

胃癌患者幽门螺杆菌感染与蛋白磷酸酶2A的癌性抑制因子表达增强的相关性

陈飞 李俊

【摘要】目的 分析胃癌患者幽门螺杆菌增强蛋白磷酸酶2A的癌性抑制因子(CIP2A)的表达,以期为临床治疗提供理论依据。**方法** 随机选取2012年10月至2015年9月本院确诊的胃癌患者共80例,通过对幽门螺杆菌及胃癌细胞培养,采用实时荧光定量法及Western blot法分别检测CIP2A蛋白表达水平,分析胃癌组织中CIP2A表达与幽门螺杆菌感染及临床病理特征相关性,应用Cox比例风险回归模型进行患者预后因素分析。**结果** CIP2A蛋白在胃癌组织、癌旁组织、正常胃黏膜组织中阳性表达率依次为66.3%、25.0%和10.0%,组间差异具有统计学意义($\chi^2 = 37.29, P = 0.025$)。CIP2A蛋白在肿瘤浸润程度加深、淋巴结转移的胃癌组织中表达更高;胃癌患者组幽门螺杆菌感染率(67.5%)显著高于健康对照组(40.0%),差异具有统计学意义($\chi^2 = 5.136, P = 0.023$);CIP2A蛋白在无幽门螺杆菌感染组和幽门螺杆菌感染组胃癌患者中阳性表达率分别为11.5%和88.9%,两组CIP2A蛋白表达率差异具有统计学意义($\chi^2 = 8.428, P = 0.005$)。胃癌组织的淋巴结转移状况、肿瘤浸润深度及CIP2A蛋白表达量高低等临床病理特征和患者预后显著相关。**结论** 胃癌患者幽门螺杆菌感染率高于健康人群;CIP2A蛋白阳性表达是影响胃癌患者预后的独立因素。

【关键词】 胃癌; 蛋白磷酸酶2A的癌性抑制因子; 幽门螺杆菌; 预后因素

Correlation of *Helicobacter pylori* infection and cancer ousinhibitor protein phosphatase 2A enhanced expression in patients with gastric cancer Chen Fei, Li Jun. Department of Oncology, The Affiliated Xiaogan Hospital of Wuhan University of Science and Technolog, Xiaogan 432000, China; Department of Oncology, Xiaogan Central Hospital, Xiaogan 432000, China
Corresponding author: Li Jun, Email: 2148396195@qq.com.

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of *Helicobacter pylori* (HP) enhancing the expression of cancer ousinhibitor protein phosphatase 2A (CIP2A) in patients with gastric cancer, and to provide theoretical basis for clinical treatment. **Methods** Total of 80 patients with gastric cancer in our hospital from October 2012 to September 2015 were collected. HP and the gastric cancer cell from tissue samples were cultured, and the changes of CIP2A protein expression were detected by real-time fluorescence quantitative method and Western blot. The correlation of CIP2A expression in gastric cancer tissue and clinicopathological features of Hp infection were analyzed. The prognostic factors of patients with gastric cancer were analyzed by Cox proportional hazards regression model. **Results** The positive expression rates of CIP2A protein in gastric cancer tissues, paracancerous tissues and normal gastric mucosal tissues were 66.3%, 25% and 10%, respectively, with significant difference ($\chi^2 = 37.29, P = 0.025$). The expression levels of CIP2A protein in gastric cancer tissue of tumor infiltrating extent and lymph node metastasis were significantly high. The infection rate of HP in patient of gastric cancer group (67.5%) was significantly higher than that of the control group (40.0%), with significant difference ($\chi^2 = 5.136, P = 0.023$). The positive expression rate of CIP2A protein were 11.5% and 88.9% in gastric cancer group with non-HP infection and with HP infection, with significant difference ($\chi^2 = 8.428, P = 0.005$). The prognosis of patients were significantly correlated with the clinical pathological features which include lymph node metastasis, tumor infiltration depth and expression of CIP2A protein in gastric cancer tissue. **Conclusions** HP infection rate of

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2017.02.017

作者单位: 432000 孝感市, 武汉科技大学附属孝感医院肿瘤科, 孝感市中心医院肿瘤科

通信作者: 李俊, Email: 2148396195@qq.com

patients with gastric cancer was higher than that of the normal population; CIP2A protein expression was an independent prognostic factor in patients with gastric cancer.

【Key words】 Gastric cancer; Cancer ousinhibitor protein phosphatase 2A; *Helicobacter pylori*; Prognosis factor

胃癌(gastric cancer, GC)是临床上常见的恶性肿瘤之一,具有高发病率、高病死率的特点^[1]。我国胃癌的患病人数大约占全球的42%^[2]。幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)是螺旋状的革兰阴性微需氧菌,其主要通过发生免疫反应,引起胃黏膜慢性炎症和损伤,进而导致胃癌的发生、发展^[3],幽门螺杆菌感染导致胃癌的具体机制仍未明确,探讨胃癌的发病机制、寻找合理的干预措施具有重要的科学研究价值和临床意义。

资料与方法

一、一般资料

选取2012年10月至2015年9月本院确诊的原发性胃癌患者80例,其中男性患者49例,女性患者31例,年龄50~99岁,平均年龄69.8岁。健康对照组中男性12例,女性8例,平均年龄52岁,均选自我院消化内科同期排除消化系统肿瘤和疾病的体检者。本研究涉及医学伦理学的内容,均符合有关规定并经本院医学伦理委员会审核通过。

二、方法

1. 通过对幽门螺杆菌与胃癌细胞培养,用实时荧光定量法和Western blot法分别检测蛋白磷酸酶2A的癌性抑制因子(cancer ousinhibitor proteinphosphatase 2A, CIP2A)表达变化和蛋白表达水平改变,分析胃癌组织中CIP2A表达与幽门螺杆菌感染和临床病理特征的相关性,应用Cox比例风险回归预后模型进行患者预后因素分析。

2. 实时荧光定量法:将MKN-45细胞培养传代后,按照细胞、细菌比例为共培养,然后在不同时间点或施加干预措施后的时间点收集细胞,进行实时荧光定量检测。

(1) RNA的提取:在细胞培养皿中加入1 ml的裂解液,尽量使细胞裂解液均匀覆盖于细胞的表面,充分裂解细胞片刻,反复吹打后将细胞裂解混合液用移液枪转移至1.5 ml试管中,再次吹打裂解细胞直至无明显沉淀,室温放置5 min。

(2) 反转录:将提取所得RNA反转录成cDNA使用TaKaRa公司试剂盒。

(3) 实时荧光定量PCR的测定:使用Rotor Gene 3000实时PCR仪器应用SYBR荧光染色法做实时荧光定量PCR反应。

3. Western blot法:将电泳分离后的细胞或组织总蛋白质从凝胶转移到固相支持物NC膜或PVDF膜上,然后用特异性抗体检测某特定抗原的一种蛋白质检测技术。

(1) 制胶:将两块胶板对齐后用板夹卡紧,垂直固定在电泳支架上;取干净的小烧杯准备配置10%的5 ml分离胶,迅速摇匀,快速用1 ml移液器顺着玻璃板一个侧角缓慢匀速灌胶。胶面高度到2/3时,换用超纯水封闭分离胶面。

(2) 上样:依据蛋白样品的浓度,确保每组蛋白含量齐同;热浴锅加热100 °C让蛋白变性;将蛋白样品加入梳齿上样孔,准备电泳。

(3) 电泳:先用80 V电压恒压电泳至溴酚蓝刚进入分离胶后,改用120 V电压恒压电泳至溴酚蓝即将跑出分离胶时终止电泳。

(4) 转膜:超纯水中浸泡2 min后将PVDF膜放到阳极液中至少浸泡5 min;依次按顺序将滤纸、凝胶、PVDF膜置入转膜槽中;在16 V条件下恒压转膜0.5 h。

(5) 封闭:用培养皿分装含5%脱脂奶粉的封闭液,然后将PVDF膜仔细小心移入培养皿中,封口膜覆盖,常温下恒温摇床摇2 h用以封闭。

(6) ECL超敏液化学发光显影和蛋白检测:用凝胶成像分析系统,检测要测定的蛋白并记录拍照,应用该系统软件分析蛋白相对表达量。

三、统计学处理

应用SPSS 20.0进行数据统计分析,计数资料采用 χ^2 检验,组间差异采用单因素方差分析,使用Box比例风险回归模型进行单因素生存分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、胃组织中CIP2A蛋白的表达

CIP2A蛋白在胃癌组织、癌旁组织、正常胃黏膜组织中阳性表达率依次为66.3%、25.0%和

10.0%，组间差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 37.29$ 、 $P < 0.001$)。胃癌组织和癌旁组织差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 27.44$ 、 $P < 0.001$)，胃癌组织和正常组织差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 20.45$ 、 $P < 0.001$)，然而癌旁组织和正常组织差异无统计学意义 ($\chi^2 = 2.10$ ， $P = 0.146$)。

二、CIP2A蛋白表达与胃癌患者临床病理特征的相关性

通过对80例胃癌患者临床病理资料研究发现，CIP2A蛋白在肿瘤浸润程度加深和有淋巴结转移的胃癌组织中表达更高，差异均具有统计学意义 (P 均 < 0.005)，详见表1。

表1 CIP2A蛋白表达与胃癌患者临床病理特征的相关性[例(%)]

病理特征	例数	CIP2A表达阳性	χ^2 值	P 值
性别			0.504	0.478
男	49	31 (63.3)		
女	31	22 (70.9)		
年龄			0.334	0.563
< 60岁	38	25 (65.7)		
≥ 60 岁	42	25 (59.5)		
肿瘤直径			0.024	0.877
< 40 mm	41	28 (68.3)		
≥ 40 mm	39	26 (66.7)		
组织分化			2.399	0.121
高中分化	38	28 (73.7)		
低分化	42	24 (57.1)		
淋巴结转移			4.581	0.032
否	34	27 (79.4)		
是	46	26 (56.5)		
浸润程度			6.265	0.012
T1T2	30	25 (83.3)		
T3T4	50	28 (56.0)		

三、胃癌患者和对照组幽门螺杆菌的感染率

胃癌患者组幽门螺杆菌感染率为67.5% (54/80)，显著高于健康对照组40.0% (8/20)，两组幽门螺杆菌感染率差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 5.136$ 、 $P = 0.023$)。

四、CIP2A蛋白表达与幽门螺杆菌感染相关性

通过对80例胃癌患者和对应的幽门螺杆菌感染状态的临床资料研究发现，CIP2A蛋白在无幽门螺杆菌感染组(26例)患者胃癌中阳性表达率为11.5% (3/26)，在幽门螺杆菌感染组胃癌中阳性表达率为88.9% (48/54)，两组CIP2A蛋白表达率差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 8.428$ 、 $P = 0.005$)，提示在胃癌组织中幽门螺杆菌感染可增强CIP2A蛋白表达。

五、Cox比例风险回归单因素预后分析

本研究通过Cox比例风险回归进行分析，结果提示以60岁为界限，老龄患者和年轻患者的胃癌预后差异无统计学意义 ($P = 0.211$)；患者性别差异对胃癌预后无显著影响 ($P = 0.897$)；胃癌标本直径(以40 mm为界限)的大小和患者预后无相关性 ($P = 0.785$)；幽门螺杆菌感染与否与胃癌患者预后也亦无相关性 ($P = 0.116$)；肿瘤的病理组织分化程度的高低对胃癌患者预后不产生显著作用 ($P = 0.223$)。然而胃癌患者淋巴结有无转移则对预后产生显著影响 ($P = 0.002$)，肿瘤组织浸润深度越深胃癌患者预后越差 ($P = 0.001$)，CIP2A蛋白表达量的高低对胃癌患者的预后亦起着很重要的作用 ($P = 0.006$)。Cox比例风险回归单因素预后模型分析表明，胃癌组织的淋巴结转移状况、肿瘤浸润深度及CIP2A蛋白表达量高低等临床病理特征和患者预后显著相关，详见表2。

表2 Cox比例风险回归单因素预后分析

单因素Cox回归分析	总生存率		
	相对危险度	95%CI	P 值
年龄(岁) (≥ 60 vs. < 60)	1.53	(0.73~3.21)	0.211
性别(男 vs. 女)	0.96	(0.53~2.21)	0.897
肿瘤直径大小(mm) (≥ 40 vs. < 40)	1.21	(0.62~2.54)	0.785
组织分化程度(低分化 vs. 高中分化)	1.76	(0.67~3.12)	0.223
淋巴结转移(有转移 vs. 无转移)	10.06	(3.45~34.62)	0.002
肿瘤浸润深度(T4T3 vs. T2T1)	13.69	(3.86~45.41)	0.001
CIP2A表达(阳性 vs. 阴性)	4.65	(2.32~10.12)	0.006
幽门螺杆菌感染(阳性 vs. 阴性)	1.86	(0.93~4.35)	0.116

讨 论

胃癌是我国常见的消化道恶性肿瘤之一,近年来临床对胃癌的治疗取得了一定进展,若能够在早期阶段发现并确诊则患者治愈的几率增加。早期诊断胃癌可通过寻找胃癌的敏感、特异性的生物标记物来实现,由于胃癌的发生、发展受多因素影响,在临床实际工作中胃癌尚无有效、可行的早期检测方法。已有研究表明,胃癌的发生与相关基因异常改变及表达密切相关^[4],CIP2A为人类多种恶性肿瘤组织中高表达的致癌因子^[5],为进一步从组织学证实以上结论,本研究检测胃癌患者组织标本中蛋白CIP2A表达水平。

本研究结果发现,在20例正常胃黏膜组织标本中,CIP2A蛋白仅表现为微弱表达。CIP2A蛋白在胃癌组织和癌旁组织中表达的差异性,提示其在胃癌的发生和发展中起到重要的作用^[6]。国内外流行病学调查资料表明,幽门螺杆菌感染是胃癌发生最主要的生物学危险因素^[7],但关于该菌致癌的具体机制目前尚未明确,胃黏膜细胞增殖功能紊乱可能是幽门螺杆菌相关胃癌形成很重要的机制^[8]。幽门螺杆菌感染在引起胃黏膜炎症损伤和促进细胞增殖的同时,也诱发基因水平改变,可能导致胃癌发生^[9]。本研究结果表明,胃癌患者中幽门螺杆菌感染率显著高于健康对照组,提示持续的幽门螺杆菌感染能够加重胃黏膜病变,从而提高胃癌发病的风险^[10]。幽门螺杆菌感染组胃癌患者中CIP2A蛋白表达率为88.9%,显著高于未感染HP的胃癌患者组患者,CIP2A蛋白表达的显著性差异提示胃癌组织中幽门螺杆菌感染能够增强蛋白表达,同时CIP2A蛋白表达升高则加速胃癌组织增殖浸润和转移,很可能是胃癌发生的又一重要机制^[11-13]。

本研究结果表明,胃癌组织中肿瘤浸润深度、CIP2A蛋白表达量高低及淋巴结转移状况等临床病理因素与患者预后显著相关^[12],均是影响胃癌患者生存率的独立预后因素。同时,淋巴结转移越多、组织浸润越深和CIP2A蛋白高表达的患者,生存时间越短,预后较差。已有文献研究显示,CIP2A蛋白高表达可作为胃癌的独立预后因素^[13]。Khanna等^[14-17]在对早期舌癌患者的生存预后研究中也得出相同的结论。Lucas等^[18-22]多因素预后分析表明,CIP2A蛋白高表达是白血病患者疾病进展和

预后的一个决定性因素。而正如本研究结果所示,CIP2A蛋白表达是影响胃癌患者预后的独立因素,故幽门螺杆菌感染可能通过增强CIP2A蛋白表达而参与胃癌的发生发展和浸润转移,因此,预防治疗幽门螺杆菌感染可起到较好的干预胃癌发生的作用^[23-24]。

综上所述,CIP2A在胃癌发生发展中起到重要作用,可作为评估胃癌侵袭能力和恶性程度重要的生物标志,CIP2A基因有望作为胃癌诊断和基因治疗的新靶点^[25],而且可作为判断胃癌预后的指标,有助于评价胃癌患者的预后。但CIP2A在胃癌组织中高表达的具体机制仍然需要进一步深入探讨。

参 考 文 献

- [1] 赵永勋. 幽门螺杆菌感染增强CIP2A在胃癌中的表达及其临床意义[D]. 兰州大学, 2014.
- [2] 陈晓兵. 胃癌患者幽门螺杆菌感染情况与肿瘤恶性程度的相关性研究[J]. 海南医学院学报, 2017, 23(4): 475-477.
- [3] 刘为, 杨志平. 根除幽门螺旋杆菌联合叶酸疗法治疗疣状胃炎患者的前景[J]. 中国民康医学, 2016, 28(5): 85-86.
- [4] 张姣莉, 李国庆. EGRF, CIP2A及c-Myc在胃癌细胞增殖中相互作用的关系[J]. 现代医药卫生, 2017, 33(3): 393-395.
- [5] 黎敏. MACC1和CIP2A蛋白表达的相关性及其与胃癌预后的关系[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(21): 25-29.
- [6] 师海蓉. CIP2A shRNA真核表达载体的构建及其对胃癌细胞增殖的抑制作用[J]. 基础医学与临床, 2015, 35(2): 162-166.
- [7] 张彭. 埃索美拉唑联合抗生素治疗幽门螺杆菌阳性萎缩性胃炎患者的效果及安全性观察[J]. 中国民康医学, 2016, 28(21): 26-28.
- [8] 张晓雪. 非甾体抗炎药相关性胃炎患者幽门螺杆菌感染对其胃黏膜功能的影响[J]. 中国民康医学, 2016, 28(24): 13-14.
- [9] 王丽昆, 杨娟, 李仲铭, 等. 三联, 四联疗法及Boulardii酵母菌在幽门螺杆菌根除治疗中的疗效评估[J]. 昆明医科大学学报, 2015, 36(2): 102-105.
- [10] 李世通, 杨兵. 幽门螺杆菌流行病学及耐药性研究现状[J]. 临床医药实践, 2016, 25(1): 53-55.
- [11] 李红伟, 李多杰, 柴大敏, 等. CIP2A和CK2 β 蛋白在食管鳞状细胞癌中的表达及其与预后的关系[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2016, 36(2): 200-205.
- [12] Wu Y, Gu TT, Zheng PS. CIP2A cooperates with H-Ras to promote epithelial-mesenchymal transition in cervical-cancer progression[J]. *Can Let*, 2015, 356(2): 646-655.
- [13] Guo Z, Liu D, Su Z. CIP2A mediates prostate cancer progression via the c-MYC signaling pathway[J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(8): 6587.
- [14] Khanna A, Rane JK, Kivinummi KK, et al. CIP2A is a candidate therapeutic target in clinically challenging prostate cancer cell populations[J]. *Oncotarget*, 2015, 5(23): 19661-19670.
- [15] Peng B, Lei N, Chai Y, et al. CIP2A regulates cancer metabolism and CREB phosphorylation in non-small cell lung cancer[J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11(1): 105-114.

- [16] Barragán E, Chillón MC, Castelló-Cros R, et al. CIP2A high expression is a poor prognostic factor in normal karyotype acute myeloid leukemia[J]. *Haematologica*,2015,100(5):183-185.
- [17] Liu CY, Hu MH, Chia-Jung H, et al. Lapatinib inhibits CIP2A/PP2A/p-Akt signaling and induces apoptosis in triple negative breast cancer cells[J]. *Oncotarget*,2016,7(8):9135-9149.
- [18] Lucas CM, Harris RJ, Holcroft AK, et al. Second generation tyrosine kinase inhibitors prevent disease progression in high-risk (high CIP2A) chronic myeloid leukaemia patients[J]. *Leukemia*,2015,29(7):1514-1523.
- [19] Liu J, Meng W, Zhang X, et al. CIP2A is associated with multidrug resistance in cervical adenocarcinoma by a P-glycoprotein pathway[J]. *Tumor Biol*,2016,37(2):2673-2682.
- [20] Xiao X, He Z, Cao W, et al. Oridonin inhibits gefitinib-resistant lung cancer cells by suppressing EGFR/ERK/MMP-12 and CIP2A/Akt signaling pathways[J]. *Int J Oncol*,2016,48(6):2608-2618.
- [21] Lucas C M, Milani M, Butterworth M, et al. High CIP2A levels correlate with an antiapoptotic phenotype that can be overcome by targeting BCL-XL in chronic myeloid leukemia[J]. *Leukemia*,2016,30(6):1273-1281.
- [22] 胡茜, 刘昆. CIP2A及c-Myc在宫颈癌组织中的表达及相关性分析[J]. *重庆医学*,2015,13(8):1072-1074.
- [23] Cristóbal I, Rojo F, Madoz-Gurpide J, et al. The cross-talk between Wnt/ β -Catenin and CIP2A/Plk1 signaling in prostate cancer: promising therapeutic implications[J]. *Mol Cell Bio*,2016,36(12):13-16.
- [24] Peng X, Jie Y, Jin H, et al. CIP2A down regulation enhances the sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine[J]. *Oncotarget*,2016,7(12):14831-14840.
- [25] 陈翠霞, 杨小敏, 祝晓芬, 等. CIP2A与c-myc在喉癌组织中的表达及临床意义[J]. *热带医学杂志*,2016,16(6):728-731.
- (收稿日期: 2016-02-20)
(本文编辑: 孙荣华)

陈飞, 李俊. 胃癌患者幽门螺杆菌感染与蛋白磷酸酶2A的癌性抑制因子表达增强的相关性[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*,2017,11(2):185-189.

中华医学会
CHINESE MEDICAL ASSOCIATION
1915