

胃癌组织中 Notch1、Jagged1 及 NF- κ B 的表达及临床意义

赵 娜,周梅恺,叶玉伟,陈兆峰,李 强,周永宁*

(兰州大学第一医院消化科,甘肃省胃肠病重点实验室,甘肃 兰州 730000)

[摘要] **目的:** 研究 Notch1、Jagged1 和 NF- κ B 在胃癌组织中的表达状况,探讨其与临床病理特征及幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染的关系。**方法:** 采用组织芯片技术和免疫组化法检测 60 例胃癌、60 例癌旁及 20 例正常胃黏膜组织中 Notch1、Jagged1 和 NF- κ B 的表达,用 Warthin-Starry 银染法检测各组织中 Hp 的感染状况。**结果:** Notch1 和 Jagged1 在胃癌组织中的阳性表达率(40.0%、70.0%)显著低于其癌旁(81.7%、96.7%)和正常组织(85.0%、100.0%),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。NF- κ B 在胃癌组织中的阳性表达率(66.7%)显著高于其癌旁(36.7%)和正常组织(0.0%),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Hp 在胃癌、癌旁及正常胃黏膜组织中的阳性感染率分别为 76.7%、93.3%和 10.0%,组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Notch1、Jagged1 表达及 Hp 感染均与胃癌的临床病理特征无关($P > 0.05$),NF- κ B 表达与胃癌的分化程度和 TNM 分期有关($P < 0.05$)。Notch1 在胃癌组织中的表达与 Jagged1 呈正相关($r = 0.460, P < 0.05$),与 NF- κ B 呈负相关($r = -0.361, P < 0.05$)。Notch1、Jagged1 及 NF- κ B 在胃癌组织中的表达均与 Hp 感染无关($r = -0.032, r = 0.155, r = 0.028$, 均 $P > 0.05$)。**结论:** 胃癌中存在 Notch1、Jagged1 和 NF- κ B 的异常表达,但均与 Hp 感染无关,Notch1 与 Jagged1 低表达可能诱导 NF- κ B 高表达,进而导致胃癌的发生。

[关键词] 胃癌; Notch1; Jagged1; NF- κ B

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)08-1061-05

Expression and significance of Notch1, Jagged1 and NF- κ B in human gastric carcinoma

ZHAO Na, ZHOU Mei-kai, YE Yu-wei, CHEN Zhao-feng, LI Qiang, ZHOU Yong-ning*

(Department of Gastroenteropathy, First Hospital of Lanzhou University, Key Laboratory for Gastrointestinal Diseases of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of Notch1, Jagged1 and NF- κ B in gastric carcinoma and their correlation with clinicopathological features and *Helicobacter pylori* (Hp) infection. **Methods:** The expression of Notch1, Jagged1 and NF- κ B was detected by tissue microarray and immunohistochemistry in 60 cases of gastric carcinoma, 60 cases of adjacent gastric carcinoma and 20 cases of normal gastric mucosa tissues and Hp infection was tested by Warthin-Starry silver stain. **Results:** The positive rates of Notch1 and Jagged1 in gastric carcinoma tissue (40.0%, 70.0%) were lower than those in adjacent gastric carcinoma tissue (81.7%, 96.7%) and normal gastric tissue (85.0%, 100.0%), the differences were significantly ($P < 0.05$). The positive rate of NF- κ B in gastric cancer tissue (66.7%) was higher than those in adjacent gastric carcinoma tissue (36.7%) and normal gastric tissue (0.0%), the differences were significantly ($P < 0.05$). The infection rates of Hp in gastric carcinoma, adjacent gastric carcinoma and normal gastric mucosa tissues were 76.7%, 93.3% and 10.0%, respectively, there were significant differences among them ($P < 0.05$). The expression of Notch1, Jagged1 and Hp infection were not correlated with the clinicopathological features, while the expression of NF- κ B was significantly correlated with tumor differentiation status and TNM stage ($P < 0.005$). The expression of Notch1 was positively correlated with Jagged1 ($r = 0.460, P < 0.05$) and negatively correlated with NF- κ B ($r = -0.361, P < 0.05$). No correlation was shown between Hp infection and expression of Notch1, Jagged1 or NF- κ B in gastric carcinoma tissues ($r = -0.032, r = 0.155, r = 0.028, P > 0.05$). **Conclusion:** The expression of Notch1, Jagged1 and NF- κ B in gastric carcinoma is abnormal but not associated with Hp infection. The low expression of Notch1 and Jagged1 may induce the high expression of NF- κ B, which result in the occurrence of gastric carcinoma.

[Key words] gastric carcinoma; Notch1; Jagged1; NF- κ B

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(8): 1061-1065]

[基金项目] 国家自然科学基金(81172366); 甘肃省技术与开发专项(0912027TCYP)

*通讯作者, E-mail: yongningzhou@sina.com

Notch1 是 Notch 信号通路的受体之一,可与 Jagged1 配体结合而活化。研究发现,Notch1 及 Jagged1 与肿瘤的关系密切,在不同的肿瘤中发挥着促癌或抑癌的作用,甚至在同一肿瘤的不同发展阶段其作用也不尽相同。

核因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 是一种真核细胞转录因子,调节多种细胞的增殖和凋亡,并在多种肿瘤中高表达。幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)作为第 I 类致癌因子,其与胃癌的关系已十分明确。本研究采用免疫组化法检测 Notch1、Jagged1 和 NF- κ B 在胃癌组织中的表达,Warthin-Starry 银染法检测各组织中 Hp 的感染状态,分析它们与临床病理特征的关系和它们之间的相关性,进一步探讨胃癌发生发展的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

收集甘肃省武威肿瘤医院 2009 年 10 月~2010 年 4 月病理科保存完好的胃癌术后石蜡标本,胃癌组织 60 例,相应癌旁组织 60 例(取材距瘤组织 ≥ 6 cm)。60 例胃癌标本中,男女比例为 4:1,年龄 28~73 (中位年龄 55)岁。病灶部位在胃窦/胃体部 36 例,贲门/胃底部 24 例。按 TNM 分期 T1 期 1 例, T2 期 9 例, T3 期 7 例, T4 期 43 例。按 WHO 分型高分化腺癌 6 例,中分化腺癌 13 例,低分化腺癌 41 例。有淋巴结转移者 52 例,无淋巴结转移者 8 例。所有患者术前均未进行放疗和化疗。另从胃镜下取 20 例正常胃黏膜组织标本作对照。

1.2 方法

1.2.1 组织芯片的制备

按照文献[1]所示的受体蜡块的制备、打孔、定位、穿刺取样、上样和切片的流程制作组织芯片。

1.2.2 Hp 感染检测

采用 Warthin-Starry 银染法。染色后背景呈棕黄色, Hp 呈黑色短杆或弯曲状,位于胃黏膜细胞表面及胃小凹或腺腔内,能观察到 Hp 即为阳性。

1.2.3 免疫组化染色

兔抗人 Notch1、Jagged1 多克隆抗体均购自北京博奥森公司,兔抗人 NF- κ Bp65 多克隆抗体购自美国 Bioworld 生物公司,免疫组化 SP 法广谱试剂盒 SP-9000 和 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥公司。按说明书操作,用已知阳性切片作为阳性对照,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.4 免疫组化结果判定

Notch1 和 Jagged1 免疫组化染色阳性结果表现为胞膜和胞质呈淡黄色或棕黄色、棕褐色颗粒; NF- κ B 染色阳性结果为胞浆或胞核呈淡黄色或棕黄色或棕褐色颗粒(图 1~3)。按半定量评分方法进行评分:根据肿瘤细胞的染色范围,阳性细胞数 $< 5\%$ 、 $5\% \sim 25\%$ 、 $26\% \sim 50\%$ 、 $> 50\%$ 分别记为 0、1、2、3 分;对每张切片阳性细胞的染色强度按未着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分别标记为 0、1、2、3 分。根据 2 项评分之和判断结果, < 3 分为阴性, ≥ 3 分为阳性。

1.3 统计学方法

统计分析采用 SPSS13.0 统计软件包进行,计数资料的比较采用 χ^2 检验或精确概率法,等级资料采用 Spearman 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Notch1、Jagged1 及 NF- κ B 蛋白的表达

Notch1 在胃癌、癌旁、正常胃组织中的阳性表达率分别为 40.0%、81.7%、85.0%,胃癌组和癌旁组比较($\chi^2 = 21.860, P = 0.000$,图 1)、胃癌组和正常组比较($\chi^2 = 12.158, P = 0.000$),差异均具有显著性;癌旁组和正常组比较($\chi^2 = 0.000, P = 1.000$),差异无显著性。Jagged1 在胃癌、癌旁、正常胃组织中的阳性表达率分别为 70.0%、96.7%、100.0%,胃癌组和癌旁组比较($\chi^2 = 15.360, P = 0.000$,图 1)、胃癌组和正常组比较($\chi^2 = 6.117, P = 0.013$),差异均具显著性;癌旁组和正常组比较,差异无显著性($P = 1.000$)。NF- κ B 在胃癌、癌旁和正常胃组织中的阳性表达率分别是 66.7%、36.7%和 0.0%,胃癌组和癌旁组比较($\chi^2 = 10.812, P = 0.001$,图 1)、胃癌组和正常组比较($\chi^2 = 26.667, P = 0.000$)、癌旁组和正常组比较($\chi^2 = 10.115, P = 0.001$),差异均具有显著性(表 1)。

2.2 胃癌组织中 Notch1、Jagged1 和 NF- κ B 蛋白表达与临床病理特征的关系

胃癌组织中 Notch1 与 Jagged1 的表达与患者的性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤直径、分化程度、TNM 分期及淋巴结转移均无关($P > 0.05$),NF- κ B 的表达与胃癌的分化程度和 TNM 分期有关($P < 0.05$),与患者的性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤直径和淋巴结转移无关($P > 0.05$,表 2)。

2.3 胃癌组织中 Notch1、Jagged1 及 NF- κ B 蛋白表达之间的关系

Spearman 等级相关分析显示,胃癌组织中 Notch1 与 Jagged1 表达呈正相关($r = 0.460, P =$

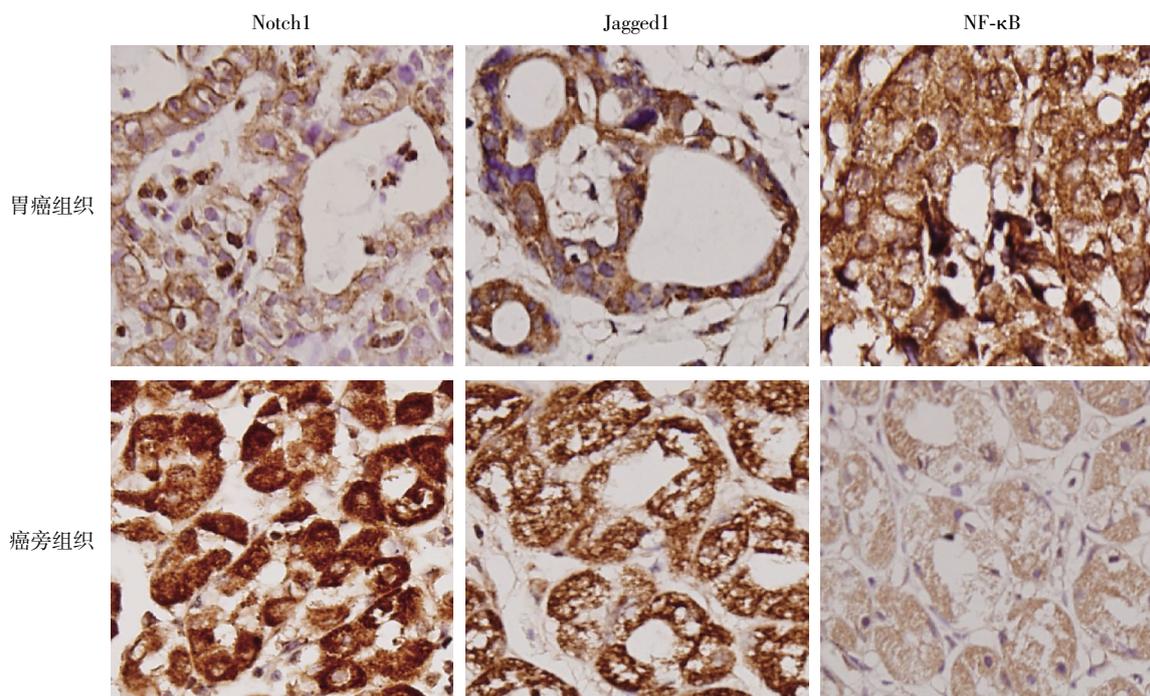


图 1 免疫组化检测 Notch1、Jagged1、NF-κB 蛋白表达(S-P, × 400)

Figure 1 The expression of Notch1, Jagged1, and NF-κB examined by immunohistochemistry(S-P, × 400)

表 1 免疫组化法检测 Notch1、Jagged1 和 NF-κB 蛋白表达
Table 1 The expression of Notch1, Jagged1 and NF-κB protein examined by immunohistochemistry

组别	n	[n(%)]		
		Notch1	Jagged1	NF-κB
胃癌组	60	24(40.0) ^{ab}	42(70.0) ^{ab}	40(66.7) ^{ab}
癌旁组	60	49(81.7)	58(96.7)	22(36.7) ^b
正常组	20	17(85.0)	20(100.0)	0(0.0)

与癌旁组比较, ^a $P < 0.05$; 与正常组比较, ^b $P < 0.05$ 。

0.000), Notch1 与 NF-κB 表达呈负相关($r = -0.361$, $P = 0.005$), Jagged1 与 NF-κB 表达无相关性($r = -0.154$, $P = 0.239$)。

2.4 胃癌组织中 Notch1、Jagged1 和 NF-κB 蛋白表达与 Hp 感染的关系

Hp 在胃癌、癌旁及正常胃黏膜组织中的阳性感染率分别是 76.7%(46/60)、93.3%(56/60)和 10.0%(2/20), 组间比较差异有统计学意义($\chi^2 = 54.843$, $P = 0.000$)。Notch1、Jagged1 及 NF-κB 在 Hp 感染阳性癌旁组中的阳性表达率与 Hp 感染阴性癌旁组比较, 差异无统计学意义($\chi^2 = 1.232$, P 均 > 0.05)。Notch1、Jagged1 及 NF-κB 在 Hp 感染阳性胃癌组中的阳性表达率与 Hp 感染阴性胃癌组相比较, 差异无统计学意义($\chi^2 = 0.062, 0.750, 0.000$, 均 $P > 0.05$)。Spearman 等级相关分析显示, 癌旁组中 Notch1、Jagged1 及 NF-κB 的表达与 Hp 感染率均无相关性

($r = -0.218, 0.094, -0.073$, P 均 > 0.05), 胃癌组中 Notch1、Jagged1 及 NF-κB 的表达与 Hp 感染率均无相关性($r = -0.032, 0.155, 0.028$, P 均 > 0.05)。

3 讨论

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤, 其发病机制与多种信号通路的调控改变有关。Notch 信号通路是一种进化上高度保守的细胞间相互作用, 在多种组织中参与细胞命运的决定。该信号通路有 4 种受体(Notch1~4)和 5 种配体(Jagged1、Jagged2、Delta-like1、Delta-like3、Delta-like4), 均为单次跨膜蛋白。其中 Notch1 与 Jagged1 是最重要的受体和配体, Notch1 的胞外域与 Jagged1 结合后促进 Notch1 胞内活性域 NICD 释放, NICD 进入核内诱导靶基因的转录。研究发现, Notch1/Jagged1 信号通路与肿瘤的关系密切, 在不同的肿瘤中起着促癌或抑癌的作用。如在肾癌中 Notch1/Jagged1 信号通路促进肿瘤的形成^[2], 但在 B 细胞白血病中 Notch1/Jagged1 信号通路则抑制肿瘤的发生^[3]。本研究显示, Notch1 与 Jagged1 在胃癌组织中的表达显著低于其在癌旁和正常胃黏膜组织中的表达($P < 0.05$), 且 Notch1 在胃癌中的表达与 Jagged1 呈正相关($P < 0.05$)。提示 Notch1 与 Jagged1 低表达可能与胃癌的发生有关, 且它们具有协同作用。故推测由 Jagged1 介导的 Notch1 信号通

表2 胃癌组织中 Notch1、Jagged1、NF-κB 蛋白表达与临床病理特征的关系

Table 2 Correlations of Notch1, Jagged1 and NF-κB protein expression with clinicopathologic features of gastric carcinoma [n(%)]

病理参数	n	Notch1	P 值	Jagged1	P 值	NF-κB	P 值
性别			0.843		0.944		1.000
男	48	20(41.7)		33(68.8)		32(66.7)	
女	12	4(33.3)		9(75.0)		8(66.7)	
年龄(岁)			1.000		0.560		0.194
< 50	11	4(36.4)		9(81.8)		5(45.5)	
≥50	49	20(40.8)		33(67.3)		35(71.4)	
肿瘤直径			0.593		0.391		0.711
< 5 cm	25	11(44.0)		16(64.0)		16(64.0)	
≥5 cm	35	13(37.1)		26(74.3)		24(68.6)	
肿瘤部位			0.053		0.645		0.264
胃窦/胃体	36	18(50.0)		26(72.2)		22(61.1)	
贲门/胃底	24	6(25.0)		16(66.7)		18(75.0)	
分化程度			0.174		0.672		0.006
高/中分化	19	10(52.6)		14(73.7)		8(42.1)	
低分化	41	14(34.1)		28(68.3)		32(78.0)	
TNM 分期			0.724		0.705		0.020
T1/T2	10	5(50.0)		8(80.0)		3(30.0)	
T3/T4	50	19(38.0)		34(68.0)		37(74.0)	
淋巴结转移			0.314		0.934		1.000
有	52	19(36.5)		37(71.2)		35(67.3)	
无	8	5(62.5)		5(62.5)		5(62.5)	

路的活化可能在胃癌中起抑癌的作用。与勾朝阳等^[4]研究结论一致,但与部分学者的报道相反^[5-6]。这可能是由于 Notch1 信号通路与众多信号通路存在串话,是整个信号网络的枢纽,其信号通路的广泛共享性使其作用机制十分复杂。此外,Notch1 信号通路是促癌还是抑癌与信号的强弱、细胞类型及细胞外基质也有关。

NF-κB 是一种真核细胞转录因子,它以同源或异源二聚体的形式存在,其中 NF-κBp50/p65 是主要的活性形式。在静止细胞中 NF-κB 与抑制蛋白 IκB 结合位于胞质中,当细胞受刺激后 IκB 降解, NF-κB 转位至核内与靶基因结合,从而调控细胞的生长、分化和凋亡。其活性的失调与包括胃癌在内的多种恶性肿瘤的发生发展密切相关。本研究显示 NF-κB 在胃癌组织中的表达显著高于癌旁和正常胃黏膜组织($P < 0.05$),并且 NF-κB 的表达与胃癌的分化程度和 TNM 分期有关($P < 0.05$),分化程度越低, TNM 分期越高, NF-κB 的表达越高。提示 NF-κB 表达增高可能是胃癌发生中的一个早期事件,并参与了胃癌的进展过程,与马海芬等^[7]研究一致。

本研究亦显示,Notch1 及 Jagged1 的表达与胃癌患者的性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤直径、分化程

度、TNM 分期及淋巴结转移均无关 ($P > 0.05$),而 NF-κB 的表达与胃癌的分化程度和 TNM 分期有关 ($P < 0.05$)。提示 Notch1/Jagged1 信号通路的下调可能促进了胃癌的发生,但对胃癌进展的作用可能是通过对 NF-κB 的调控来实现的。

Notch1 与 NF-κB 是两种决定细胞命运的关键信号通路。有研究发现,Notch1 可与 IKKα 结合,促进 IκB 的降解,增加 NF-κB 的活化^[8]。Notch1 也可直接诱导 NF-κB 启动子活化,增加 NF-κB 表达和 DNA 结合活性^[9]。但也有报道人类活化的 Notch1 是一种 IκB 分子,可与 NF-κB 结合抑制其活化^[10]。再者,与 Notch1 活性域结合后的转录因子 CSL 对 IκB 家族成员 p100 的启动子具有直接转录激活作用,也可间接抑制 NF-κB 的活化。以上研究显示 Notch1 对 NF-κB 的调控具有促进和抑制的双重性。本研究显示,Notch1 在胃癌组织中的表达与 NF-κB 呈负相关($P < 0.05$)。这与李大卫等^[11]报道的 Notch1 与 NF-κB 呈正相关的结论不一致。这可能与 Notch1 和 NF-κB 相互作用的双重性有关。此外,本研究亦显示,Jagged1 在胃癌组织中的表达与 Notch1 呈正相关($P < 0.05$),与 NF-κB 无相关性($P > 0.05$)。提示 Jagged1 对 NF-κB 的调控是通过 Notch1 间接实现

的。因此,本文推测 Jagged1 与 Notch1 结合后激活 Notch1 信号通路,后者可能通过多种机制抑制 NF- κ B 活化,从而抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡,最终抑制胃癌的形成。反之,当 Notch1 与 Jagged1 表达降低时,NF- κ B 表达增高,则促进胃癌的发生。

Hp 作为 I 类致癌因子,其与胃癌的关系已得到广泛研究,但其具体致癌机制仍未完全明确。研究发现,Jagged1 和 NF- κ B 的表达在 Hp 感染导致的胃黏膜慢性炎症和肠化生等病变中呈上调状态^[12-13]。本研究显示,Hp 在胃癌及癌旁组织中的阳性感染率显著高于正常胃黏膜组织($P < 0.05$),而癌旁组中 Hp 阳性感染率显著高于胃癌组,与文献报道相似。考虑可能与癌变胃黏膜微环境的改变不利于 Hp 生存有关。Hp 感染与胃癌的临床病理特征无关($P > 0.05$),且胃癌及癌旁组织中 Hp 感染与 Notch1、Jagged1 和 NF- κ B 表达均无关(P 均 > 0.05),Notch1、Jagged1 和 NF- κ B 在 Hp 感染阳性胃癌及癌旁组织中的阳性表达率与 Hp 感染阴性胃癌及癌旁组织中的阳性表达率之间差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。提示 Hp 导致胃黏膜癌变的机制可能与 Notch1、Jagged1 和 NF- κ B 的表达变化无关,Hp 感染可能主要作用于胃癌发生的早期阶段,当进展到胃癌后由于涉及到多种遗传物质和信号转导通路的改变,Hp 的作用则逐渐减弱。

综上所述,本研究通过使用组织芯片技术和免疫组化法证实了胃癌中存在 Notch1、Jagged1 及 NF- κ B 的异常表达,但均与 Hp 感染无关。Notch1 与 Jagged1 低表达可能导致 NF- κ B 高表达,进而促进胃癌的发生发展。然而,Notch1/Jagged1 与 NF- κ B 及 Hp 之间的具体作用机制还有待深入研究。

致谢:感谢兰州大学微生物教研室韩俭老师和兰州大学病理教研室刘伟等老师对本实验的悉心指导和技术支持。感谢甘肃省武威肿瘤医院为本研究提供标本。

[参考文献]

- [1] Bubendorf L, Nocito A, Moch H, et al. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput *in situ* studies [J]. *J Pathol*, 2001, 195(1): 72-79
- [2] Sjolund J, Johansson M, Manna S, et al. Suppression of renal

cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(1): 217-228

- [3] Zweidler-McKay PA, He Y, Xu L, et al. Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies [J]. *Blood*, 2005, 106(12): 3898-3906
- [4] 勾朝阳,哈敏文,李红. Notch1 在人胃癌组织中的表达及意义[J]. *中国医科大学学报*, 2010, 39(5): 356-358
- [5] Yeh TS, Wu CW, Hsu KW, et al. The activated Notch1 signal pathway is associated with gastric cancer progression through cyclooxygenase-2 [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(12): 5039-5048
- [6] Sun Y, Gao X, Liu J, et al. Differential Notch1 and Notch2 expression and frequent activation of Notch signaling in gastric cancers [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2011, 135(4): 451-458
- [7] 马海芬,赵仲生. 胃癌组织中 Cyr61 和核因子- κ B 的表达与转移及预后的关系[J]. *中华病理学杂志*, 2008, 37(12): 815-821
- [8] Song LL, Peng Y, Yun J, et al. Notch-1 associates with IKK α and regulates IKK activity in cervical cancer cells [J]. *Oncogene*, 2008, 27(44): 5833-5844
- [9] Nagakawa Y, Aoki T, Kasuya K, et al. Histologic features of venous invasion, expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9, and the relation with liver metastasis in pancreatic cancer [J]. *Pancreas*, 2002, 24(2): 169-178
- [10] Wang J, Shelly L, Miele L, et al. Human Notch-1 inhibits NF- κ B activity in the nucleus through a direct interaction involving a novel domain [J]. *J Immunol*, 2001, 167(1): 289-295
- [11] 李大卫,吴晴,彭志海,等. 组织芯片研究 Notch1 与 NF- κ B 在胃癌中的表达和意义[J]. *肿瘤*, 2007, 27(6): 458-461
- [12] Katoh M. Dysregulation of stem cell signaling network due to germline mutation, SNP, *Helicobacter pylori* infection, epigenetic change and genetic alteration in gastric cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(6): 832-839
- [13] Takeshima E, Tomimori K, Kawakami H, et al. NF- κ B activation by *Helicobacter pylori* requires Akt-mediated phosphorylation of p65 [J]. *BMC Microbiol*, 2009, 9(1): 36-44

[收稿日期] 2011-11-23