

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2014.06.007

胃癌组织高迁移率族蛋白 B1 的表达及与临床病理特征的关系

姜 彪¹ 靳 猛¹ 张 伟¹ 李 强²

(¹ 济宁医学院附属医院, 山东 济宁 272029 ² 天津医科大学附属肿瘤医院, 天津 300070)

摘 要 **目的** 检测高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)在胃癌组织的表达,分析其与胃癌临床病理特征的关系。**方法** 112 例胃癌及癌旁组织标本应用免疫组织化学法、反转录 PCR、Western-blot 检测 HMGB1 的表达、定量,应用统计学方法分析其与胃癌临床病理特征关系。**结果** 免疫组织化学染色显示:HMGB1 阳性颗粒主要位于细胞核;反转录 PCR、Western-blot 显示:胃癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织和正常胃组织($P<0.01$),HMGB1 过度表达与胃癌的分化程度、组织学的类型及有无淋巴结转移关系密切。**结论** HMGB1 在胃癌组织中高表达与胃癌的临床病理特征密切相关,推测其过表达可能与胃癌的侵袭、转移有关。

关键词 HMGB1;胃癌;临床病理

中图分类号:R735.2 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-9760(2014)120-407-04

Expression of HMGB1 and the relationship with clinicopathological characteristics of gastric carcinoma

JIANG Biao, JIN Meng, ZHANG Wei, LI Qiang

(The Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China)

Abstract: Objective To investigate the significance of high mobility group protein B1 (HMGB1) in gastric carcinoma (GC) and its relationship with clinicopathological characteristics. **Methods** 112 cases of GC specimens and tumor-adjacent tissues were collected. The expression of HMGB1 was tested with immunohistochemistry, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western-blot. Clinicopathological characteristics of GC patients were also analysed. The relationship between HMGB1 and the pathological characteristics of GC was analysed statistically. **Results** Immunohistochemistry data demonstrated that HMGB1 protein was predominantly localized in the nuclei of GC. Results of RT-PCR and Western-blot demonstrated that the expression of relative HMGB1 mRNA and protein in the tissue of GC were higher than that in tissue adjacent to carcinoma and normal gastric tissue ($P<0.01$). Overexpression of HMGB1 was significantly correlated with histological type, differentiation and lymph node metastasis of tumor. **Conclusion** Overexpression of HMGB1 was related to some clinicopathological characteristics of GC, and HMGB1 may promote invasion and metastasis of GC.

Key words: High mobility group protein B1; Gastric carcinoma; Clinicopathological characteristics

胃癌(gastric carcinoma, GC)是最常见的消化道恶性肿瘤之一。目前,GC 研究的主要方向是寻找 GC 可能的致癌基因和促进转移的基因。高迁移率族蛋白 B1 (High-mobility group box 1, HMGB1)在多种恶性肿瘤中呈现高表达,且与肿瘤的恶性程度及预后关系密切^[1]。本文应用免疫组织化学、反转录 PCR、Western-blot 的方法检测其在 GC 组织的表达及其与 GC 临床病理因素之间的关系。

1 资料与方法

1.1 临床病理资料

选取天津医科大学附属肿瘤医院胃部肿瘤科 2011 年 1 月 1 日至 2011 年 10 月 30 日手术切除的 112 例 GC 组织及配对的癌旁组织,其中男 62 例,女 50 例。年龄 45~75 岁,平均年龄 60 岁。乳头状腺癌 10 例,管状腺癌 58 例,黏液腺癌 20 例,印戒细胞癌 21 例,未分化癌 3 例。其中管状腺癌按

WHO 2010 年组织学标准分级分为高分化 17 例,中分化 28 例,低分化 13 例。按 UICC 2010 年新修订的 TNM 分期标准判定,Ⅰ期 25 例、Ⅱ期 29 例、Ⅲ期 42 例和Ⅳ期 16 例。有淋巴结转移的 52 例,无淋巴结转移的 60 例。所有癌旁组织距离原发癌组织边缘大于 5cm。另外收集正常胃组织标本 20 例作为对照。

1.2 主要试剂

鼠抗人 GAPDH 多克隆抗体、HMGB1、GAPDH 引物由湖南远泰生物科技公司提供;兔抗人 HMGB1 多克隆抗体和 ECL Western-blotting 试剂盒分别购自美国 Abcam 公司和 Pierce 公司。DNA Marker 购自日本 Takara 公司

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学法染色(SABC 法染色)

4%的多聚甲酸固定标本,滴加一抗 HMGB1(1:250)过夜,阴性对照用 PBS 代替一抗;滴加生物素标记的二抗,DAB 染色,苏木素复染;光镜下观察染色结果,出现棕褐色颗粒为阳性表现。两位病理科医师独立阅片,每片均显微镜下随机取 10 个 400 倍视野,每视野均计数 100 个细胞,计算细胞的阳性率。HMGB1 蛋白以细胞质或细胞核内出现黄色、棕黄色颗粒认为染色阳性。结果判定标准:细胞内阳性细胞数<10% 记为(-),10%~50% 记为(+),50%~75% 记为(++),>75% 记为(+++)。(一) 阴性,(+) 记为弱阳性,(++)、(+++) 记为强阳性。

1.3.2 反转录 PCR 组织标本总 RNA 提取后反转录合成第一链 cDNA,操作按照 reverse transcription system kit 说明进行。目的基因的相对表达水平根据该基因积分光密度值(integral optical density, IOD)(RT-PCR 产物电泳条带的光密度值×面积)与内参 GAPDH RT-PCR 产物电泳条带的 IOD 比值算出。

1.3.3 Western-blot 免疫印迹 组织标本中总蛋白提取后 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。按标记和实验设计切下膜条,加入相应的一抗(兔 HMGB1 多克隆抗体 1:300),酶标二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 1:30000)与一抗结合。阳性条带以 Gdpro4.0 版凝胶光密度分析软件进行分析,测定其积分光密度值, HMGB1 的相对表达水平根据目的基因 HMGB1 与内参 GAPDH 的 IOD 的比值算出。

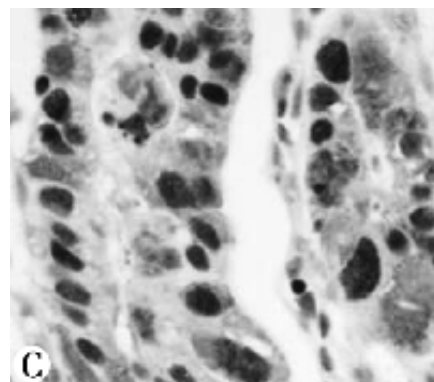
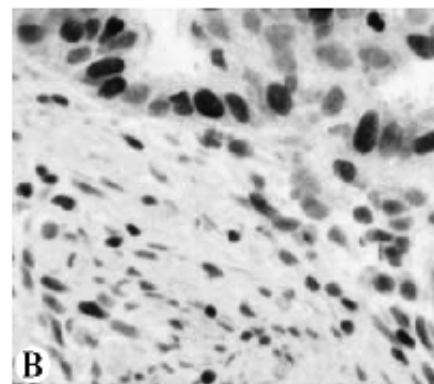
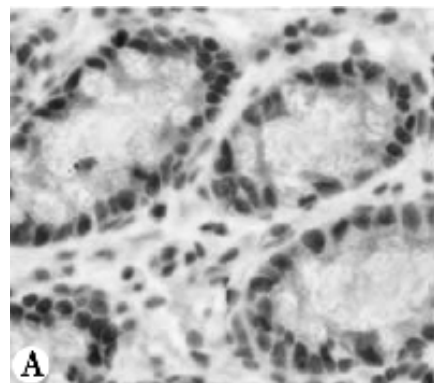
1.4 统计学方法

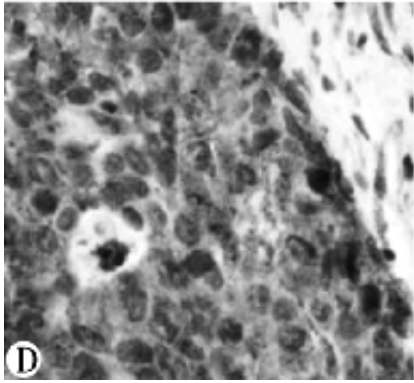
所有数据采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理。

2 结果

2.1 免疫组织化学检测 HMGB1 蛋白的表达

在正常胃组织和癌旁组织中, HMGB1 呈弱阳性;在高分化癌组织中呈强阳性;在低分化癌组织中, HMGB1 蛋白表达不仅在细胞核呈强阳性,在细胞质中也呈强阳性。见图 1。





A: 正常胃组织; B: 癌旁组织; C: 高分化 GC; D: 低分化 GC

图 1 正常胃组织、癌旁组织和癌组织的免疫组化结果(×400)

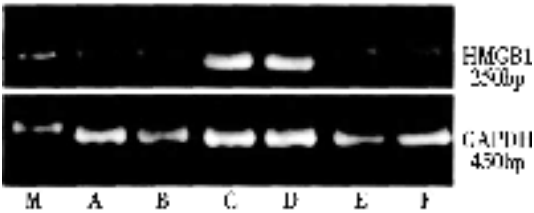
2.2 RT-PCR 检测组织中 HMGB1 mRNA 的表达

提取的 GC 组织、癌旁组织和正常胃组织的总 RNA,以 GAPDH 为内参对照,RT-PCR 扩增 3 组组织中的 HMGB1 基因,扩增产物经琼脂凝胶电泳后分析显示 3 组组织的 PCR 扩增产物均显示特异性条带 GC 组织中 HMGB1 mRNA 相对表达水平明显高于癌旁组织和正常胃组织($P<0.001$,见表 1,图 2);癌旁组织的表达较正常胃组织高,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 HMGB1 mRNA 的表达($\bar{x}\pm s$)

	n	HMGB1 mRNA 的相对表达
GC 组织组	112	0.759 ± 0.170
癌旁组织组	112	$0.473\pm 0.126^*$
正常胃组织	20	$0.407\pm 0.078^{*\Delta}$

注: * 与胃癌组织比较, $P<0.001$; Δ 与癌旁组织比较, $P>0.05$



M: marker; A, B: 正常胃组织 C, D: GC 组织 E, F: 癌旁组织

图 2 组织中 HMGB1 mRNA 的表达

2.3 HMGB1 mRNA 的表达水平与胃癌临床病理因素的关系

可以看出: HMGB1 mRNA 在不同类型 GC 中的表达水平不同,其中未分化腺癌的表达水平明显高于其它类型;就分化程度而言, HMGB1 mRNA 在低分化腺癌中的表达水平明显高于高分化腺癌; HMGB1 mRNA 在有淋巴结转移组的表达

水平明显高于无淋巴结转移组($P<0.01$)。见表 2。

表 2 GC 组织中的 HMGB1 mRNA 表达水平与临床病理因素的关系比较($\bar{x}\pm s$)

病理因素	n(%)	HMGB1 mRNA 表达水平	t/F 值	P
性别				
男	62(55.36)	0.871±0.150	0.446	>0.05
女	50(44.64)	0.831±0.182		
年龄				
≤60 岁	57(50.89)	0.871±0.144	0.676	>0.05
>60 岁	55(49.11)	0.848±0.175		
组织学类型				
腺癌	68(60.71)	0.745±0.082	4.071	<0.05
粘液腺癌	20(17.86)	0.779±0.106		
印戒细胞癌	21(18.75)	0.948±0.147		
未分化癌	3(2.68)	0.962±0.158		
分化程度				
高分化	17(29.31)	0.823±0.148	10.756	<0.05
中分化	28(48.28)	0.889±0.228		
低分化	13(11.61)	0.996±0.115		
淋巴结转移				
有	52(46.43)	0.962±0.158	14.253	<0.05
无	60(53.57)	0.739±0.106		

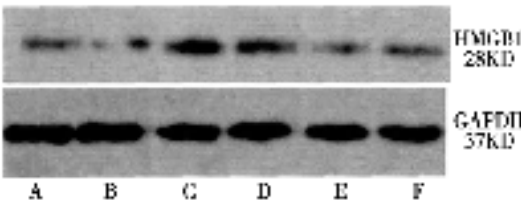
2.4 Western-blot 检测 HMGB1 蛋白的表达

以 GAPDH 为内参对照,提取 GC 组织、癌旁和正常胃组织总蛋白。免疫印迹检测结果显示: GC 组织中 HMGB1 蛋白表达比值明显高于癌旁组织和正常胃组织,差异有统计学意义 ($P<0.001$,见表 3 和图 3)。癌旁组织的表达较正常胃组织高,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 3 HMGB1 蛋白在组织中的相对表达($\bar{x}\pm s$)

分组	n	HMGB1 蛋白的相对表达	F 值	P
GC 组织组	112	0.359 ± 0.078	437.18	0.001
癌旁组织组	112	$0.173\pm 0.016^*$		
正常胃组织	20	$0.075\pm 0.028^{*\Delta}$		

注: * 与胃癌组织比较, $P<0.001$; Δ 与癌旁组织比较, $P>0.05$



A, B: 正常胃组织 C, D: GC 组织 E, F: 癌旁组织

图 3 组织中 HMGB1 蛋白的表达

3 讨论

GC 是我国常见消化系恶性肿瘤,本病进展快、恶性程度高,患者就诊时常已处于中晚期,手术及介入、药物治疗等措施对 GC 患者效果均不令人满意。GC 恶性程度高的主要原因在于 GC 细胞具有很强的侵袭迁移能力,胃血供及淋巴管丰富,癌细胞容易通过血液或淋巴循环等途径转移到其他脏器。因此,寻找与 GC 细胞侵袭、转移有关的新基因可能对阐明 GC 发病机制、寻找肿瘤标志物、确定生物治疗靶点有重要意义。随着分子生物学技术进步,有关 GC 发生进展的基因研究也取得了很大进展^[1]。当前 HMGB1 与肿瘤侵袭转移的关系已成为研究的热点^[2]。HMGB1 是 HMG 超家族成员之一,基因位于染色体的 13q12,相对分子量约 25kD。有报道表明^[3] HMGB1 与包括 GC 在内的多种肿瘤有关,该基因可通过促进肿瘤细胞侵袭迁移而导致肿瘤进展、转移。

本文结果显示:HMGB1 蛋白在 GC 组织中呈现高表达,且主要定位于细胞核;低分化癌中可见细胞核和细胞质中均呈现强阳性表达;HMGB1 基因和蛋白在 GC 组织中的表达水平明显高于正常胃组织和癌旁组织,这与 Akaike 等的研究结果一致^[4-7]。结果提示 HMGB1 可能与细胞的分裂有关,细胞质中的强阳性表达可能由于细胞受到外界因素的刺激所致。

本文结果还显示:HMGB1 的表达水平与 GC 的组织学类型、分化程度、有无淋巴结转移等临床病理因素密切相关,提示 HMGB1 虽和 GC 的发生发展有密切关系,但在不同类型的 GC 发生发展中,其具体的机制不同;在 GC 的不同阶段,作用也是不同的。有淋巴结转移者与无淋巴结转移者相比 HMGB1 表达强阳性率明显增高,低分化者

HMGB1 表达强阳性率明显高于高分化者,表明 HMGB1 可能以某种机制促进了胃癌组织的生长、浸润及转移。在肿瘤发生过程中有大量细胞坏死,向周围释放 HMGB1,造成局部组织的慢性炎性环境,进而导致更多的正常细胞发生坏死或癌变,肿瘤细胞长期存活并逐渐向周围扩张。

本文只是明确了 HMGB1 与胃癌的发生、转移和侵袭有密切的关系;但其具体的作用机制尚不清楚,有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Florou D, Papadopoulos I N, Fragoulis E G, et al. L-Dopa decarboxylase(DDC) constitutes an emerging biomarker in predicting patients' survival with stomach adenocarcinomas [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2013,139 (2):297-306.
- [2] Dao lin Tang, Rui Kang, Herbert J, et al. High-mobility group box 1[HMGB1]and cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2010,1799(1-2):131.
- [3] 张靖,朱金水.高迁移率族蛋白 B-1 与胃肠道肿瘤的相关性[J].国际肿瘤学杂志,2011,38(6):459-462.
- [4] Yan W, Chang Y, Liang X, et al. High-mobility group box 1 activates caspase-1 and promotes hepatocellular carcinoma invasiveness and metastases [J]. Hepatology, 2012, 55 (6): 1863-1875.
- [5] Akaike H, Kono K, Sugai H, et al. Expression of high mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) in gastric cancer[J]. Anticancer Res, 2007, 27(1A):449-457.
- [6] Kusume A, Sasahira T, Luo Y, et al. Suppression of dendritic cells by HMGB1 is associated with lymph node metastasis of human colon cancer[J]. Pathobiology, 2009, 76:155-62.
- [7] Wu D, Ding Y, Wang S, et al. Increased expression of high mobility group box 1(HMGB1) is associated with progression and poor prognosis in human nasopharyngeal carcinoma[J]. J Pathol, 2008, 216(2):167-175.

(收稿日期 2014-8-20)

• 启事 •

本刊正式启用网上稿件处理系统

为了更好地适应数字出版的发展趋势,《济宁医学院学报》正式启用网上稿件处理系统。

作者投稿请登录本刊官方网站 <http://xuebao.jnmc.edu.cn>, 点击左上方“作者登录”, 输入用户名和密码登录后, 按页面提示进行投稿及查询操作。首次投稿作者须先行用户注册, 注意填写完整信息, 以免投稿不成功。

网上稿件处理系统正式开通后, 原投稿邮箱 jyxbbjb0909@163.com 将不再接受新投稿件。

若有疑问, 可拨打 0537-3616267 进行咨询。

本刊编辑部