

• 临床检验研究论著 •

胃癌中 DAPK1 表达及其与临床病理因素的相关性研究

肖述兵¹, 万金龙¹, 彭碧华¹, 郑祖祥²

(湖北省仙桃市第一人民医院:1. 病理科;2. 普外科 433000)

摘要:目的 检测胃癌中死亡相关蛋白激酶 1(DAPK1) 基因表达水平, 并研究其与临床病理因素间的相关性。方法 采用免疫组织化学法(SP)检测胃癌肿瘤组织和癌旁正常组织中 DAPK1 基因表达, 采用半定量评分法评估, 分析 DAPK1 表达水平与胃癌临床病理因素间的相关性。**结果** 胃癌肿瘤组织标本中, DAPK1 蛋白质低、中和高表达分别有 52、19、5 例, 评分为 (3.7 ± 1.3) 分, 癌旁正常组织标本中, 低、中表达和高表达分别为 4、15、57 例, 评分为 (9.4 ± 2.1) 分, 胃癌肿瘤组织和癌旁正常组织评分差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。胃癌肿瘤组织中 DAPK1 表达在性别、年龄和不同肿瘤部位间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而组织学分级、TNM 分期、肿瘤最大径、淋巴结转移及远处转移对 DAPK1 表达的影响具有统计学意义 ($P < 0.05$); 胃癌肿瘤组织 DAPK1 表达评分与组织学分级、TNM 分期、肿瘤最大径、淋巴结转移和远处转移呈负相关 ($P < 0.05$)。**结论** DAPK1 在胃癌中的表达与肿瘤细胞的生长、浸润及转移紧密相关, 可作为胃癌诊断、病情及预后评估的指标。

关键词: 胃肿瘤; 死亡相关蛋白激酶 1; 肿瘤转移; 肿瘤浸润

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.12.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)12-1434-02

Expression level of DAPK1 in gastric cancer and its correlation with clinicopathologic factors

Xiao Shubing¹, Wan Jinlong¹, Peng Bihua¹, Zheng Zuxiang²

(1. Department of Pathology; 2. Department of General Surgery, Xiantao First People's Hospital, Xiantao, Hubei 433000, China)

Abstract: **Objective** To study the expression level of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in gastric cancer and its correlation with clinicopathologic factors. **Methods** Expression level of DAPK1 was detected with immunohistochemistry (SP) in gastric cancer tissues and normal tissues adjacent to carcinoma. The correlation between its expression level in gastric cancer and clinicopathologic factors was analyzed. **Results** The low, median and high expression of DAPK1 in gastric cancer were 52, 19 and 5 cases respectively, with expression score of 3.7 ± 1.3 , while there were 4, 15 and 57 cases in normal tissues adjacent carcinoma with expression score of 9.4 ± 2.1 . The differences of DAPK1 expression between different gender, age and tumor site were not statistically significant ($P > 0.05$), while between different histology grade, TNM staging, tumor size, lymphatic metastasis and distant metastasis were statistically significant ($P < 0.05$). DAPK1's expression was correlated negatively with histology grade, TNM staging, tumor size, lymphatic metastasis and distant metastasis ($P < 0.05$). **Conclusion** Expression of DAPK1 in gastric cancer tissues might be correlated with the growth, infiltration and metastasis of cancer, which could act as a marker for the diagnosis, condition and prognosis evaluation of gastric cancer.

Key words: stomach neoplasms; death associated protein kinase 1; neoplasm metastasis; tumor infiltrating

死亡相关蛋白激酶 1(DAPK1) 为钙调蛋白调节的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是细胞凋亡的正性调节因子之一, 广泛存在于各种细胞凋亡系统中, 具有抑制肿瘤细胞增殖及促进凋亡的作用, 与肿瘤的发生、发展和转移密切相关^[1-2]。研究表明, DAPK1 基因启动子表观遗传学改变与胃癌的发病机制及转移浸润紧密相关, 但目前对 DAPK1 表达与胃癌临床病理因素间的关系报道较少^[3-4]。本研究采用免疫组织化学法(SP)检测胃癌肿瘤组织和癌旁正常组织中 DAPK1 蛋白质表达, 分析 DAPK1 基因表达与胃癌临床病理因素间的关系, 研究胃癌分子诊断、病情评价与预后评估的分子标志物。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2005 年 1 月至 2011 年 1 月 76 例原发性胃癌患者胃癌根治术切除的标本, 标本取材于肿瘤组织及癌旁正常组织(距癌灶边缘 5 cm 以外), 取材后迅速转移至液氮保存备用。均为体检、胃镜和病理组织学检查确诊的初治患者, 术前未行放疗及化疗, Karnofsky(KPS)评分大于或等于

60 分。其中男性 46 例, 女性 30 例; 年龄 32 ~ 78 岁, 平均 (58.5 ± 7.2) 岁; 根据美国癌症联合委员会(AJCC)胃癌 TNM 分期: I 期 20 例, II 期 27 例, III 期 17 例, IV 期 12 例; 组织学分级 G1 和 G2 期 26 例, G3 和 G4 期 50 例。

1.2 方法

1.2.1 DAPK1 免疫组织化学检测 采用 SP 法检测肿瘤组织及癌旁正常组织 DAPK1 蛋白质表达。烤片后常规二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水; 3% H₂O₂ 阻断灭活内源性过氧化物酶后 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液 (pH 6.0) 中用煮沸 15 min, 冷却后 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 正常羊血清 37 °C 封闭 10 min, 羊抗人 Dkk-3 多克隆一抗 4 °C 冰箱孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 滴加生物素标记二抗, 37 °C 孵育 25 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液, 37 °C 孵育 25 min 后 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 加入 DAB/H₂O₂ 反应显色, 充分洗净后苏木素复染, 常规脱水、透明、干燥和封片后显微镜下观察。

1.2.2 DAPK1 表达分析 采用半定量评分法。染色强度评分:无色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。阳性细胞百分比评分:阴性为 0 分,阳性细胞小于 10% 为 1 分,阳性细胞 10%~50% 为 2 分,阳性细胞 51%~80% 为 3 分,阳性细胞 81%~100% 为 4 分。总染色评分=染色强度评分×阳性细胞百分比评分。总染色评分为 0~12 分,0~4 分为低表达,5~8 分为中表达,9~12 分为高表达。每个标本做连续切片 3 张,取平均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验;计数资料进行 χ^2 检验;DAPK1 表达相关因素采用 Spearman 秩相关分析。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 DAPK1 蛋白质表达 胃癌肿瘤组织 DAPK1 蛋白质低、中和高表达的标本数分别为 52、19、5 例,评分为(3.7±1.3)分,癌旁正常组织表达低、中和高表达的标本数分别为 4、15、57 例,评分为(9.4±2.1)分,差异具有统计学意义(*P* < 0.01)。

2.2 DAPK1 表达与临床病理因素的关系 DAPK1 在胃癌肿瘤组织中低、中和高表达的标本在性别、年龄和肿瘤部位间差异无统计学意义(*P* > 0.05),但当标本的组织学分级低、TNM 分期高、肿瘤最大径大、有淋巴结转移及远处转移时 DAPK1 低表达比例更高(*P* < 0.05),见表 1。

表 1 胃癌 DAPK1 表达与临床病理因素单因素分析

临床病理因素	<i>n</i>	DAPK1 表达[n(%)]			χ^2 值	<i>P</i> 值	
		低表达	中表达	高表达			
性别	男	46	31(67.4)	12(26.1)	3(6.5)	0.074	0.964
	女	30	21(70.0)	7(23.3)	2(6.7)		
年龄	<60 岁	41	26(63.4)	12(29.3)	3(7.3)	1.049	0.592
	≥60 岁	35	26(74.3)	7(20.0)	2(5.7)		
肿瘤部位	贲门	20	14(70.0)	5(25.0)	1(5.0)	0.181	0.996
	胃体	25	17(68.0)	6(24.0)	2(8.0)		
	胃窦	31	21(67.7)	8(25.8)	2(6.5)		
组织学分级	G1+G2	26	11(42.3)	12(46.2)	3(11.5)	12.556	0.004
	G3+G4	50	41(82.0)	7(14.0)	2(4.0)		
TNM 分期	I+II 期	47	26(55.3)	17(36.2)	4(8.5)	10.030	0.040
	III+IV 期	29	26(89.7)	2(6.9)	1(3.5)		
肿瘤最大径	<5 cm	42	23(54.8)	15(35.7)	4(9.5)	8.108	0.017
	≥5 cm	34	29(85.3)	4(11.8)	1(2.9)		
淋巴结转移	无	31	15(48.4)	12(38.7)	4(12.9)	10.190	0.006
	有	45	37(82.2)	7(15.6)	1(2.2)		
远处转移	无	64	40(62.5)	19(29.7)	5(7.8)	6.577	0.037
	有	12	12(100.0)	0(0.0)	0(0.0)		

表 2 胃癌 DAPK1 表达评分与临床病理因素相关性

临床病理因素	秩相关系数(<i>r_s</i>)	<i>P</i> 值
组织学分级	-0.518	<0.05
TNM 分期	-0.723	<0.05

续表 2 胃癌 DAPK1 表达评分与临床病理因素相关性

临床病理因素	秩相关系数(<i>r_s</i>)	<i>P</i> 值
肿瘤最大径	-0.539	<0.05
淋巴结转移	-0.451	<0.05
远处转移	-0.817	<0.05

2.3 DAPK1 表达与临床病理因素相关性研究 胃癌肿瘤组织 DAPK1 表达评分与组织学分级、TNM 分期、肿瘤最大径、淋巴结转移和远传转移呈负相关(*P* < 0.05),见表 2。

3 讨 论

DAPK1 基因位于染色体 9q34.1,是一种钙调蛋白调节的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在各种组织中广泛表达,参与内源性和外源性凋亡通路,是凋亡的正性调节因子^[5]。DAPK1 基因在正常组织中均有表达,在肝癌、肺癌及膀胱癌等肿瘤中呈低表达或缺失状态^[6-9]。研究表明,胃癌中 DAPK1 基因启动子处于高甲基化状态,肿瘤组织和外周血浆中的高甲基化可能为胃癌的诊断以及临床预后评估提供有益的线索^[10]。孔祥勇等^[11]检测了 66 例胃癌标本 DAPK1 基因启动子的甲基化状态,胃癌组织中有 66.7%(44/66)存在 DAPK1 基因的异常甲基化,显著高于相应的癌旁正常组织[10.6%(7/66)](*P* < 0.01)。体外培养表明,采用 5 氮杂胞苷逆转 BGC823 与 SCG7901 胃癌细胞 DAPK1 基因启动子甲基化后,胃癌细胞生长增殖活性明显被抑制,DAPK1 基因的 mRNA 表达明显增加^[12]。本研究中,胃癌肿瘤组织 DAPK1 蛋白质表达评分为(3.7±1.3)分,癌旁正常组织为(9.4±2.1)分,肿瘤组织 DAPK1 表达显著低于癌旁正常组织(*P* < 0.01),因此,胃癌中 DAPK1 基因处于低表达状态,可能与其启动子表观遗传学等改变有关。

本研究分析了 DAPK1 基因表达与胃癌临床病理因素间的关系,结果表明 DAPK1 在胃癌组织中低、中、高表达在性别、年龄和肿瘤部位中无明显差异(*P* > 0.05),在组织学分级、TNM 分期、肿瘤最大径、淋巴结转移及远处转移中的差异具有统计学意义(*P* < 0.05),进一步相关性分析表明肿瘤组织 DAPK1 表达评分与组织学分级、TNM 分期、肿瘤最大径、淋巴结转移和远传转移呈负相关(*P* < 0.05),与 DAPK1 基因启动子甲基化在胃癌中与临床病理因素的关系基本一致。提示 DAPK1 基因表达越低,患者病情越重,预后越差,因此,笔者认为 DAPK1 基因在胃癌中的表达与肿瘤细胞的生长、浸润及转移紧密相关,可作为胃癌诊断,病情及预后评估的标志物。

参考文献

[1] Chou SE, Huang CY, Sheen-Chen SM, et al. An evaluation of prognostic value of death-associated protein kinase 1 in breast cancer[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(10): 3633-3636.

[2] 刘莺,李克,刘文静,等. DAPK mRNA 和蛋白在食管鳞癌组织中的表达及意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(31): 3218-3222.

[3] 姜晓东,胡世莲,孙玉蓓,等. 胃癌中 E-cadherin 和 DAPK 基因启动子异常甲基化的研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2009, 36(7): 383-387.

[4] 夏俊,熊奇如. DAPK 在肿瘤中的研究进展[J]. *国际外科学杂志*, 2008, 35(8): 559-561.

[5] Hafner N, Diebold H, Jansen L, et al. Hypermethylated DAPK in serum DNA of women with uterine leiomyoma is a biomarker not restricted to cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2011, (下转第 1437 页)

检测。

1.4 统计学处理 用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理。所有计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较用 *t* 检验。T 淋巴细胞亚群和铁蛋白的相关关系采用直线相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AS 组 CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 均明显低于健康对照组 ($P < 0.05$), CD8⁺ 明显高于健康对照组 ($P < 0.05$), 铁蛋白明显高于健康对照组 ($P < 0.05$)。疾病对照组 CD4⁺ 和 CD8⁺ 均明显低于健康对照组 ($P < 0.05$), CD4⁺/CD8⁺ 明显高于健康对照组 ($P < 0.05$), 铁蛋白高于健康对照组 ($P < 0.05$)。AS 组 CD8⁺ 明显高于疾病对照组 ($P < 0.05$), CD4⁺/CD8⁺ 明显低于疾病对照组 ($P < 0.05$), 铁蛋白明显高于疾病对照组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组中 T 淋巴细胞亚群和铁蛋白水平比较

组别	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	铁蛋白(ng/ml)
AS 组	31.87±3.19	28.02±4.23	1.10±0.39	282.45±40.32
疾病对照组	32.26±4.21	16.54±2.77	2.12±0.42	187.05±54.98
健康对照组	38.45±5.26	22.30±4.65	1.72±0.52	152.34±26.63

2.2 AS 组铁蛋白与 CD8⁺ 呈正相关 ($r = 0.8469, P < 0.05$), 与 CD4⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 比值呈负相关 (r 分别为 $-0.7487, -0.5820, P < 0.05$)。

3 讨 论

CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞通常指表达 T 细胞受体 (TCR) α, β 的 T 细胞。CD4⁺ T 细胞可以帮助 CD8⁺ T 细胞、B 细胞活化与产生抗体, 并能激活巨噬细胞, 增强其杀伤胞内菌和抗原呈递能力, 故 CD4⁺ T 细胞又称为辅助性 T 细胞 (Th)。而 CD8⁺ T 细胞识别由 8~10 个残基组成的外源性抗原肽^[4]。CD8⁺ T 细胞主要执行杀伤被病毒及其他胞内寄生微生物感染的靶细胞的功能, 故又被称为细胞毒性 T 细胞 (Tc), 其释放的肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和干扰素- γ (IFN- γ) 与靶细胞表面的受体结合, 可造成靶细胞的死亡^[5]。本研究观察到 AS 患者 CD4⁺ T 细胞和 CD4⁺/CD8⁺ 比值明显降低, 而 CD8⁺ T 细胞明显升高, 与国内报道基本一致^[6-7], 说明细胞免疫功能受到抑制, 体液免疫功能相对亢进, 提示 AS 患者存在 T 淋巴细胞亚群功能紊乱, 进一步探讨 CD4⁺、CD8⁺ 的平衡关系将有助于理解其在 AS 发生、发展中的作用, 从而为临床评估病情以及治

疗提供新的思路^[8-9]。

铁蛋白是一种急性时相反应蛋白, 在机体发生炎症反应时, 巨噬细胞活化并且铁蛋白合成增加。实验证明铁蛋白具有多种免疫活性, 可以结合 T 淋巴细胞并抑制玫瑰花环形成, 抑制迟发型超敏反应, 也可抑制 B 细胞产生抗体, 削弱中性粒细胞的吞噬功能。在 AS 中, 单核巨噬细胞产生多种炎症反应性细胞因子, 如 TNF- α 、白细胞介素 (IL)-1、IL-6、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ , 这些细胞因子可以减少转铁蛋白合成, 增加铁蛋白的合成, 提示铁蛋白可以作为 AS 诊断的客观指标, 其升高机制可能与炎症细胞因子导致的免疫功能紊乱有关^[10]。

综上所述, T 淋巴细胞亚群和铁蛋白可能参与了 AS 的发生、发展的过程, 对 AS 患者的早期诊治有较大的帮助。

参考文献

- [1] 赵丹, 杨小猛, 马文松, 等. HLA-B27 阳性类风湿关节炎和强直性脊柱炎患者外周血 T 细胞亚群分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 150-153.
- [2] You SA, Wang Q. Ferritin in atherosclerosis[J]. Clin Chim Acta, 2005, 357(1): 1-16.
- [3] 朱宇芳. 流式细胞术检测人类白细胞抗原-B27 在诊断强直性脊柱炎中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7): 735-736.
- [4] 王德炳. 血液免疫学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2009: 24-29.
- [5] 张文兰, 胡同平, 王永福. 多种自身抗体检测对类风湿关节炎早期诊断的意义[J]. 中国药物与临床, 2011, 11(8): 965-967.
- [6] 苏卓娃, 马文松, 赵丹, 等. 强直性脊柱炎患者外周血 T 细胞亚群极化状态的研究[J]. 中华免疫学杂志, 2007, 23(10): 947-949.
- [7] 薛丽巾, 王秦, 罗静, 等. 类风湿关节炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群与临床相关性分析[J]. 中国医药, 2011, 6(6): 692-694.
- [8] 杜秀敏, 胡成进. 强直性脊柱炎患者外周血 T 细胞亚群及其 CD3⁺CD69⁺、CD3⁺CD54⁺ 检测[J]. 标记免疫分析与临床, 2007, 14(1): 39-40.
- [9] 孔瑞娜, 童强, 蔡青, 等. CD28⁻ T 细胞亚群在类风湿关节炎患者外周血和关节液中的表达[J]. 中华风湿病学杂志, 2011, 15(9): 611-614.
- [10] 任传永, 徐亮. 血清铁蛋白在风湿性疾病中的研究进展[J]. 安徽医学, 2009, 30(8): 980-981.

(收稿日期: 2011-12-09)

(上接第 1435 页)

121(1): 224-229.

- [6] Michie AM, McCaig AM, Nakagawa R, et al. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction; regulation in cancer[J]. Febs J, 2010, 277(1): 74-80.
- [7] 李培坤, 耿小平, 朱立新, 等. 肝癌细胞系中 SLIT2、DAPK、RIZ1、CHFR、EDNRB、3-OST-2 基因甲基化状态[J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(5): 412-415.
- [8] 彭再梅, 山长婷, 王惠芳, 等. 诱导痰 RASSF1A, p16 和 DAPK 基因启动子区甲基化在肺癌诊断中的价值[J]. 中南大学学报: 医学版, 2010, 35(3): 247-253.
- [9] 胡礼炳, 王国民, 张利能, 等. 膀胱癌细胞中 DAPK 基因启动子甲

基化状态分析[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(4): 489-491.

- [10] 沈建军, 胡世莲, 沈干, 等. RUNX3、DAPK 基因甲基化及其蛋白表达与胃癌病情的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(5): 613-617.
- [11] 孔祥勇, 胡世莲, 孙玉蓓, 等. 胃癌中 DAPK 基因启动子区 CpG 岛高甲基化的研究[J]. 肿瘤, 2009, 29(11): 1065-1069.
- [12] 王贺玲, 张健, 李岩, 等. 5-Aza-CdR 与低浓度 CDDP 联合用药对胃癌细胞系生长及 DAPK1 的影响[J]. 实用药物与临床, 2011, 14(1): 9-11.

(收稿日期: 2012-01-13)