

MYCT-1 基因在胃腺癌组织中的表达及意义

王梦然

(内蒙古自治区肿瘤医院 检验科 010010)

摘要:目的:到目前为止,胃癌的确切发病机制仍不清楚,缺乏相应的诊断标志物和治疗靶点,因此研究胃癌相关基因的表达、意义以及分析胃癌不同的分型、临床分期与 MYCT-1 表达水平的相关性, MYCT-1 在胃癌诊断、预后判断和治疗中的应用价值极其重要。方法:收集胃癌患者手术切除标本 90 例,通过免疫组化检测 MYCT-1 基因表达水平,通过统计学软件分析不同胃癌分型,临床分期与 MYCT-1 表达水平的相关性。结果:MYCT-1 阳性染色主要表达于组织的细胞胞浆,呈棕黄色颗粒,在胃腺癌组织中均有表达。MYCT-1 在胃腺癌中的强阳性表达率为 55.6% (50/90)。对临床分期胃腺癌患者癌组织 MYCT-1 呈低表达水平,差异无统计学意义 ($p < 0.05$)。结论:胃腺癌组织中 MYCT-1 基因呈阳性表达,而 MYCT-1 基因的表达与患者临床分期均无相关性。而对患者的性别、年龄、淋巴结的转移有无相关性还需进一步分析。关键词:MYCT-1; 胃腺癌; 免疫组化

Detection of MYCT-1 expression in Gastric adenocarcinoma Tissue

Objective: To detect the expression of MYCT-1 gene in Gastric adenocarcinoma Tissue and the effect of MYCT-1 detection in gastric cancer diagnosis, treatment and prognostic. **Methods:** Immunohistochemical method was performed to determine the expression of MYCT-1 in 90 Gastric adenocarcinoma Tissue and use Spss13.0 software statistical results. **Results:** In Gastric adenocarcinoma Tissue and the normal tissue, the positive expression of MYCT-1 was in the cells which have brown granules in their cytoplasm. The positive ratios and the levels of the expression of MYCT-1 were not related to clinical stage and Gastric adenocarcinoma Tissue ($p < 0.05$). **Conclusion:** The positive ratios of the MYCT-1 in Gastric adenocarcinoma Tissue lower. And the expression of MYCT-1 was not related of Gastric adenocarcinoma Tissue MYCT-1 was down-regulated in the Gastric adenocarcinoma Tissue tissues which suggest that. MYCT-1 may be associated with the development of Gastric adenocarcinoma Tissue.

Key words: MYCT-1 gastric cancer immunohistochemical

前言 胃癌是发病率最高的恶性肿瘤之一,在我国其发病率仅次于肺癌和肝癌居第三位。在我国每年新发胃癌患者40万人,死亡人数达30万人^[1]。根据胃癌发生的病因学研究表明,胃癌的发生与环境因素和遗传因素息息相关。遗传因素研究证实胃癌的发生是一个多步骤多阶段的过程,涉及到基因组的改变,微卫星不稳定性,癌基因的激活和抑癌基因的失活等等^[2-4]。但是到目前为止,胃癌的确切发病机制仍不清楚,缺乏相应的诊断标志物和治疗靶点,因此研究胃癌相关基因的表达及意义极其重要。

MYCT-1 基因是一个新克隆的肿瘤相关基因, MYCT-1 是 C-myc 的靶基因, c-myc 的功能是当前分子肿瘤学的研究热点之一,可能是信号传导途径中的一个重要成员,已有研究表明其下游基因广泛参与细胞周期调控、细胞恶性转化、细胞凋亡、细胞分化、促进基因不稳定等过程,与多种肿瘤的形成相关,提示 MYCT-1 可能具有相关的功能。在前期研究中我们已经证实了 MYCT-1 基因与胃癌发生、发展的相关性,但其在胃癌诊断和治疗中的临床应用价值还需要进一步的验证。本研究将通过大量胃癌患者标本分析胃癌不同的分型、临床分期与 MYCT-1 表达水平的相关性,通过病例随访分析 MYCT-1 在胃癌诊断、预后判断和治疗中的应用价值。

实验材料与方法

一、材料

(1) 收集胃癌患者手术切除标本 90 例,进行福尔马林固定,石蜡包埋、切片、免疫组化检测。

(2) 进行病例随访,分析 MYCT-1 在胃癌诊断、预后判断、疗效、临床检测中的价值。

(3) 通过统计学软件 spss13.0 分析不同胃癌分型,临床分期与 MYCT-1 表达水平的相关性。实验结果均以均数 \pm 标准差表示,相关性分析采用线性相关与回归法,以 $P < 0.05$ 为显著性检验水准。

二、试剂

免疫组化试剂盒

第二代免疫组织化学 EnVision™ plus 光谱试剂盒

三、方法

免疫组化染色

1、将胃腺癌组织芯片先脱蜡至3%过氧化氢封闭30min,阻断内源性过氧化 物酶活性。

2、用PBS (pH7.4) 磷酸盐缓冲液溶解,放入柠檬酸内用火加热至沸腾有气泡产生 (重复2~3次) 这样可以使抗原充分暴露,进行修复抗原。

3、倍比稀释 1:100,滴加倍比1:100稀释的一抗 (MYCT-1抗体),4℃过夜。

4、滴加生物素标记的辣根过氧化物酶工作液。

5、室温孵育30min, DAB显色。

6、冲洗,苏木素复染、脱水、透明、封片后在显微镜下观察,截取其具有代表性视野的图片照相并记录。

四、结果判断

光镜下胞浆内有棕黄色颗粒为阳性细胞,即MYCT-1的表达。每个位点随机选取1~2个高倍视野 (中倍放大),每个视野计数100个细胞,取其均值。以阳性染色强度和阳性细胞所占比例综合判断染色结果。阳性染色强度按下列标准评分:无细胞染色 (阴性) 为0分,淡黄色颗粒染色 (弱阳性) 为1分,棕黄色颗粒染色 (阳性) 为2分,棕褐色颗粒染色 (强阳性) 为3分。阳性细胞所占比例评定标准:阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为0分,阳性细胞数 11%~50% 为1分,阳性细胞数 51%~75% 为2分,阳性细胞数 $> 75\%$ 为3分。阳性标记分数=染色强度评分值 \times 阳性细胞比例分值。根据阳性标记分数将结果分为4个等级:0分为 (-)、1~2分为 (+)、3~4分为 (++)、5~9分为 (+++)。++、+++定义为高表达。

五、统计学分析

所有统计学处理均采用 SPSS 13.0 完成,癌组和癌旁组的阳性标记分数采用均数 \pm 标准差 ($\bar{X} \pm s$) 表示,两样本组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。等级非参数多样本资料比较采用 Kruskal-Wallis 检验,如 $P > 0.05$,说明多样本资料之间比较没有差异,无统计学意义;如 $P < 0.05$,说明多样本资料之间比较有差异,具有统计学意义,可以继续进行两两样本比较。

结果

一、MYCT-1 免疫组化染色结果

免疫组化结果显示MYCT-1在胃腺癌胞浆中表达居多,呈棕黄色颗粒分布,MYCT-1在胃腺癌组、癌旁对照组中阳性表达率分别为55.6% (50/90), 75.6% (68/90) 见图2-3。

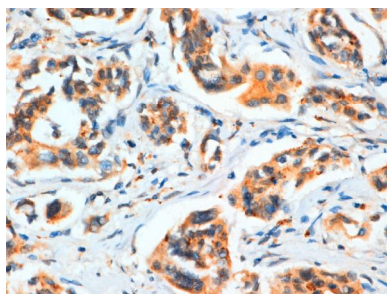


图2 MYCT-1在胃癌组织中阳性表达 (SP法中倍放大)

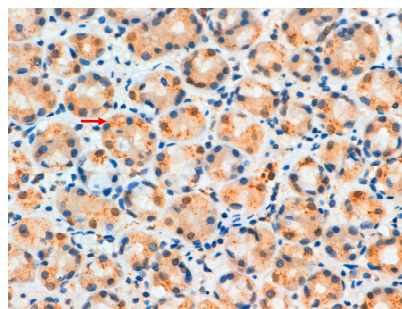


图3 MYCT-1在胃癌癌旁正常组织中阳性表达 (SP法中倍放大)

二、MYCT-1 阳性表达程度与临床相关指标分析结果

胃癌组织MYCT-1的阳性表达程度与胃癌的性别、年龄、淋巴结转移、临床分期之间的结果,见表2。

表2 MYCT-1阳性表达程度与胃癌主要临床病理指标的关系

胃癌 主要临床病理特征			MYCT-1 阳性表达				P 值
例数 90 (n)			-	+	++	+++	
性 别	男	67	10	22	11	24	0.24
	女	23	1	8	3	11	
年 龄	>65	45	7	10	8	20	0.47
	<65	45	5	17	7	16	
淋巴结侵犯	有	19	2	5	2	10	0.29
	无	71	8	25	13	25	
临床分期	I	6	0	2	0	4	0.56
	II	30	2	13	4	11	
	III	51	8	14	11	18	
	IV	3	1	1	0	1	

讨 论

一、MYCT-1基因的功能和生物学特性

MYCT-1(myct target 1)基因定位于6q25, 基因全长21Kb,由两个外显子和一个内含子构成。MYCT-1有两个转录本, mRNA序列分别为1006bp和1106bp, 编码蛋白分别含有253个氨基酸和187个氨基酸。研究表明两个转录本的细胞生物学功能基本相同。MYCT-1在斑马鱼、小鼠、黑猩猩等多个物种中高度保守, 在人体肝、脑、胃、肾等多种组织中均有表达, 可能对细胞生长和维持正常生命活动是必须的。

MYCT-1基因的启动子区含有两个E-box, 表明它是c-Myc的靶基因, 这已得到实验证实^[5]。c-Myc作为含亮氨酸拉链的转录因子, 在细胞增殖、细胞周期调控及肿瘤发生中发挥重要作用, 具有促进诱导细胞凋亡、参与细胞增殖转化的能力^[6-8], 还可促进细胞生长和血管生成^[9-10]。c-Myc为逆转录病毒癌基因, 与多种肿瘤发生发展有关, 包括喉癌^[11-12]、乳腺癌^[13]、肝癌^[14, 15]等。目前确定c-Myc的靶基因现已成为分子遗传学和肿瘤研究的热点。许多c-Myc靶基因的功能已经明确, 如促进细胞转化和肿瘤形成的基因Tnp、mt-mcl、rel和LDH-A; 诱导细胞凋亡的基因P53、mt-mcl、Cdc25A、和Gadd45以及细胞周期调控的基因有Gadd45、P53和Cdk4。对小鼠的研究表明, MYCT-1的同源基因mt-mcl可同时表现出促进细胞凋亡、促进细胞恶性转化、促进基因组不稳定性等多种c-Myc基因特性, 说明mt-mcl可能在c-Myc信号网络中居于特殊的位置, 对细胞的生长调控以及肿瘤的发生发展具有重要的作用。MYCT-1作为mt-mcl的同源基因是否有相同的功能, 有必要进行深入研究。

二、MYCT-1基因在胃癌发生过程中的表达及意义

我室前期对胃癌组织的检测表明MYCT-1mRNA在癌组织中的表达水平明显低于配对癌旁正常组织, 提示MYCT-1可能与胃癌发生有关。进一步通过基因转染实验发现, MYCT-1可促进胃癌细胞

系BGC832细胞凋亡, 抑制其生长, 表明MYCT-1表达下调可能是胃癌发生发展的一个环节。为进一步阐明MYCT-1在胃癌发生过程中的作用, 我室利用RNA干扰技术将GES-1细胞中的MYCT-1基因在mRNA水平上沉默, 结果发现被RNA干涉后MYCT-1基因表达降低, 凋亡明显增高, 细胞增殖率降低, 细胞周期S期延长, 说明其功能是抑制DNA复制。MYCT-1表达下调可能导致胃粘膜细胞中DNA复制增加, 从而使细胞生长调控失常。为进一步研究MYCT-1基因在胃癌中的蛋白表达水平, 在本研究中我们制备了抗MYCT抗体, 用免疫组织化学染色法对胃癌组织芯片进行了检测。结果表明, MYCT-1蛋白在胞浆中表达居多, MYCT-1在胃癌组, 癌旁对照组阳性表达率分别为55.6% (50/90), 75.6% (68/90), 阳性表达水平分别为 3.97 ± 2.94 和 5.36 ± 3.01 , 胃癌组MYCT-1表达显著低于癌旁组 ($P < 0.05$), 这与RT-PCR检测的结果一致, 说明MYCT-1可能参与胃癌的发生, 发展及转移。但是我们对MYCT-1基因阳性表达程度与胃癌主要临床指标的关系进行统计, 结果显示胃癌组织MYCT-1的表达与胃癌的性别、年龄、淋巴结转移和临床分期之间比较差异都无统计学意义 ($P > 0.05$)。与临床病理指标无相关性的原因可能与 I 期和IV期标本数量少有关, 需要收集更多的临床标本进一步研究。

结 论

胃癌组织中MYCT-1基因的阳性表达率低于对照组织, 而MYCT-1基因的表达与患者的性别, 年龄, 淋巴结的转移和临床分期均无相关性。MYCT-1基因在胃癌中表达下调可能与胃癌的发生发展相关。

· 本研究创新性的自我评价 ·

(1) MYCT-1 基因是一个新克隆的肿瘤相关基因, MYCT-1是C-myc的靶基因。

(2) 用免疫组化(sp法)首次检测 MYCT-1在胃癌组织的表达,

研究 MYCT-1 的表达和胃腺癌患者的性别、年龄、淋巴结转移和临床分期有无相关性。

(3) MYCT-1 的表达和胃腺癌患者的性别、年龄、淋巴结转移和临床分期有无相关性的研究可能为胃癌的诊治找到新的靶向治疗点, MYCT-1 作为潜在的肿瘤分子标志物应用于诊断, 预后分析, 具有很好的临床应用前景。

参考文献:

- 1 杨玲, 李连弟, 陈育德等. 中国2000年及2005 年恶性肿瘤发病死亡的估计与预测. 中国卫生统计, 2005, (4): 218-221.
- 2 杨家红. 胃癌病因的流行病学研究进展. 现代预防医学 2007, 27(4): 541.
- 3 Milne AN. Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer. Hum Genet, 2010(5): 615.
- 4 Freedman ND. Polymorphisms in estrogen and/or genes metabolizing genes and the risk of gastric cancer. Carcinogenesis, 2009, 20(1): 71.
- 5 Shuang Fu, Yan Guo, Hong Chen. *et al.* MYCT1-TV, A Novel MYCT1 Transcript, Is Regulated by c-Myc and May Participate in Laryngeal Carcinogenesis. PLoS One, 2011, 25(6): 48.
- 6 Larsson LG, Henriksson MA. The Yin and Yang functions of the Myc oncoprotein in cancer development and as targets for therapy. Exp Cell Res, 2010, 316: 1429-1437.
- 7 Albiñá A, Johnsen JI, Henriksson MA. MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies. Adv Cancer Res, 2010, 107: 163-224.
- 8 Perez-Sayans M, Suarez-Penaranda JM, Pilar GD, *et al.* What

real influence does the proto-oncogene c-myc have in OSCC behavior Oral Oncol, 2011, (47): 688-692.

9 Iritani BM and Eisenman RN. c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(23): 13180-13185.

10 Brandvold KA, Neiman P and Ruddell A. Angiogenesis is an early event in the generation of myc-induced lymphomas. Oncogene, 2000, 19(23): 2780-2785.

11 Krecicki T, Fraczek M, Jelen M, *et al.* Expression of c-myc oncoprotein in laryngeal squamous cell carcinoma. Acta Otolaryngol, 2009, 124: 634-637.

12 Liu T, Peng H, Wu Z. Expression and significance of signal transducer and activator of transcription 3 and c-myc in laryngeal squamous cell carcinoma. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 2010, 24: 648-651.

13 Perez EA, Jenkins RB, Dueck AC, *et al.* C-MYC Alterations and Association With Patient Outcome in Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer From the North Central Cancer Treatment Group N9831 Adjuvant Trastuzumab Trial. Clin Oncol, 2011, 29: 651-659.

14 Lin CP, Liu CR, Lee CN, *et al.* Targeting c-Myc as a novel approach for hepatocellular carcinoma. World J Hepatol, 2010, 2: 16-20.

15 Takahashi Y, Kawate S, Watanabe M, *et al.* Amplification of c-myc and cyclin D1 genes in primary and metastatic carcinomas of the liver. Pathol Int, 2007, 57: 437-42.