

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2008)01-0077-04

# 青海高原地区胃癌患者 MICA 基因在 mRNA 及其蛋白水平表达

张晓岩<sup>1</sup>, 杨生玺<sup>1</sup>, 吕同德<sup>2</sup>, 哈小琴<sup>2</sup>, 王海燕<sup>1</sup>, 耿排力<sup>1</sup><sup>1</sup> 青海大学医学院基础部, 青海 西宁 810001, <sup>2</sup> 兰州军区兰州总院实验科, 甘肃 兰州 730050

## Expression of MICA at the mRNA and protein levels in gastric cancer at plateau area of Qinghai

ZHANG Xiao-Yan<sup>1</sup>, YANG Sheng-Xi<sup>1</sup>, LÜ Tong-De<sup>2</sup>, HA Xiao-Qin<sup>2</sup>, WANG Hai-Yan<sup>1</sup>, GENG Pai-Li<sup>1</sup><sup>1</sup> Department of Basic Medicine, Medical College, Qinghai University, Xining 810001, China, <sup>2</sup> Department of Experimentation, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Military Area Command, Lanzhou 730050, China

**【Abstract】** AIM: To detect the expression of MICA at the mRNA and protein levels in gastric cancer patients in the plateau area of Qinghai and explore their correlation. **METHODS:** Semi-quantitative RT-PCR assay was used to detect the expression of MICA mRNA and SP immunohistochemistry to detect the expression of MICA protein in 41 patients with gastric cancer. Spearman rank correlation was used to analyze the correlation between them. **RESULTS:** MICA mRNA levels in gastric cancer were significantly higher than those in neighboring non-cancerous tissue ( $P < 0.05$ ). The expression of MICA protein showed a significant difference between the gastric carcinoma tissue (87.8%, 36/41) and the neighboring non-cancerous tissue (26.9%, 11/41), among the high (75.0%, 6/8), the moderate (83.3%, 10/12) and the low differentiation (95.2%, 20/21) ( $P < 0.05$ ). The expression of MICA was not correlated with sex, age and lymph node metastasis of the patients ( $P > 0.05$ ). Spearman rank correlation displayed that the expression of MICA mRNA was positively correlated with the MICA protein level ( $P < 0.01$ ). **CONCLUSION:** The overexpression of MICA may play an important role in the development and occurrence of gastric cancer in the plateau. The upregulation of MICA mRNA expression is closely correlated with the increase of MICA protein level in gastric cancer.

**【Keywords】** plateau; gastric cancer; MICA

收稿日期 2007-10-31; 接受日期 2007-12-09

基金项目: 青海省科技厅重点科技攻关项目(2006-N-175)

通讯作者 耿排力. Tel (0971) 6108393 Email gamp12003@yahoo.com.cn

作者简介 张晓岩. 硕士生(导师耿排力), 讲师. Tel (0971) 6123949

Email zhxy6123949@yahoo.com.cn

**【摘要】**目的: 研究青海高原地区胃癌组织中 MICA 基因在 mRNA 水平与其蛋白表达及相关关系。方法: 采用 RT-PCR 技术检测 41 例高原地区胃癌组织和相应的癌旁粘膜组织中 MICA mRNA 表达, 采用免疫组化 SP 法检测 MICA 蛋白在胃癌和癌旁组织中的表达, Spearman 相关关系检验分析它们之间的相关性。结果: 青海高原地区胃癌组织 MICA mRNA 的表达水平高于癌旁组织( $P < 0.05$ )。胃癌组织 MICA 蛋白表达在癌旁组织中为(26.9%, 11/41)与胃癌组织阳性率为 87.8% (36/41), 高分化组(75.0%, 6/8), 中分化组(83.3%, 10/12), 低分化组(95.2%, 20/21)之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而与肿瘤发生的性别、年龄、淋巴结转移无关( $P > 0.05$ )。Spearman 相关分析显示, MICA 蛋白表达水平与 mRNA 的表达水平呈正相关( $P < 0.01$ )。结论: MICA 的过度表达在青海高原地区胃癌的发生发展过程中起着重要作用, 胃癌组织中 MICA mRNA 以及蛋白水平的升高之间存在密切正相关。

**【关键词】**高原; 胃肿瘤; MHC-I 类链相关蛋白 A**【中图分类号】**R573 **【文献标识码】**A

## 0 引言

青海省是我国胃癌高发地区之一, 其胃癌病死率居全国之首, 达 40.62/10 万<sup>[1]</sup>。高原环境下长期慢性缺氧是重要的应激因素<sup>[2]</sup>, 也是导致一些高原地区某些疾病高发的可能原因。MHC I 类链相关蛋白 A (major histocompatibility complex class I chain related protein A, MICA) 是由位于人类第六号染色体短臂 6p21.31 的 HLA 复合体中的 MICA 基因编码的非经典 HLA I 类分子。MICA 通过与 C 型凝集素样活化性受体 NKG2D 的结合, 影响多种免疫效应细胞功能表现。该分子在多数正常组织中并不表达, 但在癌变、感染、应激时表达水平明显增加, 其与病毒感染及肿瘤关系一直是人们较为关注的问题<sup>[3]</sup>。本研究拟对青海高原地区胃癌患者 MICA 基因表达的研究, 进一步探讨高原地区和慢性缺氧环境中胃癌患者机体免疫的分子机制奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

青海大学医学院附属医院肿瘤科 2005-10/2006-04 手术切除并经病理证实的新鲜胃癌标本

41例患者居住高原30年以上,术前未做放疗和化疗。同时距肿瘤边缘5~10cm以上切取癌旁组织作为对照。标本离体后5min内即投入液氮罐并转至-70℃冰箱冻存。男26例,女15例,年龄35~76岁。黏液腺癌5例,腺癌36例。高分化8例,中分化12例,低分化21例(有27例发生淋巴结转移)。RNA提取用TRIzol试剂一步法提取总RNA,逆转录-聚合酶链反应试剂盒TaKaRa RNA PCP Kit Ver. 3.0(TaKaRa公司产品),DNA2000(购自上海生工)。琼脂糖(Agarose)购自大连宝生物公司。山羊抗人MICA单克隆抗体(购自R&D公司),生物素-链霉素抗生物素蛋白检测系统(SP)试剂盒购自北京中杉公司。依据文献设计引物<sup>[4-5]</sup>MICA(NM,2000247),内参照 $\beta$ -actin(BC2016045),引物均由大连宝生物公司合成(表1)。

表1 MICA和 $\beta$ -actin引物

引物	数据库	引物片段(5'→3')	产物(bp)
MICA	NM2000247	上游 5'-GAGCCCCACAGTCTTCGTTAT	429
		下游 3'-CCTGACGTTTCATGGCCAA	
$\beta$ -actin	BC2016045	上游 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCATCTA	661
		下游 3'-CTAGAAGCATTTCGGGACGATGGAGGG	

## 1.2 方法

1.2.1 MICA的RT-PCR检测 从-70℃冰箱中取出冻存的新鲜组织(癌及癌旁组织)100mg,采用Trizol法提取组织总RNA,测定总RNA浓度及纯度。使用Takara的M-MLV Rtase cDNA synthesis Kit(codeD6130)反转录合成cDNA的第1链,接着合成第2链(均照说明书操作)。将所得10 $\mu$ L产物冻存于-20℃以备进行PCR。PCR反应体系50 $\mu$ L,包括5 $\times$ Buffer 10 $\mu$ L, Taq DNA酶0.2 $\mu$ L,目的引物MICA上下游各1 $\mu$ L, $\beta$ -actin引物上下游各1 $\mu$ L,cDNA模板10 $\mu$ L,无菌水25.8 $\mu$ L。反应条件94℃预变性5min,94℃变性45s,退火温度55℃60s,72℃延伸60s,35个循环,72℃10min后终止反应。PCR产物于15g/L的琼脂糖凝胶做电泳,以无菌水代替cDNA模板的PCR管为阴性对照,天能凝胶成像系统对电泳条带拍照并进行半定量分析。MICA mRNA相对表达量以同一反应体系中目的产物电泳条带密度指数与内参对照 $\beta$ -actin电泳条带密度指数的比值来表示。

1.2.2 MICA免疫组化染色 取出冻存的新鲜标本

迅速置于40g/L甲醛中固定,制成石蜡块。先行HE染色确定诊断,取标本无出血、坏死区域,组织厚度3 $\mu$ m连续切片,MICA稀释浓度5 $\mu$ g/mL,SP法染色,用山羊血清代替一抗作阴性对照,阳性对照采用已知阳性切片。DAB作底物显色,苏木素复染核,梯度酒精脱水,二甲苯透明,树脂胶封片,显微镜下观察。MICA判断标准<sup>[6]</sup>。阳性细胞膜和胞质呈棕黄色颗粒着色,阴性(-)为肿瘤组织完全不着色或阳性细胞数<5%;阳性(+)为肿瘤组织阳性细胞数的范围为5%~25%;阳性(++)为肿瘤组织阳性细胞数的范围为>25%~50%;阳性(+++)为肿瘤组织阳性细胞数>50%。

统计学处理:数据采用SPSS10.0软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 $t$ 检验,多组间比较用方差分析及LSD- $t$ 检验,计数资料组间率的比较采用卡方检验,RT-PCR结果和免疫组化结果的相关性采用Spearman等级相关分析,按 $\alpha = 0.05$ 的水准判断是否具有统计学意义。

## 2 结果

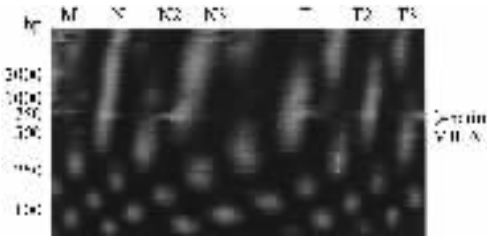
2.1 RT-PCR结果 MICA mRNA在胃癌组织中的表达水平有差异(表2,图1)。

表2 胃癌组织MICA mRNA及蛋白的表达与临床病理

参数	n	MICA		
		MICA mRNA( $\bar{x} \pm s$ )	P	MICA蛋白(%)
癌组织	41	0.56 $\pm$ 0.13	<0.05	36(41)
癌旁组织	41	0.34 $\pm$ 0.11		11(41)
性别				
男	26	0.51 $\pm$ 0.10	>0.05	23(26)
女	15	0.52 $\pm$ 0.07		13(15)
年龄(岁)				
$\leq 50$	18	0.52 $\pm$ 0.06	>0.05	16(18)
>50	23	0.49 $\pm$ 0.08		20(23)
分化程度				
高	8	0.46 $\pm$ 0.08	<0.05	6(8)
中	12	0.53 $\pm$ 0.04		10(12)
低	21	0.64 $\pm$ 0.14		20(21)
淋巴结转移				
有	27	0.52 $\pm$ 0.08	>0.05	24(27)
无	14	0.49 $\pm$ 0.05		12(14)

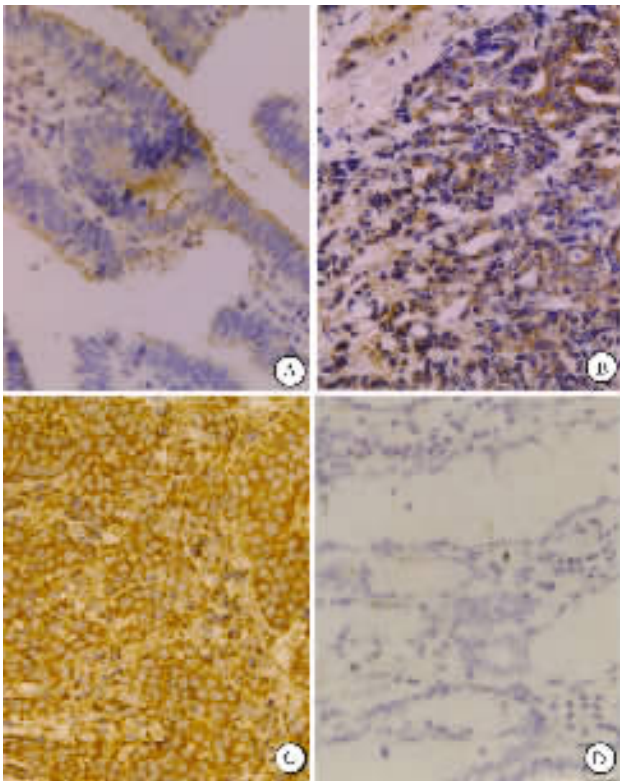
2.2 免疫组化染色 癌旁组织MICA免疫组化染色11例(26.85%) (图2),癌组织中36例(87.8%),其中(+)9例,(++)20例,(+++)7例。MICA表达与分

期有相关,高分化、中分化、低分化阳性率分别为75%(6例/8例)、83.3%(10例/12例)、95.2%(20例/21例)。组间差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。无转移者 MICA 阳性率为85.7%(12例/14例),有转移者阳性率为88.8%(24例/27例),两者差异无统计学意义(表2)。



M: marker; N1-N3: 癌旁组织; T1-T3: 胃癌组织。

图1 MICA 和  $\beta$ -actin 的 RT-PCR 扩增产物电泳图



A: 高分化; B: 中分化; C: 低分化; D: 癌旁组织对照。

图2 胃癌组织和癌旁组织 MICA 的表达 SP  $\times 100$

### 2.3 MICA mRNA 表达与 MICA 蛋白水平

Spearman 等级相关分析显示,胃癌组织中 MICA 表达水平与 MICA mRNA 的表达水平呈正相关( $r_s = 0.907, P < 0.01$ )。

## 3 讨论

高原低氧是一种环境致病因子,机体对低氧的应激反应异常是导致各种高原适应不全和高原疾病的

重要因素<sup>[7]</sup>。MICA 属于 MIC 基因家族,正常情况下仅表达于上皮细胞、内皮细胞等表面,而在组织细胞受到过度应激(如热休克、紫外线等)的情况下会诱导表达或上调表达<sup>[8]</sup>。Pende 等<sup>[9]</sup>发现, MICA 在大多数上皮来源的肿瘤细胞(肺癌、乳腺癌等)和部分黑色素瘤细胞中均有表达并被认为与恶性转化相关。研究表明, NK 细胞和  $CD8^+ \alpha\beta$  T 细胞能够消除高度表达 NKG2D 配体 MICA 的肿瘤细胞,并在小鼠肿瘤模型中激发起针对该肿瘤细胞系的抗肿瘤免疫应答<sup>[10-11]</sup>。Groh 等的研究表明, sMICA 能诱导 T 细胞表面 NKG2D 的内化和降解,并发现在胃肠恶性肿瘤患者的血清中含高水平的 sMICA 分子,从而认为是这些从肿瘤细胞表面释放的可溶性 MICA 分子导致了 NKG2D 的下调,并进一步严重影响了抗原特异性 T 淋巴细胞的反应性<sup>[12]</sup>。sMICA 通过限制活化信号的传递,对机体抗肿瘤免疫应答的负调作用是肿瘤发生免疫逃逸的机制之一。

我们用 RT-PCR 法检测了高原胃癌患者胃癌和癌旁组织中 MICA mRNA 的水平,同时用免疫组化法检测了 MICA 蛋白在癌组织和癌旁组织中的表达。结果表明, MICA mRNA 在癌组织中的表达水平高于癌旁组织,它的表达水平与与肿瘤部位、性别无关。Spearman 等级相关分析显示, MICA 蛋白表达水平与 mRNA 的表达水平呈正相关,相关系数分别为( $r_s = 0.907, P < 0.01$ )。这表明在高原低氧条件下,胃癌组织中基因 MICA 以及与其蛋白水平的升高之间具有一定地相关性。MICA 的过度表达在胃癌的发生发展过程中起着重要作用, MICA 高表达的癌组织其恶性程度也越高。提示 MICA 的表达可反映胃癌的生物学行为,有可能作为判断胃癌分化程度、和预后的有价值指标之一。

MICA 是一种可受应激诱导的蛋白质分子,其表达形式和水平的变化与机体免疫功能,尤其是抗肿瘤抗感染免疫功能密切相关。我们首次检测青海高原地区胃癌患者 MICA 基因在 mRNA 和蛋白水平的表达,在高原低氧环境中,细胞可能受到低氧应激条件的刺激,诱发表达上调。目前,在其结构与功能,以及与疾病关系等方面的研究都取得重要的进展,但对其在高原低氧条件下表达调控机制的研究却很少,尚有许多问题需要进一步研究。

### 【参考文献】

- [1] 马颖才, 熊元治, 杨卫红, 等. 青海省胃癌高发区幽门螺杆菌特异蛋白与胃癌的关系[J]. 临床床荟, 2004, 19(6): 329-330.
- [2] Magalhaes J, Ascensao A, Soares JM, et al. Acute and severe hypobaric hypoxia increases oxidative stress and impairs mitochondrial

function in mouse skeletal muscle[ J ]. J Appl Physiol , 2005 , 99 ( 4 ) : 1247 - 1253.

[ 3 ] Raulat DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands [ J ]. Nat Rev Immunol , 2003 , 3( 10 ) : 781 - 790.

[ 4 ] Molinero LL , Gruber M , Leoni L , et al. Up-regulated expression of MICA and proinflammatory cytokines in skin biopsies from patients with seborrhoeic dermatitis[ J ]. Clin Immunol , 2003 , 106( 1 ) : 50.

[ 5 ] Yamamoto K , Fujiyama Y , Andoh A , et al. Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line ( CaCo-2 ) [ J ]. Biochim Biophys Acta , 2001 , 1526( 1 ) : 10.

[ 6 ] 任学群 , 孟继明 , 傅佩达 , 等. 缺氧诱导因子-1 $\alpha$  的表达及微血管密度与结肠癌生物行为的关系 [ J ]. 第四军医大学学报 , 2004 25( 8 ) : 721 - 724.

[ 7 ] Kim JJ , Thompson RF . Cerebellar circuits and synaptic mechanisms involved in classical eye blink conditioning [ J ]. TINS , 1997 , 20( 4 ) : 177.

[ 8 ] Groh V , Bahram S , Bauer S , et al. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastro intestinal

epithelium [ J ]. Proc Natl Acad Sci USA , 1996 , 93( 22 ) : 12445 - 12450.

[ 9 ] Pende D , Rivera P , Marcenaro S , et al. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes : Analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity [ J ]. Cancer Res , 2002 , 62( 21 ) : 6178 - 6186.

[ 10 ] Diefenbach A , Jensen ER , Jamieson AM , et al. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumor immunity [ J ]. Nature , 2001 , 413( 6852 ) : 165 - 171.

[ 11 ] Cerwenka HJ , Baron JL , Lanier LL. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene ( RAE-1 ) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor *in vivo* [ J ]. Proc Natl Acad Sci USA , 2001 , 98 : 11521 - 11526.

[ 12 ] Groh V , Wu J , Yee C , et al. Tumor-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation [ J ]. Nature , 2002 , 419( 6908 ) : 734 - 738.

编辑 许昌泰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790( 2008 ) 01-0080-01

## 牙周病 106 例临床治疗分析

张 力 ( 陕西省第四人民医院口腔科 陕西 西安 710043 )

【关键词】口腔医学; 临床治疗; 牙周病  
【中图分类号】R780.1 【文献标识码】B

**0 引言** 牙周病是口腔常见病之一, 由于病因复杂被认为是难治之症。往往因得不到及时治疗而导致牙齿缺失, 甚至影响咀嚼及发音。近年来人们对牙周病有了新的认识, 对保留牙齿的治疗越来越高, 即使是晚期牙周病也不限于以拔牙为主的治疗方法<sup>[1]</sup>。我院采用内科综合用药方法对中晚期牙周病患者进行治疗, 取得满意效果。

### 1 对象和方法

**1.1 对象** 2005-06/2007-05 我院门诊治疗牙周病患者 106 (男 46, 女 60) 例, 年龄 19 ~ 66 (平均 45) 岁, 其中慢性牙周炎 81 例, 进展型牙周炎 15 例, 急性牙周脓肿 10 例。全部患者详细记录 WHO 牙龈指数 (GI) 和牙周指数 (PDI) 标准测量情况, 同时符合牙周病诊断标准, 即物理刺激牙龈易出血, 患病区牙龈充血、水肿, 牙周炎者可探及牙周袋, 牙齿呈不同程度松动, X 光照片可见牙周炎者的牙槽骨不同程度吸收现象。

**1.2 方法** 治疗原则是 (1) 去除局部不良刺激因素, 指导患者建立良好的口腔卫生和保健, 清除牙结石及菌斑, 积极治疗全身性疾病。(2) 较严重的牙周炎可行龈翻瓣术, 龈增生过度者可行增生龈切除术。(3) 抗生素治疗主要是针对急性炎症期间, 通过使用有效的抗生素药物来控制炎症的发展及改善症状, 在炎症得到控制后更重要的处理是进行局部治疗。确诊后给予甲硝唑 0.4 g, 口服 2 次/d, 或螺旋霉素 0.9 g, 口服, 3 次/d 7 d。(4) 根据病变程度行龈切除术及牙龈翻瓣术, 牙周脓肿做牙周袋分切除引流术, 对牙齿松动 II 度者调整咬颌的同时固定松动的牙齿。临床疗效评定标准: 显效-牙龈指数

(GI) 下降至 0, 叩诊阴性, 动度明显改善, 牙周袋深度明显变浅, 较治疗前减少,  $\geq 3$  mm, X 线牙槽骨与治疗前相比骨嵴表面完整, 骨密度增加; 有效-牙龈指数 (GI) 为 0 ~ 1, 轻度叩痛, 牙周袋深度变浅,  $\leq 3$  mm, X 线牙槽骨有不同程度的吸收, 骨嵴表面较完整; 无效-牙龈指数 (GI) 为 2 ~ 3, 叩痛明显, 牙周袋深度和松动度无变化, X 线片无改变。

**2 结果** 慢性牙周炎 81 例中显效 65 例 (80.2%), 有效 15 例 (18.5%), 无效 1 例 (1.3%); 进展型牙周炎 15 例中显效 10 例 (66.7%), 有效 3 例 (20.0%), 无效 2 例 (13.3%); 急性牙周脓肿 10 例中显效 8 例 (80.0%), 有效 2 例 (20.0%); 106 例中总有效 (显效 + 有效) 103 例 (97.2%)。全部患者治疗中未发生不良反应。

**3 讨论** 本文研究表明, 采用临床综合治疗原则治疗牙周病的方法是有效的, 总有效率 97%, 这与既往报道相近<sup>[2-4]</sup>。牙周病是牙齿支持组织, 包括牙龈、牙骨质、牙周韧带和牙槽骨因炎症所致的一种疾病。但患者并非所有这些组织都同时患病, 视局部炎症的轻重及范围, 实际上牙周病可分为龈炎和牙周炎两大类。牙周病的病因大多由于局部的菌斑、牙垢、牙石、食物嵌塞、不良修复体等所致, 部分可由全身系统性疾病所引起, 是牙周深层组织受损的一种慢性破坏性疾病, 至今还没有一种很好的治疗方法。本研究所用疗法具有下列优点: 一是应用甲硝唑抑制或消灭牙周袋中的革兰氏阳性厌氧菌, 配合机械性处理能防止病原菌再侵犯, 从而能延长疗效; 二是, 一次性龈上下牙石洁治术及病变牙骨质及袋内壁感染组织搔爬术, 以便形成新创面, 促进重新愈合, 可缩短疗程, 提高疗效, 同时矫正食物嵌塞修复缺失牙齿。

### 【参考文献】

[ 1 ] 张举之. 口腔内科学 [ M ]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 1999 : 129 - 150, 159 - 186.

[ 2 ] 万 龙, 宋 娟. 综合性医院口腔科急诊 2083 例临床分析 [ J ]. 现代中西医结合杂志, 2006 15( 5 ) : 634.

[ 3 ] 张小惠. 牙周病治疗 84 例临床观察 [ J ]. 中华中西医结合杂志, 2007 5( 1 ) : 34.

[ 4 ] 梁 丽. 综合方法治疗牙周病 96 例临床观察 [ J ]. World Health Diges 2007 4( 5 ) : 136 - 137.

收稿日期 2007-12-18; 接受日期 2007-12-25  
作者简介: 张 力, 本科, 主治医师. Tel : 13891907984 Email : zhangli69@sina.com

编辑 许昌泰