

[文章编号] 1000-2200(2009)04-0281-03

· 基础医学 ·

胃癌 RASSF1A 的表达与幽门螺杆菌感染关系的研究

蔡兆根, 于东红

[摘要] 目的: 探讨 RAS 相关区域家族基因 1A(RASSF1A)在胃腺癌中的表达及与幽门螺杆菌(Hp)感染的关系。方法: 用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测 48 例胃癌组织及 15 例癌旁正常组织中 RASSF1A mRNA 的表达, 用 PCR 法检测上述胃癌组织中的 Hp 感染情况。结果: RASSF1A 在胃癌组织中转录表达缺失率为 50.0%, 其表达缺失率与胃癌分化程度、淋巴结转移及 TNM 分期有一定关系($P < 0.05$), 与其组织学类型无明显关系($P > 0.05$)。胃癌组织中 Hp 感染率为 62.5% (30/48), RASSF1A 的表达缺失与 Hp 感染组之间无相关性($P > 0.05$)。结论: RASSF1A 是胃癌的相关抑癌基因, RASSF1A 的表达缺失与胃癌的临床分期和病理分级具有一定关系, RASSF1A 的表达缺失与 Hp 感染之间无明显关系, 它们可能是两个独立的致病因素。

[关键词] 胃肿瘤; RAS 相关区域家族基因 1A; 幽门螺杆菌; 逆转录-聚合酶链反应

[中国图书资料分类法分类号] R 735.2 [文献标识码] A

Expression of RASSF1A and infection of *Helicobacter pylori* in human primary gastric carcinomas

CAI Zhao-gen, YU Dong-hong

(Department of Pathology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030;

The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the relationship between the expression of RASSF1A in human primary gastric adenocarcinomas and the infection of *Helicobacter pylori* (Hp). **Methods:** The mRNA expression of RASSF1A was determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in 48 cases of primary gastric carcinoma and 15 matched normal tissues. Hp was examined in 48 cases of gastric carcinoma by polymerase chain reaction (PCR) technique. **Results:** The rate of loss of RASSF1A mRNA expression in 48 primary gastric carcinomas was 52% (26/48), and positively related with histological differentiation degree ($P < 0.05$), lymph node metastasis ($P < 0.05$) and TNM stages ($P < 0.05$). There was no relationship between RASSF1A expression and Hp infection ($P > 0.05$). **Conclusions:** RASSF1A is a related tumor suppressor gene of gastric carcinoma, it is closely correlated with the tumor clinical pathological stage and the histological differentiation degree. There is no relationship between RASSF1A expression and Hp infection, both are probably independent etiological factors.

[Key words] stomach neoplasmas; RASSF1A gene; *Helicobacter pylori*; reverse transcription polymerase chain reaction

RASSF1 基因是由 2000 年 Dammann 等^[1]使用酵母双相杂交筛选的方法, 从 3 号染色体断臂上克隆出的一种新型基因, 其转录本 RASSF1A 是肺癌的候选抑癌基因。许多研究表明, RASSF1A 在人类多种肿瘤中都存在表达缺失, 3p 染色体的杂合性缺失在胃癌的发生中出现较早, 频率较高, 由于 RASSF1 基因也位于 3p 染色体, 推测该基因可能也是对胃癌特异的抑癌基因, 国内外研究甚少。本研究采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法检测胃癌组织 RASSF1A 的表达, 明确 RASSF1A 是胃癌相关抑癌基因, 探讨该基因在胃癌发生发展过程中的作用, 及其与幽门螺杆菌 (Hp) 感染的关系。

1 资料与方法

1.1 病例来源 胃癌组织标本取自 2005 年 8 ~ 11 月我院胃肠外科、肿瘤外科胃癌手术患者, 共 48 例, 均经病理确诊。48 例患者中男 30 例, 女 18 例; 年龄 36 ~ 65 岁。标本均经两名高年资病理医师阅片确诊, 取距离肿瘤边缘 5 cm 外组织作为正常对照。所有标本均在 -80°C 冰箱保存待用。

1.2 组织 DNA 和总 RNA 提取 按照 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒 (上海生工生物工程技术服务有限公司, 简称上海生工) 操作说明书提取组织总 RNA, 紫外分光光度计测定提取 RNA 的浓度并用 1.6% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外线摄像后观察条带的完整性; 按照 UNIQ-10 柱式临床样品基因组 DNA 抽提试剂盒 (上海生工) 操作说明书提取组织 DNA, 经紫外分光光度计测定提取的 DNA 浓度。

1.3 逆转录合成 cDNA 按照 AMV 第一链 cDNA

[收稿日期] 2008-06-17

[作者单位] 蚌埠医学院 病理学教研室, 安徽 蚌埠 233030; 蚌埠医学院第一附属医院 病理科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 蔡兆根 (1976 -), 男, 硕士, 讲师。

合成试剂盒(上海生工)操作说明书,取上述提取的总 RNA 5 μ l, Oligo(dT)₁₂₋₁₈ 1 μ l, 去离子水 6 μ l, 共置于 PCR 管中, 涡旋器上轻微混匀 3 ~ 5 s, 以上均冰上操作。70 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 后, 冰上冷却, 4 000 r/min 离心 10 s。然后分别加入 5 \times 反应缓冲液 4 μ l, RNA 酶抑制剂 (20 u/ μ l) 1 μ l, (10 mmol/L) dNTP 2 μ l, 混匀, 4 000 r/min 离心 10 s, 收集产物。42 $^{\circ}$ C 孵育 5 min。加 AMV 逆转录酶 (200 u/ μ l) 1 μ l, 终体积为 20 μ l。42 $^{\circ}$ C 孵育 60 min。70 $^{\circ}$ C 加热 10 min。置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 PCR 扩增 根据相关文献^[2]选择扩增 RASSF1 不同转录本的引物分别为: RASSF1A (280 bp): 上游引物 5'-GGC GTC GTG CGC AAA GGC-3'; 下游引物 5'-GAA CCT TGA TGA AGC CTG TG-3', 以在各种组织中稳定表达的 β -actin (200 bp) 作为内参照, 其上下游引物分别为 5'-GGC GGC ACC ACC ATG TAC CCT-3'; 5'-AGG GGC CGG ACT CGT GAT ACT-3', Hp 脲素酶基因片段引物上下游分别为 5'-GCC AAT GGT AAA TTA GTT-3'; 5'-CTC CTT AAT TGT TTT TAC-3' (411 bp)^[3], 按照 PCR 合成试剂盒(上海生工)说明书进行, PCR 反应体系为 50 μ l, 含有上述合成的 cDNA 2 μ l, 10 mmol/L dNTP 2 μ l, 10 mmol/L MgCl₂ 3 μ l, 10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ l, Taq DNA 聚合酶 2.5 u (0.5 μ l), 5 \times Taq DNA 聚合酶缓冲液 5 μ l, 加超纯水至 50 μ l, 进行热循环扩增。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 56 ~ 58 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 共 35 个循环。扩增产物用 1.6% 琼脂糖凝胶电泳, 经紫外线凝胶成像系统进行摄像观察结果。

1.5 统计学方法 采用 χ^2 检验和秩和检验。

2 结果

2.1 RASSF1A 在胃癌组织和癌旁正常组织中的表达 RASSF1A mRNA 在 48 例胃癌组织中有 24 例 (50%) 表达缺失; 在 15 例癌旁正常组织中无表达缺失, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 12.12, P < 0.01$) (见图 1)。



M: DNA Marker; N: 胃癌旁正常组织; T: 胃癌组织

图 1 RASSF1A 在胃癌组织及其癌旁正常组织中表达的凝胶电泳

2.2 胃癌临床病理参数与 RASSF1A 表达的关系 胃癌组织中 RASSF1A 在淋巴转移组中的表达缺失率为 64.3%, 在无淋巴转移组的表达缺失率为 30.0%, 两组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。TNM I ~ II 期组胃癌中, RASSF1A 表达缺失率为 34.6%; III ~ IV 期组胃癌中, RASSF1A 表达缺失率为 68.2%; TNM I ~ II 期组与 III ~ IV 期组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在不同分化程度的胃癌组织中, RASSF1A 转录表达缺失率之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。RASSF1A 表达缺失与胃癌的组织学类型之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 1)。

表 1 胃癌临床病理参数与 RASSF1A mRNA 表达的关系 [n; 阳性率(%)]

胃癌临床病理参数	n	RASSF1A mRNA (+)	H _c	P
组织学类型				
乳头状腺癌	18	10(55.6)	1.04	>0.05
管状腺癌	15	7(46.7)		
黏液腺癌	9	5(5/9)		
印戒细胞癌	6	2(2/6)		
分化程度				
高分化	11	3(27.3)	5.99	<0.05
中分化	17	7(41.2)		
低分化	20	14(70.0)		
血管侵犯				
有	27	17(63.0)	4.15 ^A	<0.05
无	21	7(33.3)		
淋巴结转移				
有	28	18(64.3)	5.49 ^A	<0.05
无	20	6(30.0)		
TNM 分期				
I ~ II 期	26	9(34.6)	5.37 ^A	<0.05
III ~ IV 期	22	15(68.2)		

Δ 示 χ^2 值

2.3 RASSF1A mRNA 表达与胃癌 Hp 感染的关系 48 例胃癌组织中 Hp 表达阳性率为 62.5%, 其中 24 例 RASSF1A mRNA 表达阳性的胃癌组织中 Hp 阳性率为 70.8%, 24 例 RASSF1A mRNA 表达阴性的胃癌组织中 Hp 表达阳性率为 54.2%, 两者表达阳性率无相关关系 ($P > 0.05$) (见表 2 及图 2)。

表 2 胃癌组织 RASSF1A mRNA 表达与 Hp 感染的关系

RASSF1A mRNA 表达	Hp		合计	χ^2	P
	阳性	阴性			
阳性	17	7	24	1.42	>0.05
阴性	13	11	24		
合计	30	18	48		

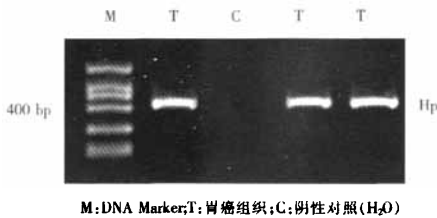


图 2 幽门螺杆菌 DNA 电泳

3 讨论

自从 Dammann 等^[1]分离出一段编码与人类 DNA 错配修复蛋白 XPA 相互作用的候选蛋白的 cDNA 片段,该片段 C 末端核酸序列与鼠的 RAS 效应蛋白 Norel^[4]和其同源蛋白 Maxp1 有高度同源性,并将其命名为 RASSF1。RASSF1 有 6 个外显子,2 个启动子及关联 CPG 岛。其中外显子 3、4、5、6 在转录时是共用外显子,编码 RAS 相关结构域 (RA)^[5]。差异在于 5' 端的第 1、2 外显子,根据在 mRNA 的选择剪接,转录出不同的 mRNA 转录本并编码不同的蛋白,RASSF1A 为 1 α 2 α 3 β 3456,cDNA 长度为 1 837 bp,包含一个 340 氨基酸的 ORF(开放读码框架),编码蛋白的分子量为 38.8 kDa,含 RAS 相关结构域、DAG 结合结构域和 ATM 磷酸化底物结合域三部分^[6]。

有研究发现,RASSF1A 在几乎所有的正常组织表达,而在肺癌、乳腺癌、肾细胞癌等多种肿瘤细胞系中存在较高的表达缺失^[7,8]。Dammann 等发现,RASSF1A mRNA 表达缺失或降低存在于所有的小细胞肺癌细胞系中,不表达 RASSF1A 的 A549 肺癌细胞系经甲基化抑制剂处理并重新表达 RASSF1A 后,可减少其细胞克隆形成,抑制非贴壁性细胞生长,而表达 RASSF1A 的裸鼠移植肿瘤较对照组的肿瘤生长明显减慢。本研究发现,RASSF1A mRNA 在 48 例原发性胃癌组织中存在较高的表达缺失,而癌旁正常组织中均表达 ($P < 0.01$)。RASSF1A 在胃癌的临床分期上存在明显的差异,提示 RASSF1A mRNA 表达缺失的病例往往预后较差。RASSF1A 在胃癌的不同组织学类型中的表达率虽然有所不同,但尚无统计学意义,这一结果与 Byun 等^[9]在胃

癌组织中的研究结果一致。

众多的研究已经表明,Hp 感染是胃癌发生、发展的一个重要的危险因素^[3],本组 Hp 感染阳性率为 62.5%;本研究结果显示 RASSF1A 表达与 Hp 感染未见明显相关性,提示 RASSF1A 的表达缺失和 Hp 感染也许是参与胃癌发生过程的两个独立致病因素。鉴于未见有关此方面的研究报道,因此 RASSF1A 表达缺失和 Hp 感染的关系还需进一步研究证实。现已明确 RASSF1A 在肺癌等肿瘤中的失活机制主要是由于其启动子区域 CPG 的高甲基化所致,今后的深入研究将揭示 RASSF1A 在肿瘤发生中的具体机制及与其它癌基因、抑癌基因的关系。

【参 考 文 献】

- [1] Dammann R, Li C, Yoon JH, *et al.* Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3 [J]. *Nat Gene*, 2000, 25(3): 315-319.
- [2] 邵康,赫捷,程邦昌,等. RASSF1 基因不同转录本在肺癌组织中的转录表达及临床意义 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2003, 25(2): 149-152.
- [3] 庄小强,郑杰,林三仁,等. 胃癌中幽门螺杆菌感染与胃黏膜增殖及凋亡研究 [J]. *中国人兽共患病杂志*, 2005, 21(9): 765-768.
- [4] Sekido Y, Ahmadian M, Wistuba II, *et al.* Cloning of a breast cancer homozygous deletion junction narrows the region of search for a 3p21.3 tumor suppressor gene [J]. *Oncogene*, 1998, 16(24): 3151-3157.
- [5] Vavvas D, Li X, Avruch J, *et al.* Identification of Norel as a potential Ras effector [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(10): 5439-5442.
- [6] Ponting CP, Benjamin DR. A novel family of Ras-binding domains [J]. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21(11): 422-425.
- [7] Agathangelou A, Honorio S, Macartney DP, *et al.* Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours [J]. *Oncogene*, 2001, 20(12): 1509-1518.
- [8] Morrissey C, Martinez A, Zatyka M, *et al.* Epigenetic inactivation of the RASSF1A 3p21.3 tumor suppressor gene in both clear cell and papillary renal cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(19): 7277-7281.
- [9] Byun DS, Lee MG, Chae KS, *et al.* Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A by aberrant promoter hypermethylation in human gastric adenocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(19): 7034-7038.