

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)20-1868-04

## Caveolin-1 基因 mRNA 和蛋白在胃癌组织的表达

刘斌, 杨育生, 邢传平, 高自芳, 顾立萍, 钱震, 董亮, 苏勤军 (兰州军区兰州总医院病理科, 甘肃 兰州 730050)

### Expression of Caveolin-1 gene mRNA and protein in gastric carcinoma

LIU Bin, YANG Yu-Sheng, XING Chuan-Ping, GAO Zi-Fang, GU Li-Ping, QIAN Zhen, DONG Liang, SU Qin-Jun

Department of Pathology, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Military Area Command, Lanzhou 730050, China

**【Abstract】** AIM: To investigate the expression of Caveolin-1 mRNA and protein in different lesions of gastric tissues and to analyze the correlations among mRNA, protein expression and clinical parameters. **METHODS:** SP immunohistochemical method and *in situ* hybridization (ISH) method were respectively used to detect the expression of Caveolin-1 protein and mRNA in 25 normal gastric tissues, 65 gastric atypical hyperplasia cases and 71 gastric carcinoma cases. The 21 bp oligonucleotide probe of Caveolin-1 gene sequence was designed and synthesized according to GenBank (NC-000007). **RESULTS:** The positive expressions of Caveolin-1 mRNA and protein in normal gastric tissues, gastric atypical hyperplasia and gastric carcinomas were gradually decreased and the positive rates were 92.0%, 83.1%, 38.2% and 88.0%, 83.1%, 28.2%, respectively. The expression of Caveolin-1 mRNA and protein was correlated with the malignant progression of gastric carcinoma, lymph nodes metastasis and vessel invasion ( $P < 0.05$ ), but not correlated with patients' age and gender ( $P > 0.05$ ). In addition, the expression of Caveolin-1 mRNA was positively related to the protein expression ( $r_s = 0.967, P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** The positive rates of Caveolin-1 mRNA and protein in normal gastric tissues, gastric atypical hyperplasia and gastric carcinomas are gradually decreased. The consistency of Caveolin-1 mRNA and protein expression in different lesions shows that the suppressed expression of Caveolin-1 gene in carcinoma tissues takes place at the transcription level or above.

**【Keywords】** stomach neoplasms; Caveolin-1 gene; immunohistochemistry; *in situ* hybridization

收稿日期 2007-03-09; 接受日期 2007-05-16

基金项目 全军医药卫生科技基金(06MB102); 甘肃省自然科学基金(3ZS061-A25-094)

作者简介: 刘斌, 博士, 教授, 主任医师. Tel: (0931) 8975406

Email: liumb@public.lz.gs.cn

**【摘要】**目的: 通过研究 Caveolin-1 mRNA 及蛋白在胃不同病变组织中的表达, 对 mRNA 及蛋白表达的相关性及与胃癌临床病理参数间的关系进行分析. 方法: 25 例正常胃黏膜、65 例不典型增生胃黏膜及 71 例胃癌组织, 采用免疫组化 SP 法检测蛋白的表达情况, 依据 GenBank 中 Caveolin-1 基因序列 (NC-000007), 设计并合成全长 21 bp 的寡核苷酸探针, 运用原位杂交技术对 Caveolin-1 mRNA 的表达进行检测. 结果: Caveolin-1 mRNA 和蛋白在正常胃黏膜、不典型增生胃黏膜及胃癌细胞浆中的阳性表达率呈递减趋势, 阳性率分别为: 92.0%, 83.1%, 38.2% 和 88.0%, 83.1%, 28.2%. Caveolin-1 mRNA 和蛋白表达在不同浸润深度、有无淋巴结转移组、有无脉管侵犯组内表达率的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 在年龄及性别组内表达率的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ). Caveolin-1 mRNA 和蛋白表达呈正相关 ( $r_s = 0.967, P < 0.05$ ). 结论: Caveolin-1 mRNA 和蛋白在正常胃黏膜、不典型增生胃黏膜、胃癌中阳性表达率均逐渐降低, 两者在不同病变组织中表达的一致性提示该基因在癌组织中的低表达发生于转录或以上水平的抑制.

**【关键词】** 胃肿瘤; Caveolin-1 基因; 免疫组织化学; 原位杂交  
**【中图分类号】** R735.2 **【文献标识码】** A

### 0 引言

肿瘤发生过程中原癌基因和抑癌基因之间的关系以及抑癌基因的失活是导致肿瘤发生最重要的分子生物学基础. 抑癌基因具有潜在抑癌作用(抑制细胞生长), 在癌旁相应的正常组织中正常表达, 但在癌组织中往往表现为 mRNA 表达下降及蛋白产物缺失, 导致肿瘤的发生<sup>[1]</sup>. Caveolin-1 是一种候选抑癌基因, 在结肠癌、卵巢癌、肺癌等肿瘤组织中低表达<sup>[2-3]</sup>, 而在前列腺癌、膀胱癌、食管癌、乳腺癌、胰腺癌中高表达<sup>[4-6]</sup>. 本研究采用免疫组织化学 SP 法和原位杂交以及胃癌组织芯片技术观察正常黏膜、不典型增生胃黏膜及胃癌组织中 Caveolin-1 mRNA 及蛋白表达在不同病变胃组织中的表达定位, 对 mRNA 及蛋白表达的相关性以及胃癌临床病理参数间的关系进行分析, 从而探讨 Caveolin-1 基因的功能, 研究 Caveolin-1 在胃癌发生、发展、浸润转移中的作用, 以期胃癌的临床诊断及预后提供一种新的生物学指标.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 65例不典型增生胃黏膜及71例胃癌组织均来自兰州军区总医院2004-08/2005-07病理科手术及存档石蜡包埋标本。胃癌组包括男性49例,女性22例,年龄30~84(中位年龄61)岁。所有标本术前均未行放疗和化疗,胃癌组织包括高分化腺癌21例,中分化24例,低分化26例;其中淋巴结转移阳性35例,有脉管侵犯者49例。同时取距离肿瘤组织>5cm的胃黏膜25例作为正常对照。所有标本均经40g/L甲醛固定,常规石蜡包埋4 $\mu$ m厚连续切片,分别行HE和免疫组化染色及原位杂交。

Caveolin-1抗体为鼠抗人单克隆抗体(稀释度为1:400)购于美国基因公司。原位杂交检测试剂盒(REMBRANT® Universal RISH & HRP Detection Kit)购于Pan-Path公司。Caveolin-1基因寡核苷酸探针,使用Oligo软件设计探针,由上海生工生物技术服务有限公司合成。Caveolin-1寡核苷酸探针序列为5'-CTCAG CCAAT AAAGC GATGG A-3',探针片段长度21bp,3'端标记地高辛。

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组化SP法染色** 石蜡切片,烤干后脱蜡至水,高温修复,30mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育10min,加入非免疫性动物血清孵育10min,加入一抗过夜,再加入二抗,DAB显色,苏木素复染,中性树胶封片。Caveolin-1阳性表达均位于细胞质内。

**1.2.2 原位杂交** 石蜡切片经常规脱蜡至水,30mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温放置10min以灭活内源性过氧化物酶,滴加3%盐酸新鲜稀释的胃蛋白酶,37℃消化15min,以暴露mRNA核酸片断,变性及杂交,过夜,加HRP化鼠抗地高辛,37℃孵育30min,DAB显色,苏木素复染,中性树胶封片。mRNA表达:胞质内着棕黄色为Caveolin-1 mRNA信号阳性。

**1.2.3 结果判定** 采用双盲法对每张切片在高倍镜( $\times 400$ )下计数10个视野,以染色强度分别计0~3分,无染色为0分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;再以阳性细胞所占百分比评分,阴性为0分,阳性细胞 $\leq 10\%$ 为1分,11%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分,两项得分相乘0分为“-”,1~2分为“+”,3~8分为“++”,9~12分为“+++”。基因扩增:细胞核内检测到阳性信号(正常细胞核内无阳性信号)即为基因扩增。

统计学处理:组间率的比较采用 $\chi^2$ 检验,测量指标间相关分析采用Spearman秩相关,使用SPSS10.0统计软件包进行统计学处理。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Caveolin-1 mRNA和蛋白在不同病变的胃组织中的表达** Caveolin-1 mRNA在正常胃黏膜、不典型增生胃黏膜及胃癌细胞胞质中的表达阳性表达率呈递减趋势(图1), $\chi^2$ 检验显示组间差异有统计学意义( $\chi^2 = 108.403, P < 0.05$ ),Caveolin-1 mRNA在部分癌细胞核中呈强阳性表达,蛋白阳性表达率在正常胃黏膜、不典型增生胃黏膜及胃癌各组间呈递减趋势( $\chi^2 = 36.328, P < 0.05$ ,图2)。另外,Caveolin-1 mRNA在胃黏膜不典型增生组和胃癌组间阳性率差异有统计学意义( $\chi^2 = 47.556, P < 0.01$ );胃黏膜不典型增生和高分化腺癌组间阳性率差异有统计学意义( $\chi^2 = 4.980, P < 0.05$ ,表1)。

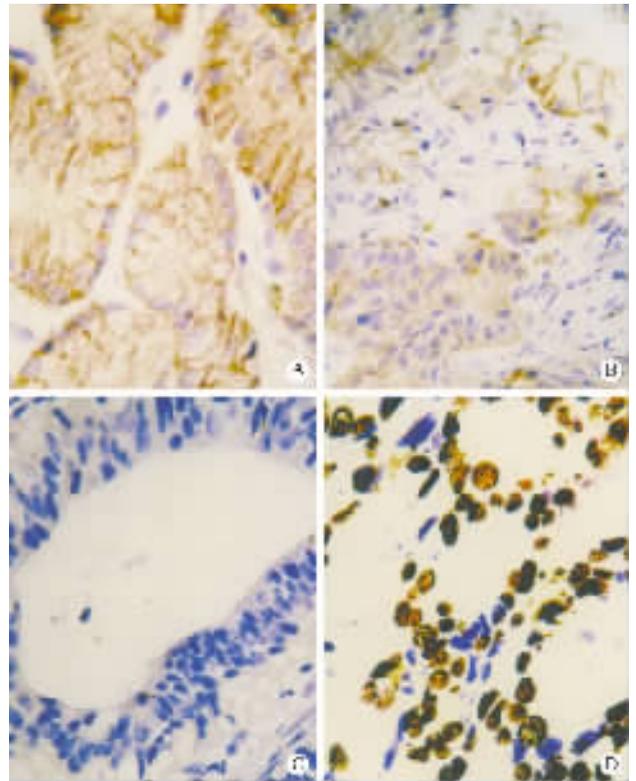
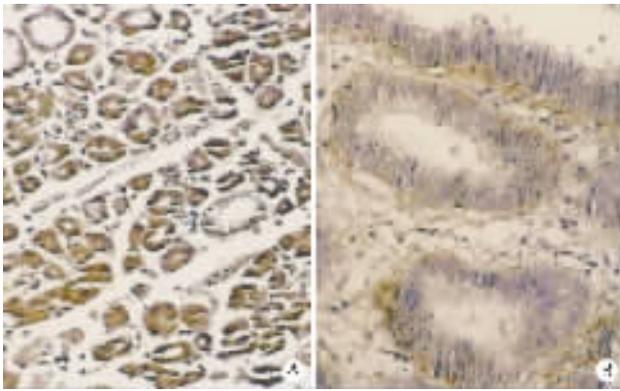


图1 Caveolin-1 mRNA表达  
A:胃黏膜腺上皮细胞强 ISH  $\times 400$  B:重度不典型增生胃黏膜上皮 ISH  $\times 200$  C:胃中分化腺癌 ISH  $\times 200$  D:胃低分化腺癌细胞胞浆、胞核 ISH  $\times 400$ 。

图1 Caveolin-1 mRNA表达

**2.2 Caveolin-1基因mRNA和蛋白在胃癌中的表达** Caveolin-1基因mRNA和蛋白表达在不同浸润深度、有无淋巴结转移组、有无脉管侵犯组内表达率的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),在年龄及性别组内表达率的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,表2)。Spearman等级相关分析显示Caveolin-1 mRNA和蛋白表达呈正相关( $r_s = 0.967, P < 0.05$ )。



A:胃黏膜腺上皮细胞呈强阳性表达 SP ×100 ;B:胃中分化腺癌细胞呈阴性表达 SP ×200.

图2 Caveolin-1 表达

表1 不同胃黏膜组织中 Caveolin-1 mRNA 和蛋白表达

[ n(%) ]

| 组别       | n  | Caveolin-1 蛋白         |    | Caveolin-1 mRNA       |    |
|----------|----|-----------------------|----|-----------------------|----|
|          |    | +                     | -  | +                     | -  |
| 正常胃黏膜    | 25 | 22(88.0)              | 3  | 23(92.0)              | 2  |
| 胃黏膜不典型增生 | 65 | 54(83.1)              | 11 | 55(83.1)              | 10 |
| 轻        | 20 | 19(95.0) <sup>b</sup> | 1  | 19(95.0) <sup>a</sup> | 1  |
| 中        | 21 | 19(90.5) <sup>a</sup> | 2  | 19(90.5) <sup>a</sup> | 2  |
| 重        | 24 | 16(66.7)              | 8  | 17(70.1)              | 7  |
| 胃腺癌      | 71 | 20(28.2)              | 51 | 27(38.2)              | 44 |
| 高分化      | 21 | 8(38.1) <sup>d</sup>  | 13 | 10(47.6) <sup>d</sup> | 11 |
| 中分化      | 24 | 7(29.2) <sup>c</sup>  | 17 | 9(37.5) <sup>c</sup>  | 15 |
| 低分化      | 26 | 5(19.2)               | 21 | 8(30.8)               | 18 |

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 重度不典型增生, <sup>c</sup>P<0.05, <sup>d</sup>P<0.01 vs 低分化腺癌.

2.3 胃癌组织中 Caveolin-1 基因扩增和细胞浆内 mRNA 表达的相关性 正常胃黏膜和不典型增生胃黏膜中细胞核内均未见 Caveolin-1 基因扩增,但部分胃癌组织中可见癌细胞核中有基因扩增,并且其表达趋势与 Caveolin-1 蛋白和胞浆内 mRNA 表达呈相反趋势(表3).

### 3 讨论

肿瘤组织中基因表达指从基因转录到产物最终发挥生物学功能的全过程,基因表达异常的最终表现是该基因生物学功能的丧失或增强,基因表达研究主要是检测所表达蛋白和基因转录产物 RNA,二者具有如下关系:①蛋白质表达正常,而功能丧失或异常,说明翻译后修饰阶段异常或是结构基因发生了突变;②蛋白质表达明显改变,需要进行基因转录产物

表2 胃癌组织中 Caveolin-1 mRNA 及蛋白表达与临床病理参数的关系 [ n(%) ]

| 临床病理指标 | n  | Caveolin-1 蛋白         |    | Caveolin-1 mRNA        |    |
|--------|----|-----------------------|----|------------------------|----|
|        |    | +                     | -  | +                      | -  |
| 年龄(岁)  |    |                       |    |                        |    |
| <45    | 31 | 7(22.6)               | 24 | 13(41.9)               | 18 |
| ≥45    | 40 | 10(25.0)              | 30 | 14(35.0)               | 26 |
| 性别     |    |                       |    |                        |    |
| 男      | 49 | 11(22.4)              | 38 | 15(30.6)               | 34 |
| 女      | 22 | 6(27.3)               | 16 | 12(54.5)               | 10 |
| 浸润深度   |    |                       |    |                        |    |
| 黏膜内    | 19 | 9(47.4) <sup>cf</sup> | 10 | 12(63.2) <sup>de</sup> | 7  |
| 肌层     | 24 | 6(25.0) <sup>e</sup>  | 18 | 8(33.3)                | 16 |
| 浆膜外    | 28 | 2(7.1)                | 26 | 7(25.0)                | 21 |
| 淋巴结转移  |    |                       |    |                        |    |
| -      | 35 | 14(40.0) <sup>a</sup> | 21 | 16(45.7) <sup>a</sup>  | 19 |
| +      | 36 | 3(8.3)                | 33 | 11(30.6)               | 25 |
| 脉管侵犯   |    |                       |    |                        |    |
| -      | 49 | 10(20.4) <sup>a</sup> | 39 | 20(40.8) <sup>a</sup>  | 29 |
| +      | 22 | 7(31.8)               | 15 | 7(31.8)                | 15 |

<sup>a</sup>P<0.05 vs +, <sup>c</sup>P<0.05, <sup>d</sup>P<0.01 vs 肌层, <sup>e</sup>P<0.05 vs 浆膜外.

表3 胃癌中 Caveolin-1 蛋白表达、基因扩增和胞浆内 mRNA 表达的相关性 [ n(%) ]

| 胃癌  | n  | 蛋白表达                 |    | 核内基因扩增  |    | 胞浆内 mRNA 表达           |    |
|-----|----|----------------------|----|---------|----|-----------------------|----|
|     |    | +                    | -  | +       | -  | +                     | -  |
| 高分化 | 21 | 7(33.3) <sup>a</sup> | 14 | 1(5.0)  | 20 | 10(47.6) <sup>a</sup> | 11 |
| 中分化 | 24 | 6(25.0)              | 18 | 2(8.0)  | 22 | 9(37.5)               | 15 |
| 低分化 | 26 | 4(15.4)              | 22 | 3(11.5) | 23 | 8(30.8)               | 18 |

<sup>a</sup>P<0.05 vs 低分化腺癌.

(RNA)水平的分析;③RNA降低,表明基因表达在转录水平受到抑制;④RNA正常而蛋白水平改变,表明蛋白质的翻译过程受到影响.目前,国内外关于肿瘤组织中 Caveolin-1 基因的研究还尚少,而且对于其在不同肿瘤组织中表达的研究结果并不一致<sup>[7-10]</sup>(甚至在同一种肿瘤组织中的表达结果也不尽相同),人们对于 Caveolin-1 基因的认识还有待于进一步加深.

本研究通过对正常胃黏膜、不典型增生胃黏膜及胃癌中 Caveolin-1 蛋白和 mRNA 表达率的统计分析,显示 Caveolin-1 在正常胃黏膜→不典型增生胃黏膜→胃癌中阳性表达率逐渐降低,且组间差异有统计学意义,在胃癌不同的浸润深度及有无淋巴结转移组内差异有统计学意义.胃癌组织中 Caveolin-1 蛋白表达明显降低,同时,胃癌组织中 mRNA 表达降低,上述

结果提示胃癌中 Caveolin-1 基因表达在转录水平受到抑制。由此我们确立胃癌中 Caveolin-1 基因表达降低的研究方向主要包括 DNA 点突变、染色体移位、大片段 DNA 缺失、基因扩增、碱基的异常修饰等。研究中还发现正常胃黏膜和不典型增生胃黏膜中细胞核内均未见阳性信号表达,说明了此类病变未出现核内异常基因扩增,但胃癌组织中可见细胞核阳性信号表达,并且其表达趋势与 Caveolin-1 蛋白和胞浆内 mRNA 表达呈相反趋势。从另外一个角度佐证了胃癌中 Caveolin-1 基因表达在转录水平受到抑制的观点。我们的研究结果与高雪等<sup>[3]</sup>在蛋白水平的研究结果基本一致即 Caveolin-1 在胃上皮细胞中的表达水平随着胃癌的发生和发展而呈进行性下调乃至缺失。而在 RNA 水平的研究结果存在差异:原位杂交结果显示, Caveolin-1 mRNA 在正常胃黏膜、不典型增生胃黏膜及胃癌细胞胞浆中的阳性表达率呈递减趋势,而高雪等<sup>[3]</sup>用 RT-PCR 方法显示,胃癌组织和相应非癌胃黏膜组织中 Caveolin-1 的表达无显著性差异。在重度不典型增生组和高分化腺癌组之间 Caveolin-1 基因表达的阳性率差异有统计学意义,提示在胃黏膜癌前病变向胃癌的转变过程中有可能存在着另外的调节因子或机制。

本研究中运用地高辛标记的寡聚核苷酸探针检测 Caveolin-1 基因 mRNA 表达,阳性率略高于其蛋白的表达。寡聚核苷酸探针检测技术具有敏感性高、背

景清晰等优点,但原位杂交技术实验条件要求高,费用昂贵,不宜推广。

## 【参考文献】

- [1] 查良德, 药立波. 医学分子生物学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 152-153.
- [2] Davidson B, Goldberg I, Givant-Horwitz V, et al. Caveolin-1 expression in ovarian carcinoma is MDR1 independent [J]. Am J Clin Pathol, 2002, 117(2): 225-234.
- [3] 高雪, 孙媛, 黄磊等. Caveolin-1 在胃癌组织中的表达及临床生物学意义 [J]. 癌症, 2005, 24(3): 311-316.
- [4] Kato K, Hida Y, Miyamoto M, et al. Overexpression of caveolin-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage [J]. Cancer, 2002, 94(4): 929-933.
- [5] Savage K, Lambros MB, Robertson D, et al. Caveolin 1 is overexpressed and amplified in a subset of basal-like and metaplastic breast carcinomas: a morphologic, ultrastructural, immunohistochemical, and in situ hybridization analysis [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(1): 90-101.
- [6] Suzuoki M, Miyamoto M, Kato K, et al. Impact of caveolin-1 expression on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Br J Cancer, 2002, 87(10): 1140-1144.
- [7] Bender FC, Raymond MA, Bron C, et al. Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity [J]. Cancer Res, 2000, 60(20): 5870-5878.
- [8] 汪翼, 罗红梅, 杨罗艳. Caveolin-1 的表达及膀胱癌与病理分级及临床分期的关系 [J]. 中国康复杂志, 2005, 7: 780-782.
- [9] Tahir SA, Ren C, Timme TL, et al. Development of an immunoassay for serum caveolin-1: a novel biomarker for prostate cancer [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(10 pt 1): 3653-3659.
- [10] Wiechen K, Sers C, Agoulnik A, et al. Down regulation of caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas [J]. Am J Pathol, 2001, 158: 833-839.

编辑 吴涛

· 经验交流 · 文章编号 1000-2796(2007)20-1871-01

## 耳鼻咽喉医源性异物 19 例临床分析

刘海楼

(延安大学附属医院耳鼻咽喉科, 陕西 延安 716000)

【关键词】耳鼻咽喉; 异物; 医源性

【中图分类号】R762 【文献标识码】B

1 临床资料 1995-07/2005-12 延安大学附属医院耳鼻咽喉科收治医源性异物患者 19(男 10, 女 9)例, 年龄 5~65 岁。其中鼻及鼻窦异物 9 例, 均为手术操作时遗留的棉片或纱条, 于 3~6 mo 后经前鼻孔取出。食管异物 2 例, 1 例原为鼻咽腔异物(玩具金属小飞机), 在采取坐位经口腔取出时不慎被软腭挂脱, 嵌入食管第二狭窄处, 后经胸外科手术取出; 1 例发生于局麻下扁桃体切除术中, 切除的扁桃体嵌入食管入口, 次日在硬管食管镜下取出。纵隔异物 2 例, 均为局麻下行食管异物取出术时并发食管穿孔, 其中 1 例为假牙, 穿孔后出血较多, 术者慌乱中夹持棉球压迫止血, 经穿孔进入纵隔后滑脱, 后经胸外科手术取出; 另 1 例为枣核, 手术失败, 行食管造影

时钡剂进入纵隔, 未行取出。气管异物 2 例, 均发生于气管切开术后戴金属气管套者。其中 1 例为喉乳头状瘤患儿, 术后 1 a 气管外套管自底板处断裂掉入气管内; 另 1 例为甲状腺癌患者, 术后 2 a 外套管末端被蚀, 断入气管内。2 例异物均行硬管气管镜检查, 经气管造瘘口取出。耳异物 2 例, 均为慢性中耳炎术后术腔换药时遗留棉絮, 均在耳内窥镜下取出。鼻咽腔异物 1 例, 为鼻腔金属异物(子弹头), 在用镊子钳出时嵌入鼻咽腔, 于仰卧低头低位经口腔取出。颈部异物 1 例发生于一脑出血昏迷患者, 气管切开后继发出血, 缝扎止血时缝针折断未能找到断端, 因病情危重征得家属同意后未取出。

2 讨论 本组医源性异物发生原因均为医务人员操作不当或责任心不强所致, 因此, 应引起医务人员的高度重视。朱才新等<sup>[1]</sup>也曾报道 1 例。我们认为, 避免和减少医源性异物发生应做到①熟练掌握耳鼻咽喉解剖特点, 熟悉其临床特征; ②规范医疗操作, 低年资医师应在上级医师指导下进行手术或操作; ③在诊疗过程中, 应仔细检查和操作, 增强责任心; ④医源性异物一旦发现, 应立即向上级医师请示报告, 及时治疗, 避免造成不良后果; ⑤在和患者及家属沟通过程中, 应注意态度诚恳, 讲究技巧, 不能推卸责任, 争取获得理解。

## 【参考文献】

- [1] 朱才新, 陈福虎, 高自强等. 医源性鼻腔异物 1 例 [J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2004, 18(5): 287-287.

编辑 杨湘华

收稿日期 2007-07-16; 接受日期 2007-08-30

作者简介 刘海楼, 学士, 副主任医师. Tel: (0911) 2881187 Email:

liuhailou66@163.com