

ITF2 的表达水平与胃癌转移相关

徐佳慧^{1,2}, 胡世莲^{1,2}, 沈国栋^{1,2}, 翁海燕³, 徐婷娟^{1,2}, 沈干^{1,2}

摘要 目的 探讨免疫球蛋白转录因子 2 (ITF2) 在胃癌中的表达水平和临床意义。方法 收集 42 例胃腺癌和 20 例良性胃黏膜组织蜡块, 应用免疫组化 SP 法检测临床标本中 ITF2 的蛋白表达水平, 并分析其表达量与患者临床病理各参数之间的关系。另以胃腺癌细胞 HSC44-PE 与 44As3 以及人胃黏膜上皮细胞系 GES-1 为研究对象, 使用 Western blot 法检测细胞中 ITF2 表达水平, 划痕实验方法检测 HSC44-PE 与 44As3 细胞的转移能力。结果 恶性组织中 ITF2 蛋白表达强度明显高于良性组织, 两者间差异有统计学意义 ($Z = -2.401, P < 0.05$); 伴随有淋巴结转移的胃癌组织中 ITF2 表达量明显高于无转移病例, 且随着肿瘤浸润深度、TMN 分期的升高而升高 ($P < 0.05$); 但与年龄、性别和肿瘤分化程度差异均无统计学意义; ITF2 表达量高的胃癌细胞 44As3 转移潜能明显高于转移潜能较低的胃癌细胞 HSC44-PE 和正常胃上皮细胞 GES-1 ($P < 0.05$)。结论 ITF2 在胃癌组织中呈高表达, 尤其与肿瘤转移潜能相关, 提示该蛋白可能参与胃癌的发生和发展, 并可能成为胃癌进展的监测指标。

关键词 胃癌; ITF2; 表达; 转移

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)02-0284-05

胃癌是源自胃黏膜上皮的恶性肿瘤, 是五大最常见癌症之一, 胃癌在我国发病率很高, 其致死率占恶性肿瘤的第二位, 仅次于肺癌^[1]。肿瘤的转移和复发往往是导致预后不良的重要因素, 其发生分子机制十分复杂, 通常涉及多基因、多阶段、多因素参与。该过程常常伴随着癌性信号通路的激活与抑癌性通路的失活, 这往往是癌症发生发展过程中两个重要的分子机制。研究^[2-4]证明异常活化的 Wnt/ β -catenin 信号通路涉及胃癌等多种实体肿瘤的发

生和转移。免疫球蛋白转录因子 2 (immunoglobulin transcription factor 2, ITF2) 是碱性螺旋-环-螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH) 结构蛋白家族的转录因子之一, 其功能主要参与早期发育过程中的中枢神经系统形成以及成年期的淋巴细胞、肌肉和胃肠道等系统的发育^[5-6]。近年来有研究^[7]表明 ITF2 是癌性通路 Wnt 信号通路下游的靶基因。该研究旨在探讨 ITF2 在胃癌的发生发展以及在转移中所发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 组织 收集安徽医科大学附属省立医院 2009 年 1 月~2014 年 12 月病理科存档的胃癌(腺癌)大标本蜡块 42 例, 其中男 31 例, 女 11 例, 年龄 29~81 岁, 中位年龄 64.5 岁。按照 2010 年日本胃癌学会 (JGCA) 的 TNM 分期标准, 其中 I 期 + II 期 18 例, III 期 + IV 期 24 例; 肿瘤浸润局限于黏膜下层 (T1 + T2) 15 例, 浸润至肌层以及浆膜层 (T3 + T4) 27 例; 高/中分化 23 例, 低分化 19 例; 有淋巴结转移 22 例, 无淋巴结转移 20 例。另取胃部分切除吻合口正常组织和慢性浅表性胃炎组织共 20 例作为良性对照。所有组织标本经两位副主任以上医师核实, 组织临床病理数据齐全。

1.2 设备和试剂 电烘箱(上海三发科学仪器公司); Olympus IX71 倒置显微镜(日本 Olympus 公司); 离心机(德国 Eppendorf 公司); 化学发光成像仪成像和 Chemi Analysis 分析软件(上海 ChemiScope 公司); 枸橼酸、PBS 粉剂(武汉博士德生物公司); 兔抗人 ITF2 多克隆抗体(英国 Abcam 公司); 小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体、HRP 标记的山羊抗小鼠/兔 IgG(美国 Cell Signaling Technology 公司); 山羊血清、PV6000 通用型二步法检测试剂盒和二氨基联苯胺(DAB)显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司); RIPA(弱)裂解液、loading buffer(上海碧云天生物技术有限公司); 蛋白酶抑制剂和蛋白磷酸酶抑制剂(瑞士 Roche 公司); BCA 蛋白试剂盒、Western blot 显影液(美国 Thermo scientific 公司); 人胃黏膜上皮细胞系 GES-1 购自上海细胞库; 人胃

2015-11-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81071808); 安徽省自然科学基金项目(编号: 1408085MH167); 安徽省科技攻关项目(编号: 1301042094)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院¹老年病科、²肿瘤免疫与营养治疗安徽省重点实验室、³病理科, 合肥 230001

作者简介: 徐佳慧, 女, 硕士研究生;

沈干, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: shengamustc@163.com

腺癌细胞株 44As3 及 HSC44-PE 由日本名古屋大学武井佳史教授赠送; DMEM 和 RPMI1640 培养基(美国 HyClone 公司); 5% BSA 由 1.5 g 脱脂奶粉和 30 ml TBST 配制。

1.3 免疫组化及评分标准 将由甲醛固定、石蜡包埋后的切片行 2 μm 连续切片, 经免疫组化 SP 法: 在电烘箱内以 60 $^{\circ}\text{C}$ 的条件烘烤 10 ~ 20 min 后, 放入二甲苯中脱蜡以及梯度酒精中脱水, 在枸橼酸 (pH7.2) 溶液中通过高温高压的方式进行抗原修复, 自然冷却至室温, 经 3% 的过氧化氢溶液清除内源性氧化酶, 用山羊血清室温封闭 30 min, 弃去, 加入 ITF2 抗体工作液 (1 : 150) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 次日经 PBS (pH7.2) 洗净后, 二抗孵育 1 h, DAB 染色剂, 染色时间控制在 6 min 以内, 清水终止, 放入苏木精中复染, 最后进行梯度酒精二甲苯脱水透明化, 进行封片, 并在显微镜下评分。同时每一位患者的石蜡切片均通过 HE 染色, 由病理科医师重新鉴别组织类型。结果判断: ITF2 蛋白以细胞染色呈淡黄色至棕褐色颗粒为阳性, 免疫组化评分根据阳性细胞百分比和染色强度综合评分。① 阳性细胞比例评分标准: 染色比例 < 5% 为 0 分; 5% ~ 25% 为 1 分; 25% ~ 50% 为 2 分; 50% ~ 75% 为 3 分, $\geq 75\%$ 为 4 分; ② 染色强度评分标准: 无染色为 0 分; 淡黄色为 1 分; 明显的黄棕色为 2 分; 强棕褐为 3 分。镜下 ($\times 400$) 随机选取 5 个视野, 以 5 个视野阳性细胞比例与染色强度评分的乘积最后的平均值为最后得分。以最后分值 ≥ 2 视为阳性, 其中 2 ~ 4 分为弱阳性, ≥ 4 为强阳性。

1.4 细胞培养 GES-1 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 中培养, 人胃癌细胞株 44As3 及 HSC44-PE 使用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基。以上细胞均在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内培养。

1.5 Western blot 以及数据分析 待细胞贴壁并长至 70% ~ 80% 满度, 经预冷的 PBS 清洗后, 加入裂解液 RIPA (弱)、蛋白酶抑制剂和蛋白磷酸酶抑制剂混合物置于冰上反应 30 min; 经 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的离心机, 15 000 r/min 离心 10 min, 取上清液细胞总蛋白, 通过 BCA 试剂盒测定蛋白浓度; 加入 loading buffer, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 10 min, 高温变性后用于 SDS-PAGE 电泳。电转后的 PVDF 膜用 5% BSA 室温封闭 1 h, 加入小鼠抗人 β -actin 工作液 (1 : 1 000) 或兔抗人 ITF2 多克隆抗体工作液 (1 : 500) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日, 充分洗膜后加入 HRP 标记的山羊抗小鼠/兔 IgG 工作液 (1 : 1 000) 室温孵育 1 h。以上抗体均

使用 5% BSA 封闭剂稀释。滴加免疫印迹显影液, 使用化学发光成像仪成像并用 Chemi Analysis 分析软件对蛋白电泳条带灰度值进行定量分析。蛋白相对定量 = 目的蛋白灰度值 / 同标本 β -actin 内参灰度值。

1.6 细胞划痕 将胃癌细胞 44As3 和 HSC44-PE 接种到 6 孔板中, 待细胞贴壁并长至 80% 满度, 用 200 μl 枪头尖端划出痕迹, 同时保证轨道宽度保持一致, 用无菌 PBS 清洗 3 遍, 以清除脱落细胞, 重新加入新鲜无血清培养基, 分别于 0、14 h 在显微镜下进行拍照, 观察划痕愈合情况并测量。

1.7 统计学处理 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析, Western blot 蛋白相对定量值和划痕实验迁移运动面积采用独立样本 t 检验, 胃癌中 ITF2 蛋白免疫组化评分结果在良性组织和恶性组织表达差异采用 Mann-Whitney U 检验, ITF2 表达阳性率与胃癌患者临床病理特征的关系通过 χ^2 检验。

2 结果

2.1 ITF2 在良性组织与恶性组织中表达水平 ITF2 大部分表达于细胞质, 一部分表达于淋巴细胞、结缔组织。20 例良性组织中有 8 例阳性, 其中有 5 例呈弱阳性, 3 例呈强阳性。42 例恶性组织中有 30 例表达阳性, 其中 23 例呈弱阳性, 7 例呈强阳性。良性组织与恶性组织之间的表达差异有统计学意义 ($Z = -2.401$, $P < 0.05$)。见图 1。

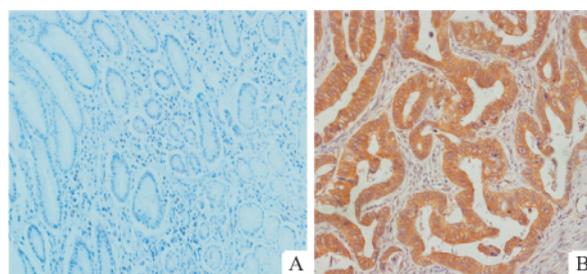


图1 良性组织与恶性组织中 ITF2 的表达情况 SP $\times 200$
A: 良性组织中; B: 恶性组织

2.2 ITF2 蛋白的表达水平与胃癌生物学特征之间的关系 本实验结果表明, ITF2 在有淋巴结转移的肿瘤中表达阳性率比无淋巴结转移病例更高, 并随着 TNM 分期、肿瘤浸润深度的增加而增加, I + II 期和 III + IV 期、T1 + T2 和 T3 + T4 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), ITF2 的表达与胃癌患者年龄、性别、分化差异均无统计学意义。见表 1。

2.3 ITF2 表达水平与肿瘤细胞转移相关 为了探

表1 ITF2在胃癌的表达与临床各病理参数之间的关系

项目	n	ITF2 表达水平(n)		χ ² 值	P 值
		阴性	阳性		
分化程度					
高/中分化	23	8	15	0.961	0.327
低分化	19	4	15		
浸润深度					
T1 + T2	15	8	7	7.010	0.008
T3 + T4	27	4	23		
淋巴结转移					
有	25	4	21	4.783	0.029
无	17	8	9		
TNM 分期					
I + II	18	8	10	3.889	0.049
III + IV	24	4	20		
性别					
男	31	10	21	0.788	0.375
女	11	2	9		
年龄(岁)					
>60	26	9	17	1.222	0.269
≤60	16	3	13		

讨 ITF2 在胃癌细胞中的表达情况,通过 Western blot 检测 GES-1、44As3 和 HSC44-PE 中的表达水平,显示 ITF2 在正常细胞中的表达量明显低于胃癌细胞($P < 0.05$),胃癌细胞 44As3 明显高于 HSC44-PE($P < 0.05$),见图 2。

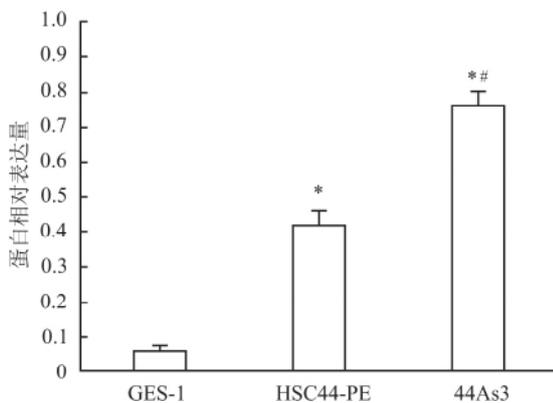
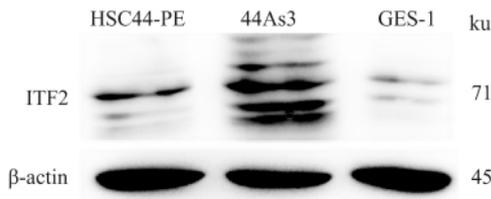


图2 Western blot 检测 ITF2 在 GES-1、44As3 和 HSC44-PE 细胞中的表达量

与 GES-1 比较: * $P < 0.05$; 与 HSC44-PE 比较: # $P < 0.05$

2.4 44As3 转移潜能高于 HSC44-PE Western blot 结果显示 44As3 中 ITF2 的表达量高于 HSC44-

PE。为了探讨 ITF2 对细胞运动性的影响,通过细胞划痕实验检测该两种细胞的转移能力,44As3 转移能力明显高于 HSC44-PE,差异有统计学意义($t = -25.142, P < 0.05$),见图 3。

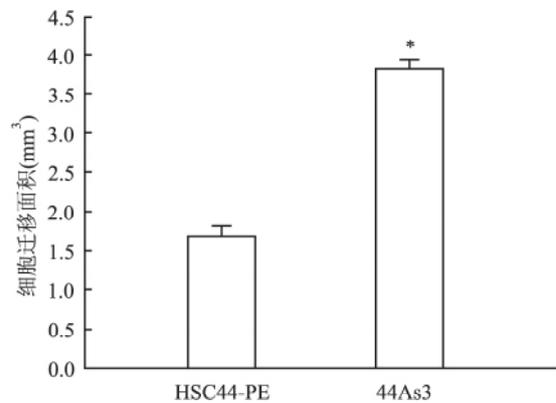
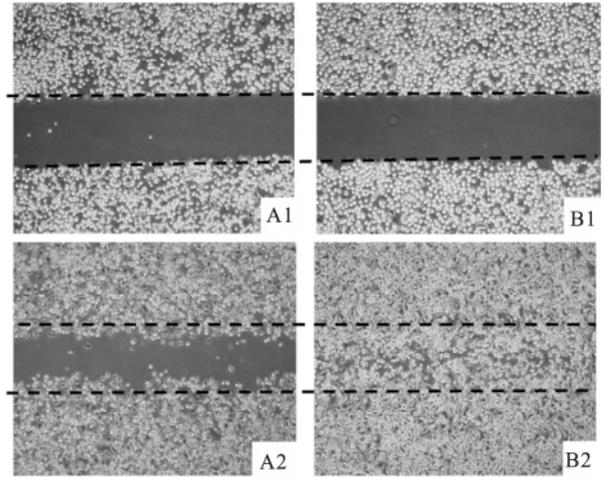


图3 划痕实验检测 44As3 与 HSC44-PE 的转移性 ×100 A: HSC44-PE; B: 44As3; 1: 0 h; 2: 14 h; 与 HSC44-PE 比较: * $P < 0.05$

3 讨论

由于胃癌早期临床症状特异性低和无有效的监测指标,近半数患者在确诊时多已处于进展期,往往发生局部或远处转移,从而失去了最佳治疗时期。因此,胃癌的病程是影响预后最重要的因素之一,目前胃癌转移进展的分子机制尚未完全阐明。值得关注的是,与人体细胞生命活动息息相关的细胞信号通路调节过程一旦出现偏差,往往导致疾病的发生发展。

Wnt 信号通路是调控胚胎发育和机体器官发育的重要信号通路,其在细胞增殖、分化等方面发挥作用。研究^[8-9]显示 Wnt 信号通路在多种肿瘤中呈异常激活状态,伴随着大量 β-catenin/TCF4 转录复合物的形成,激活下游与癌症相关的靶基因,从而可能

促进肿瘤转移。ITF2 是 bHLH 蛋白结构家族的转录因子,主要参与胚胎中枢神经系统、体节和性腺嵴的形成,并且可能参与淋巴细胞、胃肠道、甲状腺和肾脏等发育^[5-6]。在此之前 ITF2 基因的异常主要导致精神分裂等中枢神经疾病^[10]。近年来,科学家开始探讨 ITF2 在癌症中发挥的作用,发现该基因是 Wnt 信号通路的下游靶基因,并且可能参与了肿瘤的发生发展^[7,11]。Vincent et al^[12] 在肺癌骨转移模型细胞中发现 ITF2 呈高表达,并且在后期的研究中发现其能够赋予亲代细胞骨转移能力,再一次确认了其在促进肿瘤转移中的可能性。

为了探索 ITF2 在胃癌发生发展中的作用,本实验首先通过免疫组化检测其在 42 例胃恶性组织与 20 例良性组织的表达情况,并分析了其表达量与临床病理参数之间的关系,结果提示恶性组织中 ITF2 蛋白表达阳性程度明显高于良性组织,二者差异有统计学意义,其表达水平与肿瘤浸润程度、淋巴结转移、以及肿瘤 TMN 分期有关、与年龄、性别、分化因素之间无显著相关。采用 Western blot 检测 ITF2 在胃癌细胞 44As3、HSC44-PE 和 GES-1 中的表达水平,发现该蛋白在胃癌细胞中的表达水平明显高于正常细胞,且在 44As3 高于 HSC44-PE。同时通过细胞划痕实验检测胃癌细胞株 44As3、HSC44-PE 的转移能力,结果提示前者的转移能力明显高于后者,这与免疫组化结果一致。综上所述,ITF2 在胃癌中大多呈阳性表达,其表达水平与胃癌的转移能力有关,提示其可能成为一种用于胃癌预后评估的分子标志物。

参考文献

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin* 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Ravindranath A, Yuen H F, Chan K K, et al. Wnt- β -catenin-Tcf-4 signalling-modulated invasiveness is dependent on osteopontin expression in breast cancer[J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(4): 542-51.
- [3] 韩竟春, 赵燕林, 李川, 等. Wnt 信号通路在非小细胞肺癌组织中的活化[J]. *临床军医杂志* 2012, 40(2): 373-5.
- [4] Bleckmann A, Siam L, Klemm F, et al. Nuclear LEF1/TCF4 correlate with poor prognosis but not with nuclear β -catenin in cerebral metastasis of lung adenocarcinomas[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2013, 30(4): 471-82.
- [5] de Pontual L, Mathieu Y, Golzio C, et al. Mutational, functional, and expression studies of the TCF4 gene in Pitt-Hopkins syndrome[J]. *Hum Mutat*, 2009, 30(4): 669-76.
- [6] Pscherer A, Dörflinger U, Kirfel J, et al. The helix-loop-helix transcription factor SEF-2 regulates the activity of a novel initiator element in the promoter of the human somatostatin receptor II gene[J]. *EMBO J*, 1996, 15(23): 6680-90.
- [7] Kolligs F T, Nieman M T, Winer I, et al. ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in human cancers with beta-catenin defects and promotes neoplastic transformation[J]. *Cancer Cell*, 2002, 1(2): 145-55.
- [8] Johnson R W, Merkel A R, Page J M, et al. Wnt signaling induces gene expression of factors associated with bone destruction in lung and breast cancer[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2014, 31(8): 945-59.
- [9] Yu J, Virshup D M. Updating the Wnt pathways[J]. *Biosci Rep*, 2014, 34(5).
- [10] Forrest M P, Hill M J, Quantock A J, et al. The emerging roles of TCF4 in disease and development[J]. *Trends Mol Med*, 2014, 20(6): 322-31.
- [11] Appaiah H, Bhat-Nakshatri P, Mehta R, et al. ITF2 is a target of CXCR4 in MDA-MB-231 breast cancer cells and is associated with reduced survival in estrogen receptor-negative breast cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(6): 600-14.
- [12] Vincent S, Luis-Ravelo D, Antón I, et al. A novel lung cancer signature mediates metastatic bone colonization by a dual mechanism[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(7): 2275-85.

Levels of ITF2 in gastric cancer and functionally associated with metastasis

Xu Jiahui^{1,2}, Hu Shilian^{1,2}, Shen Guodong^{1,2}, et al

(¹Dept of Geriatrics, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University,

²Anhui Provincial Key Laboratory of Tumor Immunotherapy and Nutrition Therapy, Hefei 230001)

Abstract Objective To explore the levels and clinical significance of immunoglobulin transcription factor 2 (ITF2) in gastric cancer. **Methods** Expression of ITF2 in 42 malignant tumor samples and 20 benign tissues was detected by immunohistochemistry, and the association of ITF2 with clinicopathological characteristics was statistically analyzed. The role of ITF2 in cancer cells 44As3, HSC44-PE and human gastric epithelial cell line GES-1

广西少数民族地区农村老年人生命质量调查

康敏^{1*}, 黄照权^{2*}, 石武祥², 杨平¹, 刘建英³, 高东⁴, 麦浩⁵, 郭振友²

摘要 目的 对广西壮、瑶、苗、侗、仫佬、毛南、回、京族等 8 个少数民族地区农村老年人和汉族农村老年人生命质量状况进行评估,旨在为提高广西少数民族地区农村老年人的生命质量提供依据。方法 采用分层和整群抽样的多阶段抽样方法获取调查对象,应用《居民家庭情况调查表》、《老年人个人基本情况调查表》和《欧洲生命质量测定量表》进行横断面入户调查。结果 广西少数民族地区农村老年人 EQ-VAS 平均得分为(69.82 ± 10.63)分, EQ-5D 指数评分为(0.784 ± 0.153)。老年人对其自我照顾能力评价相对较高,满意率为 93.1%;而对疼痛或不适的评价较差,满意率为 30.1%。其中,壮族老年人 EQ-5D 健康指数得分最高,回族老年人 EQ-5D 健康指数得分最低。结论 广西不同民族地区农村老年人生命质量状况不同,不同民族有不同生命质量;其健康相关生命质量应引起社会关注。

关键词 生命质量;农村老年人;少数民族;广西壮族自治区中图分类号 R 195.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)02-0288-05

2015-11-23 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81260446);2012 年度教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(编号:KY2013078);2011 年度教育部人文社会科学研究项目青年基金(编号:11YJCZH048)

作者单位:¹ 桂林医学院基础医学院 桂林 541004

² 桂林医学院人文与管理学院 桂林 541004

³ 桂林医学院工会 桂林 541004

⁴ 桂林医学院招生就业处 桂林 541004

⁵ 桂林市疾病预防控制中心 桂林 541001

作者简介:康敏,女,硕士研究生;

石武祥,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: swx_56@126.com

* 对本文具有同等贡献

2010 年第六次全国人口普查结果显示,60 岁及其以上人口占全国总人数的 13.26%,我国老龄化进程逐步加快^[1]。随着农村人口的老龄化加剧,农村老年人口的健康问题也日益受到关注^[2]。伴随着社会经济的发展,人民生活水平的进步,对健康的要求也逐渐提高,如今生命质量已成为国内外衡量健康的一个重要指标^[3]。我国是多民族统一国家,少数民族分布于我国 60% 的国土,但关于少数民族农村老年人生命质量的研究较少。鉴于此,该研究选取了广西壮、瑶、苗、侗、京、回、仫佬、毛南等 8 个少数民族农村地区 60 岁以上老年人作为研究对象,评估他们的生命质量状况,旨在为进一步研究关于少数民族农村老年人的生命质量奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象 纳入居住在少数民族典型聚居地 3 年以上、年满 60 岁,愿意参加调查者;排除智力障碍、语言表达能力差及居住时间未滿 3 年者。

1.2 抽样方法 调查采用分层和整群抽样的多阶段抽样方法。第一阶段按照政府定义的壮、瑶、苗、侗、京、回、仫佬、毛南等 8 个少数民族典型聚居地分层,每层选取 1 个样本县。第二阶段在每个样本县按少数民族典型居住乡镇和随机化原则抽取 3 个乡镇,典型居住乡镇定义为该乡镇某少数民族人口 ≥ 60%。第三阶段在每个样本乡镇按少数民族典型自然村抽取 6 个自然村,典型居住自然村定义为该自然村某少数民族人口 ≥ 90%。第四阶段每个自然村符合条件的个人和家庭全部调查。对照组按照经济

was tested by Western blot, the motility of cancer cells was determined by wound healing assay. **Results** ITF2 was overexpressed in the malignant tissues than benign tissues ($Z = -2.337, P < 0.05$); statistical analysis of association of ITF2 expression with clinicopathological characteristics revealed that expression of ITF2 was associated with TNM stage, lymph node metastasis and invasion ($P < 0.05$); expression of ITF2 was not statistically different with age, sex and differentiation degree; expression of ITF2 in 44As3 was higher than the HSC44-PE and GES-1 ($P < 0.05$), while the metastasis potential was positively correlated with ITF2 expression ($P < 0.05$). **Conclusion** ITF2 in gastric cancer shows high expression, especially with metastasis potential, suggesting that this protein may be involved in the occurrence and development of gastric cancer, could be an indicator for monitoring progression.

Key words gastric cancer; ITF2; expression; metastasis