

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.15.043

MIF mRNA 在胃窦胃癌组织中的表达及其与幽门螺杆菌感染的关系

刘成勇¹ 夏云玲¹ 彭琼¹ 李娟² 张雯¹

(1 合肥市第一人民医院消化内科 安徽 合肥 230032; 2 合肥市第一人民医院肿瘤科 安徽 合肥 230032)

摘要 目的:探讨胃窦胃癌组织中巨噬细胞移动抑制因子 MIF mRNA 的表达,并分析其与幽门螺杆菌感染的关系,分析二者在胃窦胃癌发生中的相关性。**方法:**选取 2013 年 1 月至 2014 年 12 月于我院收治的胃窦胃癌患者 30 例作为观察组,另随机选择 10 例胃窦胃炎患者作为对照组,采用 ¹⁴C-尿素呼气试验(UBT)检测各组患者有无幽门螺杆菌感染,定量逆转录 PCR 检测观察组患者及对照组患者组织中 MIF mRNA 表达。统计分析不同组织中 MIF mRNA 表达与幽门螺杆菌感染之间的关系。**结果:**观察组组织中 MIF mRNA 的表达为(1.09±0.11),高于对照组组织的(0.21±0.08),差异具有统计学意义(P<0.05)。进一步亚组分析,观察组合并幽门螺杆菌感染组织中 MIF mRNA 的表达为(1.24±0.14),高于非幽门螺杆菌感染者的(1.09±0.11),差异具有统计学意义(P<0.05)。**结论:**MIF mRNA 在胃窦胃癌组织中高表达,幽门螺杆菌感染促进了 MIF mRNA 的表达,共同促进了胃窦胃癌的发生发展。

关键词:巨噬细胞移动抑制因子;幽门螺杆菌;胃窦胃癌;胃窦胃炎

中图分类号:R735.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)15-2965-04

Expressions of MIF mRNA in Gastric Antrum Cancer and Its Relationship with *Helicobacter Pylori* Infections

LIU Cheng-yong¹, XIA Yun-ling¹, PENG Qiong¹, LI Juan², ZHANG Wen¹

(1 Department of Gastroenterology, The First People's Hospital of Hefei, Hefei, Anhui, 230032, China;

2 Department of Oncology, The First People's Hospital of Hefei, Hefei, Anhui, 230032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the human MIF mRNA expression in tissues from patients with gastric antrum cancers and to analyze its relationship with *Helicobacter pylori* infections in the development of gastric antrum cancer. **Methods:** 30 patients with gastric antrum cancer in our hospital from January 2013 to December 2014 were selected as observation group, and 10 patients with gastric antral gastritis were randomly selected as control group. ¹⁴C-urea breath test (UBT) was used to detect *Helicobacter pylori* infections or not in each group, and quantitative reverse transcription PCR was used to detect the levels of MIF mRNA expression in the tissues from the patients of the observation group and the control group. Statistically analysed the relationship between the expression of MIF mRNA in different tissues and *Helicobacter pylori* infection. **Results:** The level of MIF mRNA expression in tissues from observation group was (1.09±0.11), which was significantly higher in tissues from control group (0.207±0.08), the difference was statistically significant (P<0.05). Trough further subgroup analysis, the levels of MIF mRNA expression in Hp infection patients with gastric antrum cancer were (1.24±0.14), which were significantly higher those in non-Hp infection patients (1.09±0.11), the difference was statistically significant (P<0.05). **Conclusion:** MIF mRNA is highly expressed in gastric antrum carcinoma, and *Helicobacter pylori* infection promotes the expression of MIF mRNA, and they promote together the development of gastric antrum cancer.

Key words: Macrophage migration inhibitory factor; *Helicobacter pylori*; Gastric antrum cancer; Gastric antrum gastritis

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

Article ID: 1673-6273(2017)15-2965-04

前言

巨噬细胞移动抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) 是一种炎症细胞因子,具有多向性生物学功能,并与多种恶性肿瘤的发生、发展过程关系密切^[1]。胃癌是我国常见的消化系统恶性肿瘤之一,胃癌的发生是多阶段、多基因调控的进展性过程^[2]。幽门螺杆菌是人类胃癌的 I 类致癌原,在胃癌的发生发展中起重要致病作用^[3]。诸多研究已经发现^[4],胃炎、胃

癌的好发部位也是幽门螺杆菌在胃内的寄居部位,这显示了两者之间的相关性,根除幽门螺杆菌可延缓胃粘膜上皮癌变。国内外已有研究发现幽门螺杆菌和 MIF 在胃癌发生发展过程中的作用,但有关 MIF 与幽门螺杆菌感染关系的研究甚少^[5]。本研究探讨幽门螺杆菌感染与 MIF mRNA 表达水平的关系,旨在分析两者在胃窦胃癌中的关系,为临床治疗胃癌提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 一般资料

选择 2013 年 1 月至 2014 年 12 月于我院南区滨湖医院门诊初次就诊并行胃镜检查病理诊断胃窦胃癌患者 30 例作为观

作者简介:刘成勇(1981-),男,硕士,主治医师,从事消化道早癌方面的研究,E-mail: maguobin159@sina.com

(收稿日期:2017-01-22 接受日期:2017-02-17)

察组。纳入标准:患者均行胃镜检查且病理诊断为胃窦胃癌,所有标本的组织病理结果均经过2位病理医生证实;未采取药物治疗;临床资料完整排除标准:肝肾功能严重障碍者,患有精神疾病者;其中男20例,女10例,年龄28-86岁,平均年龄(61.5 ± 18.5)岁;幽门螺杆菌感染阳性胃窦胃癌17例,幽门螺杆菌感染阴性胃窦胃癌13例。另随机选择10例胃窦胃炎患者做为对照组,其中男6例,女4例,年龄29-87岁,平均年龄(60.8 ± 19.2)岁。两组患者性别、年龄比较无统计学差异($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 幽门螺杆菌检测 幽门螺杆菌采用¹⁴C-尿素呼气试验(UBT)^[9]进行检测, ≥ 150 dpm为阳性。

1.2.2 引物设计与合成 MIF引物序列(上海生工生物工程公司)为,上游:5'-CGC GGATCCTGCGGCTCTTAGGCGAAGG-3',下游:5'-CGCCATATGCCGATGTTCATCGTAAACAC-3',扩增片段长度为353bp,内参 β -actin引物(上海生工生物工程公司):上游5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGG-3',下游:3'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-5',扩增片段长度为868bp。

1.2.3 组织标本准备及总RNA提取 经胃镜检查取新鲜胃窦标本后迅速放至无RNA酶EP管中,-80℃保存。使用Trizol RNA提取液,按照其说明书对胃窦胃癌组织和胃窦胃炎组织提取总RNA,通过甲醛变性凝胶电泳定性和紫外分光光度仪定量。

1.2.4 RT-PCR 取总RNA 1 μ g进行逆转录 MIF mRNA的PCR反应:94℃预变性5 min,94℃变性45 s,55℃退火45 s,72℃延伸60 s,共35个循环,最后72℃10 min末延伸。吸取10 μ L PCR扩增产物,琼脂糖凝胶电泳鉴定结果。将PCR产物电泳后凝胶置于UVP凝胶成像分析仪内,使用图像分析软件对电泳条带进行灰度扫描,分别获得MIF和 β -actin产物条带的灰度值,计算两者比值,即得到MIF-mRNA表达的相对值。

1.3 观察指标

对比观察组和对照组组织的MIF mRNA表达水平,以及比较观察组中合并幽门螺杆菌感染与非幽门螺杆菌感染组织中MIF mRNA的表达。

1.4 统计学处理

应用SPSS20.0统计软件对所得数据进行统计学处理,MIF mRNA表达、平均年龄等计量资料均以($\bar{x} \pm s$)表示,进行配对t检验,性别比例等计数资料以例数表示,采用卡方检验,检验标准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

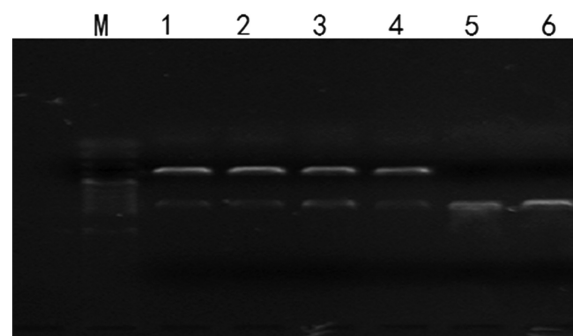
2.1 两组 MIF mRNA 比较

MIF mRNA在观察组和对照组组织中均有表达,其表达水平分别为(1.09 ± 0.11)和(0.21 ± 0.08),观察组组织MIF mRNA表达明显高于对照组组织,差异有统计学意义($t=3.856, P=0.000$)。

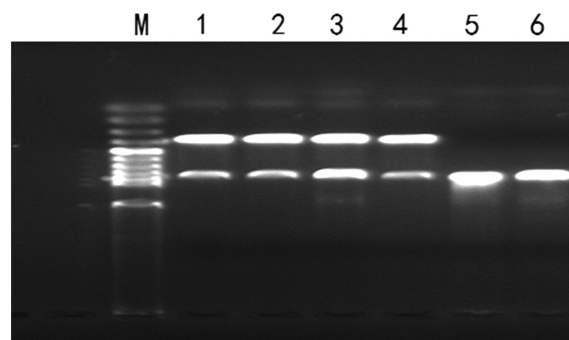
2.2 观察组合并幽门螺杆菌感染与非幽门螺杆菌感染组织中 MIF mRNA 的表达

MIF mRNA在观察组合并幽门螺杆菌感染和非幽门螺杆菌感染组织中均较高表达,其表达水平分别为(1.24 ± 0.14)和

(1.09 ± 0.11)(见图2);观察组合并幽门螺杆菌感染组织中MIF mRNA的表达较非幽门螺杆菌感染组升高,差异具有统计学意义($t=2.632, P=0.008$)。



Note: Figure 1, RT-PCR results: 1,2 tracks show MIF mRNA expression in *Helicobacter pylori* (-) gastric antral cancer; 3,4 tracks show MIF mRNA expression in gastric antral cancer; 5, 6 tracks show β -actin internal blank control.



Note: Figure 2, RT-PCR results: 1,2 tracks show MIF mRNA expression in *Helicobacter pylori* (+) gastric antral cancer; 3,4 tracks show MIF mRNA expression in *Helicobacter pylori* (-) gastric antral cancer; 5,6 tracks show β -actin internal blank control.

3 讨论

巨噬细胞移动抑制因子(MIF)是一种来源于活化T淋巴细胞和巨噬细胞的细胞因子,具有多向性种生物学功能,可以介导炎症反应和免疫反应^[6]。近年来,很多研究发现MIF这一特殊的细胞因子与多种疾病关系密切^[7,8]。并且,MIF与多种消化道炎症性疾病如慢性乙型病毒性肝炎、重症急性胰腺炎,多种消化系统肿瘤如胃癌、食管癌、肝癌的发生、发展和预后关系密切^[9]。已有研究发现^[10],MIF在多种恶性肿瘤中的作用机制为MIF促进肿瘤细胞增殖、侵袭和转移,抑制其凋亡;通过上调VEGF、TGF- β 、PDGF等的表达促进肿瘤血管生成^[11];通过上调MIF、基质金属蛋白酶(MMPs)等增加了癌细胞对周围基质以及基底膜的溶解,使得癌细胞更容易向周围组织侵袭^[12]。胃粘膜由胃炎、肠化生到胃上皮癌变是一个多阶段、多因素、多基因调控的缓慢过程^[13]。由早期的可逆性改变到后期的不可逆改变,幽门螺杆菌和MIF细胞因子在这一过程中起着重要的促进作用。一项较早的研究发现^[14],MIF mRNA和MIF蛋白的表达与胃粘膜癌变程度正相关;随着胃粘膜组织学恶变程度加重而增加,提示MIF蛋白与胃粘膜上皮细胞增殖及癌变过程密切相关。MIF通过影响胃癌细胞的增殖及侵袭转移等诸多环节

在胃癌的发生、发展过程中起着非常重要的作用^[15]。反之,国内外已有研究开始针对 MIF 这一靶点,通过阻断 MIF 的表达,抑制肿瘤的进展^[16]。Kim BS^[17]等发现,MIF 蛋白在鼻咽癌高转移细胞株中表达量增高;MIF 降低粘附蛋白的表达,减弱鼻咽癌细胞间的粘附性,从而提高鼻咽癌细胞侵袭迁移能力。该研究还发现,MIF 的表达受 miR-451 的调控,miR-451 能够抑制 MIF 的表达;Transwell 实验证实 miR-451 通过下调 MIF 的表达,抑制了鼻咽癌细胞的侵袭迁移能力^[18]。我们前期的研究发现,MIF 互变异构酶活性抑制剂 ISO-1 通过抑制该酶活性,下调 MIF 蛋白的分子生物学行为,从而抑制大肠癌细胞的增殖、血管生成和侵袭、转移能力。

幽门螺杆菌感染与胃癌的发生关系密切,被认为是最重要的致癌因子^[19]。我国是幽门螺杆菌感染率较高的国家之一,成人幽门螺杆菌的感染率约为 40%-60%^[20];并且,我国胃癌的新发病例占全球胃癌病例的 40%^[21]。胃癌的发生是一个进展性过程,其分多个阶段,并受多个基因调控。流行病学资料提示,胃窦是胃癌发生的主要部位,占 50%以上^[22]。幽门螺杆菌感染在胃窦胃癌的发生过程中起着重要的诱发和促进作用。在幽门螺杆菌感染的胃癌高风险人群中进行根治性治疗能延缓或部分逆转胃上皮组织的萎缩和肠化、降低胃癌的危险率^[23]。幽门螺杆菌感染在胃癌的发生发展过程中的作用可能与幽门螺杆菌促进多种细胞信号转导途径有关;通过不同多种细胞因子的表达,诱导胃粘膜上皮细胞的过度增殖。而且致癌物质易攻击处于过度增殖状态的细胞,导致 DNA 畸变的危险增加,从而促进胃癌的发生。

本次研究发现,在胃窦胃癌组织中 MIF mRNA 高表达,与胃窦胃炎对照组相比具有显著性差异,提示 MIF 与胃窦胃癌的发生关系密切。并且,合并幽门螺杆菌感染的胃窦胃癌组织中 MIF mRNA 的表达明显高于非幽门螺杆菌感染胃癌或胃窦胃炎患者,提示 MIF mRNA 的表达与幽门螺杆菌呈正相关。MIF 在胃癌的发生发展这一复杂过程中起到重要的促进作用,这在幽门螺杆菌感染组织中更为明显。我们通过思考 MIF 的生物学行为,分析幽门螺杆菌感染、MIF mRNA 的表达与胃癌之间的关系。众所周知,肿瘤新生血管的生成与 VEGF 的表达有关,VEGF 表达与肿瘤的转移潜能呈正相关;MMPs 作为唯一可降解胶原纤维的一种酶类,可参与肿瘤细胞达到降解基底膜和细胞外基质的效果。在 MMPs 成员中,MMP-9 直接参与肿瘤侵袭转移过程,并发挥最重要的作用。Graham A^[24]等发现,在胃癌组织中,MIF、MMP-9、VEGF 蛋白的表达显著高于癌旁正常组织;MIF、MMP-9 均影响着淋巴转移及肿瘤浸润深度。胃癌组织中幽门螺杆菌 L 型阳性组中 MIF、MMP-9、VEGF 蛋白表达阳性率高于幽门螺杆菌 -L 阴性组,且幽门螺杆菌感染与 MIF、MMP-9 和 VEGF 表达均呈正相关关系。刘展艳^[25]等的研究同样发现,在胃癌组织中 MIF 的表达量显著高于癌旁组织;MIF 的表达与胃癌的分化程度和 TNM 临床分期有关。Zeiner PS 等^[26]发现,胃腺癌患者术前 MIF 高于对照组,术后 MIF 含量与对照组接近;胃癌的病理分级越高,血清中 MIF 的含量逐渐增加。

综上所述,幽门螺杆菌感染促进了胃窦胃癌组织中 MIF mRNA 的表达,从而促进了胃窦胃癌的发生、发展。其机制可能为幽门螺杆菌感染通过 MIF 这一特殊的细胞因子,上调胃窦

胃癌细胞表达 MMP-9、VEGF 等,促进胃癌细胞的增殖、抑制其凋亡,促进肿瘤血管生成与细胞外基质溶解,共同促进胃窦胃癌的发生发展。在临床上用这一发现可以进一步证实利用根除幽门螺杆菌治疗能够预防胃癌的发生。并且,临床可通过检测血清或组织内 MIF 蛋白的表达,可以监测胃窦粘膜从炎症到胃癌的动态变化、监测胃窦胃癌术后复发与否;并且,针对 MIF 这一细胞因子的靶向治疗或许可以作为胃癌综合治疗的一部分。

参考文献(References)

- [1] Giannoni É, Schneider A, Calandra T, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF), a regulator of neonatal innate immune response [J]. Med Sci (Paris), 2016, 32(12): 1062-1064
- [2] 密玉帅,岑刚,张威浩,等.长链非编码 RNA 在胃癌中的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(13): 2548-2551
Mi Yu-shuai, Cen Gang, Zhang Wei-hao, et al. The Research Progress of lncRNAs in Gastric Cancer [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16(13): 2548-2551
- [3] Shahi H, Bahreiny R, Reisi S. *Helicobacter pylori* and Its Virulence Factors' Effect on Serum Oxidative DNA Damages in Adults With Dyspepsia[J]. Acta Med Iran, 2016, 54(11): 704-708
- [4] Tsujimae M, Yamashita H, Hashimura H, et al. A Comparative Study of a New Class of Gastric Acid Suppressant Agent Named Vonoprazan versus Esomeprazole for the Eradication of *Helicobacter pylori* [J]. Digestion, 2016, 94(4): 240-246
- [5] 李晨,王卫星,左腾,等.MIF 抑制剂 ISO-1 在妊娠大鼠重症急性胰腺炎肺损伤中的作用[J].海南医学, 2016, (2): 180-183
Li Chen, Wang Wei-xing, Zuo Teng, et al. Effects of MIF inhibitor ISO-1 on lung injury in rat models of acute pancreatitis in pregnancy [J]. Hainan Medical Journal, 2016, (2): 180-183
- [6] Ohta S, Yaguchi T, Okuno H, et al. CHD7 promotes proliferation of neural stem cells mediated by MIF[J]. Mol Brain, 2016, 9(1): 96
- [7] 赵光磊,谭辉,田茂松,等.食管鳞癌组织中巨噬细胞移动抑制因子、金属蛋白酶 -9 和血管内皮生长因子的表达意义[J].中国老年学杂志, 2015, 35(24): 7096-7098
Zhao Guang-lei, Tan Hui, Tian Mao-song, et al. Expression and significance of macrophage migration inhibitory factor, matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2015, 35(24): 7096-7098
- [8] 赵夏平,李晓云,于晓辉,等.MIF、IL-17、IL-10 在肝细胞癌组织中的表达及临床意义[J].临床肿瘤学杂志, 2014, 19(4): 307-311
Zhao Xia-ping, Li Xiao-yun, Yu Xiao-hui, et al. Expression of MIF, IL-17 and IL-10 in hepatocellular carcinoma and their clinical significance[J]. Chinese Clinical Oncology, 2014, 19(4): 307-311
- [9] Yoo SA, Leng L, Kim BJ, et al. MIF allele-dependent regulation of the MIF coreceptor CD44 and role in rheumatoid arthritis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(49): E7917-E7926
- [10] Salem SA, Asaad MK, Elsayed SB, et al. Evaluation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) levels in serum and lesional skin of patients with alopecia areata [J]. Int J Dermatol, 2016, 55 (12): 1357-1361
- [11] Bloom J, Metz C, Nalawade S, et al. Identification of Igaratimod as

- an Inhibitor of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) with Steroid-sparing Potential[J]. J Biol Chem, 2016, 291(51): 26502-26514
- [12] Zhang Y, Gu R, Jia J, et al. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor (MIF) tautomerase activity suppresses microglia-mediated inflammatory responses [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2016, 43(11): 1134-1144
- [13] Yin S, Huang J, Li Z, et al. The Prognostic and Clinicopathological Significance of Tumor-Associated Macrophages in Patients with Gastric Cancer: A Meta-Analysis[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0170042
- [14] Wang WM, Liu JC. Effect and molecular mechanism of mir-146a on proliferation of lung cancer cells by targeting and regulating MIF gene[J]. Asian Pac J Trop Med, 2016, 9(8): 806-811
- [15] Yang S, He P, Wang J, et al. A Novel MIF Signaling Pathway Drives the Malignant Character of Pancreatic Cancer by Targeting NR3C2 [J]. Cancer Res, 2016, 76(13): 3838-3850
- [16] 曾钢,李彩东,吴斌,等.乙型肝炎肝硬化患者外周血 MIF、IL-17 和 IL-10 检测的临床意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(9): 1205-1206, 1209
Zeng Gang, Li Cai-dong, Wu Bin, et al. Clinical significance of detecting peripheral blood MIF, IL-17 and IL-10 in patients with liver cirrhosis [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2015, 36(9): 1205-1206, 1209
- [17] Kim BS, Stoppe C, Grieb G, et al. The clinical significance of the MIF homolog d-dopachrome tautomerase (MIF-2) and its circulating receptor (sCD74) in burn[J]. Burns, 2016, 42(6): 1265-1276
- [18] Fukaya R, Ohta S, Yaguchi T, et al. MIF Maintains the Tumorigenic Capacity of Brain Tumor-Initiating Cells by Directly Inhibiting p53 [J]. Cancer Res, 2016, 76(9): 2813-2823
- [19] Kountouras J, Polyzos SA, Zeglinas C, et al. *Helicobacter pylori*-related metabolic syndrome as predictor of progression to esophageal carcinoma in a subpopulation-based Barrett's esophagus cohort [J]. Gastrointest Endosc, 2017, 85(2): 462-463
- [20] 王建军,王泽友,姚永良,等.幽门螺杆菌作用巨噬细胞后诱导的炎症反应研究[J].中国免疫学杂志, 2015, 31(6): 737-740
Wang Jian-jun, Wang Ze-you, Yao Yong-liang, et al. Research on inflammatory response of *Helicobacter pylori*-treated macrophages [J]. Chinese Journal of Immunology, 2015, 31(6): 737-740
- [21] 王巍,潘志峰,唐伟跃,等.胃癌患者血红蛋白的表面增强拉曼光谱分析[J].光谱学与光谱分析, 2015, 35(12): 3402-3405
Wang Wei, Pan Zhi-feng, Tang Wei-yue, et al. Research on Early Diagnosis of Gastric Cancer by the Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Human Hemoglobin [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2015, 35(12): 3402-3405
- [22] Tustumi F, Bernardo WM, Dias AR, et al. Detection value of free cancer cells in peritoneal washing in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. Clinics (Sao Paulo), 2016, 71(12): 733-745
- [23] Ahn JS, Sinn DH, Son HJ, et al. Letter: *Helicobacter pylori*-related non-alcoholic fatty liver disease with concomitant metabolic syndrome as risk factor for colorectal neoplasia - authors' reply [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2017, 45(4): 577-578
- [24] Graham A, Falcone T, Nothnick WB. The expression of microRNA-451 in human endometriotic lesions is inversely related to that of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and regulates MIF expression and modulation of epithelial cell survival [J]. Hum Reprod, 2015, 30(3): 642-652
- [25] 刘展艳,赵子潇,易纯,等.miR-451 下调 MIF 的表达并抑制其促鼻咽癌细胞浸润和转移的作用[J].现代肿瘤医学, 2016, 24(4): 527-530
Liu Zhan-yan, Zhao Zi-xiao, Yi Chun, et al. miR-451 downregulates the expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and inhibits the effect that MIF promotes the invasion and metastasis in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Journal of Modern Oncology, 2016, 24(4): 527-530
- [26] Zeiner PS, Preusse C, Blank AE, et al. MIF Receptor CD74 is Restricted to Microglia/Macrophages, Associated with a M1-Polarized Immune Milieu and Prolonged Patient Survival in Gliomas [J]. Brain Pathol, 2015, 25(4): 491-504