

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.10.016

FXR 在胃粘膜肠化生及胃癌中的表达及其意义研究*

苏林娜 刘向强 吕丽芬 聂勇战 时永全[△]

(第四军医大学西京消化病医院肿瘤生物学国家重点实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究 FXR 在胃炎、胃粘膜肠化生及胃癌组织中的表达,分析其在胃癌发生中的意义。**方法:**采用免疫组化方法检测 FXR 在 55 例胃炎组织, 61 例胃黏膜肠化生组织及 61 例胃癌组织中的表达,利用统计学方法 SPSS17.0 软件分析其在三种组织中的表达变化,结合文献回顾,分析 FXR 在胃癌发生中的意义。**结果:**FXR 在胃黏膜肠化生中的表达明显高于胃炎组织($P<0.05$),而在胃癌组织中,FXR 的表达显著低于胃黏膜肠化生组织($P<0.05$)。**结论:**FXR 是一个潜在的胃癌发生生物标记物,其具体机制有待于进一步探索。

关键词:肠化生;FXR;胃癌

中图分类号:R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)10-1875-04

The Study of Expression and Significance for FXR in the Gastric Mucosal Intestinal Metaplasia and Gastric Cancer*

SU Lin-na, LIU Xiang-qiang, LV Li-fen, NIE Yong-zhan, SHI Yong-quan[△]

(Department of digestive diseases of Xijing hospital, State key laboratory of cancer biology, the fourth military medical university, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of FXR in gastritis tissues, gastric mucosal intestinal metaplasia tissues and gastric cancer tissues, and analyze the significance of FXR in gastric carcinogenesis. **Methods:** Immunohistochemistry was performed to detect the FXR expression in gastritis, intestinal metaplasia tissues, and gastric cancer tissues, and the expressional relation between these three groups of tissue were analyzed by SPSS17.0. The significance of FXR in gastric cancer was also analyzed. **Results:** The expression of FXR in gastric mucosal intestinal metaplasia tissues was significantly higher than that in gastritis tissues ($P<0.05$). However, in the gastric cancer group, the FXR expression was clearly lower than that in gastric mucosal intestinal metaplasia tissues ($P<0.05$). **Conclusion:** FXR is a potential gastric biomarker, and its mechanisms were to be studied in future.

Key words: Intestinal metaplasia; Farnesoid X receptor(FXR); Gastric cancer.

Chinese Library Classification(CLC): R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)10-1875-04

前言

目前,胃癌是世界上第二大致死性肿瘤^[1]。肿瘤是继心血管疾病后第二大危害公共健康的死因,约占全球所有致死病因的23%^[2]。近几十年来,胃癌的全球发病率已明显下降^[3]。一般来讲,胃癌的发生率男性大约为女性的两倍。东亚人、东欧人、南美洲人最易患胃癌,而最不易患病的为北美洲人和非洲人^[4]。虽然,胃癌的早期诊断已被提高,且治疗性胃切除在许多国家作为标准化外科治疗已被接受,然而,胃癌的预后却并不尽如人意。胃癌分子标志物的研究对于了解胃癌的发生、有效治疗及预后判断至关重要^[5]。

肠化生被公认为是胃癌发生前状态,尤其对于肠型胃癌^[6]。据报道,肠化生,尤其是内镜下活检发现的不完全肠化生病例对胃癌高度特异与敏感,且在组织学上为后续肠型胃癌发生的

高危风险状态^[7]。然而,肠化生与胃癌发生的关系至今未明。

法尼脂衍生物 X 受体 FXR(NR1H4)是配体依赖的转录因子核受体超家族中的一员,FXR 激活后需与视黄醛 X 受体结合形成异二聚体后才能发挥转录因子的作用^[8]。胆汁酸能够结合并激活核受体 FXR,鹅脱氧胆酸为最强的 FXR 激活剂^[9]。此外,几个人工合成的 FXR 配体已产生。最广泛使用的为 GW4064^[10]。FXR 高度表达于肝、肠、肾、肾上腺皮质且在胆汁酸稳态、脂质调节、胆固醇代谢及葡萄糖代谢过程中起到重要作用^[11,12]。近期研究发现,FXR 的作用不仅限于各种体内代谢,且参与了炎症及肿瘤的发生^[12]。FXR 功能失调被认为是乳腺癌、结肠癌、肝癌,以及胰腺癌的重要决定因素^[13-16]。考虑到胆汁酸的异常分泌紧密联系于食管炎、胃食管返流病,食管腺癌(EAC)及胃贲门腺癌(GCA)^[17,18]。鉴于以上文献回顾,探索 FXR 在胃癌发生中的作用显得势在必行。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81270445;81370484)

作者简介:苏林娜(1987-),女,硕士研究生,住院医师,主要研究方向:胃癌发生标志物的研究,电话 18392181107, E-mail: sulinna714@163.com

[△]通讯作者:时永全, E-mail: shiyquan@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2013-11-28 接受日期:2013-12-25)

1 材料与方法

1.1 病例

组织样品来源于第四军医大学西京消化病医院病理科存档, 总共收集了 177 例病人的石蜡组织, 这些标本均来自于 2011 年 3 月年至 2013 年 2 月于西京消化病医院首次内镜下手术或活检(西安, 中国), 其中, 55 例为内镜下活检病理诊断为胃炎的标本, 61 例为内镜下取活检病理诊断为肠化生的标本, 另外 61 例为外科手术胃癌标本。这 177 例病人均没有癌症相关性疾病的病史。所有的病理诊断, 经过三名病理学专家的共同鉴定。GIN 低度与高度的分级根据维也纳分类法^[9]。所选病例中所有病人内镜手术前所有病人都签署了知情同意书, 本研究获得第四军医大学西京医院道德与伦理委员会的批准。

1.2 免疫组化一抗

兔抗人多克隆抗体 FXR (H-130):sc13063 购买于 Santa Cruz 生物技术公司。

1.3 FXR 免疫组化染色

每一例组织样品常规病理连续石蜡切片两张, 厚约 4 μ m。所有的切片染色均在两个月内进行以降低抗原的损失。简而言之, 切好的片子置于 60℃ 烤箱过夜烘干, 然后与二甲苯中将石蜡切片脱蜡, 再梯度酒精进行水化。内源性过氧化物酶用含 3% H₂O₂ 的甲醇溶液灭活 10 分钟。然后, 置于缓冲液 PBS 中 10 分钟, 洗 3 次。接下来是抗原修复, 切片浸入 0.05 M Tris-HCl / 1mM EDTA(pH 9.0)缓冲液中, 放入微波炉约 25 分钟, 然后冷却 20 分钟, 0.01mol/l PBS pH(7.4)中洗 10 分钟, 洗 3 次, 接着切片用含 10%山羊血清的 PBS 封闭 30 分钟, 用含 1%胎牛血清白蛋白的 PBS 稀释一抗 FXR (1:100, sc13063, Santa Cruz) or CDX2 (1:100, sc130716, Santa Cruz) 孵育, 然后置于湿盒中 4℃ 过夜。阴性对照的切片用免疫前鼠血清替代一抗孵育过夜。PBS 洗 3 分钟 3 次, 之后用免疫组化专用二抗试剂盒 Maxvision™ / HRP-Polymer anti-Rabbit IHC Kit (KIT 5905) 室温孵育 15 分钟, PBS 洗 3 分钟 3 次。反应结果通过二氨基联苯胺 (DAB, ZLI-9032, ZSGB. Beijing, China) 的显色程度观察约 2 分

钟后, 再用苏木素 (ZLI-9039, ZSGB. Beijing, China) 复染细胞核 3 分钟, 并用自来水冲洗后立即用梯度酒精和二甲苯进行脱水, 加中性树胶, 盖玻片封片。用配置有 DP70 数码相机的光学显微镜 (Olympus BX51, Olympus, Japan) 进行拍片。

1.4 染色结果的评价

免疫组化染色结果的评判由两位有经验的病理专家在完全不知样本临床资料的前提下独立作出评判。FXR 的表达程度由每张切片中的阳性细胞比例(R)及染色强度(I)两个参数共同决定最终结果。每张切片细胞阳性率计分标准为: 0 分(阳性细胞数 <1%); 1 分(阳性细胞数 2%~25%); 2 分(阳性细胞数 26%~50%); 3 分(阳性细胞数 51%~75%); 4 分(阳性细胞数 >75%)。染色强度分级如下: 0: 无信号; 1: 弱信号; 2: 中度信号; 3: 强信号。用公式(R × I)将阳性染色率与染色强度结合起来计算总染色评分, 所得 FXR 或 CDX2 表达分数范围为 0-20。最终评分结果(R × I)被计算并规定: 阴性(-)为评分: 0-2, 阳性(+)为评分: 3-12。

1.5 统计学分析

所有的统计方法均使用 IBM SPSS 17.0 软件。测量数据使用 Student's t 或 one-way ANOVA 方法。分类数据使用非参数检验方法。P < 0.05 被确定为有统计学意义。

2 结果

2.1 FXR 在胃炎、胃粘膜肠化生及胃癌组织中的表达

对 177 例病人石蜡组织样品连续切片后进行免疫组化染色, 包括 55 例胃炎和 61 例肠化生及 61 例胃癌标本, 使用兔抗人多克隆抗体 FXR 进行染色(图 1)。免疫组化结果显示: 在 55 例胃炎标本中, 有 30 例为阳性, 阳性率为 54.5%; 在 61 例肠化生胃癌标本中, 有 56 例为阳性, 阳性率占 91.8%; 且在 61 例胃癌标本中, 有 36 例为阳性, 阳性率占 59.0%(图 2)。

2.2 统计学分析

通过 SPSS17.0 进行分析显示, FXR 在胃肠化生组织中的表达明显高于其在胃炎组织中的表达(P < 0.05), 并且, FXR 进一步在胃癌组织中的表达显著低于肠化生组织(P < 0.05)。此

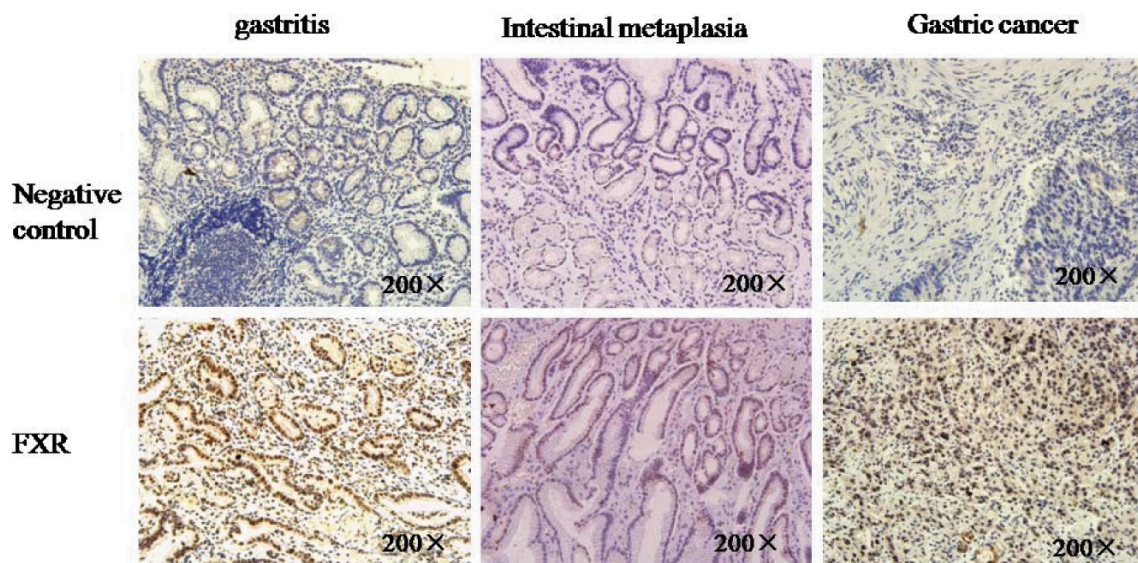


图 1 FXR 在胃炎、肠化生、胃癌组织中的表达

Fig.1 The expression of FXR in gastritis, intestinal metaplasia and gastric cancer tissues

外,我们还对其它病例参数进行了分析,未发现 FXR 的表达与年龄、性别、肿瘤分期等有明显相关性(表 1,2,3)。

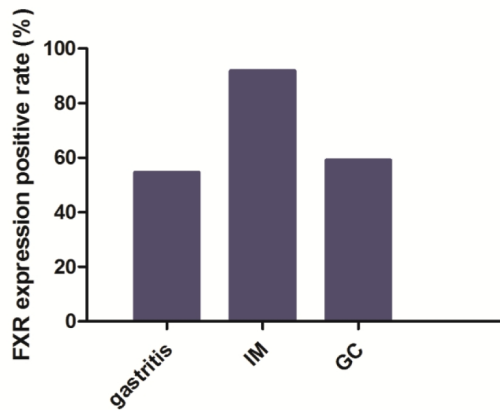


图 2 FXR 在胃炎、肠化生、胃癌组织中的表达阳性率

Fig.2 The positive rate of FXR expression in gastritis, intestinal metaplasia and gastric cancer tissues

表 1 FXR 的表达与胃炎组织中其它病例参数的关系

Table 1 The relationship between FXR expression and parameters of gastritis

Parameters	FXR			P value
	Total numberr	Negative(-)	Positive(+)	
Age				
<60	43	20	23	0.766
>=60	12	5	7	
Gender				
Male	33	14	19	0.580
Female	22	11	11	

表 2 FXR 的表达与胃粘膜肠化生组织中其它病例参数的关系

Table 2 The relationship between FXR expression and parameters of gastric mucosal intestinal metaplasia

Parameters	FXR			P value
	Total numberr	Negative(-)	Positive(+)	
Age				
<60	37	3	34	0.975
>=60	24	2	22	
Gender				
Male	42	4	38	0.574
Female	19	1	18	

型胃癌被认为与慢性胃炎、胃萎缩、肠化生、不典型增生、胃癌等一系列发展过程密切相关。

本研究首次对 FXR 在胃炎、胃粘膜肠化生及胃癌这一系列发展过程中的表达进行研究,且 FXR 在肠化生组织中显著高于胃炎组织,其在胃癌中与胃粘膜肠化生相比又明显降低,FXR 在胃癌发生中的具体机制需在后续工作中进一步进行探索。总之,本研究表明 FXR 的表达与胃粘膜肠化生及胃癌的发生密切相关,其在胃癌尤其是肠型胃癌发生中的作用不容忽视,有望成为胃癌发生的分子标志物,希望进一步的研究能证实其对胃癌的诊断及治疗有所帮助。

3 讨论

本研究发现 FXR 的表达在胃粘膜肠化生组织中明显高于胃炎组织,而在胃癌组织中 FXR 的表达有较之胃粘膜肠化生组织显著降低,其差异均具有统计学意义。对其它病例参数如年龄、性别、肿瘤分期等进行分析,结果未发现 FXR 与性别、年龄、肿瘤分期等具有明显相关性。提示:FXR 可能在胃粘膜肠生以致胃癌的发生中起到重要作用。由于肠化生为肠型胃癌的主要前期阶段,因此,研究相对正常胃粘膜、胃粘膜肠化生以及胃癌发生过程中的关键分子变化显得至关重要。

法尼脂衍生物 X 受体 FXR 被认为是参与消化道肿瘤发生的重要分之一,包括食管癌、胰腺癌、肝癌,以及结肠癌^[16,20,21]。FXR 被鉴定为胆汁酸受体,且为调控胆汁酸合成的生物感受器^[22]。在近几十年里,贲门部胃癌的发生率持续性增加。其中一个病因假设便是与胆汁酸分泌异常密切相关的胃食管返流病^[17]。根据 Lauren 分型法,胃癌从形态学上被分为肠型和弥漫型^[23]。肠

参考文献(References)

- [1] Dang LH, Chen F, Knock SA, et al. CDX2 does not suppress tumorigenicity in the human gastric cancer cell line MKN45 [J]. Oncogene, 2006, 25(14):2048-2059
- [2] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1):10-29
- [3] Zhu AL, Sonnenberg A. Is gastric cancer again rising? [J]. J Clin Gastroenterol, 2012, 46(9):804-806
- [4] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90

表 3 FXR 的表达与胃癌组织中其它病例参数的关系

Table 3 The relationship between FXR expression and parameters of gastric cancer

Parameters	FXR			P value
	Total number	Negative(-)	Positive(+)	
Age				
<60	22	7	15	0.275
≥60	39	18	21	
Gender				
Male	42	17	25	0.905
Female	19	8	11	
Classification				
Well differentiated	20	7	13	0.643
Moderately differentiated	29	14	15	
Poorly differentiated	10	4	6	

- [5] Deng J, Liang H, Zhang R, et al. STAT3 is associated with lymph node metastasis in gastric cancer[J]. Tumour Biol, 2013, 34(5):2791-2800
- [6] Lee HJ, Nam KT, Park HS, et al. Gene expression profiling of metaplastic lineages identifies CDH17 as a prognostic marker in early stage gastric cancer[J]. Gastroenterology, 2010, 139(1):213-225 e3
- [7] Shiotani A, Iishi H, Uedo N, et al. Helicobacter pylori-induced atrophic gastritis progressing to gastric cancer exhibits sonic hedgehog loss and aberrant CDX2 expression [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2006, 24 Suppl 4:71-80
- [8] Forman BM, Goode E, Chen J, et al. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites[J]. Cell, 1995, 81(5):687-693
- [9] Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor[J]. Science, 1999, 284(5418):1365-1368
- [10] Cariou B, Staels B. FXR: a promising target for the metabolic syndrome? [J]. Trends Pharmacol Sci, 2007, 28(5):236-243
- [11] Laffitte BA, Kast HR, Nguyen CM, et al. Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor[J]. J Biol Chem, 2000, 275(14):10638-10647
- [12] Wang YD, Chen WD, Moore DD, et al. FXR: a metabolic regulator and cell protector[J]. Cell Res, 2008, 18(11):1087-1095
- [13] De Gottardi A, Touri F, Maurer CA, et al. The bile acid nuclear receptor FXR and the bile acid binding protein IBABP are differently expressed in colon cancer[J]. Dig Dis Sci, 2004, 49(6):982-989
- [14] Swales KE, Korbonits M, Carpenter R, et al. The farnesoid X receptor is expressed in breast cancer and regulates apoptosis and aromatase expression[J]. Cancer Res, 2006, 66(20):10120-10126
- [15] Yang F, Huang X, Yi T, et al. Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor [J]. Cancer Res, 2007, 67(3):863-867
- [16] Lee JY, Lee KT, Lee JK, et al. Farnesoid X receptor, overexpressed in pancreatic cancer with lymph node metastasis promotes cell migration and invasion[J]. Br J Cancer, 2011, 104(6):1027-1037
- [17] Carr JS, Zafar SF, Saba N, et al. Risk factors for rising incidence of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma[J]. J Gastrointest Cancer, 2013, 44(2):143-151
- [18] Kim R, Weissfeld JL, Reynolds JC, et al. Etiology of Barrett's metaplasia and esophageal adenocarcinoma[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1997, 6(5):369-377
- [19] Shimizu M, Shimoda T, Sipponen P, et al. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia[J]. Gut, 2000, 47(2):251-255
- [20] Guan B, Li H, Yang Z, et al. Inhibition of farnesoid X receptor controls esophageal cancer cell growth in vitro and in nude mouse xenografts[J]. Cancer, 2013, 119(7):1321-1329
- [21] Martinez-Becerra P, Monte I, Romero MR, et al. Up-regulation of FXR isoforms is not required for stimulation of the expression of genes involved in the lack of response of colon cancer to chemotherapy[J]. Pharmacol Res, 2012, 66(5):419-427
- [22] Tu H, Okamoto AY, Shan B. FXR, a bile acid receptor and biological sensor[J]. Trends Cardiovasc Med, 2000, 10(1):30-35
- [23] Bai Z, Ye Y, Chen D, et al. Homeoprotein Cdx2 and nuclear PTEN expression profiles are related to gastric cancer prognosis[J]. APMIS, 2007, 115(12):1383-1390