

# 胰十二指肠同源基因 1 在胃癌中的表达及对胃癌生物学行为的影响

马娟<sup>1</sup>, 余莲英<sup>1</sup>, 廖山婴<sup>1</sup>, 王蓓蓓<sup>1</sup>, 沙卫红<sup>1</sup>, 王启仪<sup>1</sup>, 刘庆华<sup>2\*</sup>

(1. 广东省人民医院//广东省医学科学院消化科, 广东 广州 510080; 2. 中山大学附属第一医院肾内科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】明确 PDX1 基因在胃癌中的表达模式, 探讨 PDX1 表达上调对胃癌细胞增殖和凋亡的影响, 从而揭示 PDX1 在胃癌发生发展中的作用。【方法】免疫组化法检测胃癌组织芯片的 PDX1 蛋白表达, RT-PCR 和免疫印迹法检测 3 株胃癌细胞(AGS、SGC7901、BCG823)PDX1 mRNA 表达; 构建 PDX1 正义表达载体, 瞬时转染胃癌细胞, 免疫印迹法检测转染后 PDX1、Ki-67、PCNA、Caspase3 的表达, 同时检测转染后胃癌细胞的增殖指数和凋亡指数。筛选 PDX1 稳定表达株, 评价胃癌细胞伤口愈合、克隆形成、移植瘤形成等生物学行为。【结果】胃癌组织芯片包括 171 例腺癌, 12 例黏液腺癌, 6 例印戒细胞癌, 5 例未分化癌, 7 例恶性间质瘤, 1 例类癌, 8 例正常胃黏膜组织。PDX1 蛋白在正常胃黏膜组织中腺上皮细胞的胞浆及胞核中高表达, 胃癌组织中 PDX1 蛋白则表达下降甚至缺失( $P < 0.05$ ); 肿瘤分化级别越高, PDX1 表达随之下降( $P < 0.05$ ); 与淋巴结无转移组比较, 淋巴结转移组 PDX1 表达显著降低( $P < 0.05$ )。与正常对照相比, PDX1 mRNA 和蛋白在胃癌细胞中表达微弱。瞬时转染 PDX1 正义表达载体后, PDX1 表达明显上调, 胃癌细胞增殖相关蛋白 Ki67 和 PCNA 下降, 增殖指数显著下降; 凋亡蛋白 Caspase3 被激活, cleaved-Caspase3 被诱导表达, 凋亡指数显著增加。与空质粒对照组比较, PDX1 稳定过表达抑制了体外胃癌细胞的伤口愈合率以及克隆形成率和体内裸鼠移植瘤形成率( $P < 0.05$ )。【结论】PDX1 基因在胃癌组织和细胞中表达下调, 与癌组织淋巴结转移与分化程度有关; PDX1 基因可能在胃癌发展过程中可能起着重要作用。

**关键词:** 胰十二指肠同源基因 1; PDX1; 胃癌; 生物学行为

**中图分类号:** R73      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2014)02-0215-09

## Expression of Pancreatic Duodenal Homeobox1 Gene and Its Effects on Cell Biological Behavior in Gastric Cancer

MA Juan<sup>1</sup>, YU Lian-ying<sup>1</sup>, LIAO Shan-ying<sup>1</sup>, WANG Bei-bei<sup>1</sup>, SHA Wei-hong<sup>1</sup>, WANG Qi-yi<sup>1</sup>, LIU Qing-hua<sup>2\*</sup>  
(1. Department of Gastroenterology and Hepatology, Guangdong General Hospital//Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objectives】 To determine PDX1 gene expression in gastric malignant and the influence of PDX1 upregulation in proliferation and apoptosis of gastric cancer cells. 【Methods】 Gastric cancerous tissue chips were used for detecting PDX1 protein expression by immunohistochemical staining. Three gastric cancer cell lines (AGS, SGC7901, BCG823) were used for detecting PDX1 mRNA and protein level by RT-PCR and Western blotting. Using gastric cancer cells in vitro, effects of PDX1 on cell proliferation and apoptosis after transient transfection with PDX1 vector as well as clone formation and wound healing after stable transfection were assessed. Using xenograft mice in vivo, tumor formation was evaluated. 【Results】 The gastric malignant chip includes 171 adenocarcinomas, 12 mucinous adenocarcinoma, 6 signet cell cancers, 5 undifferentiated carcinomas, 7 malignant stromal tumors, 1 carcinoid and 8 gastric normal tissues. PDX1 protein was positive in plasma and nuclear of the normal gastric gland cells while absent or significantly down-regulated in gastric cancer ( $P < 0.05$ ). Compared with normal control, PDX1 mRNA and protein level were also weakly in gastric cancer cell lines. After transient transfection, Ki67 and PCNA were decreased and cleaved-Caspase3 was induced following by PDX1 gene over-expression. Meanwhile, the proliferation index was decreased for 48 hours after

收稿日期: 2013-11-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81001112); 广州市科技局珠江科技新星项目资助(2012J2200019)

作者简介: 马娟, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 消化道肿瘤的临床及基础研究, E-mail: majuanhku@hotmail.com; \* 通信作者: 刘庆华, 医学博士, 副教授, E-mail: mjqlh@163.com

transfection and the apoptotic index was increased for 24 hours after transfection. PDX1 overexpression significantly decreased the rates of wound healing, colonal formation and xenotransplanted tumor formation ( $P < 0.05$ ). 【Conclusion】 This study implies that PDX1 gene is down-regulated in gastric cancerous tissues and cells and is associated with lymphatic metastasis and differentiation. Up-regulation of PDX1 gene inhibits gastric carcinogenesis.

**Key words:** pancreatic duodenal homeobox1; PDX1; gastric cancer

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(2):215-223]

胰十二指肠同源异型基因 1 (pancreatic duodenal homeobox1, PDX1), 是 Homeobox 家族中 ParaHox 亚家族的一个转录因子<sup>[1]</sup>, 编码胰腺十二指肠同源框蛋白 1 (pancreatic duodenal homeoprotein 1), 与胚胎消化道的发育分化和胃的病理过程有关。Pdx1 基因选择性表达于胰脏内分泌腺的  $\beta$  细胞、十二指肠绒毛上皮的 Brunner 氏腺体以及胃窦内分泌腺细胞<sup>[2-4]</sup>。Pdx1 基因敲除小鼠的胃十二指肠接合处难以发育成熟, 导致小鼠胃排空异常, 最终形成胃潴留<sup>[5]</sup>。PDX1 基因表达异常可能与胃粘膜萎缩及化生的免疫学和形态学有关<sup>[6]</sup>, 亦与胃角假幽门腺化生及胃肿瘤有关<sup>[7]</sup>。但至今尚无 PDX1 基因及蛋白在胃癌发生发展中的功能研究。我们前期研究发现 PDX1 在伴有萎缩和肠化生的胃粘膜中表达下降<sup>[8]</sup>, 故本研究旨在明确 PDX1 在胃癌及癌旁组织中的表达模式, 探讨 PDX1 基因对胃癌细胞增殖凋亡的影响, 从而揭示 PDX1 在胃癌发生发展中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象

胃癌和正常组织组合微阵列芯片, 含 TNM 和病理分级, 217 例/217 点, 包括腺癌 172 例, 黏液腺癌 12 例, 未分化癌 5 例, 印戒细胞癌 6 例, 类癌 3 例, 鳞状细胞癌 1 例, 恶性间质瘤 9 例, 正常胃组织 8 例, 每例一点。另购买 3 例人胃癌细胞株 SGC7901、AGS、BCG823, 培养于含 100 mL/L 胎牛血清、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  青霉素、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 70%、体积分数为 5% 的  $\text{CO}_2$  恒温孵育箱中常规培养、传代。

### 1.2 免疫组化

组织芯片常规脱蜡至水, 切片置于柠檬酸缓冲液中 (0.01 mol/L, pH 6.0) 经微波 95  $^{\circ}\text{C}$  10 min 修复抗原, 0.3% 过氧化氢甲醇溶液室温培育 30 min 以封闭非特异性抗原, 一抗为 1:300 兔抗

PDX1 (Santa-Cruz, 美国), 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.01 mol/L, pH 7.4) 代替一抗作为阴性对照。然后滴加辣根过氧化酶的二抗 (羊抗兔, 1:100, DaKo 公司), 室温下孵育 1 h。3, 3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 细胞核用苏木素复染 10 s, 中性树脂封片。结果判断: 根据病理切片染色深度及染色面积共同评估, 予以评分。染色面积评分: 0~5% 为 0 分, >5%~35% 为 1 分, >35%~65% 为 2 分, >65% 为 3 分; 染色深度评分: 不显色或显色不清为 0 分, 土黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 深褐色为 3 分, 两个评分相加除 2 取平均值, 然后 0.5~1 为 1 分 (+), 1.5~2.0 为 2 分(++), 2.5~3.0 为 3 分(+++)。

### 1.3 RT-PCR

TRIZOL 试剂提取组织总 RNA, 取 1  $\mu\text{g}$  RNA 样本使用逆转录 cDNA 合成试剂盒 (ThermoScript<sup>TM</sup> RT-PCR System): Cat. No. 11146-024, Invitrogen 公司) 逆转录合成 cDNA, -80 $^{\circ}\text{C}$  低温保存。分别加入 2  $\mu\text{L}$  Hotstar DNA *Taq* 酶、0.5  $\mu\text{L}$  上下游引物 (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )、2  $\mu\text{L}$  cDNA 模板、15  $\mu\text{L}$  双蒸水于 200  $\mu\text{L}$  的 Eppendorf 管中, 混匀。设置反应参数: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 接着 94  $^{\circ}\text{C}$   $\times$  20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$   $\times$  20 s, 72  $^{\circ}\text{C}$   $\times$  40 s 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。PDX1 合成引物序列为: 5' -CGGAAGAAAAGAGCC ATTG-3' (Forward) 和 5' -GCCAGAGGAAGAGGA GGACT-3' (Reverse), 扩增产物 354 bp; GAPDH 合成引物序列为: 5' -GACCACAGTCCATGCCATC AC-3' (Forward) 和 5' -GTCCACCACCCTGTTGCT GTA-3' (Reverse), 扩增产物 454 bp。

### 1.4 免疫印迹法

细胞转染 24 h 后, 弃去培养液, 冰 PBS 洗两遍, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  细胞裂解液, 经细胞刮刮取细胞裂解物, 冰上裂解 30 min。以 4  $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 $\times g$  离心 10 min。收集上清, BSA 标准品定量后, 各取 20  $\mu\text{g}$ , 95 度变性 10 min, 进行 12% SDS-PAGE。将蛋白用半干转移法转印至 PVDF 膜。膜用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 与 1:150 稀释的抗 PDX1 抗体

(Santa-Cruz 公司)4℃孵育过夜。膜与1:3 000稀释的辣根过氧化物酶( peroxidasehorseradish, HRP)偶联的抗兔IgG室温孵育1h后,利用ECL化学发光检测试剂盒进行检测。

### 1.5 PDX1 正义表达载体的构建、转染及筛选

亚克隆含有PDX1 cDNA全长的pUB-PDX1质粒,制作大肠杆菌感受态,转化细菌,抽提质粒保存。培养SGC7901细胞,利用Lipofecter脂质体转染后继续培养至少24h,详细步骤参考以往研究<sup>[9]</sup>。如果用于筛选稳定表达细胞株,则在转染后24h加入含有1 000 μg/mL G418的RMPI1640培养液,筛选4周,然后用含600 μg/mL G418的RMPI1640培养液稳定培养。转染空质粒pcDNA3.1(+)的细胞作为对照。

### 1.6 细胞增殖检测

$5.0 \times 10^4$ /个细胞孔接种96孔板中,培养过夜。瞬时转染空质粒pcDNA3.1或PDX1,DNA与脂质体按0.2 μg:0.5 μL的比例混合;37℃,体积分数5% CO<sub>2</sub>培养24h、48h;每孔加入10 μL WST-1,37℃,体积分数5% CO<sub>2</sub>继续培养4h;酶联免疫检测仪480 nm波长处测定细胞的吸光度值(D);计算出 $D_{\text{实验组}}/D_{\text{空白对照组}}$ ,即细胞增殖指数。

### 1.7 细胞凋亡检测

接种 $5.0 \times 10^6$ /孔个细胞于六孔板中,培养过夜;瞬时转染空质粒pcDNA3.1或PDX1,DNA与脂质体按0.4 μg:5 μL比例混合;37℃,体积分数5%CO<sub>2</sub>培养24、48h;按照试剂盒Apo-BrdU Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, USA)的要求,收集、固定、染色细胞;荧光显微镜下计算1 000个细胞中凋亡细胞的个数,计算出凋亡指数(凋亡细胞数/1 000 × 100%)。

### 1.8 伤口愈合实验

取六孔板,种植每孔 $1 \times 10^6$ 稳定转染细胞,培养24h至细胞密度接近100%。用无菌1 000 μL的移液枪头沿孔中央轻轻划出一伤口,并用PBS冲洗划痕处以去除划落的细胞。然后分别观察0、24、48、72h伤口愈合情况,计算伤口愈合率(%) = 观察时间点的伤口宽度/0点伤口宽度 × 100%。

### 1.9 细胞克隆形成实验

取六孔板,种植每孔 $2 \times 10^3$ 稳定转染单细胞悬液,轻轻转动,使细胞分散均匀,静置培养2周,观察至培养板中出现肉眼可见的克隆时即终止培

养。弃上清,甲醇固定,适量0.005%龙胆紫溶液染色,然后用流水缓慢洗去染色液,空气干燥;在低倍倒置光学显微镜下计数50个细胞以上的克隆数,计算克隆形成率(克隆形成率=克隆数/接种细胞数 × 100%)。

### 1.10 裸鼠成瘤性实验

8只裸鼠随机分为2组,空质粒组和PDX1组,分别接种 $5 \times 10^6$ 稳定表达胃癌细胞接种至裸鼠右侧腹肋处皮下。接种3周后处死裸鼠,观察移植瘤形成率。

### 1.11 统计学分析

计数资料用Mean ± SEM表示,采用Student *t* test和单因素方差分析(ANOVA)比较。计量资料用率表示,采用卡方检验(Pearson Chi-Square和Fisher's Exact Test)比较。等级资料半定量表示,采用Wilcoxon W秩和检验比较。 $P < 0.05$ 被认为组间差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 PDX1 基因在胃癌组织中表达下调

免疫组化染色结果显示,共有6例发生组织脱片,包括1例腺癌、类癌2例、鳞癌1例、恶性间质瘤2例,因组织缺失、未能染色、无法定量,故剔除。最终纳入胃恶性肿瘤202例,男性154例,女性48例,平均年龄32~94(59.67 ± 0.77)岁,包含171例腺癌、12例黏液腺癌、6例印戒细胞癌、5例未分化癌、7例恶性间质瘤、1例类癌。同时8例正常胃黏膜组织作为正常对照,男性5例,女性3例,平均年龄15~50(36.75 ± 3.91)岁。

本研究用免疫组化法检测了胃癌组织芯片的PDX1蛋白表达水平,PDX1蛋白在正常胃黏膜组织中腺上皮细胞的胞浆及胞核中高表达(被染成黄褐色),尤以那些增殖性腺腔为显著(图1A、B);胃癌组织中PDX1蛋白则表达下降甚至缺失(图1C、D)。定量分析结果显示胃癌标本有202例,包括31例阴性、82例+、52例++、37例+++。对照正常组织有8例,全部阳性,包括2例++、6例+++。以两组等级资料进行Wilcoxon W秩和检验, $Z = -3.548, P < 0.001$ ,结果显示胃癌组织中PDX1表达明显低于对照组。进一步两组评分分别为 $1.75 \pm 0.16, 1.46 \pm 0.07$ ,与正常对照相比,胃癌组织中PDX1表达显著降低( $P < 0.0001$ ,图1E)。进一步

分析病例性别、年龄、病理类型、病理分级、TNM 分期等变量与 PDX1 蛋白表达的关系。如表 1 所示,不同 TNM 分期 (I 期至 IV 期),PDX1 表达虽有下降趋势,但无显著性差异 ( $P > 0.05$ ),进一步比较淋巴结转移与 PDX1 表达的关系,结果显示与无淋巴结转移组比较,淋巴结转移组 PDX1 表达评分显著下降 ( $P = 0.04$ ;图 1F)。171 例腺癌组织中,

高分化组 ( $n = 11$ )、中分化组 ( $n = 45$ )、低分化组 ( $n = 107$ )、未分化组 ( $n = 8$ )PDX1 蛋白定量分别为  $0.82 \pm 0.30$ 、 $1.33 \pm 0.16$ 、 $1.64 \pm 0.08$ 、 $1.63 \pm 0.26$ ,组间差异有统计学意义 (ANOVA,  $1.63 \pm 0.26$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.02$ ;图 1G)。随着年龄不断增加,胃癌中 PDX1 表达有下降趋势,如表 1,青年组 ( $n = 20$ )、中年组 ( $n = 78$ )、老年组 ( $n = 104$ )PDX1 蛋

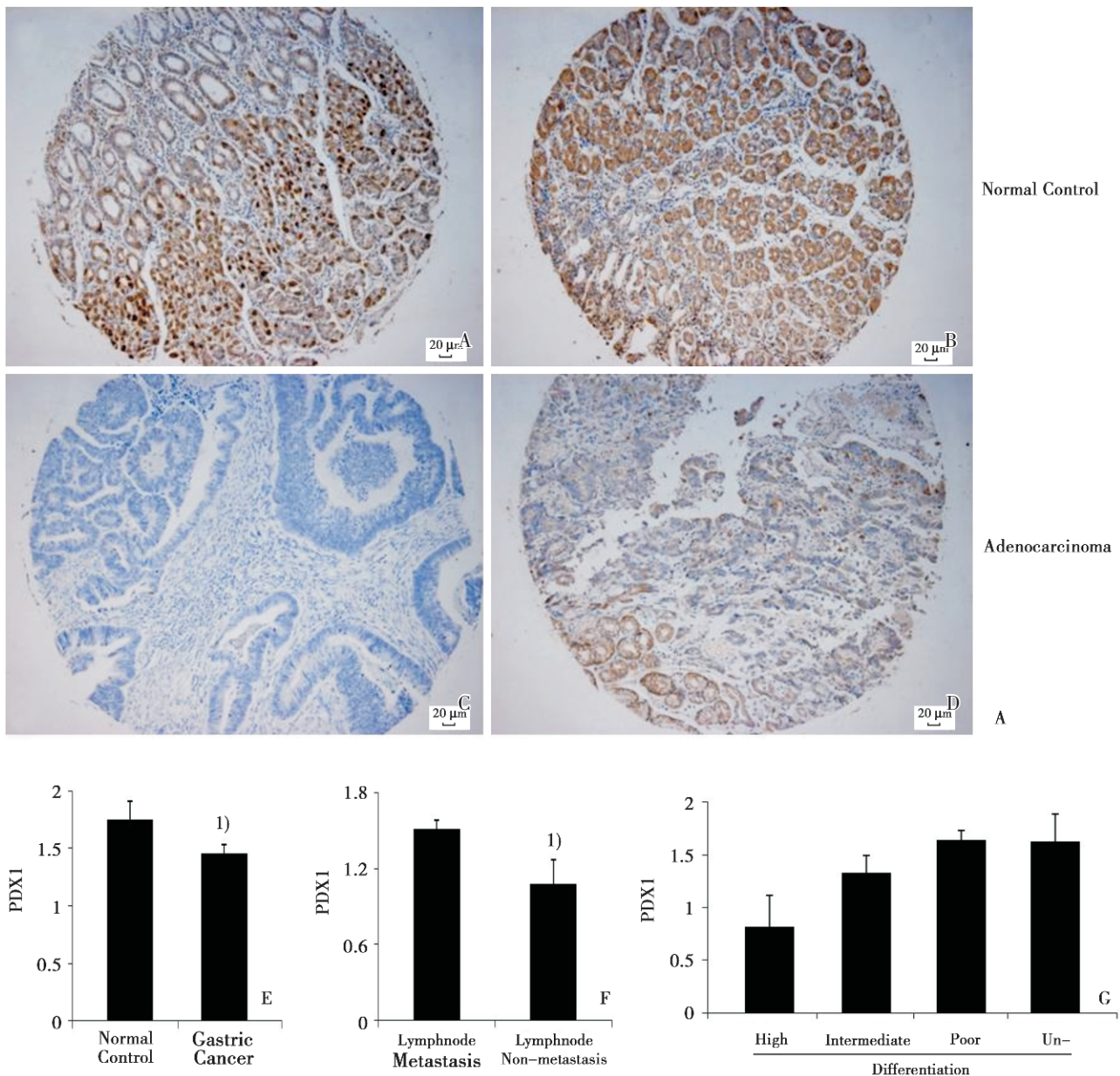


图 1 PDX1 基因在胃癌组织中的表达

Fig.1 Expression of PDX1 gene in gastric cancerous tissues

A and B: PDX1 protein was positive in nuclear and plasma of gastric normal gland cells, especially proliferational glands (A). C and D: PDX1 protein was weak (D) or negative (C) in gastric adenocarcinoma. E: Compared to normal control PDX1 protein level was decreased significantly in gastric cancer by IHC ( $P < 0.05$ ). F: Compared to gastric cancerous tissues without lymphnode metastasis, PDX1 protein was decreased significantly in gastric cancerous tissues with lymphnode metastasis ( $P < 0.05$ ). G: PDX1 protein level was significantly different among gastric cancerous tissues with different differentiation ( $P < 0.05$ ).

表 1 病例临床资料变量与 PDX1 蛋白表达的相关性分析

Table 1 PDX1 protein expression relative to clinical values of gastric cancer cases				
	Value	Cases(n)	PDX1	Statistics
Gender	Male	154	1.45 ± 0.08	<i>P</i> = 0.68
	Female	48	1.52 ± 0.13	
Age/years	Youth	20	1.85 ± 0.16	<i>P</i> = 0.11
	Middle age	78	1.51 ± 0.11	
	Old age	104	1.37 ± 0.09	
Pathological types	Adenocarcinoma	171	1.46 ± 0.77	<i>P</i> = 0.26
	Mucinous adenocarcinoma	12	1.42 ± 0.23	
	Signet ring cell cancer	6	2.00 ± 0.26	
	Undifferentiated carcinoma	5	2.00 ± 0.32	
	Others	8	1.00 ± 0.00	
TNM stage	I	123	1.56 ± 0.09	<i>P</i> = 0.25
	II	44	1.27 ± 0.14	
	III	13	1.15 ± 0.27	
	IV	3	1.33 ± 0.33	
Lymphnode metastasis <sup>1)</sup>	No	179	1.51 ± 0.07	<i>P</i> = 0.04
	Yes	24	1.08 ± 0.19	
Pathological grading <sup>2)</sup>	High differentiation	11	0.82 ± 0.30	<i>P</i> = 0.02
	Intermediate differentiation	45	1.33 ± 0.16	
	Poor differentiation	107	1.64 ± 0.08	
	Undifferentiation	8	1.63 ± 0.26	

1) Lymphnode metastasis vs Lymphnode non-metastasis, *P* < 0.05;

2) Comparison among groups with different pathological grading, PDX1 expression is significant difference, *P* < 0.05。

白定量分别为 1.85 ± 0.16、1.51 ± 0.11、1.37 ± 0.09, 但组间差异无显著性 ( $F = 2.28$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.11$ )。其他变量如性别和病理类型与 PDX1 表达无明显相关性 ( $P > 0.05$ )。

## 2.2 PDX1 基因在胃癌细胞株中表达下调

本研究尚检测了 SGC7901、AGS、BCG823 三株胃癌细胞的 PDX1 表达, 将正常胃窦黏膜组织作为对照。与正常对照比较, SGC7901、AGS、BCG823 细胞的 PDX1 mRNA (图 2A) 和蛋白 (图 2B) 表达水平仅见微弱表达。

## 2.3 PDX1 过表达抑制了胃癌细胞的增殖

本研究瞬时转染 PDX1 正义表达载体研究 PDX1 表达上调对 SGC7901 和 AGS 细胞增殖的影响。如图 3 所示, Western blotting 显示瞬时转染 24h 后, 与转染空质粒的对照组比较, 转染了 PDX1 正义表达载体的 SGC7901 细胞过表达 PDX1, 同时增殖相关蛋白 Ki-67 表达大大降低, 另一增殖相关蛋白 PCNA 亦相应轻度下调 (图

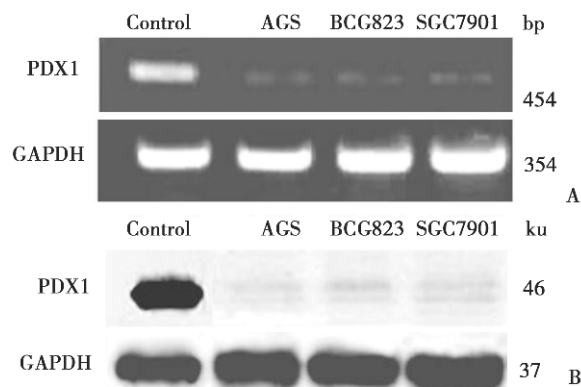


图 2 PDX1 在胃癌细胞中的表达

Fig.2 PDX1 expression in gastric cancer cell lines

Three gastric cancer cell lines including AGS, BCG823 and SGC7901 had low mRNA and protein level of PDX1 gene (A & B), normal gastric antrum was used as control.

3A)。与空质粒对照组 ( $1.04 \pm 0.01$ 、 $0.63 \pm 0.06$ ) 比较, PDX1 组细胞的增殖指数在转染 48h 后显著降低 ( $0.60 \pm 0.04$ 、 $0.25 \pm 0.04$ ,  $P < 0.05$ ; 图 3B)。

## 2.4 PDX1 过表达诱导了胃癌细胞的凋亡

本研究尚评估了瞬时转染 PDX1 后 SGC7901 和 AGS 细胞凋亡情况。Western blotting 结果显示 PDX1 瞬时过表达后, 凋亡蛋白 caspase-3 激活, 相应的 cleaved caspase-3 表达增加 (图 3A); PDX1 瞬时转染 24 h, 收集细胞并予 Apo BrdU 染色, 结果显示与空质粒组 ( $1.27 \pm 0.65$ 、 $0.69 \pm 0.43$ ) 对比, 转染了 PDX1 的 SGC7901 和 AGS 细胞的凋亡指数 ( $10.55 \pm 5.29$ 、 $7.22 \pm 0.89$ ) 均明显增加,  $P < 0.05$ ) (图 3C)。

## 2.5 PDX1 过表达抑制了胃癌细胞的伤口愈合能力、克隆形成、裸鼠移植瘤形成

本研究培养 SGC7901, 转染 PDX1, 经 G418 筛选出单克隆稳定表达细胞株 PDX1, 空质粒作为对照 (图 4A)。为进一步了解 PDX1 基因对胃癌细胞生物学行为的影响, 本研究设计体外实验研究 PDX1 表达上调对胃癌细胞伤口愈合能力、克隆形成能力的影响。如图 4B, 空质粒组伤口愈合率为  $0.30 \pm 0.06$ 、 $0.60 \pm 0.03$ 、 $0.80 \pm 0.08$ , PDX1 组伤口愈合率为  $0.05 \pm 0.03$ 、 $0.05 \pm 0.02$ 、 $0.10 \pm 0.03$ , 两组比较, PDX1 过表达细胞的伤口愈合率显著低于对照 ( $P < 0.05$ )。如图 4C, 空质粒对照组和 PDX1 组克隆形成率分别为  $10.98 \pm 2.27$ 、 $3.79 \pm 0.42$ , 两者比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。本研究最后初步

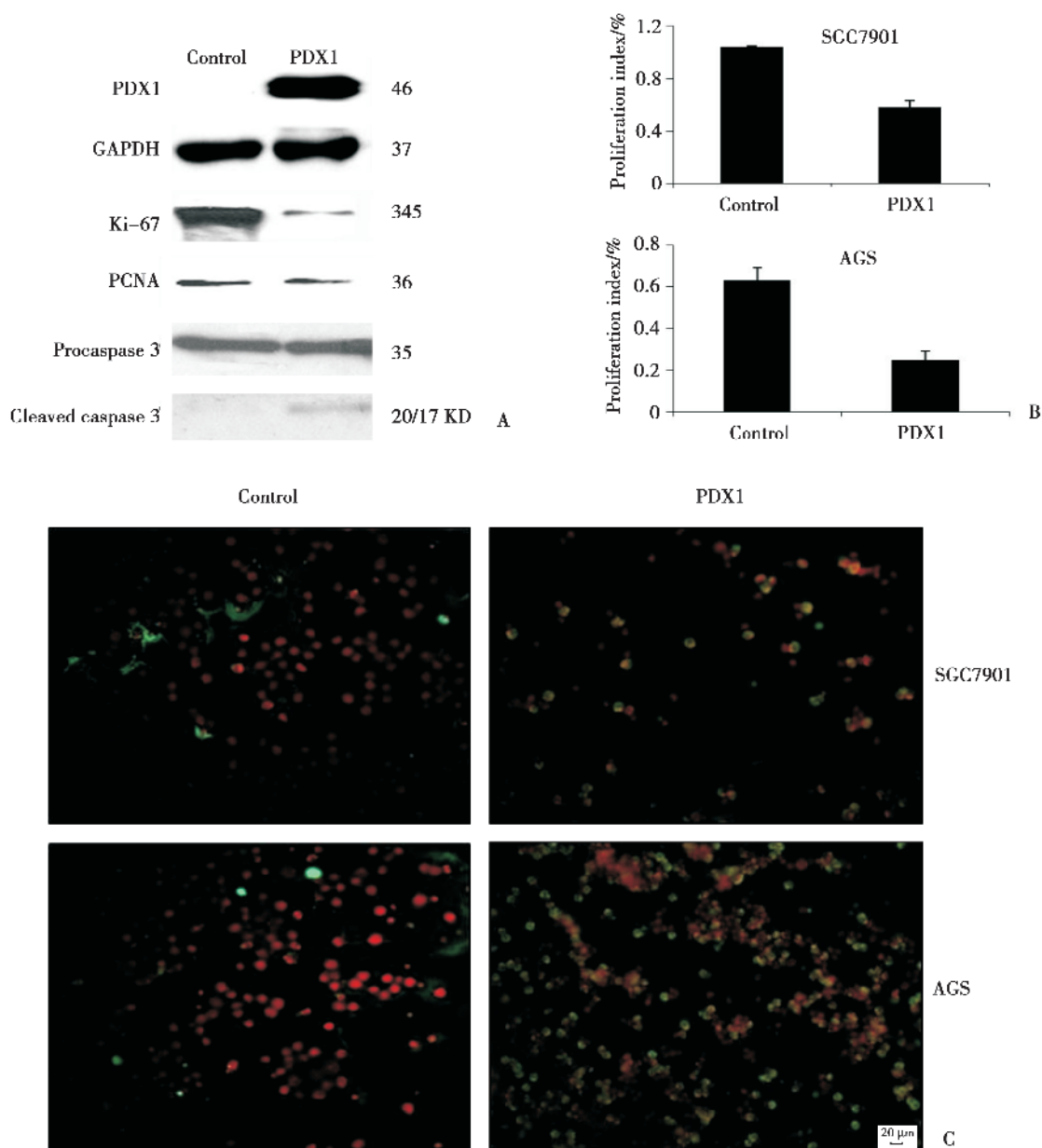


图 3 PDX1 瞬时过表达对胃癌细胞增殖和凋亡的影响

Fig.3 Effects of PDX1 transient overexpression on cell proliferation and apoptosis of gastric cancer

A: After PDX1 transfection, Ki-67 was significantly decreased, PCNA was weakly decreased and cleaved apoptosis was positive following PDX1 upregulated. B: After PDX1 transient transfection for 48 hours, proliferation indexes of SGC7901 and AGS cells were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). C: After PDX1 transient transfection for 24 hours, apoptosis indexes of SGC7901 and AGS cells were significantly increased, compared to empty vector control ( $P < 0.05$ ). Empty vector was used as control.

研究了 PDX1 稳定转染细胞株对裸鼠移植瘤形成的影响。种植  $5 \times 10^6$  胃癌细胞于裸鼠皮下, 3 周后观察裸鼠移植瘤形成情况。如图 4D 所示, PDX1 组裸鼠未见移植瘤形成, 而空质粒组则有 3 例移植瘤形成, 成瘤率为 75%。

### 3 讨论

本研究首次探讨了 PDX1 在胃癌细胞生长及肿瘤发生中的作用。结果显示 PDX1 在胃癌组织

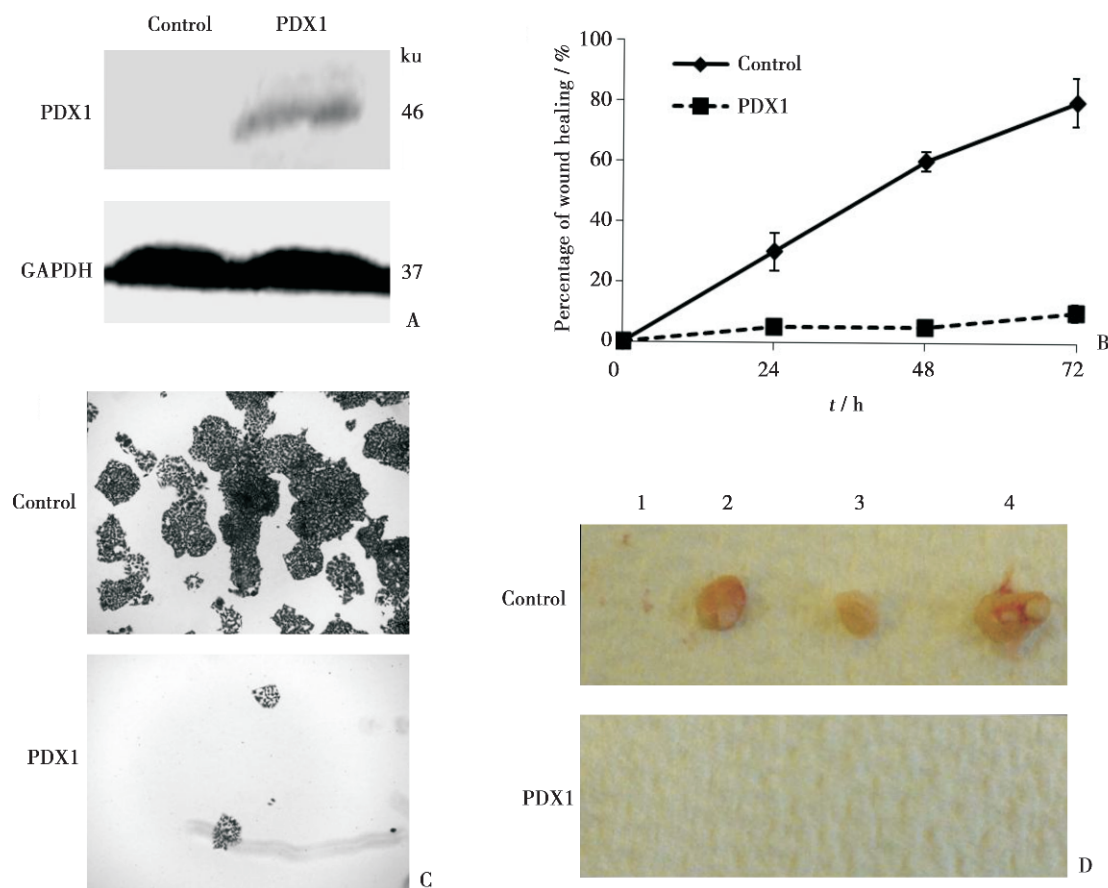


图 4 PDX1 稳定过表达对胃癌细胞克隆形成、伤口愈合、裸鼠成瘤的影响

Fig.4 Effects of PDX1 stable overexpression on colonic formation and wound healing, in vitro and xenotransplanted tumors in vivo

A: After PDX1 was stably transfected, PDX1 expression was upregulated in SGC7901 cells. B and C: in SGC7901 cells with PDX1 stable transfection, percentages of wound healing (B) and colonic formation were significantly decreased than both of empty vector group. D: In nude mice transplanted with AGC stable cells for 3 weeks, no xenotransplanted tumors was found in PDX1 group but three developed in empty vector control.

芯片中低表达, 且与肿瘤淋巴结浸润和分化程度有关。PDX1 基因在胃癌细胞中低表达甚或缺失, 构建 PDX1 正义表达载体, PDX1 的瞬时转染抑制胃癌细胞增殖、诱导胃癌细胞凋亡, PDX1 稳定过表达抑制胃癌细胞的伤口愈合率、克隆形成率和裸鼠成瘤率; 本研究结果提示 PDX1 基因可能在胃癌的发生发展中起到重要作用。

PDX1 是 ParaHox 家族中的一个转录因子, 在小鼠胚胎发育过程中, PDX1 选择性表达于胰腺、十二指肠及胃幽门腺体, PDX1 基因发生缺陷后, 这些部位就难以正常发育<sup>[2-4, 10]</sup>。近来有研究报道 PDX1 在多种良性成恶性肿瘤如胰腺、乳腺、结肠、前列腺及肾脏肿瘤中表达<sup>[11-13]</sup>, 在萎缩性胃炎黏

膜及胃假幽门腺腺体部位亦有表达<sup>[6-7]</sup>, 但迄今为止尚无 PDX1 在胃癌及正常胃组织中的表达模式的相关研究。本研究前期研究<sup>[8]</sup>发现与正常胃黏膜组织比较, 伴随幽门螺杆菌感染或/和肠化生的胃黏膜中 PDX1 的表达水平是下调的, 本研究证实 PDX1 基因在胃癌中表达也是下调的, 这提示了 PDX1 基因及其蛋白表达在胃癌发生过程中可能是逐步丢失的。我们以往的研究<sup>[14]</sup>已经成功构建了 PDX1 启动子, 发现 DNA 甲基化影响 PDX1 启动子活性, 进而抑制了 PDX1 转录, 导致 PDX1 表达下降, 支持了本研究结果。

本研究尚进一步分析了 PDX1 表达与胃癌病例的年龄、性别、肿瘤分化程度、病理类型、TNM 分

期等变量的关系,结果发现随着胃癌发生淋巴浸润,PDX1 表达降低,此外随着胃腺癌分化程度增加,PDX1 表达降低,提示 PDX1 表达与胃癌细胞分化和浸润有一定关系,但具体机制如何尚待进一步研究。PDX1 表达在不同年龄组 and 不同TNM 分期组间差异无统计学意义,但仍显示出一定下降趋势,即年龄愈大、TNM 分期愈晚,PDX1 表达水平愈低,今后更大样本的临床研究或流行病学调查会有助于进一步研究上述变量与 PDX1 的关系。以往研究已经报道另一同源异型基因 *prox1* 能抑制肝细胞癌的分化和增殖<sup>[15]</sup>,我们研究支持了同源异型基因不同成员间的共性。

本研究免疫组化结果显示正常胃粘膜组织中,PDX1 阳性细胞(被染成黄褐色)在腺上皮细胞的胞浆及胞核中检测到,这与以往研究类似<sup>[6,8,16]</sup>。有学者在胃粘膜组织的胞核和胞浆中检测到 PDX1 表达<sup>[6,8]</sup>。更有学者高糖能够刺激 PDX1 从胰腺  $\beta$ -细胞胞浆转移到胞核<sup>[16]</sup>。这提示某些特定情况下 PDX1 这一转录因子会在胃癌细胞的胞浆和胞核间双向转移,PDX1 基因的活化转移可能参与了胃癌发生发展,且有可能与增殖相关,也恰好支持以往的研究观点:PDX1 对于消化道器官或异位肝组织分化有着关键作用<sup>[17-19]</sup>。

本研究进一步检测到 PDX1 在胃癌细胞株中同样是低表达甚至缺失,这与组织芯片结果一致,同时通过瞬时转染实验初步证实 PDX1 过表达对胃癌细胞增殖和凋亡中的影响。

本研究发现 PDX1 过表达抑制了胃癌细胞的增殖,增殖指数下降的同时增殖相关蛋白 Ki-67 和 PCNA 表达水平随之降低,尤其 Ki-67。这和本研究免疫组化结果所示 PDX1 在正常胃粘膜增殖性腺腔高表达符合。本研究还显示 PDX1 瞬时过表达显著增加了胃癌细胞凋亡的指数,凋亡蛋白酶 *caspase-3* 也随之被激活。凋亡过程主要包括内在和外来信号两条主要信号通路。各种信号通过线粒体、细胞胞浆、颗粒酶等不同途径最终导致 *caspase-3* 这一下游凋亡效应亚类蛋白酶的自身裂解和活化,最终引起凋亡的逐级放大效应,引起靶细胞凋亡<sup>[20]</sup>。我们的结果提示 PDX1 可能参与上述信号通路,但是 PDX1 通过怎样的信号通路最终参与调控胃癌细胞增殖凋亡的机制尚不清楚,我们后续会继续深入研究。最近有学者提到,胰岛素生长因子 Igf 通路相关的 PDX1 表达减低

与胰腺细胞凋亡有关,这和我们结果相反,恰恰体现了 PDX1 基因对在不同器官中的表达和功能的选择性<sup>[21]</sup>。

本研究建立 PDX1 稳定过表达株,观察 PDX1 稳定过表达对胃癌细胞生物学行为的影响。研究发现 PDX1 稳定过表达使胃癌细胞伤口愈合率、克隆形成率、裸鼠体内成瘤率明显降低。这些结果都提示 PDX1 有抑制胃癌生长的作用。Homeobox 亚族 ParaHox 家族另一成员尾型同源盒转录因子-2(Cdx2)亦有类似特性。有研究显示 Cdx2 能抑制小鼠末端结肠肿瘤的发生<sup>[22]</sup>,降低结肠癌细胞的活动性,抑制肿瘤细胞的转移播散<sup>[23]</sup>。尽管 PDX1 和 CDX2 在消化道肿瘤发生发展中存在某些共性,两者有无相互作用尚待进一步探讨,且 PDX1 作为一个转录因子,受哪些上游基因的影响并影响着哪些下游靶基因尚不知,需要进一步深入研究。

总之,本研究研究了 PDX1 在胃癌中的表达和功能。PDX1 普遍表达于慢性胃炎的正常腺体中,且在胃癌发生中逐步丢失;PDX1 过表达抑制胃癌细胞增殖、促进凋亡,同时抑制了胃癌某些生物学行为,确切的生物学机制尚待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Brooke NM, Garcia-Fernandez J, Holland PW. The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster[J]. *Nature*, 1998, 392(6679): 920-922.
- [2] Stoffers DA, Heller RS, Miller CP, et al. Developmental expression of the homeodomain protein IDX-1 in mice transgenic for an IDX-1 promoter/lacZ transcriptional reporter[J]. *Endocrinology*, 1999, 140(11): 5374-5381.
- [3] Guz Y, Montminy MR, Stein R, et al. Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny[J]. *Development*, 1995, 121(1): 11-18.
- [4] Larsson LI, Madsen OD, Serup P, et al. Pancreatic-duodenal homeobox 1 -role in gastric endocrine patterning[J]. *Mech Dev*, 1996, 60(2): 175-184.
- [5] Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, et al. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum[J]. *Development*, 1996, 122(3):

- 983-995.
- [6] Faller G, Kirchner T. Immunological and morphogenic basis of gastric mucosa atrophy and metaplasia [J]. *Virchows Arch*, 2005, 446(1): 1-9.
- [7] Sakai H, Eishi Y, Li XL, et al. PDX1 homeobox protein expression in pseudopyloric glands and gastric carcinomas[J]. *Gut*, 2004, 53(3): 323-330.
- [8] Zhu SL, Xia HH, Chen MH, et al. Alterations of gastric homeoprotein expression in *H. pylori* infection, incisural antralisation and intestinal metaplasia, and their association with trefoil family factor 2 and mucin 6 expression [J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(4 Suppl 2): A598.
- [9] 马娟,刘庆华,沙卫红,等. PDX1 正义表达载体的构建与表达[J]. *广东医学*, 2010, 31(23): 3030-3031.
- Ma J, Liu QH, Sha WH, et al. Construction and expression of PDX1 sense expression vector [J]. *Guangdong Med J*, 2010, 31(23): 3030-3031.
- [10] Fukuda A, Kawaguchi Y, Furuyama K, et al. Loss of the major duodenal papilla results in brown pigment biliary stone formation in Pdx1 null mice [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(3): 855-867.
- [11] Liu T, Gou SM, Wang CY, et al. Pancreas duodenal homeobox-1 expression and significance in pancreatic cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(18): 2615-2618.
- [12] Koizumi M, Doi R, Toyoda E, et al. Increased PDX-1 expression is associated with outcome in patients with pancreatic cancer [J]. *Surgery*, 2003, 134(2): 260-266.
- [13] Wang XP, Li ZJ, Magnusson J, et al. Tissue microarray of pancreatic duodenal homeobox-1 in human cancers [J]. *World J Surg*, 2005, 29(3): 334-338.
- [14] 马娟,刘庆华,王蓓蓓,等. 胃癌 PDX1 启动子载体构建及其受 DNA 甲基化的调节[J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(31): 3222-3228.
- Ma J, Liu QH, Wang BB, et al. Construction of PDX1 promoter vectors and effects of DNA methylation on PDX1 promoter in gastric cancer [J]. *World Chin J Digestol*, 2011, 19(31): 3222-3228.
- [15] Shimoda M, Takahashi M, Yoshimoto T, et al. A homeobox protein, *prox1*, is involved in the differentiation, proliferation, and prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(20 Pt 1): 6005-6011.
- [16] Macfarlane WM, Mckinnon CM, Feiton-Edkins ZA, et al. Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(2): 1011-1016.
- [17] Mizusawa N, Hasegawa T, Ohigashi I, et al. Differentiation phenotypes of pancreatic islet beta- and alpha-cells are closely related with homeotic genes and a group of differentially expressed genes [J]. *Gene*, 2004, 331: 53-63.
- [18] Fujitani Y, Fujitani S, Boyer DF, et al. Targeted deletion of a cis-regulatory region reveals differential gene dosage requirements for Pdx1 in foregut organ differentiation and pancreas formation [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(2): 253-266.
- [19] Miyatsuka T, Kaneto H, Kajimoto Y, et al. Ectopically expressed PDX-1 in liver initiates endocrine and exocrine pancreas differentiation but causes dysmorphogenesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 310(3): 1017-1025.
- [20] Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy [J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(3): 178-194.
- [21] Fujimoto K, Polonsky KS. Pdx1 and other factors that regulate pancreatic beta-cell survival [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2009, 11 Suppl 4: 30-37.
- [22] Bonhomme C, Duluc I, Martin E, et al. The *Cdx2* homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development [J]. *Gut*, 2003, 52(10): 1465-1471.
- [23] Gross I, Duluc I, Benamur T, et al. The intestine-specific homeobox gene *Cdx2* decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells [J]. *Oncogene*, 2008, 27(1): 107-115.

(编辑 孙慧兰)