

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.06.009  
文章编号: 1005-8982 (2018) 06-0050-04

## 缺氧诱导因子 1 $\alpha$ 与甘氨酸甲基转移酶 在胃癌组织中的表达及其临床意义

达热拜·热达提, 赵为民, 曾祥岳, 杨新辉

(新疆医科大学附属肿瘤医院 胃肠外科, 新疆 乌鲁木齐 830011)

**摘要:** **目的** 研究胃癌组与癌旁正常组织中缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 和甘氨酸甲基转移酶 (GNMT) 的表达及与病患预后的关系。**方法** 选取 2015 年 6 月-2016 年 6 月于新疆医科大学附属肿瘤医院胃肠外科收治的胃癌患者 45 例为研究对象。分别采集患者胃癌组织和癌旁正常组织标本, 对比 HIF-1 $\alpha$  和 GNMT 在胃癌组织和癌旁正常组织的表达并分析其与患者预后的关系。**结果** HIF-1 $\alpha$  在胃癌组织和癌旁组织中的表达率分别为 84.44% 和 4.45%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); HIF-1 $\alpha$  在胃癌细胞胞核的阳性率高于胞质 (64.44% vs 4.45%) ( $P < 0.05$ )。GNMT 在胃癌组织和癌旁组织中的表达量分别为 (678.23  $\pm$  221.88) 和 (1 136.73  $\pm$  332.81) ng/ml, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。多因素 Cox 回归分析显示, 影响胃癌患者 5 年生存结局的独立因素包括 HIF-1 $\alpha$  蛋白 (+) 表达 ( $P = 0.002$ )、GNMT 蛋白 (-) 表达 ( $P = 0.006$ )、分化程度 ( $P = 0.036$ )、浸润深度 ( $P = 0.001$ ) 和远处转移 ( $P = 0.002$ )。**结论** HIF-1 $\alpha$  在胃癌组织中高表达, 而 GNMT 在胃癌组织中低表达, 并且与胃癌的预后有一定的联系, 可作为判断胃癌患者预后的指标。

**关键词:** 缺氧诱导因子 1 $\alpha$ ; 甘氨酸甲基转移酶; 胃癌组织; 癌旁正常组织

**中图分类号:** R735.2

**文献标识码:** A

## Effect of HIF- 1 $\alpha$ and glycine methyltransferase on prognosis of gastric cancer

Darebai·Redati, Wei-min Zhao, Xiang-yue Zeng, Xin-hui Yang

(Department of Gastrointestinal Surgery, Xinjiang Tumor Hospital, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression levels of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and glycine methyltransferase (GNMT) in patients with gastric cancer and potential association with prognosis. **Methods** Totally 45 cases of gastric cancer patients admitted to our hospital from June 2015 to June 2016 were included in this study. Cancer tissues and adjacent normal tissues were collected for further purposes. Expression of HIF-1 $\alpha$  and GNMT were determined by Immunostaining method. Potential association between expression of target proteins and clinical outcome was analyzed. **Results** The positive rate of HIF-1 $\alpha$  in gastric carcinoma was increased significantly compared with normal tissue (84.44% vs 4.45%,  $P < 0.05$ ). Among HIF-1 $\alpha$  expressing cells, nucleus positive rate was dramatically higher compared with cytoplasm positive rate (64.44% vs 4.45%,  $P < 0.05$ ). Concentration of GNMT in gastric cancer tissue was downregulated when compared with that in normal tissue [(678.23  $\pm$  221.88) ng/ml vs (1,136.73  $\pm$  332.81) ng/ml,  $P < 0.05$ ]. Multivariate Cox regression analysis showed that the independent factors for 5 year survival of patients included HIF-1 $\alpha$  protein (+) ( $P = 0.002$ ), GNMT protein (-) ( $P = 0.006$ ), differentiation degree ( $P = 0.036$ ), invasion depth ( $P = 0.001$ ), and distant metastasis ( $P = 0.002$ ). **Conclusion** Expression of HIF-1 $\alpha$  increases while GNMT decreases in gastric cancer tissue, which may be the prognostic factors for outcome of gastric tumor.

收稿日期: 2017-05-15

[通信作者] 杨新辉, E-mail: 390597111@qq.com

**Keywords:** hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ ; glycine methyltransferase; gastric cancer normal tissue adjacent to cancer

胃癌是全世界范围内都较为常见的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,在任何年龄段都可能发生,且多见于40~60岁,男性多于女性。这可能与社会的发展使得人们的饮食结构发生不同程度的改变及不良生活习惯等有关,确切的诱发病因至今不明。目前胃癌治疗的主要方案为外科手术,但由于大多数早期胃癌患者其身体并无症状,只有少数会有呕吐、恶性或是类似于上消化道溃疡病症状的表现<sup>[2]</sup>。一旦发现出现体重减轻或身体疼痛时,多数患者已经发展到进展期,对人们的生活和健康构成严重威胁<sup>[3]</sup>,因此,发现对早期胃癌防治及预后能产生有效特异性标志物显得尤为重要。本研究缺氧诱导因子1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )和甘氨酸甲基转移酶 (glycine methyltransferase, GNMT)在胃癌组织中和癌旁正常组织的表达及与患者预后关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

选取2015年6月-2016年6月本院收治的45例的胃癌患者为观察对象。分别采集患者胃癌组织与癌旁正常组织标本。其中,男性28例,女性17例;年龄28~78岁,平均(58.34 $\pm$ 9.28)岁;肿瘤位置:贲门6例,胃底8例,胃体4例,胃窦27例;肿瘤大小:<6 cm 23例, $\geq$ 6 cm 22例;分化程度:高分化12例,中分化25例,低分化8例;T分期:T<sub>1</sub>+T<sub>2</sub> 25例,T<sub>3</sub>+T<sub>4</sub> 20例;淋巴转移:有21例,无24例;TNM分期:I+II 29例,III+IV 16例。入选标准:①患者均确诊为胃癌;②术前未进行放化疗等;③所有病患或其家属均知情并签字同意参与研究。排除标准:①术前有放化疗治疗;②拒绝参与研究的患者。所有患者均签署知情同意书,本文获得我院伦理委员会审核并批准。

### 1.2 方法

**1.2.1 实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)** 提取标本组织RNA,采用购自Invitrogen公司的Trizol试剂,严格按照说明书操作。将组织样本置入EP管中(内含无RNA酶2 ml),并将1 ml Trizol加入管中,在液氮中研磨后于常温中静置5 min后将0.2 ml 氯仿滴入管中并摇晃15 s,然后继续静置10 min(常温)。以12 000 r/min进行15 min离心(温度为4 $^{\circ}$ C),将上清液分离出加入新的EP管

(内含无RNA酶1.5 ml),并将0.5 ml 异丙醇加入管中并混合均匀后常温下静置3 min,再以12 000 r/min进行15 min离心(温度为4 $^{\circ}$ C)后将上清液倒掉,加入1 ml 乙醇(浓度为75%)对RNA沉淀进行洗涤。再以12 000 r/min进行8 min离心(温度为4 $^{\circ}$ C)后将上清液倒掉,乙醇完全挥发后将高温灭菌后的50  $\mu$ l MiliQ纯水(焦碳酸二乙酯对其进行处理)。采用逆转录试剂将mRNA逆转录为cDNA(购自Toyobo公司),采用7900HT序列仪将cDNA进行qRT-PCR(购自美国生物公司),每个样本进行3次重复试验,算出其相对值。

**1.2.2 提取蛋白并行Western blot检测** 使用RIPA裂解法提取蛋白,裂解时为降低蛋白降解速度加入PMSF等蛋白酶的抑制剂。将裂解物以12 000 r/min进行10 min离心(温度为4 $^{\circ}$ C)后分离上清液并对其蛋白总浓度进行测定,BCA试剂盒购于碧云天生物。将3 $\times$ 蛋白缓冲液适量加入裂解液中,行10 min沸水浴后蛋白变性,行胶上电泳后将蛋白置于PVDF膜上。用TBST制成脱脂牛奶(浓度为5%)中封闭保存PVDF膜1 h,将封闭液洗净后孵育HIF-1 $\alpha$ 抗体(购自Abcam公司,浓度为1:1 500)。在4 $^{\circ}$ C冰箱冷冻保存12 h以上,进行清洗并继续孵育1 h(用兔二抗),进行清洗后用浓度为1:3 000的GAPDH进行显影(购自Vazyme公司)。用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)对癌组织以及旁边组织GNMT表达。用GNMT的引物序列经PCR仪器增加,并计算其相对值。

**1.2.3 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)** 用购于联世科技的ELISA试剂盒对GNMT进行检测,严格按照试剂说明书在各个孔中分别加入样品,并恒温(37 $^{\circ}$ C)孵育2 h后将试剂A加入其中后继续孵育1 h,将反应液吸出后洗涤3次后将试剂B加入其中,恒温(37 $^{\circ}$ C)孵育30 min,将反应液吸出后洗涤5次后将90  $\mu$ l反应物底物加入继续恒温(37 $^{\circ}$ C)孵育20 min,将50  $\mu$ l终止液加入并进行吸光度检测。

### 1.3 效果评价

染色以及免疫组织化学(免疫组化)结果判断:将样本制成芯片后对其进行相关处理(脱蜡和水化),

用浓度为 3% 的  $H_2O_2$  对其过氧化物酶进行灭活 ( 常温下密闭 10 min ), 并与高温高压下恢复抗原热, 将抗原抗体反应 ( 非特异性 ) 经牛血清白蛋白 ( bovine albumin, BSA ) 进行封闭; 将购自 Abcam 公司, 浓度为 1 : 300 的 HIF-1 $\alpha$  以及其公司生产的浓度为 1 : 400 的 CD34 加入后在 4 $^{\circ}C$  下进行过夜孵育; 给予磷酸盐缓冲液 ( phosphate buffered saline, PBS ) 进行洗涤, 孵育兔二抗, 常温下保持 30 min 用 PBS 进行洗涤; 进行 5 ~ 10 min 避光显色后终止显色 ( 用自来水洗涤 )。阳性百分率的评判标准如下<sup>[4]</sup>: 0 分为细胞无着色; 1 分为细胞着色  $\leq 25\%$ ; 2 分为细胞着色范围在 26%~74%; 3 分为细胞着色  $>75\%$ 。染色强度的评判: 无着色 0 分; 淡黄色 1 分; 棕黄色 2 分; 棕褐色 3 分。阴性表达: 阳性百分率  $\times$  染色强度  $\leq 2$  分, 阳性表达: 阳性百分率  $\times$  染色强度  $>2$  分。将阳性百分比和染色强度的评分结果相乘, 即为综合评分, 用判定阳性表达强度, 综合评分 0 ~ 1 分判定为表达阴性 ( - ), 2 ~ 5 分判定为表达弱阳性 ( + ), 6 ~ 8 分判定为表达中度阳性 ( ++ ), 9 分判定为表达强阳性 ( +++ )。

#### 1.4 统计学方法

数据处理采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 (  $\bar{x} \pm s$  ) 表示, 采用  $t$  检验, 计数资料以率 ( % ) 表示, 比较做  $\chi^2$  检验。影响胃癌患者 5 年生存结局的多因素生存分析采用 Cox 比例风险回归模型,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胃癌组织和癌旁正常组织中 HIF-1 $\alpha$ 的表达

HIF-1 $\alpha$  在胃癌组织中的阳性率为 84.44%, 高于癌旁正常组织的阳性率 4.45%; HIF-1 $\alpha$  在胃癌组织

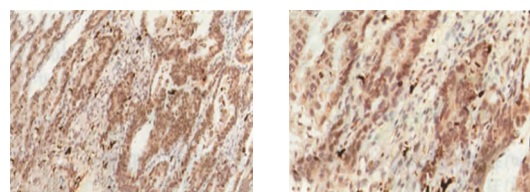
胞核的阳性率为 64.44%, 高于胞质的阳性率 20.00%。见表 1 和图 1、2。

### 2.2 GNMT 在胃癌组织及癌旁组织的表达

GNMT 在胃癌组织 (  $678.23 \pm 221.88$  ) ng/ml 的表达低于癌旁正常组织 (  $1136.73 \pm 332.81$  ) ng/ml, 差异有统计学意义 (  $t = 7.689, P = 0.000$  )。GNMT 在胃癌组织的表达低于癌旁正常组织 (  $P < 0.05$  )。

表 1 胃癌组织和癌旁正常组织中 HIF-1 $\alpha$  胞核阳性率及胞质阳性率的比较 (  $n = 45$  )

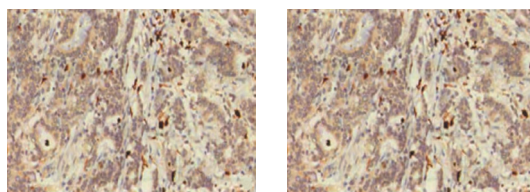
组别	胞核阳性表达例 (%)	胞质阳性表达例 (%)	合计 %
胃癌组织	29 ( 64.44 )	9 ( 20.00 )	84.44
癌旁正常组织	2 ( 4.45 )	0 ( 0.00 )	4.45
$\chi^2$ 值	15.361	11.052	16.830
$P$ 值	0.000	0.002	0.000



A (  $\times 100$  )

B (  $\times 200$  )

图 1 胃癌组织胞核中 HIF-1 $\alpha$  表达阳性 ( 免疫组化 )



A (  $\times 100$  )

B (  $\times 200$  )

图 2 胃癌组织胞质中 HIF-1 $\alpha$  表达阳性 ( 免疫组化 )

表 2 COX 模型筛选的危险因素及参数估计

影响因素	b	$S_b$	$\hat{OR}$	Wald $\chi^2$	95%CI		$P$ 值
					下限	上限	
Lgr5 蛋白 ( + ) 表达	0.424	0.631	2.517	9.137	4.846	12.674	0.002
CD44 蛋白 ( - ) 表达	0.645	0.073	3.133	7.736	5.954	10.245	0.006
分化程度	0.266	0.587	2.520	9.326	8.014	11.241	0.036
浸润深度	0.637	0.137	3.371	10.214	3.862	17.914	0.001
远处转移	0.325	0.335	3.625	6.356	2.371	10.221	0.002
病理分期	0.235	0.124	0.213	10.154	8.106	12.374	0.086

注: 总  $\chi^2 = 47.20, \nu = 5, P < 0.001$

### 2.3 患者5年生存结局的独立因素分析

多因素Cox回归分析显示,影响胃癌患者5年生存结局的独立因素包括HIF-1 $\alpha$ 蛋白(+)表达( $P=0.002$ )、GNMT蛋白(-)表达( $P=0.006$ )、分化程度( $P=0.036$ )、浸润深度( $P=0.001$ )和远处转移( $P=0.002$ )。见表2。

## 3 讨论

胃癌发病率在消化系统肿瘤中占据40%~50%比例,发病率与致残率在恶性肿瘤中占比最高<sup>[5-7]</sup>。胃癌的治疗目前为放化疗、手术及中医措施和对患者免疫力进行提升等综合疗法,由于胃癌患者一旦发现绝大部分是已属发展期<sup>[8-10]</sup>,且具有较为复杂的分化、组织成分及生物型行为,疗效满意度低,为此如何有效防治胃癌成为医疗工作者研究的重点和焦点。找寻特异而又敏感的肿瘤分子类标志,在基因以及分子水平对胃癌进行生物学检测,更深层次的对胃癌发病机制进行了解,能提高早期诊断率,从而及早制定方案并改善患者预后<sup>[11]</sup>。

本文HIF-1 $\alpha$ 在胃癌组织胞核的表达阳性率高于胞质的阳性率,且均高于癌旁正常组织中胞核和胞质的阳性率。表明HIF-1 $\alpha$ 的表达主要集中在胃癌组织的胞核与胞质,说明HIF-1 $\alpha$ 进入胞核才能对调控血管内皮中的生长因子产生作用,进而调控基质金属酶的表达,对肿瘤细胞发生转移及浸润产生影响<sup>[12-13]</sup>。HIF-1 $\alpha$ 在胃癌组织中的阳性表达率高于癌旁组织,而GNMT胃癌组织中的表达低于癌旁正常组织。表明HIF-1 $\alpha$ 与GNMT对胃癌组织与癌旁正常组织表达之间差异较大,临床可通过检测患者HIF-1 $\alpha$ 与GNMT表达来对胃癌进行评估。GNMT作为多功能的一种蛋白质在人体内能参与到致癌环境物质代谢过程中起到解毒作用,GNMT作为多环芳烃与蛋白相结合物质在解毒途中对化学物质进行截获,能有效抑制肿瘤<sup>[14]</sup>。有报道称,GNMT减少表明肿瘤感性物会有所增加,提示GNMT在肿瘤发病机制中也发挥着作用<sup>[15]</sup>。本研究还发现,在胃癌预后单或多因素分析中,性别、年龄及位置无差异,与分化程度、T分期及淋巴转移等比较均有差异,表明胞核HIF-1 $\alpha$ 表达是危险因子,且对预后不会产生独立作用。有报道表明,胃癌组织中GNMT表达与TNM肿块呈负相关,与分化程度呈正相关,由此得出

GNMT与胃癌的发病进展具有相关性。

综上所述,HIF-1 $\alpha$ 与GNMT在胃癌组织中高表达,并且与胃癌预后有关系,可作为预测胃癌患者预后的重要指标之一,不过还有待大量的实验来验证。

### 参考文献:

- [1] SMITH J P, NADELLA S, OSBORNE N, et al. Gastrin and gastric cancer[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017, 4(1): 75-83.
- [2] 李庆新,张振坤,李向莉,等. FICE内镜、胃蛋白酶原I、胃蛋白酶原II水平检测对胃癌及萎缩性胃炎的诊断价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2015, 22(8): 765-768.
- [3] HU Q Y, ZHAO Z Y, LI S Q, et al. A meta-analysis: The diagnostic values of long non-coding RNA as a biomarker for gastric cancer[J]. Mol Clin Oncol, 2017, 6(6): 846-852.
- [4] AJANI J A, LEE J, SANO T, et al. Gastric adenocarcinoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2017(3): 17036.
- [5] 杜刚,左强强,冯琴. 幽门螺杆菌致病性及耐药性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(20): 3018-3020.
- [6] SHAH M A. Future directions in improving outcomes for patients with gastric and esophageal cancer[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2017, 31(3): 545-552.
- [7] 张飘,石燕强,冯晓婷,等. 肾上腺素能受体与胃癌关系的研究进展[J]. 广东医学, 2016, 37(3): 448-450.
- [8] 沈维,邓胜明,章斌,等. <sup>18</sup>F-FDG PET/CT对胃癌术后的监测价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2016, 23(4): 470-472.
- [9] 李威威,张海萍,吴敏,等. 人表皮生长因子受体2基因扩增及蛋白表达与胃癌患者临床病理特征的关系[J]. 肿瘤研究与临床, 2017, 29(1): 7-10.
- [10] GE X, LIU X, LIN F, et al. MicroRNA-421 regulated by HIF-1 $\alpha$  promotes metastasis, inhibits apoptosis, and induces cisplatin resistance by targeting E-cadherin and caspase-3 in gastric cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(17): 24466-24482.
- [11] ZHAO Q, LI Y, TAN B B, et al. HIF-1 $\alpha$  Induces multidrug resistance in gastric cancer cells by inducing MiR-27a[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0132746.
- [12] 韦花媚,刘坤平,罗春英,等. MMP-9及HIF-1 $\alpha$ 在鼻NK/T细胞淋巴瘤表达中的作用研究[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(6): 863-866.
- [13] LIU L, WANG Y, BAI R, et al. MiR-186 inhibited aerobic glycolysis in gastric cancer via HIF-1 $\alpha$  regulation[J]. Oncogenesis, 2017, 6(4): e318.
- [14] 谢磊,于振海,黄钢. 缺氧诱导因子1 $\alpha$ (HIF1 $\alpha$ )下调HepG2细胞中甘氨酸-N-甲基转移酶(GNMT)基因的表达[J]. 复旦学报(医学版), 2013, 40(5): 511-515.
- [15] 潘定宇,钱玉元,冯梦龙,等. 甘氨酸甲基转移酶在胃癌与癌旁组织中的表达及临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(8): 2038-2040.

(王荣兵 编辑)