

肿瘤发病机制与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000051

人体胃癌组织中 Smad3 基因与 Smad7 基因的相关性表达
及其临床意义

马速佳, 周志强, 吴成稳, 高建伟

(郑州大学第二附属医院普外科, 郑州 450014)

【摘要】目的:研究胃癌组织中 Smad3 基因与 Smad7 基因的表达水平以及二者的相关性,并探索其临床意义。**方法:**采用免疫组织化学和 RT-PCR 的方法,检测 50 例胃癌,癌旁组织以及 10 例正常胃壁组织中,Smad3 与 Smad7 蛋白与 mRNA 的表达。**结果:**胃癌组织中 Smad3 蛋白表达阳性率明显低于癌旁组织(50.0% vs. 92.0%, $P=0.000$),2 组相比有统计学差异。并与肿瘤的分期($P=0.004$)及肿瘤组织的分化($P=0.030$)密切相关。而与年龄($\chi^2=0.439$, $P=0.508$)、性别($\chi^2=0.117$, $P=0.733$)均无关,胃癌组织中 Smad7 蛋白的表达阳性率高于癌旁组织(48.0% vs. 4.0%, $P=0.000$),正常组织最低。且与肿瘤的分期($P=0.009$),组织的分化程度($P=0.001$)密切相关。在胃癌组织中发现 Smad3 蛋白与 Smad7 蛋白呈负相关性($r=-0.539$, $P=0.000$)。Smad3 mRNA 在癌组织中的表达低于癌旁组织($Z=7.84$, $P=0.000$),而 Smad7 mRNA 在癌组织中的表达高于癌旁组织($Z=7.83$, $P=0.000$)。**结论:**Smad3 基因在癌组织中低表达,而 Smad7 基因在癌组织中则高表达,并且二者与胃癌的分期,组织分化程度有关,提示二者在胃癌的发生、发展中有一定的作用,可能和胃癌的分化,分期有关。

【关键词】胃癌;Smad3;Smad7;免疫组织化学;逆转录聚合酶链反应

【中图分类号】R656.6+1

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-05-12

Correlation between Smad3 gene and Smad7 gene in human gastric carcinoma and its clinical significance

Ma Sujia, Zhou Zhiqiang, Wu Chengwen, Gao Jianwei

(Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Zhengzhou University)

【Abstract】Objective: To explore the expression of Smad3 gene and smad7 gene in human gastric carcinoma, their correlation and clinical significances. **Methods:** Totally 50 cases of gastric carcinoma with adjacent tissues and 10 cases of normal gastric tissues were collected in this study. Smad3 and Smad7 protein and mRNA expression in these samples was detected by immunohistochemistry and RT-PCR. **Results:** Smad3 protein expressions in gastric carcinoma tissue was significantly lower than that in the adjacent carcinoma tissue (50.0% vs. 92.0%, $P=0.000$). The expression was closely related with tumor stage ($P=0.004$) and tumor differentiation stage ($P=0.030$). The expression was not related with patients' age ($\chi^2=0.439$, $P=0.508$) or gender ($\chi^2=0.117$, $P=0.733$). Positive rate of Smad7 protein expression in gastric carcinoma tissue was higher than that in adjacent carcinoma tissue (48.0% vs. 4.0%, $P=0.000$) with that in normal tissue being the lowest. The positive rate was closely related with tumor stage ($P=0.009$) and degree of differentiation ($P=0.001$). Smad3 protein and Smad7 protein was found negative correlated in gastric carcinoma ($r=-0.539$, $P=0.000$). Smad3 mRNA expression in carcinoma tissue was lower than that in adjacent carcinoma tissue ($Z=7.84$, $P=0.000$), but Smad7 mRNA expression in carcinoma tissue were higher than those in adjacent carcinoma tissue ($Z=7.83$, $P=0.000$). **Conclusions:** Smad3 gene expression in carcinoma tissue is decreased while Smad7 gene expression in cancer tissue is increased. Smad3 gene expression and Smad7 gene expression are related with stage of gastric carcinoma and degree of differentiation. Correlated expression of these two genes plays certain role in the occurrence and development of gastric carcinoma.

【Key words】 gastric carcinoma; Smad3; Smad7; immunohistochemistry; reverse transcription-polymerase chain reaction

在我国恶性肿瘤的发病率中,胃癌位居第2位,

在癌症死因中位列第3,发病率和死亡率分别为29.9/10万、22.3/10万^[1],给我国经济社会的发展带来了巨大的影响。目前,对其发病的分子学机制还不十分清楚。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族是一种具有重要生物效应的细

作者介绍:马速佳, Email: zdmjsj2011@163.com,

研究方向:普外科疾病的临床与基础研究。

通信作者:周志强, Email: qiang6364@sohu.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000051.html>

胞因子,通过膜受体介导将信号传入细胞内,能够抑制细胞的增殖和分裂。国外学者研究发现,恶性肿瘤的发生和发展与对 TGF- β 产生抵抗作用密切相关^[2]。Smad 是其下游非常重要的信号蛋白,能通过多种方式参与各种基因的表达^[3]。研究表明,TGF- β /Smad 通路和人类恶性肿瘤有关。但是,在胃癌中 Smad3,Smad7 的表达与临床病理特征之间的关系以及二者是否有一定的相关性,研究较少。本实验采用免疫组织化学和 RT-PCR 技术检测二者在癌组织、癌旁组织以及正常组织中的蛋白与 mRNA 的表达,以此来分析 Smad3、Smad7 在胃癌的发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 标本来源

研究对象来源于我科 2011–2012 年间经病理证实的胃癌手术患者,共 50 例。男性 39 例,女性 11 例。年龄为 35~80 岁,平均年龄为 (54.86 ± 9.24) 岁。每位患者分别取癌组织和癌旁组织(距肿瘤 2 cm),所有患者在手术前均未行放疗和化疗,术后均经病理证实为胃癌。10 例正常胃组织取自胃镜检查者,且经病理证实为良性病变(慢性胃炎)。本研究所提供标本的患者,均已签订《手术标本知情同意书》,并且报郑州大学伦理委员会审核批准。手术标本离体后分成两部分,一部分迅速置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱冻存,用于检测 mRNA。另一部分置于 10% 的甲醛溶液中固定,待石蜡包埋切片,用于免疫组化的检测。离体的肿瘤组织和癌旁组织都经病理确诊,并按照国际抗癌联盟标准进行 TNM 分期。其中,50 例癌症患者中 I 期 3 例(6.2%),II 期 19 例(37.5%),III 期 20 例(40.0%),IV 期 8 例(16.2%)。按肿瘤病理学分级:低分化 11 例(21.2%),中分化 18 例(35.0%),高分化 21 例(43.7%)。在 60 例标本中成功地检测到了各基因的 mRNA 表达情况。在全部 50 例胃癌组织及癌旁组织,10 例正常组织中检测了各基因的蛋白表达情况。

1.2 试剂与设备

兔抗人 Smad3、Smad7 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),RT-PCR 试剂盒购自 Transgene 公司,引物由北京博大泰克公司合成。Smad3 引物:正义链 5'-CGTCCATCTGCC-TTTCAC-3',反义链 5'-TAGCTCGTGGTGGCTGTGC-3',扩增产物大小为 305 bp;Smad7 引物:正义链 5'-CTGTGCAAAG-TGTTTCAGGTGGCC-3',反义链 5'-CGGGTATCTGGAGTAA-GGAGGG-3',扩增产物大小为 171 bp; β -actin 为内参照,正义链 5'-CTGGGACGACATGGAGAAAA-3',反义链 5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3',扩增产物大小为 564 bp。SP900 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限工程公司);PCR

仪(Eppendorf 公司);显微成像系统(德国 Leica 公司);凝胶成像分析系统(大连竞迈生物公司); $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱(SANYO 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组织化学检测 Smad3 与 Smad7 蛋白的相应表达

制作石蜡切片,切片厚 $5\text{ }\mu\text{m}$,常规脱蜡水化,采用 SP 法进行染色,具体步骤按照试剂盒说明书进行操作。阳性对照为已知的 Smad3 与 Smad7 蛋白染色呈阳性的组织切片,在显微镜下观察,细胞核出现棕黄色颗粒为阳性表达。用 PBS 液代替一抗作空白对照。采用正常胃黏膜组织作为 Smad3 与 Smad7 蛋白表达的阳性对照。

1.3.2 Smad3 与 Smad7 蛋白表达的评价 参照相关资料^[4]

对 Smad3 蛋白与 Smad7 蛋白的表达情况进行半定量评分:根据细胞染色强度可分为:无色 0 分,浅黄 1 分,棕黄 2 分,棕褐 3 分。再按显色细胞的百分比:无显色细胞 0 分, $<10\%$ 为 1 分, $10\%\sim 50\%$ 为 2 分, $>50\%\sim 75\%$ 为 3 分, $>75\%$ 为 4 分。二者的乘积 ≥ 3 分为阳性。

1.3.3 RT-PCR 检测 Smad3 mRNA、Smad7 mRNA 的表达

取标本(胃癌组织、癌旁组织、正常胃壁组织)50 mg,匀浆后用 Trizol 试剂盒提取总 RNA,用紫外分光光度仪测定其浓度和纯度,合格后进行反转录。反应条件如下: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,1 个循环; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,共 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 总延伸 6 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统成像,用软件分析电泳条带。用目的基因与 β -actin 条带灰度值的比值,表示基因表达量。

1.4 统计学处理

用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。其中计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,计数资料用率表示。计数资料采用卡方检验或校正卡方检验,Kruskal-Wallis 行组间检验,Spearman 秩相关行相关性分析。检验水准 $\alpha=0.05$,校正检验水准 $\alpha'=\alpha/2=0.167$ 。

2 结果

2.1 Smad3 和 Smad7 蛋白在正常、癌旁与胃癌组织中的表达

从图 1~3 可以看出,Smad3 蛋白阳性表达产物呈棕黄色,主要在细胞核中。在 50 例胃癌患者中,癌组织中 Smad3 蛋白表达阳性率为 $50.0\%(25/50)$,癌旁组织为 $92.0\%(46/50)$,正常组织 $100.0\%(10/10)$ 。在胃癌组织中 Smad7 蛋白阳性表达产物主要位于细胞核中(图 4~6),阳性表达率为 $48.0\%(24/50)$,而癌旁组织为 $4.0\%(2/50)$,正常组织中未见阳性表达。在胃癌组织中 Smad3 蛋白与 Smad7 蛋白的表达呈负相关($r=-0.539$, $P=0.000$)(表 1)。按照临床病理参数进行统计学处理,可见 Smad3 蛋白与 Smad7 蛋白的表达,与年龄、性别无关($P>0.05$)。与肿瘤的分期,组织学分级有一定关系,即 Smad3 蛋白随着分期增大表达降低,随组织分化程度降低表达减小。Smad7 则与其相反(表 2)。

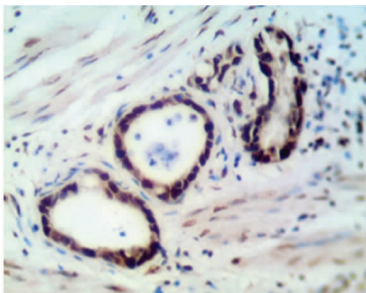


图 1 Smad3 蛋白在正常组织的表达
Fig.1 Expression of Smad3 protein in normal tissue

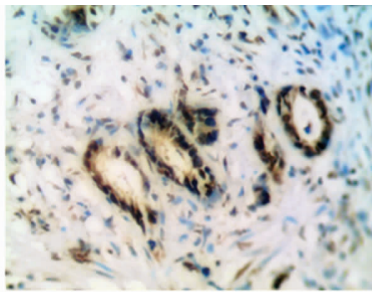


图 2 Smad3 蛋白在癌旁组织的表达
Fig.2 Expression of Smad3 protein in adjacent carcinoma tissue

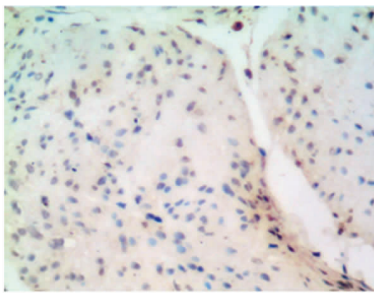


图 3 Smad3 蛋白在癌组织的表达
Fig.3 Expression of Smad3 protein in carcinoma tissue

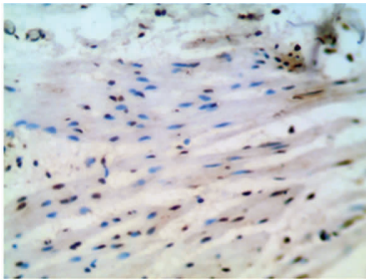


图 4 Smad7 蛋白在正常组织的表达
Fig.4 Expression of Smad7 protein in normal tissue

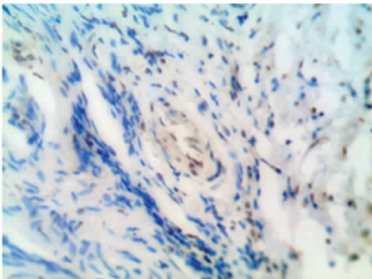


图 5 Smad7 蛋白在癌旁组织的表达
Fig.5 Expression of Smad7 protein in adjacent carcinoma tissue

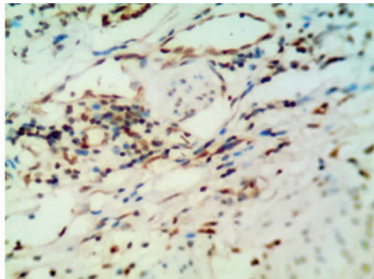


图 6 Smad7 蛋白在癌组织的表达
Fig.6 Expression of Smad7 protein in carcinoma tissue

表 1 胃癌中 Smad3 蛋白表达和 Smad7 蛋白表达的相关性 (*n*)

Tab.1 Correlation between Smad3 protein expression and Smad7 protein expression in gastric carcinoma (*n*)

Smad3蛋白	Smad7蛋白		χ^2 值	<i>P</i> 值
	+	-		
+	4	21	20.51	0.000
-	20	5		

表 2 Smad3 和 Smad7 蛋白的表达与胃癌临床病理因素的相关性

Tab.2 Correlation between Smad3 and Smad7 protein expression and clinical pathological factors of gastric carcinoma

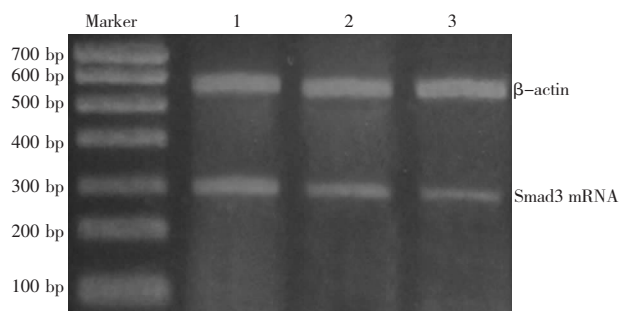
病理特征		例数 (<i>n</i>)	Smad3蛋白阳性 表达 (<i>n</i> , %)	χ^2 值	<i>P</i> 值	Smad7蛋白阳性表 达 (<i>n</i> , %)	χ^2 值	<i>P</i> 值
性别	男	39	20 (51.2)	0.117	0.733	18 (46.1)	0.242	0.623
	女	11	5 (45.4)			6 (54.5)		
年龄 (岁)	≥60	12	7 (58.3)	0.439	0.508	4 (33.3)	1.361	0.243
	<60	38	18 (47.3)			20 (52.6)		
肿瘤分期	I ~ II	22	16 (72.7)	8.117	0.004	6 (27.3)	6.762	0.009
	III ~ IV	28	9 (32.1)			18 (64.3)		
分化程度	高	21	15 (71.4)	7.019	0.030	5 (23.8)	13.006	0.001
	中	18	7 (38.9)			9 (50)		
	低	11	3 (27.2)			10 (90.9)		

2.2 Smad3 mRNA 和 Smad7 mRNA 在正常、癌旁与胃癌组织中的表达

Smad3 mRNA 和 Smad7 mRNA 在胃癌与癌旁组织中的表达情况见图 7、图 8(取自同一病例)、表 3。可知,Smad3

mRNA 的表达量差异有统计学意义,正常组织最高,癌旁次之,癌组织最低;而 Smad7 mRNA 的表达量为:癌组织高于癌旁组织,癌旁组织又高于正常组织。对其二者 mRNA 的表达值按性别、年龄、分期和组织分化程度进行统计分析。可以发现

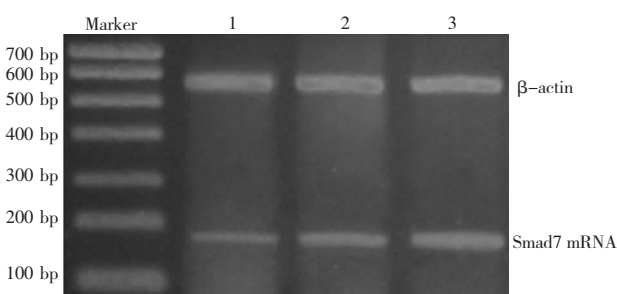
胃癌 Smad3 mRNA 和 Smad7 mRNA 的表达差异基本与其各自蛋白表达有一致性。



1. 正常胃组织组;2. 癌旁组;3. 胃癌组

图 7 Smad3 mRNA 在组织中的表达

Fig.7 Expression of Smad3 mRNA in the tissue



1. 正常胃组织组;2. 癌旁组;3. 胃癌组

图 8 Smad7 mRNA 在组织中的表达

Fig.8 Expression of Smad7 mRNA in the tissue

表 3 Smad3 mRNA 和 Smad7 mRNA 在癌旁组织,癌组织以及正常组织中的表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Expression of Smad3 mRNA and Smad7 mRNA in adjacent to carcinomatissue,gastric carcinoma tissue and normal tissue ($\bar{x} \pm s$)

分类	例数 (n)	Smad3 mRNA	Smad7 mRNA
癌旁组织	50	0.323 ± 0.038	0.225 ± 0.022
癌组织	50	0.115 ± 0.018 ^a	0.561 ± 0.029 ^a
正常组织	10	0.622 ± 0.073 ^{bc}	0.130 ± 0.011 ^{bc}
χ^2 值		88.474	88.478
P 值		0.000	0.000
Z 值 ^a		7.84	7.83
Z 值 ^b		2.71	2.72
Z 值 ^c		7.23	7.24
P 值 ^a		0.000	0.000
P 值 ^b		0.004	0.003
P 值 ^c		0.000	0.000

注:a,癌组织与癌旁组织比较, $P<0.05$;b,正常组织与癌旁组织比较, $P<0.05$;c,正常组织与癌组织比较, $P<0.05$; $P_{\text{Smad3 mRNA}}=0.000$, Smad3 mRNA 在此 3 组中的表达存在差异, $\alpha'=0.05/3=0.017$; $Z_{12}=7.84$, $P=0.000$; $Z_{13}=2.71$, $P=0.004$; $Z_{23}=7.23$, $P=0.000$; 正常组织最高,癌旁次之,癌组织最低

3 讨论

胃癌的发生、发展是一个复杂的病理生理过程,涉及到基因的调控以及相应蛋白质的表达。其中 TGF- β 超家族是一种具有重要生物效应的细胞因子,通过膜受体介导将信号传入细胞内。它作为信息传递的使者,无疑在肿瘤的发生过程中起着无可替代的作用。随着分子生物学技术的飞速发展,应用基因疗法,抑制信号的传递成为目前研究的热点。TGF- β 可以通过控制细胞周期,使其停止在细胞复制的 G1 期,从而抑制细胞的分裂和增殖。在 TGF- β 超家族信号转导的过程中,有一种重要的信号蛋白即 Smad 蛋白家族,它能够把生长因子信号从胞质转运到细胞核中,从而发挥生长抑制效应。Smad3 基因可以抑制原癌基因 c-myc 的转录和表达。上调对 CDK 有抑制作用的 P15 和 P21 的表达,通过 P15 阻止 CDK4 和 CDK6 与 cyclin D 的结合,从而抑制抑制周期素 E2 以及周期素依赖激酶 2 复合物的活性,发挥抑制细胞周期的作用^[9]。研究表明,在肿瘤发生、发展的早期,TGF- β 有明显的抑制肿瘤细胞的作用,失去 TGF- β 超家族的生长抑制作用是肿瘤发生、发展的重要因素^[6]。本实验显示,在胃癌中 Smad3 蛋白与 mRNA 的表达水平都低于癌旁组织,并且 Smad3 蛋白与 mRNA 的表达与患者的年龄、性别无明显相关性。与患者的肿瘤分期,肿瘤的组织分化程度有一定相关性。在胃癌 I 期与 II 期之间,III 期与 IV 期之间,其表达量未见明显差异。但是在 I 期 II 期与 III 期 IV 期之间,二者存在差异,前 2 期 Smad3 蛋白与 mRNA 的表达高于后 2 期。同时在从低分化到高分化的过程中,Smad3 蛋白与 mRNA 的表达量逐渐增加。这表明可能由于 Smad3 蛋白的表达减少,使得 TGF- β 信号通路的传导发生障碍,从而在某种程度上失去了 TGF- β 抑制肿瘤细胞增殖,诱导其凋亡的生物学功能。从而引发恶性肿瘤的发生,并且随着分期与组织分化程度发生改变。这与 Smad3 基因在子宫内膜癌^[7]、肝癌^[8]等恶性肿瘤发生过程中的生物学作用基本相似。

Smad7 基因位于人类染色体 18q21,是一种抑制型的 Smad,研究表明 Smad7 基因不能被相应受体磷酸化。相反,它能与活化的 TGF- β 受体 1 结合,进而影响 R-Smad 磷酸化,以此来对 TGF- β 超家族

信号的传递产生负调控效应。Nakahata 等^[9]国外学者发现,若 Smad7 基因的表达发生错误,可影响相关细胞对 TGF- β 超家族信号的应答。如:检测表明在 T 细胞白血病,T 细胞淋巴瘤中,均有 Smad7 基因的高表达。Matsuo 等^[10]研究发现在甲状腺癌中 Smad7 基因高表达。Halder 等^[11]通过研究结肠癌发现在其癌组织中,Smad7 基因表达上调与结肠癌的肝转移有一定相关性。本实验研究显示,在胃癌组织中 Smad7 蛋白与 mRNA 的表达均高于癌旁组织,并且与肿瘤的分期和组织学分化程度有一定相关性,在 I 期 II 期,III 期 IV 期 Smad7 蛋白与 mRNA 的表达逐渐增高。按照胃癌的组织学分化程度的降低,其蛋白与 mRNA 的表达呈上调趋势。这表明 Smad7 基因的表达可能与胃癌的发生、发展以及分期和恶性程度有一定联系。由于 Smad7 基因的过度表达,使得其有等多的 Smad7 基因与活化的 TGF- β 超家族受体 1 结合,阻碍了 R-Smad(受体调节型 Smad)的磷酸化,进而 TGF- β 超家族信号通路被阻断,使得 TGF- β 失去抑制生长的作用,最终导致肿瘤的发生、发展。由此可见,Smad7 基因对于维护 TGF- β 超家族信号通路的平衡是至关重要的。

总之,胃癌的发生、发展以及转移是一个相当复杂的过程。Smad3 基因、Smad7 基因作为 Smad 家族的重要成员,在胃癌组织中的异常表达使得 TGF- β 超家族信号通路的正常传递中断。Smad3 蛋白的表达减少,从而在某种程度上失去了 TGF- β 抑制肿瘤细胞增殖,诱导其凋亡的功能。Smad7 基因的过度表达,同时也使得 TGF- β 失去抑制生长的作用,二者的异常表达,都能促使 TGF- β 失去抑制肿瘤细胞增殖的生物学效应,有共同的作用。但是 Smad3 基因是 R-Smad,它属于 TGF- β 家族受体激酶作用的直接底物^[3]。Smad7 基因属于抑制型 Smad,通过干扰 R-Smad 磷酸化,影响 TGF- β 超家族信号通路的传导^[12]。二者在作用方式和机理上有着差异。

综上所述,通过对 Smad3 基因、Smad7 基因在

胃黏膜中表达的检测,以及对其二者的表达进行干预,可能为胃癌的预防和治疗,提供分子学水平的参考,这必将产生深远的意义。

参 考 文 献

- [1] Yang L.Incidence and mortality of gastric cancer in China[J].World J Gastroenterol,2006,12(1):17-20.
- [2] Pennison M,Pasche B.Targeting transforming growth factor- β signaling[J].Curr Opin Oncol,2007,19(6):579-585.
- [3] Attisano L,Wrana JL.Signal transduction by the TGF- β superfamily[J].Science,2002,296(5573):1646-1647.
- [4] 刘贵鹏,张淑兰,舒红,等.TGF- β 1 及 T β R II 在子宫内膜癌组织中的表达及其临床意义[J].肿瘤防治杂志,2005,12(13):989-993.
- [5] Baughn LB,Di Liberto M,Niesvizky R,et al.CDK2 phosphorylation of Smad2 disrupts TGF- β transcriptional regulation in resistant primary bone marrow myeloma cells[J].J Immunol,2009,182(4):1810-1817.
- [6] Macleod K.Tumor suppressor genes[J].Curr Opin Genet Dev,2000,10(1):81-93.
- [7] 王东娇,刘贵鹏,张莹,等.子宫内膜癌组织 Smad2/3 和 Smad7 表达及其临床意义的探讨[J].中华肿瘤防治杂志,2011,18(6):439-442.
- [8] 康凯夫,石祥呈,陈小伍,等.肝癌组织中 PTT G 与 TGF- β 1 及受体的表达及其临床意义[J].中华肿瘤防治杂志,2007,14(16):1223-1225.
- [9] Nakahata S,Yamazaki S,Nakauchi H,et al.Downregulation of ZEB1 and overexpression of Smad7 contribute to resistance to TGF β 1-mediated growth suppression in adult T-cell leukemia/lymphoma[J].Oncogene,2010,29(29):4157-4169.
- [10] Matsuo SE,Fiore AP,Siguematu SM,et al.Expression of SMAD proteins,TGF- β /activin signaling mediators,in human thyroid tissues[J].Arq Bras Endocrinol Metabol,2010,54(4):406-412.
- [11] Halder SK,Rachakonda G,Deane NG,et al.Smad7 induces hepatic metastasis in colorectal cancer[J].Br J Cancer,2008,99(6):957-965.
- [12] Yang G,Yang X.Smad4-mediated TGF- β signaling in tumorigenesis[J].Int J Biol Sci,2010,6(1):1-8.

(责任编辑:关蕴良)