

# 胃癌候选抑癌基因 Syk 表达的意义

夏建国, 丁永斌, 陈国玉

夏建国, 丁永斌, 陈国玉, 南京医科大学第一附属医院普外科 江苏省南京市 210029

夏建国, 男, 1961-06 生, 2003 年南京医科大学博士, 教授, 主任医师, 研究方向: 胃肠疾病。

江苏省高校自然科学基金资助, No. 03KJD320138

项目负责人: 夏建国, 江苏省南京市广州路 300 号, 南京医科大学第一附属医院普外科. njdyb@sina.com

电话: 025-86563750

收稿日期: 2003-06-27 接受日期: 2003-08-16

## Expression of tyrosine kinase Syk and its clinical significance in gastric carcinoma

Jian-Guo Xia, Yong-Bin Ding, Guo-Yu Chen

Jian-Guo Xia, Yong-Bin Ding, Guo-Yu Chen, Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by the Science Fund of Department of Education of Jiangsu Province, No. B (03KJD320138)

Correspondence to: Jian-Guo Xia, Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. njdyb@sina.com

Received: 2003-06-27 Accepted: 2003-08-16

### Abstract

**AIM:** To evaluate the effects of the Syk mRNA expression in human gastric carcinoma on tumor growth and metastasis, and the correlation of expression of the Syk gene with p53.

**METHODS:** Using semi-RT-PCR technique, we detected specimens from 61 gastric carcinoma patients (tumor tissues, adjacent normal tissues) for their rate and level of Syk and p53 gene expression. Meanwhile, immunohistochemical staining was also used to detect Syk expression.

**RESULTS:** All normal gastric tissues were detected the expression of the Syk gene. Unlike normal tissue, 47 out of 61 breast cancer tissue did not show any detectable Syk mRNA expression, and there were significant difference between the two groups ( $\chi^2=72.3$ ,  $P < 0.05$ ). The level of Syk mRNA in the primary gastric carcinoma tissues was significantly lower than that in the adjacent non-cancerous gastric tissues ( $t = 2.1$ ,  $P < 0.05$ ). Furthermore, only 3 gastric carcinoma tissues in 31 patients with lymph node metastasis had the Syk mRNA expression. The Syk mRNA expression was negatively correlated to lymph node metastasis ( $\chi^2 = 4.85$ ,  $P < 0.05$ ). And the Syk expression was correlated to that of p53 ( $\chi^2 = 22.03$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The expression of the Syk gene may play an important role in suppressing growth and metastasis in gastric cancer. Syk gene expression is repressed in a p53-dependent manner.

Xia JG, Ding YB, Chen GY. Expression of tyrosine kinase Syk and its clinical significance in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(4):767-769

### 摘要

**目的:** 探索酪氨酸激酶 Syk (spleen tyrosine kinase, Syk) 基因的表达与胃癌生成及转移的关系。

**方法:** 用半定量 RT-PCR 检测胃癌组织、正常胃组织 61 例 Syk mRNA, p53 的表达, 同时用免疫组化方法检测 Syk 的表达。

**结果:** 所有正常胃组织都有 Syk 基因的表达, 而 61 例胃癌组织中只有 14 例表达, 正常胃组织 Syk 基因表达率显著高于胃癌组织 ( $\chi^2=72.3$ ,  $P < 0.05$ ), 且胃癌组织中 Syk mRNA 含量比正常胃组织显著降低 ( $t = 2.1$ ,  $P < 0.05$ )。31 例有淋巴结转移的胃癌组织中, 3 例有 Syk 基因表达, 30 例无淋巴结转移的胃癌中有 11 例检测到 Syk mRNA 的表达, 有淋巴结转移的胃癌 Syk mRNA 的表达率和表达水平显著降低 ( $\chi^2=4.85$ ,  $P < 0.05$ ), 且 Syk mRNA 表达与 p53 的表达呈正相关 ( $\chi^2=22.03$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** Syk 基因的表达缺失与胃癌的生长及转移相关, 呈 p53 依赖性。

夏建国, 丁永斌, 陈国玉. 胃癌候选抑癌基因 Syk 表达的意义. *世界华人消化杂志* 2004;12(4):767-769

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/767.asp>

### 0 引言

胃癌的发生、发展是一个复杂的多阶段的过程, 包括癌基因的激活和抑癌基因的变异和缺失. 在对胃癌的研究中, 基因的变异对肿瘤的生成和转移一直是焦点<sup>[1-2]</sup>, 在胃癌的信号传导途径中, 酪氨酸激酶起着至关重要的作用. 酪氨酸激酶 Syk 是一种非受体型蛋白酪氨酸激酶, 近来的研究表明 Syk 的表达缺失与恶性肿瘤的发病机制有关, 其被认为能抑制恶性肿瘤的生长和转移. 我们用半定量 RT-PCR 法检测胃癌中 Syk 的表达情况, 同时分析患者的发病年龄、肿瘤大小, 病理分级、淋巴结转移的情况, 以探讨 Syk 的表达与胃癌病理特征的关系。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院 2002-08/2003-08 手术切除的胃癌标本 61 例, 分别取瘤体及距瘤体 5 cm 外正常胃组织标本,

迅速经液氮冷冻后置 -70 °C 冰箱保存备用. 年龄 16-80 岁(平均 55 岁), 男 37 例, 女 24 例, 有淋巴结转移 31 例. 所有肿瘤标本都经病理证实, 总 RNA 的提取采用 Roche 公司 Trizol RNA 提取试剂.

1.2 方法 按说明书过程提取总 RNA. RT 及 PCR 在 PE-2400 型 PCR 仪上进行. 取总 RNA 4  $\mu$ L 经 RNase Free DNase 消化可能存在的痕量 DNA 后, 采用逆转录酶 Mu-MLV 按 20  $\mu$ L 体系 42 °C 逆转录 45 min, 99 °C 5 min 灭活 AMV 酶. 取得的 cDNA 按 50  $\mu$ L 的体系进行 PCR 扩增, PCR 反应系统如下: 10 $\times$ Buffer 5  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ L, dNTP Mix 1  $\mu$ L, 引物 1, 2 各 1  $\mu$ L, Taq 酶 0.5  $\mu$ L, 模板 10  $\mu$ L, 无核酸水 33.5  $\mu$ L. 预变性 94 °C 5 min, 94 °C 变性 45 s, 61 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 45 s, 30 个循环后 72 °C 延伸 7 min. Syk 扩增引物正链为: 5' - CATGTCAAGGATAAGAACATCATAGA - 3'; 反链为: 5' - AGTTCACCACGTCATAGTAGTAATT - 3', 扩增片段为 514 bp. 并用甘油醛 - 3- 磷酸脱氢酶(GAPDH)用作内对照, GAPDH 引物正链为: 5' - AGAAGGCTGGG GCTCATTTCAGGG - 3', 负链为: 5' - GTCCTGCGTCTTCACCACCATG - 3', 扩增片段为 143 bp. PCR 产物 5  $\mu$ L 于 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 于紫外分析仪下分析结果. 电泳产物条带用 Fluor-S 多图像分析, 每一电泳带的强度与 GAPDH 相对照, 算出每一 PCR 产物的相对含量. p53 扩引物正链为 5' - ACGACGGGGCTGGT TGCCA - 3', 反链为 5' - CTCCCAGAGACCCAGT TGC - 3', 扩增片段为 201 bp, 反应条件为预变性 94 °C 5 min, 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 min, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环后 72 °C 延伸 7 min.

同时用免疫组化检测患者 Syk 表达情况, 瘤体标本中性甲醛固定, 石蜡包埋, 连续切片, 厚约 4  $\mu$ m 进行免疫组化检查. 切片脱蜡水化后, PBS(磷酸缓冲液, PH=7.4)冲洗 3 次, 3 min/ 次; 加过氧化物酶阻断溶液 50  $\mu$ L, 以阻断内源性过氧化物酶活生, 室温下孵育 10 min; 切片放入盛有 0.01 mol/L PBS 溶液中置微波炉中至 90 °C 左右, 10 min. PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min. 每张切片加入 100 mL/L 羊血清 50  $\mu$ L, 室温下孵育 10 min, PBS 冲洗 1 次. 切片中加入第一单抗(鼠抗人 Syk, 1 : 25,) 50  $\mu$ L 室温下反应 2 h; PBS 冲洗 3 次, 3 min/ 次. 再加入生物素标记的二抗(羊抗鼠 IgG, 1 : 50)后室温下孵育 10 min, PBS 冲洗, 加入链球菌抗生素 - 过氧化物溶液 50  $\mu$ L, 室温下孵育 10 min, PBS 冲洗, 最后切片上加入新配制的 DAB(联苯二胺)溶液 100  $\mu$ L, 蒸馏水冲洗, 苏木素染色, 梯度酒精脱水干燥, 中性树脂胶封闭. Syk 为细胞膜着色, 按肿瘤细胞着色强度及阳性细胞的分析范围分为两个等级: 以 10-30% 细胞呈弱、中等强度阳性反应为标准, 分为阴性和阳性, 并分析其与患者肿瘤大小、肿瘤分级、淋巴结大小情况.

统计学处理 不同组织中 Syk 基因的表达强度的比较用 t 检验. 相关性分析采用  $\chi^2$  统计学分析.

## 2 结果

2.1 Syk 在胃癌组织中的表达 应用 RT-PCR 法, 正常胃组织 61 例均能检测出 Syk mRNA 的表达, 而胃癌标本 61 例仅 14 例有 Syk mRNA 的表达 ( $\chi^2=72.3$ ,  $P < 0.05$ , 图 1). 有淋巴结转移的 31 例胃癌中, 有 3 例可检测出 Syk mRNA 表达, 而无淋巴结转移的 30 例胃癌组织中 11 例有 Syk mRNA 表达 ( $\chi^2=4.85$ ,  $P < 0.05$ ). Syk mRNA 的表达与年龄、肿瘤分级、大小及浸润深度无关(资料未列出). 应用免疫组化法, 在 61 例正常胃组织中有 56 例 Syk 阳性, 61 例胃癌组织中有 12 例阳性, 两组 Syk 阳性率差异有显著性 ( $\chi^2=61.43$ ,  $P < 0.05$ ). RT-PCR 法和免疫组化法检测 Syk 的阳性率没有显著性差异 ( $\chi^2=3.27$ ,  $P > 0.05$ ).

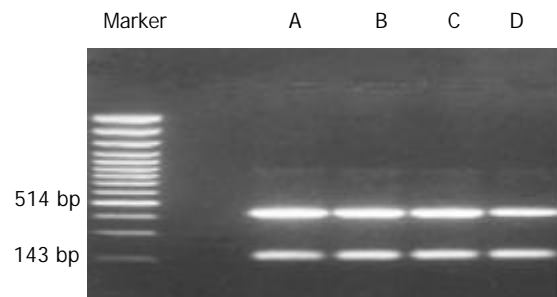


图 1 正常胃组织 Syk 基因 PCR 产物电泳图.

2.2 半定量 RT-PCR RT-PCR 产物 10  $\mu$ L 用 15 g/L 的琼脂糖电泳, GAPDH 作为对照, 分析不同组织中 Syk 含量(图 1). 胃癌组织中 Syk 表达水平为  $1.71 \pm 1.23$ , 邻近正常胃组织中为  $3.19 \pm 0.59$ , 胃癌组织 Syk/GAPDH 比邻近组织显著降低 ( $t = 2.1$ ,  $P < 0.05$ ). 有转移的胃癌组织 Syk 表达水平为  $1.18 \pm 1.13$ , 无转移的胃癌组织 Syk 表达水平为  $2.14 \pm 1.27$ , 有转移的胃癌组织中 Syk/GAPDH 比无转移者显著降低 ( $t = 3.4$ ,  $P < 0.05$ ).

2.3 p53 基因在胃癌组织中的表达 61 例胃癌组织中有 19 例可检测到 p53 基因, 邻近正常胃组织中有 53 例有 p53 基因表达, 胃癌组织中 Syk 基因表达率显著低于正常胃组织 ( $\chi^2=36.91$ ,  $P < 0.05$ ). 31 例有淋巴结转移的胃癌组织中 p53 mRNA 表达阳性 4 例, 30 例无淋巴结转移的胃癌组织中阳性表达 15 例, 有淋巴结转移 p53 mRNA 阳性率显著低于无淋巴结组 ( $\chi^2=8.13$ ,  $P < 0.05$ ).

2.4 Syk mRNA 与 p53 mRNA 表达的关系 p53 表达阳性的 19 例胃癌瘤体中, 有 12 例检出 Syk mRNA 的表达, 42 例 p53 阴性胃癌组织中 Syk mRNA 的表达 2 例, p53 表达阳性的胃癌组织 Syk mRNA 的表达检测高于 p53 表达阴性的胃癌组织 ( $\chi^2=22.03$ ,  $P < 0.05$ ).

## 3 讨论

Syk 广泛在造血细胞上表达, 长期以来一直作为信号传导过程中一个影响因子而被广泛研究. 在前后串排和多个自体磷酸化部位含有两个 Src 同源序列 SH2. Syk 通过 SH2 区域与依赖酪氨酸的免疫受体活化基序(ITAM)

结合而活化, 并且在淋巴细胞发展及免疫细胞活化过程中起着极为重要的作用, Syk 的表达缺失可导致 B、T 细胞的成熟障碍, 从而使机体失去对突变细胞的监控作用<sup>[3]</sup>.

我们应用 RT-PCR 及免疫组化法检测 Syk 在胃癌中的表达情况, 结果发现 Syk mRNA 在胃正常组织中表达率及表达水平高于胃癌组织, 两组差异有显著性, 这表明 Syk mRNA 的表达缺失可能与胃癌的发生有关, Sada et al 认为 Syk 是一种候选抑癌基因, Syk 的缺失会导致免疫细胞发育、成熟障碍, 重者会导致重症联合免疫缺陷病(SCID), 从而使肿瘤易于发生. 同时我们也注意到 RT-PCR 法检测 Syk 的阳性率高于免疫组化法, 但两种检测方法差异没有显著性, 这可能与样本量过小有关.

在 31 例有淋巴结转移的胃癌组织中只有 3 例检测到 Syk mRNA 的表达, 有淋巴结转移的胃癌细胞的 Syk mRNA 的检测率远低于无淋巴结转移组, 这表明 Syk mRNA 的表达缺失可能与胃癌的淋巴转移有关, 但非受体酪氨酸激酶 Syk 的信号传导在肿瘤的转移过程中如何起作用还不清楚. Carter WB 认为 Syk 与 HER2/neu 一对功能相反的抑癌/癌基因, HER2/neu 的过度表达可诱导血管内皮细胞的收缩, 从而使肿瘤细胞易于穿过血管屏障, 易于发生转移, 而 Syk 可抑制 HER2/neu 的收缩血管内皮细胞作用, 从而抑制肿瘤的转移<sup>[4]</sup>. Mahabeleshwar 研究认为 Syk 通过抑制 PI-3 (phosphatidylinositol 3, PI-3) 激酶的活性, 从而抑制肿瘤细胞的分裂和核因子 NF- $\kappa$ B 调节的 u-PA (urokinase type plasminogen, u-PA) 的激活分泌, 而过去研究证实 u-PA 的激活分泌与多种恶性肿瘤的发生、发展及转移相关<sup>[5-6]</sup>.

在 p53 表达阳性的胃癌组织中, Syk mRNA 的表达率及表达水平较高, 且与 p53 表达相关, Syk 基因的

表达呈 p53 依赖性的, 在肿瘤生成过程中 p53 的功能丧失会导致 Syk 的活性下降, 从而使肿瘤易于生成和转移. Syk 是内皮细胞生长的重要调控因素, 非受体酪氨酸激酶在胃癌的生成、转移过程中的作用尚进一步探索. 现在的初步研究为将来防治胃癌提供了新的分子学靶位, 因而对 Syk 的进一步深入研究, 必将为胃癌治疗的提供新的策略<sup>[7-8]</sup>.

#### 4 参考文献

- 1 李庆明, 余谦, 闵存云. P53 突变与 VEGF 在大鼠胃癌中的表达及中药胃康宁的防治作用. 世界华人消化杂志 2003;11:997-1000
- 2 郝冬梅, 孙秀菊, 郑志红, 贺光, 马鸣超, 徐惠绵, 王梅先, 孙开来. 胃癌癌前病变相关基因的筛查及表达研究. 世界华人消化杂志 2003;11:6-9
- 3 Sada K, Takano T, Yanagi S, Yamamura H. Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J Biochem (Tokyo)* 2001; 130:177-186
- 4 Carter W, Hoying JB, Boswell C, Williams SK. HER2/neu over-expression induces endothelial cell retraction. *Int J Cancer* 2001;91:295-299
- 5 Mahabeleshwar GH, Kundu GC. SYK, a protein-tyrosine kinase suppresses the cell motility and nuclear factor  $\kappa$ B mediated secretion of urokinase type plasminogen activator by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase activity in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2003;278:6209-6221
- 6 Toyama T, Iwase H, Yamashita H, Hara Y, Omoto Y, Sugiura H, Zhang ZH, Fujii Y. Reduced expression of the Syk gene is correlated with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Lett* 2003;189:97-102
- 7 Ding YB, Chen GY, Xia JG, Zang XW, Yang HY, Yang L. Association of VCAM-1 overexpression with oncogenesis, tumor angiogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1409-1414
- 8 Wang L, Duke L, Zhang PS, Arlinghaus RB, Symmans WF, Sahin A, Mendez R, Dai JL. Alternative splicing disrupts a nuclear localization signal in spleen tyrosine kinase that is require for invasion suppression in breast cancer. *Cancer Res* 2003;63:4724-4730

## World Journal of Gastroenterology 2005 年将改为周刊

《World Journal of Gastroenterology, WJG》是我国消化病学领域中惟一以全英文发表原创性论文的国际性学术期刊. WJG 创刊于 1995 年, 原名《China National Journal of New Gastroenterology》, 1998 年更名为 WJG, 由世界胃肠病学杂志社出版. WJG 国际标准刊号 ISSN 1007-9327, 国内统一刊号 CN 14-1219/R, 月刊, 大 16 开, 256 页, 邮发代号 82-261, 北京报刊发行局发行. 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 以及日益增多的国际科技交流的需要, 从 2005 年开始, WJG 将由半月刊改为周刊, 大 16 开, 160 页, 每月 7、14、21、28 日出版.