

Semaphorin6D在胃癌中的表达及其意义

赵向阳, 陈凇, 许倩, 李玉红

赵向阳, 陈凇, 中国人民解放军总医院普通外科 北京市 1000853
许倩, 承德医学院基础医学研究所 河北省承德市 067000
李玉红, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000
通讯作者: 陈凇, 1000853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院普通外科, chenlinbj@vip.sina.com
电话: 010-66937846 传真: 010-68181689
收稿日期: 2006-09-01 接受日期: 2006-10-11

Expression of Semaphorin6D and its significance in gastric carcinoma

Xiang-Yang Zhao, Lin Chen, Qian Xu, Yu-Hong Li

Xiang-Yang Zhao, Lin Chen, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Qian Xu, Institute of Basic Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

Yu-Hong Li, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chende 067000, Hebei Province, China

Correspondence to: Professor Lin Chen, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Beijing 100853, China. chenlinbj@vip.sina.com
Received: 2006-09-01 Accepted: 2006-10-11

Abstract

AIM: To investigate the expression of Semaphorin6D in gastric carcinoma and its significance.

METHODS: The mRNA and protein expression of Semaphorin6D was detected by semi-quantity reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively, in 30 cases of gastric carcinoma and normal mucosa.

RESULTS: The expression of Semaphorin6D was significantly higher in gastric carcinoma than that in the normal mucosa both at mRNA and protein level (0.24 ± 0.06 vs 0.19 ± 0.07 , $P = 0.013$; 0.26 ± 0.09 vs 0.20 ± 0.10 , $P = 0.0194$).

CONCLUSION: Semaphorin6D may play an important role in the occurrence and development of gastric carcinoma.

Key Words: Gastric carcinoma; Semaphorin6D; Western blot; Immunohistochemistry

Zhao XY, Chen L, Xu Q, Li YH. Expression of

Semaphorin6D and its significance in gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(33):3233-3236

摘要

目的: 探讨Semaphorin6D在胃癌中的表达及其意义。

方法: 应用RT-PCR和Western blot检测30例胃癌患者的癌组织及胃切缘正常胃黏膜Semaphorin6D的mRNA和蛋白表达。

结果: 胃癌组织中的Semaphorin6D蛋白及mRNA的表达明显高于胃正常黏膜(0.26 ± 0.09 vs 0.20 ± 0.10 , $P = 0.0194$; 0.24 ± 0.06 vs 0.19 ± 0.07 , $P = 0.013$)。

结论: Semaphorin6D在胃癌发生、发展中发挥重要作用。

关键词: 胃癌; 胃正常黏膜; Semaphorin6D

赵向阳, 陈凇, 许倩, 李玉红. Semaphorin6D在胃癌中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2006;14(33):3233-3236
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3233.asp>

0 引言

在过去的十年来,一系列的基因和功能研究发现了一群蛋白质分子,被命名为Semaphorin蛋白超家族,其在神经系统形成、胚胎发生、血管生成、免疫反应和肿瘤发生、发展中发挥着重要作用^[1-5],其中Semaphorin6D是新近发现的调节神经系统发生、发展的新基因,其通过不同的剪接,分为5个亚型: Semaphorin6Ds, Semaphorin6D-1, Semaphorin6D-2, Semaphorin6D-3和Semaphorin6D-4^[6]。目前对Semaphorin6D功能及作用机制了解甚少,尤其在肿瘤方面的研究未见报道,本研究首次通过RT-PCR和Western blot方法研究Semaphorin6D在胃癌及其正常黏膜表达并探讨其临床病理意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集解放军总医院2006-04/08手术切

■背景资料

Semaphorin6D是新近发现的一组新基因,目前对其功能只进行了初步探讨,发现其在轴突形成和心脏发生中起着重要作用,然而在其他方面的作用了解甚少,尤其在肿瘤方面的研究未见报道。

■创新盘点

本研究首次通过RT-PCR和Western blot方法研究Semaphorin6D在新鲜胃癌组织和正常胃黏膜表达并探讨其临床病理意义。

表 1 Semaphorin6D 5个亚型引物序列

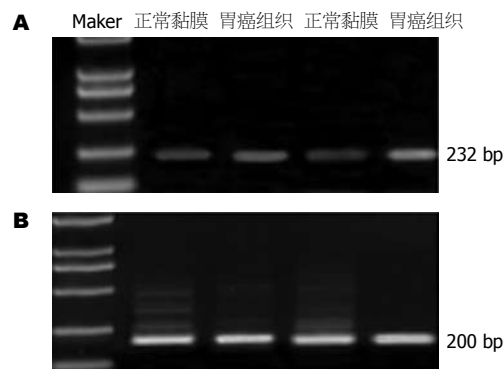
亚型	上游引物	下游引物	长度(bp)
Semaphorin6Ds	5'-GCTTTGTGCCTACATACTGCT-3'	3'-ACCGGATATTGCCTTGAATAGTG-5'	114
Semaphorin6D-1	5'-TGAACGACAGCGTATTACTGGA-3'	3'-GGAAAGCAAAGAAGTCTTCGGTT-5'	297
Semaphorin6D-2	5'-TAGTAACCTGCTAACCAGTCGG-3'	3'-GTGGCGGACTAGACGGAAAA-5'	230
Semaphorin6D-3	5'-CTCAGTCGCTGTGAGCGTTAT-3'	3'-CAGATGTTGGACCGCCAAATA-5'	232
Semaphorin6D-4	5'-ATATTTGGCGGTCCAACATCTG-3'	3'-TTGTCAGTTTAGGTCTCCAGGTA-5'	115

除的30例胃癌患者的胃癌组织及远离癌肿胃切缘正常黏膜。患者术前未接受化疗和放疗。全部病例均经手术和病理证实。男19例,女11例;年龄32-74(平均 54 ± 15)岁。肿瘤部位:贲门7例,胃体3例,胃窦20例。肿瘤分化程度:高、中分化腺癌13例,低分化腺癌14例。区域淋巴结转移阴性者17例,阳性13例。新鲜组织离体后迅速提取总RNA和总蛋白, -70°C 储存。

1.2 方法

1.2.1 半定量RT-PCR 用TRIzol(博大泰克公司)提取总RNA,溶于40 μL DEPC处理的双蒸水中,混匀,在核酸蛋白测定仪上检测总RNA浓度。20 μL 逆转录体系中加入1.5 μg 总RNA,用M-MLV第一链cDNA合成试剂盒(博大泰克公司)逆转录,按试剂盒说明书操作步骤进行。取2 μL 逆转录产物作模板,选用即用PCR扩增试剂盒(博大泰克公司)在PCR仪上进行PCR扩增。以 β -actin作为外参照。 β -actin和Semaphorin6D引物由华大基因合成。Semaphorin6D 5个亚型引物序列见表1。 β -actin引物序列:上游5'-CGCACCACTGGCATTTGTCAT-3',下游3'-TTCTCCTTGATGTCACGCAC-5'。PCR反应体系50 μL , PCR反应条件为: 94°C 预变性5 min, 94°C 变性50 s, 55°C 退火50 s(β -actin 56°C 50 s), 72°C 延伸1 min, 37个循环, 72°C 再延伸8 min。取8 μL PCR产物在20 g/L的琼脂糖凝胶上电泳30 min,溴乙锭染色。将Semaphorin6D与 β -actin的灰度值的比值作为Semaphorin6D mRNA的相对表达水平。

1.2.2 Western blot检测 取100 mg组织加入预冷的蛋白裂解液0.5 mL,裂解组织细胞,提取总蛋白。取50 μg 蛋白进行100 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移到PVDF膜上。50 g/L脱脂牛奶封闭2 h, Semaphorin6D鼠抗mAb 3 mg/L(R&D system公司) 4°C 过夜, 1:800辣根酶标记的二抗室温1 h孵育后显影。用美国BIO-RAD公司Quantity One分析软件对显影条带进行灰度分析,将Semaphorin6D与 β -actin灰度值的比值作为

图 1 RT-PCR方法检测Semaphorin6D mRNA的表达。A: Semaphorin6D; B: β -actin。

Semaphorin6D蛋白的相对表达水平。

统计学处理 所得数据以mean \pm SD表示,采用SPSS 11.5统计软件对所得数据进行配对 t 检验。

2 结果

2.1 Semaphorin6D的mRNA表达 经RT-PCR对Semaphorin6D 5个亚型mRNA的检测,只有Semaphorin6D-3型在胃癌组织和正常胃黏膜中有表达, Semaphorin6D-3 mRNA扩增产物为232 bp, β -actin为200 bp(图1)。Semaphorin6D在胃癌组织中的表达明显高于正常胃黏膜(0.24 ± 0.06 vs 0.19 ± 0.07 , $P = 0.013 < 0.05$)。

2.2 Semaphorin6D蛋白表达 Western blot法显示胃癌组织和胃正常黏膜中与Semaphorin6D蛋白抗体结合的特异性条带位于相对分子质量为100 kDa处(图2)。Semaphorin6D蛋白在胃癌组织中的表达明显高于正常胃黏膜(0.26 ± 0.09 vs 0.20 ± 0.10 , $P = 0.0194 < 0.05$),与RT-PCR检测结果相符。

3 讨论

Semaphorin最早在神经系统发现,是一个较大的蛋白超家族,可分为8种类型, Semaphorin1, 8分别存在于无脊椎动物和病毒中,而Semaphorin3

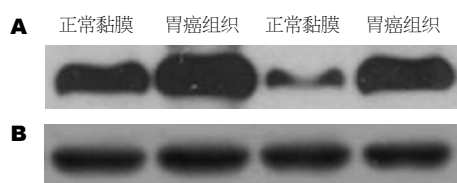


图 2 Western blot方法检测Semaphorin6D蛋白的表达. A: Semaphorin6D; B: β -actin.

到Semaphorin7在脊椎动物中发现, 人类有20种Semaphorin蛋白, 其中Semaphorin3是分泌型蛋白, Semaphorin4, 5, 6是跨膜蛋白, Semaphorin7是通过GPI连接在细胞膜上的蛋白^[7]. 近年来, 一些研究发现Semaphorin与一些肿瘤的发生、发展存在着密切关系. 例如, Semaphorin3E和Semaphorin3C可促进一些肿瘤细胞的浸润和转移^[8-9], 而Semaphorin3B和Semaphorin3F是抑癌基因, 由于该基因的丢失或超甲基化使肿瘤得以发生、发展^[5,10-11]. 2002年Qu *et al*^[6]发现Semaphorin家族新基因, 被命名为Semaphorin6D, 定位于染色体1q12-12.1, 其在许多组织中表达, 如脑组织、肌肉、胃肠道和胚胎组织等, 并发现Semaphorin6D参与神经系统的发生、发展, 与轴突形成有着密切关系. 众所周知, 神经系统与血管有着相似的解剖结构: (1)都形成复杂而又精密的分支网络样结构; (2)神经血管总是伴行生长; (3)动脉-静脉运输氧分和排除CO₂等废物的职能化与神经系统传入-传出神经传递传入和传出信号相对应; (4)血管系统和神经系统都有两种细胞组成: 内皮细胞/外周细胞、神经元/胶质细胞^[12], 所以推测神经系统的形成与血管生成存在着相似的分子调控机制. 关于Semaphorin6D在血管生成机制方面的调节作用, Toyofuku *et al*^[13]研究报道, 在胚胎发育过程中, Semaphorin6D通过与不同的受体结合, 可诱导或抑制心脏不同部位的上皮细胞的迁移, 从而在胚胎心血管的形态发生中发挥重要作用. 肿瘤血管生成是肿瘤侵袭和转移的重要前提之一^[14-16]. 同样, 胃癌的生成及其恶性侵袭和转移与血管生成也有着密切关系, 本研究通过RT-PCR对Semaphorin6D的5个亚型进行检测, 结果发现只有Semaphorin6D-3在胃癌组织和正常黏膜中表达, 而且癌组织中Semaphorin6D mRNA表达明显高于正常黏膜, 进而我们又通过Western blot方法检测Semaphorin6D蛋白在胃癌中的表达, 结果与RT-PCR结果一致. 提示Semaphorin6D与胃癌的发生、发展存在着密

切关系, 推测其机制可能与Semaphorin6D参与胃癌血管生成, 进而调节胃癌的侵袭和转移有关. 本研究从一个全新的角度, 首次报道Semaphorin6D在胃癌中的表达情况及其临床病理意义, 为深入探讨胃癌的发生、发展机制奠定了基础, 同时为胃癌的治疗研究提供一个崭新的思路.

4 参考文献

- Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 1993; 75: 1389-1399
- Torres-Vazquez J, Gitler AD, Fraser SD, Berk JD, Van N Pham, Fishman MC, Childs S, Epstein JA, Weinstein BM. Semaphorin-plexin signaling guides patterning of the developing vasculature. *Dev Cell* 2004; 7: 117-123
- Serini G, Valdembrì D, Zanivan S, Morterra G, Burkhardt C, Caccavari F, Zammataro L, Primo L, Tamagnone L, Logan M, Tessier-Lavigne M, Taniguchi M, Puschel AW, Bussolino F. Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. *Nature* 2003; 424: 391-397
- Shi W, Kumanogoh A, Watanabe C, Uchida J, Wang X, Yasui T, Yukawa K, Ikawa M, Okabe M, Parnes JR, Yoshida K, Kikutani H. The class IV semaphorin CD100 plays nonredundant roles in the immune system: defective B and T cell activation in CD100-deficient mice. *Immunity* 2000; 13: 633-642
- Tomizawa Y, Sekido Y, Kondo M, Gao B, Yokota J, Roche J, Drabkin H, Lerman MI, Gazdar AF, Minna JD. Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13954-13959
- Qu X, Wei H, Zhai Y, Que H, Chen Q, Tang F, Wu Y, Xing G, Zhu Y, Liu S, Fan M, He F. Identification, characterization, and functional study of the two novel human members of the semaphorin gene family. *J Biol Chem* 2002; 277: 35574-35585
- Gherardi E, Love CA, Esnouf RM, Jones EY. The sema domain. *Curr Opin Struct Biol* 2004; 14: 669-678
- Yamada T, Endo R, Gotoh M, Hirohashi S. Identification of semaphorin E as a non-MDR drug resistance gene of human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 14713-14718
- Christensen CR, Klingelhofer J, Tarabykina S, Hulgaard EF, Kramerov D, Lukanidin E. Transcription of a novel mouse semaphorin gene, M-semaH, correlates with the metastatic ability of mouse tumor cell lines. *Cancer Res* 1998; 58: 1238-1244
- Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Williams NN, Kaiser LR, Croce CM. Allelic loss on chromosome 3p21.3 and promoter hypermethylation of semaphorin 3B in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 3352-3355
- Xiang R, Davalos AR, Hensel CH, Zhou XJ, Tse C, Naylor SL. Semaphorin 3F gene from human 3p21.3 suppresses tumor formation in nude mice. *Cancer*

■同行评价

本研究立意新颖, 研究方法先进, 为研究胃癌的发生机制和治疗方法提供一个崭新的思路.

- Res 2002; 62: 2637-2643
- 12 Autiero M, De Smet F, Claes F, Carmeliet P. Role of neural guidance signals in blood vessel navigation. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 629-638
- 13 Toyofuku T, Zhang H, Kumanogoh A, Takegahara N, Suto F, Kamei J, Aoki K, Yabuki M, Hori M, Fujisawa H, Kikutani H. Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. *Genes Dev* 2004; 18: 435-447
- 14 牛新捷, 王作仁, 张云峰, 吴胜利. 胆囊癌组织微血管密度的临床意义. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 109-110
- 15 洪照友, 俞金龙, 张云生, 高毅. 基质金属蛋白酶-9, CD34的表达与肝癌侵袭转移的关系. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 170-174
- 16 钱颀, 刘南植, 程胜平. 胃癌组织Angiopoietin-2及MMP-9表达的意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 299-302

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2007 中华肝胆胰脾外科(国际)学术论坛征文通知

本刊讯 “2007中华肝胆胰脾外科(国际)论坛”应澳门特区外科学会的盛情邀请于2007-04-13/16在澳门举办,现将征文通知公布如下:

1 征文内容

(1)肝癌诊断及外科与综合治疗: 新诊断技术-可切除与否的界定-综合治疗与序贯化思路-对复发转移的研究进展-微创技术实际应用的可能性; (2)医源性胆管损伤的预防-胆管下端功能状态对修复及重建的影响-肝胆管结石外科治疗的新经验-肝门胆管癌根治性切除的实施与效果; (3)胰腺炎-重症急性、出血坏死性、“凶险性”-治疗中早期复苏的策略与实施-相关并发症的预防和处理; (4)胰腺癌-早期诊断的思路与进展-根治术在当前的含义和尺度-术前减黄与并发症的处理; (5)脾功能研究进展-保脾和切脾含义和抉择-PH时单纯切脾的指征与价值; (6)肝移植-应用指征的决策-供肝切取与保存-技术性与非技术性并发症-再移植-远期存活的努力。

2 投稿要求及截稿日期

来稿请寄未曾公开发表过4000字以内全文及800字论文摘要各1份(无摘要不入汇编)并请在信封上注明“会议征文”。截稿日期: 2007-01-31. 正式代表发论文证书并授一级继续教育学分. 来稿请寄: 《中华肝胆外科杂志》编辑部。

3 联系方式

地址: 北京市复兴路28号; 邮编: 100853; 电话: 010-66936223; 电传: 010-68177009; E-mail: zhgdwkzz@vip.163.com; 详情请登陆网站: www.zhgdwkzz.net.