

RASSF1A 基因在胃癌中的表达及意义

赵 军¹, 张义胜¹, 王永生², 赵国海^{1*}

(¹ 皖南医学院附属弋矶山医院胃肠外科, 安徽 芜湖 241000; ² 南京大学医学院附属鼓楼医院呼吸内科, 江苏 南京 210008)

[摘要] 目的:检测抑癌基因 RASSF1A 在胃癌细胞株及组织中的表达情况,探讨 RASSF1A 在胃癌发生发展中的作用及临床意义。方法:用 RT-PCR 及 Western blot 检测细胞株、胃癌及癌旁组织中 RASSF1A 基因及蛋白的表达水平。结果:RASSF1A 在低分化 BGC-823 细胞中的表达量明显低于中分化 SGC-7901 细胞,在胃癌中的表达阳性率(43.48%)显著低于癌旁组织(85.51%),且低分化胃癌中的表达低于中高分化,Ⅲ、Ⅳ期胃癌中的表达低于 I、II 期($P<0.05$)。结论:在原发性胃癌组织中,RASSF1A 的表达明显缺失或低下,且与肿瘤的分化程度及分期相关。

[关键词] RASSF1A;胃癌

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2017)01-0090-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20170120

胃癌是常见的消化道肿瘤之一,我国为胃癌高发地区,其死亡率仅次于肺癌、肝癌^[1]。目前胃癌的治疗以综合治疗为主,包括手术治疗、放化疗、靶向治疗等^[2],近年来,随着胃癌分子生物学研究的不断深入,靶向治疗在胃癌中越来越受到关注,胃癌的发生发展是一个复杂、连续的过程,不仅与刺激细胞异常增殖的癌基因变异有关,也与抑癌基因的功能失活有关^[3]。RASSF1A 是 Ras 相关区域家族基因 1 的一个剪接体,其表达产物含有与 Ras 蛋白结构相关区域,相关研究表明其在多种肿瘤中表达减低,甚至缺失,预示着该基因可能在多种肿瘤的发生发展过程中发挥作用^[4]。本文旨在通过检测 RASSF1A 在胃癌细胞及组织中的表达情况,从而探讨其表达与胃癌生物学特性的关系。

1 对象和方法

1.1 对象

收集 2013 年 1 月—2015 年 1 月本院胃癌患者 69 例,其中男 44 例,女 25 例,年龄 30~82 岁,平均(55.6±11.7)岁。所有患者均为首次发现肿瘤,接受了胃癌根治术,病理明确诊断为原发性胃腺癌,术前行任何放化疗。收集患者手术时的胃癌组织及

距癌缘 5 cm 以上的癌旁正常组织,快速置入液氮罐,转入-80℃冰箱内存储。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

胃癌细胞株 BGC-823 及 SGC-7901(中科院上海细胞库),细胞培养于 37℃,5% CO₂ 条件下,用含 10%胎牛血清(杭州四季青公司)、1 nmol/L 谷氨酰胺、1%青霉素、1%链霉素的 RPMI 1640 培养液(Invitrogen 公司,美国)培养。隔天换液。

1.2.2 RT-PCR

使用 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司,美国)提取肿瘤组织及肿瘤细胞系中的总 RNA,具体步骤按说明书进行。按照逆转录试剂盒说明书将组织及细胞的总 RNA 逆转录成 cDNA,以 GAPDH 为内参照行 PCR 反应。RASSF1A 引物:上游引物:5'-ATTGCAAGTTCACCTGCCAC-3',下游引物:5'-CTTCCTACGTATCCTGCAGCGG-3',GAPDH 作为内参,上游引物:5'-ATCATCCCTGCCTCTACTGG-3',下游引物:5'-TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC-3',由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应条件:95℃预变性 5 min;95℃ 40 s,65℃ 40 s,72℃ 45 s,35 个循环,72℃延伸 10 min。反应产物用 2%琼脂糖凝胶电泳分离,以凝胶成像系统分析结果,计算各目标条带与内参条带光密度比值。肿瘤组织较正常组织条带缺失或减弱 75%以上者可判断为基因缺失。

1.2.3 Western 印迹分析

提取总蛋白,使用 BCA 蛋白定量试剂盒(南京凯基公司)检测蛋白的含量,取 100 μg 蛋白样品进

[基金项目] 国家自然科学基金(81301882);安徽省科技厅科技攻关项目(1604a0802098);皖南医学院重点培育基金(WK20142F16);芜湖市科技计划项目(2014hm26);弋矶山医院引进人才科研基金(YR201512)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:zhaoguohai@vip.tom.com

行 SDS-PAGE 电泳分离,转移至 PVDF 膜,室温封闭过夜,次日分别用鼠抗人 GAPDH 抗体、羊抗人 RASSF1A 抗体(Cell Signaling Technology, 美国)在室温下孵育 1 h。PVDF 膜用 PBS 洗 3 次,加入各自相应的二抗,孵育 1 h。将 PVDF 膜用 PBS 彻底洗净,用 ECL 检测试剂成像、曝光。

1.3 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据统计,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,计数资料采用卡方检验。 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RASSF1A 在肿瘤细胞中的表达

RASSF1A mRNA 和蛋白在不同分化程度的胃癌细胞系中均有表达,且在低分化的 BGC-823 细胞中的表达量明显低于中分化的 SGC-7901 细胞 ($P< 0.05$,图 1)。

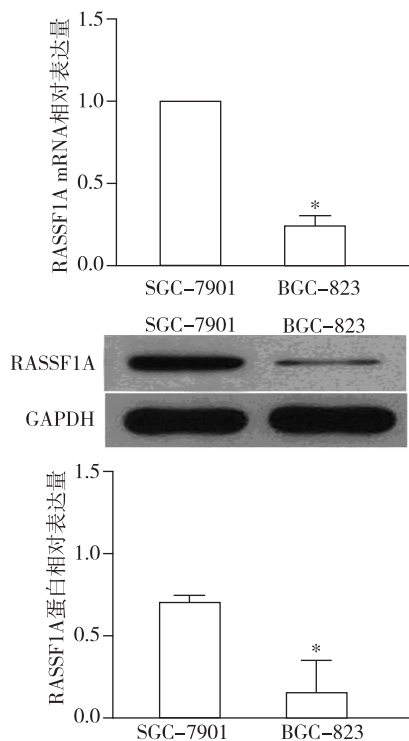


图 1 RASSF1A mRNA 和蛋白在不同细胞系中的相对表达量

2.2 RASSF1A 在胃癌及癌旁组织中的表达

RASSF1A 在胃癌组织中的阳性表达为 30 例 (43.48%), 在癌旁组织中的阳性表达为 59 例 (85.51%),RASSF1A 在胃癌组织中的缺失率高于癌旁组织,差异有统计学意义($\chi^2=26.6, P<0.05$)。

2.3 RASSF1A 的表达与胃癌临床相关因素的关系

从表 1 中可以看出,RASSF1A 的表达与年龄、

性别无明显相关性($P>0.05$),但与肿瘤分化程度、肿瘤分期的相关性显著($P<0.05$)。

表 1 胃癌组织中 RASSF1A 的表达与临床相关因素的关系 [(n)%]

临床病理特征	缺失	表达	<i>P</i> 值
年龄(岁)			0.775
<65	10(25.6)	6(20.0)	
≥65	29(74.4)	24(80.0)	
性别			0.801
女	15(38.5)	10(33.3)	
男	24(61.5)	20(66.7)	
组织分化程度			<0.001
低分化	31(79.5)	9(30.0)	
中高分化	8(20.5)	21(70.0)	
分期			0.003
I~II	17(43.6)	24(80.0)	
III~IV	22(56.4)	6(20.0)	
Lauren 分型			0.025
肠型	17(43.6)	21(70.0)	
弥漫性	22(56.4)	9(30.0)	

3 讨论

RASSF1A 是 2000 年从 3 号染色体短臂上克隆出来的新型候选抑癌基因,其在肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[5]。RASSF1A 几乎在所有的正常组织中表达,但在肺癌、乳腺癌、肾细胞癌等多种肿瘤中表达缺失^[6]。RASSF1A 抑制肿瘤生长的机制可能有以下两种:一种可能是 RASSF1A 通过对 Rb 家族的细胞周期检查点的作用而诱导细胞周期的停滞;另一种是活化的 Ras 蛋白可能发挥双重作用,既能促进细胞生长和分化,又能诱导凋亡抑制细胞生长,在肿瘤细胞中,RASSF1A 甲基化引起的表达缺失会破坏 Ras 的平衡作用,从而使其发挥促进生长的作用而导致肿瘤的发生^[3]。目前,有研究表明 95% 不表达 RASSF1A 的肿瘤标本的甲基化都发生在启动子区的 CpG 位点上。这种异常的甲基化导致基因功能的丧失,在胃癌的发生中起重要作用^[7]。因此,本实验旨在验证 RASSF1A 在胃癌中存在表达缺失,并尝试进一步阐明其表达与肿瘤分期和分化程度的关系。

本研究首先检测了胃癌细胞株中 RASSF1A 的表达,结果表明 RASSF1A 均有表达,但在中分化细胞中的表达高于低分化细胞,此结果与已有的实验结果相一致^[8]。同时,在胃癌及癌旁组织中进一步验证此结果,证实 RASSF1A 在胃癌中的表达缺失高于癌旁组织,并且 RASSF1A 的表达缺失与肿瘤的

分化程度及分期有关,即低分化的胃癌组织 RASSF1A 的表达缺失明显高于中高分化的胃癌组织,Ⅲ、Ⅳ期的胃癌组织 RASSF1A 的表达缺失明显高于 I、II 期的胃癌组织,此结果也与国内多项研究结果相一致^[9-10]。此外进一步验证了胃癌 Lauren 分型与 RASSF1A 表达的相关性,Lauren 分型将胃癌分为肠型与弥漫型,肠型胃癌呈现高分化腺癌结构,呈局限性生长,弥漫型胃癌呈胃型黏液细胞特征,分化程度低^[11]。实验结果表明 RASSF1A 在肠型胃癌中的表达高于弥漫型胃癌。结合以上结果,可以初步认为 RASSF1A 的表达可以作为评估胃癌恶性程度及其预后的一项有效指标。

综上所述,RASSF1A 在胃癌的发生过程中发挥重要作用,基因的甲基化具有可逆性,失活的 RASSF1A 在一定条件下可被再次活化,使其基因正常表达,这为将来的肿瘤临床治疗提供了新的思路。

[参考文献]

[1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2011,61(2):69-90
 [2] 季加孚,季鑫.胃癌治疗的新进展[J].循证医学,2011,11(2):82-86
 [3] 李学彦,傅宝玉,林朝胜.抑癌基因 FASSF1 在胃癌组织中表达及其临床意义的研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2007,14(24):1882-1884

[4] 叶梅,夏冰,郭秋莎,等. Ras 相关结构域家族 1A 基因在胃癌组织中的表达[J]. *中华消化杂志*, 2007,27(3):150-153
 [5] 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 Genet*, 2000,25(3):315-319
 [6] 蔡兆根,于东红.胃癌 RASSF1A 的表达与幽门螺杆菌感染关系的研究[J]. *蚌埠医学院学报*, 2009,34(4):281-283
 [7] 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
 [8] 陈明军,陈吉祥,党胜春. RASSF1 基因在胃癌组织和细胞中的表达及意义[J]. *广东医学*, 2010,31(20):2648-2650
 [9] 杜鹏,张一楚.抑癌基因 RASSF1A 在胃癌中的表达及意义[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2007,27(6):710-712
 [10] 龚光伟,沈世强,涂友明,等. RASSF1A 在胃癌组织中的表达及其临床意义[J]. *腹部外科*, 2006,19(6):363-364
 [11] 邓程伟,申竝.胃癌 Lauren 分型与其临床病理特点及预后的关系[J]. *实用癌症杂志*, 2014,29(4):394-396

[收稿日期] 2016-05-18

(上接第 89 页)

prophylactic placement of intravascular balloon catheters for placenta accreta [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2007,197(4):402.e1-402.e5
 [3] Thia EW, Lee SL, Tan HK, et al. Ultrasonographical features of morbidly-adherent placentas [J]. *Singapore Med J*, 2007,48(9):799-802
 [4] Meng X, Xie L, Song W. Comparing the diagnostic value of ultrasound and magnetic resonance imaging for placenta accreta: a systematic review and meta-analysis [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2013,39(11):1958-1965
 [5] 杨洁,徐莉,陈敦金,等.彩超和磁共振成像诊断胎盘植入价值的评价[J]. *现代妇产科进展*, 2008,17(7):530-531
 [6] Lax A, Prince MR, Mennitt KW, et al. The value of specific MRI features in the evaluation of suspected placental invasion [J]. *Magn Reson Imaging*, 2007,25(1):87-93

[7] Baughman WC, Corteville JE, Shah RR. Placenta accreta: spectrum of US and Mr imaging findings [J]. *Radiographics*, 2008,28(7):1905-1916
 [8] Koo BC, Sala E, Hackett GA, et al. A pregnant lady with intermittent vaginal bleeding (2007: 3b). Placenta percreta [J]. *Eur Radiol*, 2007,17(6):1647-1649
 [9] Silver RM, Landon MB, Rouse DJ, et al. Maternal morbidity associated with multiple repeat cesarean deliveries [J]. *Obstet Gynecol*, 2006,107(6):1226-1232
 [10] Higgins MF, Monteith C, Foley M, et al. Real increasing incidence of hysterectomy for placenta accreta following previous caesarean section [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2013,171(1):54-56
 [11] 周欣,王美莲,孙丽洲.凶险型前置胎盘围手术期综合手术治疗方法探讨[J]. *实用妇产科杂志*, 2013,29(7):516-518

[收稿日期] 2016-04-01