

□消化·泌尿系肿瘤□

凋亡诱导因子(AIF)在胃癌细胞和组织中的表达及意义

王昌正,李英男,吴本俨,朱 鸣,王卫华

The expression and significance of AIF in gastric cancer tissues and cell lines

WANG Chang - zheng, LI Ying - nan, WU Ben - yan, ZHU Ming, WANG Wei - hua

Department of Geriatric Gastroenterology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective: To explore the expression of apoptosis inducing factor (AIF) and its correlation with the clinicopathological characteristics in gastric cancers **Methods:** Immunoblotting (B) method was performed to study the expression level of the AIF in cells Immunohistochemical method was used to detect the expression of AIF in 29 cases of gastric cancer tissues and 10 cases of normal gastric mucosa **Results:** The expression level of AIF in gastric cancer cells (MGC - 803, SGC - 7901) was stronger than those of gastric epithelial cells (HFE - 145, GES - 1). The positive rates of AIF expression in the gastric cancer and normal gastric tissues were 41.38% and 10%, respectively. However there was no significant difference in AIF expression with respect to the depth of invasions or lymph nodes metastasis, either **Conclusion:** Increased expression of AIF in gastric cancer tissues and cells suggests that AIF expression may play a role in gastric tumorigenesis

【Key words】apoptosis inducing factor (AIF); gastric cancer cell; gastric cancer tissue; immunoblotting (B); immunohistochemistry

Modern Oncology 2008, 16(7): 1184 - 1186

【摘要】目的:探讨凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)在胃癌中的表达及其与临床病理特征的关系。方法:用免疫印迹法检测 AIF在细胞中的表达量;用免疫组化法检测 AIF在 29例胃癌组织和 10例癌旁正常胃组织中的表达。结果:胃癌细胞株中(低分化胃癌细胞株 MGC - 803、中分化胃癌细胞株 SGC - 7901) AIF的表达量高于胃上皮细胞株(胎儿胃上皮细胞株 HFE - 145、胃上皮永生细胞株 GES - 1); AIF在胃癌组织、癌旁正常胃组织中表达阳性率分别为 41.38%、10%,胃癌组织中 AIF的表达与肿瘤的浸润深度、TNM分期、有无淋巴结转移均无关 ($P > 0.05$)。结论: AIF的表达量上调可能对胃癌的发生、发展起一定作用。

【关键词】凋亡诱导因子;胃癌细胞;胃癌组织;免疫印迹;免疫组化

【中图分类号】R735.2 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1672 - 4992 - (2008)07 - 1184 - 03

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,其发生发展是一个多基因参与和多因素作用的复杂过程。细胞凋亡的异常与肿瘤的发生密切相关^[1]。凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)既具有细胞凋亡活性又具有氧化还原酶活性。正常生理状态下, AIF位于线粒体的膜间隙,具有氧化还原酶活性;细胞受到凋亡刺激后, AIF从线粒体易位到胞浆中,再易位到细胞核,在细胞核中与染色体结合,从而引起细胞凋亡。与其他凋亡途径不同, AIF可以不依赖于 caspase途径而行使细胞凋亡功能^[2-5]。本研究中我们检测了 AIF在胃上皮细胞和胃癌细胞中表达量的差别;并检测了 AIF在胃癌组织和癌旁正常胃组织中的表达,以探讨胃癌组织中 AIF的表达与胃癌生物学行为的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

收集我院 1999年 12月 - 2002年 6月胃癌手术切除标

本 29例,其中男性 21例,女性 8例,年龄在 35岁 - 73岁(54.34 ± 10.58)岁之间,中位年龄 56岁,均有明确的病理诊断,29例均为腺癌。术后 TNM分期:Ⅰ期 2例,Ⅱ期 6例,Ⅲ期(包括Ⅲa和Ⅲb期)13例,Ⅳ期 8例。同时还选取该 29例患者中的 10例癌旁正常胃组织作比较。

细胞株:MGC - 803、SGC - 7901、HFE - 145、GES - 1均由本实验室保存。

1.2 试剂

免疫组化 SP - 9003试剂盒购自中山生物公司;山羊抗人 AIF多克隆抗体、鼠抗 β -actin单克隆抗体均购自 Santa Cruz公司;DMEM (High glucose)为 GBCO公司产品;胎牛血清(FBS)购自杭州江滨生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 MGC - 803、SGC - 7901、HFE - 145、GES - 1细胞株均在含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中, 37℃, 5% CO₂条件下培养。

1.3.2 免疫印迹 将细胞裂解上清进行 SDS - PAGE电泳,电泳结束后将蛋白转印硝酸纤维素膜(半干转移, Bio - Rad, 20V 2h),用含 5%脱脂奶粉的 TBST (含 0.05% Tween 20的 TBST)4 封闭过夜, TBST洗涤 3次,每次 5min。加入适度稀

【收稿日期】 2007 - 08 - 23

【基金项目】 解放军总医院科技创新基金资助课题(06LN02)

【作者单位】 解放军总医院南楼消化科,北京 100853

【作者简介】 王昌正(1971 -),男,山东烟台人,助理研究员,博士,主要从事消化肿瘤的相关研究。



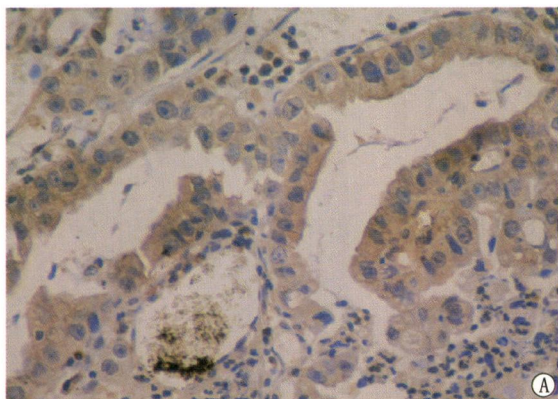
释于 TBST的相应抗体 (如 AIF多克隆抗体、抗 β -actin单克隆抗体等),室温孵育 1h,同上洗涤后加入稀释于含 5%脱脂奶粉 TBST的辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1h,洗涤后用 Immunoblotting luminol reagent显色。

1.3.3 免疫组化 组织标本制成蜡块后,4 μ m连续切片,60 烤片过夜。以二甲苯脱蜡,酒精水化后,予 PBS冲洗 3次,每次 5min。用枸橼酸盐高压修复组织抗原,然后用 3%过氧化氢溶液室温孵育 15min,予 PBS冲洗 3次,每次 5min。用正常兔血清室温封闭 15min,滴加 AIF一抗 (1:200),湿盒内 37 孵育 2h后;滴加生物素标记的兔抗山羊 IgG二抗,湿盒内 37 孵育 15min;再滴加辣根酶标记链霉卵白素,湿盒内 37 孵育 15min。DAB显色,苏木素复染。用 PBS代替一抗作空白对照。

1.3.4 判定标准 细胞内见棕褐色颗粒者为 AIF表达阳性细胞。每张切片在高倍镜下随机选取 10个视野,按阳性细胞占同类细胞总数的百分比来计算。5%为阴性 (-),6% - 29%为低表达 (+),30% - 60%为表达阳性 (++) ,61% - 100%为表达强阳性 (+++)。

1.3.5 统计学方法 采用 χ^2 检验,检验标准以 $P < 0.05$ 为有显著差异。

2 结果



2.1 AIF在不同细胞株表达量的检测

B检测显示,AIF在胃癌细胞株 (低分化胃癌细胞株 MGC - 803、中分化胃癌细胞株 SGC - 7901)和胃上皮细胞株 (胎儿胃上皮细胞株 HFE - 145、胃上皮永生细胞株 GES - 1) 均有表达,且在 MGC - 803、SGC - 7901的表达量高于 HFE - 145、GES - 1 (图 1)。以细胞中 β -actin的表达作为对照。

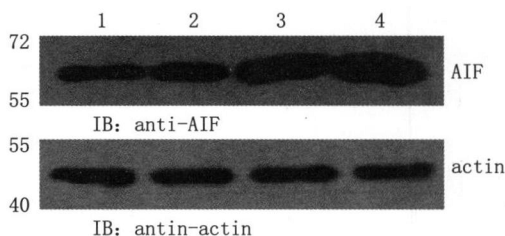


图 1 免疫印迹检测 AIF在不同细胞株的表达

分别用 AIF抗体、 β -actin抗体检测不同细胞株的细胞裂解上清中 AIF及 β -actin的表达量: 1: HFE - 145; 2: GES - 1; 3: MGC - 803; 4: SGC - 7901。

2.2 AIF在胃癌组织和癌旁正常组织中表达的检测

AIF在胃癌组织和正常组织的阳性率分别为 41.38% (12/29)、10% (1/9),前者显著高于后者 ($P < 0.05$)。(图 2)

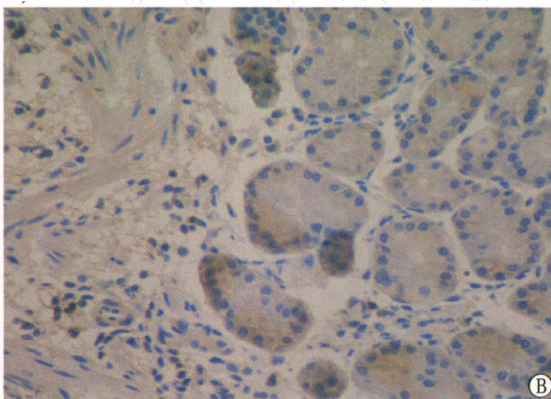


图 2 免疫组化检测 AIF在胃癌及癌旁正常组织中的表达
A:胃癌组织;B:癌旁正常组织

2.3 AIF在胃癌组织中的表达与临床病理特征之间的关系

选择组织类型、TNM分期、转移情况和浸润深度作为胃癌生物学行为的指标。本实验结果表明,AIF的表达与上述因素均无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 胃癌组织中 AIF的表达与临床病理特征之间的关系 (n, %)

临床病理特征	例数	AIF表达		阳性率 (%)	χ^2	P
		阳性	阴性			
组织类型						
中高分化	9	6	3	66.7	3.715	0.156
低分化	15	4	11	26.7		
黏液、印戒	5	2	3	40		
TNM分期						
+	8	2	6	25	1.222	0.408
+	21	10	11	47.6		
浸润深度						
T ₁ + T ₂	5	1	4	20	1.138	0.370
T ₃ + T ₄	24	11	13	45.8		
淋巴结转移						
有	23	10	13	43.5	0.202	1.000
无	6	2	4	33.3		

3 讨论

细胞凋亡是多细胞生物体更新正常细胞和清除异常细胞的重要手段,对于维持生物体正常发育和行使功能起重要的作用。线粒体是细胞凋亡的调控中心^[6]。受凋亡刺激后,线粒体外膜通透性增高,将位于膜间隙的可溶性蛋白释放到细胞质中,这些蛋白或激活 caspase途径,或独立的与细胞核内染色体作用,引起细胞凋亡^[7]。AIF是 Susin等发现具有促凋亡活性的蛋白,其对细胞的凋亡诱导作用是非 caspase 依赖的。AIF位于线粒体膜间隙,既具有细胞凋亡活性又具有氧化还原酶活性,但二者的作用是解偶联的。细胞受到凋亡刺激后,AIF从线粒体易位到胞浆中,再易位到核,在核中与染色体结合,使染色体凝集,并断裂成约 50kb的大片段,从而引起细胞凋亡^[2-3]。

本研究发现,胃癌细胞株中 (低分化胃癌细胞株 MGC - 803、中分化胃癌细胞株 SGC - 7901)AIF的表达量高于胃上皮细胞株 (胎儿胃上皮细胞株 HFE - 145、胃上皮永生细胞株 GES - 1);AIF在胃癌组织中的表达也高于正常胃组织。AIF在肿瘤细胞中呈现高表达,其可能的解释是:AIF对细胞凋亡起促进作用,因此对肿瘤细胞产生选择性机制,即令具有

抵抗 AIF 凋亡作用的肿瘤细胞得以存活;另一个可能性就是 AIF 在细胞中发挥消除自由基或清除过氧化物的毒性,从而使细胞得以继续存活。线粒体中的 AIF 可作为一种电子传递酶在电子传递中起到重要的作用,为细胞的生长活动提供能量,这在生长比较活跃旺盛的肿瘤细胞中是非常重要的。Lee JW 等对 60 例胃癌患者的组织标本用免疫组化染色检测发现:AIF 在 42 例患者(70%)的胞浆中阳性表达;AIF 的表达与胃癌的组织类型和浸润深度无关^[8]。本研究中 AIF 在胃癌组织中表达的阳性率(41.38%)低于 Lee JW 的结果(70%),可能与种族个体差异及所取组织不同有关;也可能因为我们的标本保存时间偏长,从而使其抗原有所损失。

综上所述,AIF 在胃癌中的表达量上调提示 AIF 可能在胃癌的发生和演化中起一定作用。**AIF 本身既是细胞凋亡的起始因子,又是细胞凋亡的效应因子**^[3],AIF 在胃癌中的高表达以及它在细胞凋亡中的作用,有可能使 AIF 成为胃癌预防和治疗的新靶点。

【参考文献】

[1] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. Science, 1995, 267: 1456 - 1462.

[2] Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor [J]. Nature, 1999, 397: 441 - 446.

[3] Joza N, Susin SA, Daugas E, et al Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death [J]. Nature, 2001, 410: 549 - 554.

[4] Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, et al Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space [J]. EMBO, 2005, 24: 1375 - 1386.

[5] Ye H, Cande C, Stephanou NC, et al DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor [J]. Nat Struct Biol, 2002, 9: 680 - 684.

[6] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis [J]. Science, 1999, 281: 1309 - 1313.

[7] Dawson VL, Dawson TM. Deadly conversations: Nuclear - Mitochondrial cross-talk [J]. J Bioenerg Biomembr, 2004, 36: 287 - 294.

[8] Lee JW, Eun GJ, Young HS, et al Immunohistochemical analysis of apoptosis-inducing factor (AIF) expression in gastric carcinomas [J]. Pathol Res and Pract, 2006, 202: 497 - 501.

胃癌组织 CD44v6、COX - 2、MMP - 2 表达及其与淋巴结转移的关系

于颖剑,高鹏志

Expression of CD44v6, COX - 2, MMP - 2 in gastric carcinomas and their relationship to lymph node metastasis

YU Ying - jian, GAO Peng - zhi

No 1 Hospital Shijiazhuang City, Shijiazhuang 050011, China

【Abstract】 Objective: To study the expression of CD44v6, COX - 2 and MMP - 2 in gastric carcinomas and their relationship to lymph node metastasis **Methods:** The expressions of CD44v6, COX - 2 and MMP - 2 in gastric carcinomas were detected by immunohistochemical method, and their relationship with lymph node metastasis was analyzed **Results:** The positive rates of the expression of CD44v6, COX - 2 and MMP - 2 in 60 gastric cancer tissues were 61.7% (37/60), 55.0% (33/60) and 73.3% (44/60), respectively. The expressions of CD44v6, COX - 2 and MMP - 2 were significantly related with lymph node metastasis **Conclusion:** The expressions of CD44v6, COX - 2 and MMP - 2 were significantly related with lymph node metastasis in gastric carcinomas, they can be used as indicators to predict prognosis of gastric carcinomas

【Key words】gastric carcinoma; CD44v6; COX - 2; MMP - 2; lymph node metastasis; immunohistochemistry

Modern Oncology 2008, 16(7): 1186 - 1187

【摘要】 目的:研究胃癌组织中 CD44v6、COX - 2、MMP - 2 的表达及其与胃癌淋巴结转移的关系。**方法:**用免疫组化方法检测胃癌组织中 CD44v6、COX - 2、MMP - 2 的表达情况,并分析其表达与胃癌淋巴结转移的关系。**结果:**60 例胃癌组织中,CD44v6、COX - 2 和 MMP - 2 表达阳性率分别为 61.7% (37/60), 55.0% (33/60) 和 73.3% (44/60)。胃癌组织中 CD44v6、COX - 2、MMP - 2 的表达与淋巴结转移密切相关。**结论:**胃癌组织中 CD44v6、COX - 2、MMP - 2 的表达与胃癌淋巴结转移密切相关,提示 CD44v6、COX - 2、MMP - 2 可作为判断胃癌预后的指标。

【收稿日期】 2007 - 07 - 30

【作者单位】 石家庄市第一医院胃肠肛肠外科,河北 石家庄 050011

【作者简介】 于颖剑(1971 -),男,宁夏银川人,副主任医师,主要从事胃肠科临床工作。

