

Reg IV与胃癌腹腔转移的相关性研究

应莉莎,顾琳慧,杜灵彬,王新保,潘晓丹,余江流,刘 玮,凌志强
(浙江省肿瘤研究所,浙江省肿瘤医院,浙江 杭州 310022)

摘要: [目的] 探讨 *Reg IV* 表达与胃癌腹腔转移的相关性。[方法] 利用实时荧光定量 PCR 检测 50 例胃癌患者腹腔冲洗液中 *Reg IV*、CA72-4、CK20 的表达水平。[结果] 病理诊断已明确发生腹腔转移的 12 例胃癌腹腔冲洗液中 *Reg IV* 的相对表达量为 34.3(26.2~39.6), 显著高于 38 例未发生腹腔转移的 *Reg IV* 的相对表达量 22.7(18.4~33.0) ($P=0.017$)。 *Reg IV* 表达水平与患者淋巴结转移、淋巴管侵犯、临床分期等密切相关。淋巴结转移和淋巴管侵犯阳性的患者腹腔冲洗液中 *Reg IV* 的表达水平明显升高(均为 $P=0.024$); 晚期胃癌(Ⅲ期和Ⅳ期)患者腹腔冲洗液中 *Reg IV* 的表达水平明显高于早期胃癌患者(Ⅰ期和Ⅱ期) ($P=0.015$)。 *Reg IV* 在胃癌患者中敏感性(100.0%) 优于 CA72-4(66.7%) 和 CK20(58.3%)。[结论] *Reg IV* 的表达与胃癌的腹腔转移密切相关, 利用荧光定量 PCR 检测胃癌患者的腹腔冲洗液中 *Reg IV* 的水平, 可以提高对胃癌腹腔转移的预测。

关键词: 胃肿瘤; *Reg IV*; CA72-4; CK20; 腹腔转移

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)04-0241-05

The Correlation of *Reg IV* with Peritoneal Metastasis in Gastric Cancer

YING Li-sha, GU Lin-hui, DU Ling-bin, et al.

(Zhejiang Cancer Research Institute, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the correlation of the expression of *Reg IV* with peritoneal metastasis in gastric cancer. [Methods] The mRNA levels of *Reg IV*, CA72-4 and CK20 in peritoneal washing fluid in 50 Cases with gastric cancer were detected by real-time PCR. [Results] The expression of *Reg IV* in 12 cases with peritoneal metastasis (34.3, 26.2~39.6) was significant higher than that in 38 cases without peritoneal metastasis (22.7, 18.4~33.0) ($P=0.017$). The expression of *Reg IV* was closely correlated with lymph node metastasis and lymphatic vessel invasion ($P=0.024$); and also was higher in advanced stages than that in early stages ($P=0.015$). The sensitivity of *Reg IV* (100.0%) was higher than that of CA72-4 (66.7%) and CK20 (58.3%) for gastric cancer diagnosis. [Conclusion] The expression of *Reg IV* is closely related to peritoneal metastasis in gastric cancer. Detecting the expression of *Reg IV* from peritoneal washing fluid by RT-PCR could improve the predictability of peritoneal metastasis in gastric cancer.

Subject words: gastric neoplasms; *Reg IV*; CA72-4; CK20; peritoneal metastasis

我国是胃癌的高发区, 其患病率和死亡率均是世界平均水平的 2 倍多。2008 年我国胃癌发病率在男性中达 34.86/10 万, 女性中为 14.46/10 万; 每年新发胃癌患者达 40 万人, 死亡人数达 30 万人, 是我国第二大常见肿瘤^[1]。随着手术、放化疗、免疫及生物治疗技术的日臻完善, 胃癌患者的 5 年生存率有了长足的进步, 但仍有 30%~50% 左右的患者术后复发

转移。临床显示, 胃癌术后复发和不能根治切除的主要原因是腹膜转移。胃癌腹膜种植转移占全部胃癌手术者的 30%~50%, 根治切除术后复发率为 50%~60%, 且占术后死亡原因的 53.8%^[2,3]。因此, 能够早期发现与胃癌腹腔转移密切相关的分子靶标, 对提高胃癌的治疗效果具有重要的意义。

Regenerating gene type IV (*Reg IV*) 是再生基因 (regenerating gene, REG 或 Reg) 家族的一名新成员。近年, 国内外研究者应用多种生物学技术包括基因表达序列分析 (serial analysis of gene expression, SAGE)、cDNA 芯片等^[4-6] 对胃癌进行了一系列基因

基金项目: 浙江省科技厅分析测试科技计划项目 (2008F70024);

浙江省医药卫生科技计划项目 (2009B029)

通讯作者: 凌志强, 副所长, 副研究员, 博士; 浙江省肿瘤医院浙江省肿瘤研究所, 浙江省杭州市半山桥广济路 38 号 (310022);
E-mail: lingzq@hotmail.com。

收稿日期: 2012-03-26; **修回日期:** 2012-04-02

表达谱分析,均发现*Reg IV*在胃癌中特异性上调,是胃癌的高表达基因之一。*Reg IV*的表达与神经内分泌细胞相关^[7],在胃癌中通过抑制肿瘤细胞的凋亡、参与5-Fu化疗耐药^[8]等过程可能成为胃癌治疗的新一代分子标志。近年相关研究还发现*Reg IV*的表达参与胃肠道肿瘤的远处转移,如大肠癌的肝转移^[9]、胃癌的腹腔转移^[10]等。

为了进一步研究*Reg IV*与胃癌腹腔转移的相关性和临床价值,我们利用荧光定量PCR技术检测了50例胃癌患者腹腔冲洗液中的*Reg IV*以及与胃癌分子标志物糖类抗原72-4(CA72-4)、角蛋白20(CK20)等的表达水平。通过分析各基因与临床病理相关因素的关系,探讨利用*Reg IV*作为胃癌腹腔转移指标的检测价值,为阐明胃癌腹腔转移的发生和发展规律提供客观依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选取2008年11月~2009年11月在浙江省肿瘤医院行手术治疗的50例胃癌初诊患者的腹腔冲洗液。50例胃癌患者中男性28例,女性22例;中位年龄58岁(40~72岁)。病理类型:腺癌40例,其他10例(黏液癌/未分化癌/髓样癌/印戒细胞癌)。临床分期:根据2003年版UICC制定的胃癌TNM分期,I期22例,II期9例,III期11例,IV期8例。其中病理诊断明确发生腹腔转移的胃癌患者12例,未发生腹腔转移的胃癌患者38例。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集及处理

腹腔冲洗液的收集:胃癌患者术中如发现有腹水则吸取之;无腹水者以生理盐水分别冲洗腹腔及网膜囊,吸出收集。收集的腹腔冲洗液3 000g离心5min,弃上清备用。

1.2.2 荧光定量RT-PCR

用血液提取总RNA试剂盒(Axygen,美国)提取总RNA,逆转录试剂盒(TaKaRa,日本)逆转录为cDNA。所有的操作严格按照试剂盒说明进行。

利用荧光定量PCR试剂盒(博日,杭州)检测各标本中的*Reg IV*、CA72-4及CK-20的mRNA表达水平,内参基因为GAPDH。根据Genbank中所报道

基因序列设计并由上海英骏公司合成相关引物。分别是:*Reg IV*-F:5'-GAGTGTCTAGTCTTACGGAACG-3',*Reg IV*-R:5'-TCGTGCAGGCCAATCCATATC-3';CA72-4-F:5'-AAAAGGAGGGAGTTACTCTCAGG-3',CA72-4-R:5'-GCTGTGAGGGACACATCAGAG-3';CK20-F:5'-ATGGATTTTCAGTCGCAGAAGC-3',CK20-R:5'-CTCCCATAGTTCACCGTGTGT-3';GAPDH-F:5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3';GAPDH-R:5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'。

荧光定量PCR设置参数:95℃ 2min;95℃ 10s和60℃ 30s,循环40次,在60℃处收集荧光信号。PCR实验完成后,再通过溶解曲线分析产物的特异性。溶解曲线参数设置按照7500荧光定量PCR仪(ABI,美国)的设置参数设置,具体如下:95℃ 15s;60℃ 1min;95℃ 15s;60℃ 15s。

荧光定量PCR结果分析:基因的相对含量通过 $1000 \times 2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析,其中 $-\Delta C_t = -\Delta(Ct_{\text{靶基因}} - Ct_{\text{内参}})$ 。3个指标均以正常对照组中最大值作为分界点判断阴阳性。

1.3 统计学处理

所有数据均用SPSS 13.0软件包进行统计处理,计量资料采用中位数(P25,P75)表示。利用秩和检验Mann-Whitney test对数据进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 发生腹腔转移和未发生腹腔转移的胃癌患者*Reg IV*相对表达量比较

50例胃癌患者中经病理诊断已明确发生腹腔转移的患者12例,其腹腔冲洗液中*Reg IV*相对表达量为34.3(26.2~39.6);38例未发生腹腔转移患者的*Reg IV*相对表达量为22.7(18.4~33.0)。*Reg IV*相对表达量在发生腹腔转移的胃癌中显著升高($P = 0.017$)。

2.2 胃癌患者腹腔冲洗液中*Reg IV*、CA72-4、CK20相对表达量与临床病理参数的关系

胃癌患者腹腔冲洗液中*Reg IV*的相对表达量在有否淋巴结转移、淋巴管侵犯及不同临床分期时有显著差异。淋巴结转移和淋巴管侵犯阳性的患者腹腔冲洗液中*Reg IV*的表达水平明显升高(均为

$P=0.024$);晚期胃癌(Ⅲ期和Ⅳ期)患者腹腔冲洗液中 *Reg IV* 的表达水平明显高于早期胃癌患者(Ⅰ期和Ⅱ期)($P=0.015$)。

胃癌患者腹腔冲洗液中 *CA72-4* 相对表达量在不同肿瘤浸润深度、血管侵犯、淋巴管侵犯、淋巴结转移、临床分期等方面有显著差异。

胃癌患者腹腔冲洗液中 *CK20* 相对表达量在不

同肿瘤浸润深度、淋巴管侵犯、淋巴结转移、临床分期等方面有显著差异。见表 1。

2.3 *Reg IV*、*CA72-4*、*CK20* 敏感性比较

在 50 例胃癌患者中,根据病理资料显示明确发生腹腔转移的患者有 12 例。*CA72-4* 表达阴性的患者 4 例,敏感性为 66.7%(8/12);*CK20* 表达阴性的患者 5 例,敏感性为 58.3%(7/12);*Reg IV* 表达均为阳性,敏感性为 100%(表 2)。

表 1 *Reg IV*、*CA72-4*、*CK20* 相对表达量与临床病理参数的关系

参数	例数	<i>RegIV</i>		<i>CA72-4</i>		<i>CK20</i>	
		平均值	<i>P</i>	平均值	<i>P</i>	平均值	<i>P</i>
性别							
女性	22	23.36	0.532	27.05	0.459	23.41	0.316
男性	28	27.18		24.29		27.14	
分化程度							
高分化	32	25.52	0.532	24.09	0.333	25.52	0.766
中分化	9	29.33		24.67		23.22	
低分化	9	21.61		31.33		27.72	
浸润深度							
T ₁	11	18.64	0.061	19.55	0.027*	15.00	0.019*
T ₂	25	23.88		23.40		27.16	
T ₃	12	34.29		34.92		31.33	
T ₄	2	30.75		28.00		27.50	
血管侵犯							
阳性	10	32.55	0.087	35.00	0.020*	28.15	0.526
阴性	40	23.74		23.13		24.84	
淋巴管侵犯							
阳性	17	32.00	0.024*	33.29	0.002**	30.91	0.036*
阴性	33	22.15		21.48		22.71	
淋巴结转移							
阳性	29	29.47	0.024*	30.62	0.001**	33.10	0.000**
阴性	21	20.02		18.43		15.00	
肿瘤大小(cm)							
长径>5	34	26.84	0.344	26.82	0.297	25.63	0.917
长径≤5	16	22.66		22.69		25.22	
临床分期							
Ⅰ+Ⅱ	31	21.58	0.015*	20.81	0.001**	21.21	0.003**
Ⅲ+Ⅳ	19	31.89		33.16		32.50	

注: * : $P<0.05$, ** : $P<0.01$ 。

表 2 *Reg IV*、*CA72-4*、*CK20* 敏感性比较

患者	临床分期	分化程度	<i>Reg IV</i>	<i>CA72-4</i>	<i>CK20</i>
1	Ⅳ	低分化	+	-	-
2	Ⅲb	高分化	+	-	-
3	Ⅳ	中分化	+	-	-
4	Ⅳ	低分化	+	-	-
5	Ⅳ	高分化	+	+	+
6	Ⅲb	高分化	+	+	+
7	Ⅲb	中分化	+	+	+
8	Ⅳ	低分化	+	+	+
9	Ⅳ	低分化	+	+	+
10	Ⅲb	高分化	+	+	+
11	Ⅳ	中分化	+	+	-
12	Ⅳ	中分化	+	+	+

3 讨 论

Reg 家族属钙依赖的植物凝集素超家族,编码一组涉及胃肠道黏膜对损伤反应的重要蛋白,具有抑制凋亡,促进增殖,促进胰腺 β 细胞和神经细胞生长及急性反应等作用^[11]。*Reg* 的作用最早是在糖尿病研究中发现的,近年来随着研究的深入,发现 *Reg* 家族成员不仅与胰腺炎、创伤、胆总管结石及阿尔茨海默病等疾病相关^[12-15],而且参与多种肿瘤的发展进程。不同家族成员在相应肿瘤的高表达,可以作为预后差的标志^[16],因此 *Reg* 异常表达或异位表达在肿瘤中的作用受到了越来越多的关注。

利用实时荧光定量 PCR 检测胃癌患者腹腔冲洗液中 *Reg IV* 的表达水平能够较为敏感地反应患者体内肿瘤转移状况。大量临床病例统计表明,利用传统腹腔冲洗细胞学(peritoneal lavage cytology, PLC)检查方法检测腹腔脱落癌细胞,浆膜受侵的胃癌的 PLC 阳性率为 40%~50%,但部分 PLC 阴性病例

术后仍发生腹膜转移。尤其是无腹水或腹腔癌细胞较少的胃癌病例常会漏诊。这也是部分患者细胞学阴性而术后仍复发的原因之一。且因腹腔内常有脱落的间皮细胞干扰镜下观察,容易产生偏差;更重要的是,部分细胞学阴性患者术后仍会出现腹膜播散的情况,诸多因素降低了它的临床实际价值。病理学的连续切片和免疫学等检测可以发现在淋巴结、骨髓和血道的微转移细胞,但敏感性较低。免疫组织化学技术通过选用肿瘤细胞标志物的抗体,特别是采用单克隆抗体进行细胞抗原标记,可区别出正常细胞和肿瘤细胞间的差异,其敏感性较细胞学检测有了较大的提高,但依然存在特异性、敏感性不高的问题。荧光定量 RT-PCR 方法具有时间短(小于 3h)、敏感性高的特点,能够检测出 10^{-7} 个正常细胞中的个数级别肿瘤细胞,不但远远高于常规的检验方法,而且敏感性优于常规 RT-PCR^[17,18],目前正越来越多地被应用于临床检测。

同时,研究结果显示有淋巴结转移以及淋巴管侵犯的患者 *Reg IV* 表达水平明显升高,与 Miyagawa 等^[10]研究结果相同。同时,我们还发现胃癌早期/晚期患者 *Reg IV* 表达差异显著,临床Ⅲ期及Ⅳ期患者表达水平明显高于Ⅰ期、Ⅱ期患者($P=0.015$),提示 *Reg IV* 参与了胃癌疾病的进展,特别与其转移密切相关。利用 *Reg IV* 作为胃癌腹腔转移的检测靶标,敏感性较高。与目前较为常用的胃癌转移的分子标志物 CA72-4、CK20 等相比较, *Reg IV* 敏感性(100%)要优于 CA72-4 (66.7%)、CK20 (58.3%)。Kobayashi 等^[19]、Tao 等^[20]通过检测胃癌患者血清 *Reg IV*、CEA、CA19-9 和胃蛋白酶的表达水平,也发现 *Reg IV* 敏感性和特异性均优于其他检测指标。我们在分析胃癌患者腹腔冲洗液中 *Reg IV*、CA72-4 和 CK20 的表达水平与临床病理资料的相关性时发现, CA72-4 和 CK20 与肿瘤的浸润深度关系密切 (P 分别为 0.027 和 0.019),但是 *Reg IV* 表达水平与肿瘤浸润深度未见显著性差异($P=0.061$)。肿瘤的浸润深度与腹腔转移关系密切,凡有腹腔内种植者,通常其浆膜多有浸润。然而,在本研究中 *Reg IV* 与肿瘤浸润深度并没有如 CA72-4 和 CK20 具有显著性差异,其可能原因是 *Reg IV* 引物设计有待最佳化。CA72-4 和 CK20 是两个很成熟的胃癌腹腔转移标志物,引物很成熟;而 *Reg IV* 研究较少,引物设计等诸多环

节都有待于进一步完善。

综上所述, *Reg IV* 与胃癌腹腔转移密切相关,利用荧光定量 PCR 检测胃癌患者的腹腔冲洗液中 *Reg IV* 的水平,可以提高对胃癌腹腔转移的预测。

参考文献:

- [1] 郝捷,赵平,陈万青,等.2011 中国肿瘤登记年报[M].第 1 版.北京:军事医学科学出版社,2012.1-216.
- [2] Yoo CH, Noh SH, Shin DW, et al. Recurrence following curative resection for gastric carcinoma [J]. Br J Surg, 2000, 87 (2): 236-242.
- [3] Fujimoto S, Takahashi M, Mutou T, et al. Successful intraperitoneal hyperthermic chemoperfusion for the prevention of postoperative peritoneal recurrence in patients with advanced gastric carcinoma [J]. Cancer, 1999, 85 (3): 529-534.
- [4] Yasu IW, Oue N, Ito R, et al. Search for new biomarkers of gastric cancer through serial analysis of gene expression and its clinical implications[J]. Cancer Sci, 2004, 95 (5): 385-392.
- [5] Lee JY, Eom EM, Kim DS, et al. Analysis of gene expression profiles of gastric normal and cancer tissues by SAGE [J]. Genomics, 2003, 82 (1): 78-85.
- [6] Oue N, Hamai Y, Mitani Y, et al. Gene expression profile of gastric carcinoma: identification of genes and tags potentially involved in invasion, metastasis, and carcinogenesis by serial analysis of gene expression [J]. Cancer Res, 2004, 64 (7): 2397-2405.
- [7] Oue N, Mitani Y, Aung PP, et al. Expression and localization of *Reg IV* in human neoplastic and non-neoplastic tissues: *Reg IV* expression is associated with intestinal and neuroendocrine differentiation in gastric adenocarcinoma [J]. J Pathol, 2005, 207(2): 185-198.
- [8] Mitani Y, Oue N, Matsumura S, et al. *Reg IV* is a serum biomarker for gastric cancer patients and predicts response to 5-fluorouracil-based chemotherapy [J]. Oncogene, 2007, 26(30): 4383-4393.
- [9] Oue N, Kuniyasu H, Noguchi T, et al. Serum Concentration of *Reg IV* in patients with colorectal cancer: overexpression and high serum levels of *Reg IV* are associated with liver metastasis [J]. Oncology, 2007, 72(5-6): 371-380.
- [10] Miyagawa K, Sakakura C, Nakashima S, et al. Overexpression of *Reg IV* in peritoneal dissemination of gastric cancer and its potential as a novel marker for the detection of peritoneal micrometastasis [J]. Anticancer Res, 2008, 28

- (2B): 1169–1179.
- [11] Broekaert D, Eyckerman S, Lavens D, et al. Comparison of leptin-and interleukin-6-regulated expression of the rPAP gene family: evidence for differential co-regulatory signals [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2002, 13(1): 78–85.
 - [12] Planas R, Alba A, Carrillo J. Reg (regenerating) gene over-expression in islets from non-obese diabetic mice with accelerated diabetes: role of IFN β [J]. *Diabetologia*, 2006, 49(10): 2379–2387.
 - [13] Bluth MH, Patel SA, Dieckgraefe BK, et al. Pancreatic regenerating protein (reg I) and reg I receptor mRNA are up regulated in rat pancreas after induction of acute pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(28): 4511–4516.
 - [14] Satomura Y, Sawabu N, Mouri I, et al. Measurement of serum PSP/reg-protein concentration in various diseases with a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *J Gastroenterol*, 1995, 30(5): 643–650.
 - [15] Duplan L, Michel B, Boucraut J, et al. Lithostathine and pancreatitis-associated protein are involved in the very early stages of Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2001, 22(1): 79–88.
 - [16] Harada K, Zen Y, Kanemori Y, et al. Human reg I gene is up-regulated in intrahepatic cholangiocarcinoma and its precursor lesion [J]. *Hepatology*, 2001, 33(5): 1036–1042.
 - [17] Nakanishi H, Kodera Y, Yamamura Y, et al. Rapid quantitative detection of carcinoembryonic antigen-expressing free tumor cells in the peritoneal cavity of gastric-cancer patients with real-time RT-PCR on the lightcycler [J]. *Int J Cancer*, 2000, 89(5): 411–417.
 - [18] Riber-Hansen R, Abrahamsen HN, Sorensen BS, et al. Quantitative real-time RT-PCR in sentinel lymph nodes from melanoma patients. Detection of melanocytic mRNA predicts disease-free survival [J]. *APMIS*, 2008, 116(3): 199–205.
 - [19] Kobayashi Y, Niwa Y, Tajika M, et al. Serum tumor antigen REG4 as a useful diagnostic biomarker in gastric cancer [J]. *Hepatogastroenterology*, 2010, 57(104): 1631–1634.
 - [20] Tao HQ, He XJ, Ma YY, et al. Evaluation of REG4 for early diagnosis and prognosis of gastric cancer [J]. *Hum Pathol*, 2011, 42(10): 1401–1409.