑: 张昊)