

组胺 H4 受体在胃腺癌组织中的表达及临床意义 *

方征宇[△] 张巨峰 刘 立 李佳娜 黎满慧

(深圳北京大学香港科技大学医学中心 广东 深圳 518036)

摘要 目的:研究胃癌腺癌(gastric adenocarcinoma, GAC)中组胺 H4 受体的表达水平及其临床意义。方法:60 例 GAC 组织(病例组)与配对癌旁组织(adjacent normal tissue, ANT)中应用免疫组织化学技术检测组胺 H4 受体的表达,应用实时荧光定量 RT-PCR 方法检测组胺 H4 受体 mRNA 的表达 统计分析组胺 H4 受体表达与临床病理特征之间的关系。结果:①胃癌腺癌组织中组胺 H4 受体蛋白的阳性表达率(11.7%)显著低于癌旁正常组织(96.7%)。②胃癌腺癌组织中组胺 H4 受体 mRNA 水平较癌旁组织明显降低($p<0.001$)。③组胺 H4 受体蛋白和 mRNA 表达异常和肿瘤的病理分级有相关性($p=0.0027$ 和 $p=0.0011$) ,也与有无胃周淋巴结转移有关($p<0.001$ 和 $p=0.0049$)。结论 组胺 H4 受体在胃腺癌组织有表达异常 ,表达量与病理分期相关。组胺 H4 受体表达异常和组胺水平紊乱可能在胃癌发生发展过程中有重要作用。

关键词: 胃腺癌 组胺 H4 受体 荧光实时定量 PCR 免疫组化

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)01-81-03

Expression of Histamine Receptor H4 in Gastric Adenocarcinoma and Its Clinical Significance*

FANG Zheng-yu[△], ZHANG Ju-feng, LIU Li, LI Jia-na, LI Man-hui

(Shenzhen PKU-HKUST Biomedical Research Institute, 518036, Shenzhen Guangdong, China)

ABSTRACT **Objective:** To investigate the expression level of HRH4 in gastric adenocarcinoma (GAC) and its clinical significance.

Methods: The protein and mRNA level of HRH4 was examined in tissues from 60 patients with GAC by SP immunohistochemistry and real-time PCR compared with adjacent normal tissues (ANT). **Results:** ① The positive expression rate of HRH4 protein in GACs (11.7%) was significantly lower than that in ANT (96.7%, $P<0.001$). ② The average mRNA level in patients with was much lower than those in adjacent tissues. ③ The positive expression rate of HRH4 protein and HRH4 mRNA in stage T3~T4 (2.6% and 5.1%) was significantly lower than that in stage T1~T2 (28.6% and 38.1%, $P<0.05$). **Conclusion:** The expression of HRH4 gene is reduced significantly in GAC tissues and is correlated with TNM stage. Abnormally expressed HRH4 and histamine might play a role in the progression of GAC.

Key words: Gastric adenocarcinoma; Histamine Receptor H4; Immunohistochemistry; Real-time PCR

Chinese Library Classification: R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)01-81-03

前言

组胺是体内广泛存在生物活性胺,通过特定的组胺受体调控行使其多样的生物学功能。组胺受体家族有四个成员,分别为组胺 H1、H2、H3 和 H4 受体^[1,2]。其中,组胺 H4 受体(histamine receptor H4, HRH4)在 2000 年之后才被发现和克隆^[3],在造血细胞和白细胞中表达丰富,与体内免疫和炎症反应密切相关^[4]。此外,一些最新的研究表明组胺 H4 受体可能与肿瘤发生发展有关,组胺 H4 受体可介导组胺对胰腺癌^[5]和乳腺癌^[6]细胞增殖的调控,结直肠癌组织中组胺 H4 受体表达明显降低^[7]。

很早以前人们就发现胃癌组织中存在组胺分泌的紊乱^[8],且与组胺受体的协同参与了胃癌的发生发展过程^[9]。在组胺 H4 受体被发现和克隆后,由于其在人体整个胃肠道都有分布^[10],组胺 H4 受体在胃癌发生发展中可能也存在潜在作用,目前尚无明确报道。本研究选取 60 例胃腺癌组织标本和配对的癌旁

正常组织,应用实时荧光定量 PCR 法检测 HRH4 mRNA 的表达,采用免疫组织化学从蛋白检测 HRH4 的表达情况,分析组胺 H4 受体表达与临床病理特征的关系,探讨组胺 H4 受体在胃腺癌发生发展过程中的意义。

1 材料与方法

1.1 临床样本

深圳市北大医院 2008 年 12 月~2009 年 6 月手术切除 GAC 组织标本 60 例。其中年龄 47~65 岁,平均年龄 54.5 岁。按照病理分型其中乳头状腺癌 27 例、管状腺癌 23 例、低分化腺癌 5 例、粘液腺癌 3 例、印戒细胞癌 2 例,每例均作 TNM 分期,所有患者术前均未接受过放疗和化疗。选取配对手术切除正常肝组织为对照组。所有标本取部分提取总 RNA 后,均经 10% 福尔马林液固定后常规石蜡包埋连续切片。

1.2 实验试剂来源

* 基金项目 中国博士后基金项目(20080440779)

作者简介 方征宇(1979-) 男,博士 助理研究员,主要研究方向 跨膜受体的功能和信号转导途径

△ 通讯作者 方征宇 电话 0755-83067048 E-mail:fangzy796@gmail.com

(收稿日期 2010-09-06 接受日期 2010-09-30)

免疫组化试剂盒 购自上海生工生物工程公司 ;小鼠抗人组胺 H4 受体单克隆抗体 Mouse Anti-Human HRH4 Monoclonal Antibody(Unconjugated, Clone 2D5 ,来自 TransGenic Inc.) ,小鼠抗人 CD34 单克隆抗体、超敏 S-P 试剂盒、液体 DAB 酶底物显色试剂盒均购自上海 Genetech 有限公司。Trizol 总 RNA 抽提试剂盒购自上海生工生物公司 ,逆转录酶(MMLV-RT)购自美国 Promega 公司 ,Realtime-PCR 专用 Sybergreen 荧光染料购自美国 Biorad 公司 ,所使用的 Realtime-PCR 仪为 iQ5 Multi-color Real-Time PCR Detection System。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组织化学方法 石蜡切片经脱蜡水化后 ,采用高压法修复抗原 ,HRH4 一抗工作浓度为 1 :100 ,常规 S-P 法(步骤按试剂盒说明书进行) ,DAB 显色苏木精复染。以已知阳性的胃腺癌切片作阳性对照 ,以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3.2 实时荧光定量 RT-PCR 法 按照总 RNA 抽提试剂盒说明书的使用步骤对癌变组织和对照组织进行总 RNA 的抽提 ,按照逆转录酶使用说明将样本 mRNA 逆转录为 cDNA。Real-time-PCR 体系(20 l)为 :10× Buffer 2 l ,dNTPs(200mM)0.4 l ,MgCl₂(25mM)2.4 l ,上游和下游引物(10mM)各 0.5 l ,Fermetas Taq DNA 聚合酶 0.2 l ,Sybergreen 荧光染料 0.3 l(0.5 g/ml) ,ddH₂O14.7 l 。Realtime-PCR 所使用的上下游引物分别为 :GAPDH Forward primer: 5'- TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3'; Reverse primer: 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3' ,HRH4 Forward primer: 5'- TAA GCC ACC TGA GCA GCT -3' ,Reverse primer 5'- ACG GCA ATA CCC TGT CTT -3'。Realtime-PCR HRH4 参数 :95℃ 预变性 3 min ,95℃ 30s ,55℃ 30s ,72℃ 20s ,共 40 个循环 ,最后 72℃ 延伸 10min ; GAPDH 参数 :95℃预变性 3 min ,95℃ 30s ,60℃ 25s ,72℃ 20s ,共 30 个循环 ,最后 72℃ 延伸 10min。GAPDH 标准品连续倍比稀释后与样品同步扩增 ,得到标准品实时扩增曲线及对数标准曲线。保证每批标准品实时扩增曲线为一组近似平行的光滑曲线 ,对数标准曲线相关系数在 0. 999 ,否则重复检测本。进行三次组内重复后 ,使用 Ct(ΔΔCT) 值法^[11]进行计算 ,分析癌变组织和对照组织中 HRH4 相对于 GAPDH 表达的相对量。

各分组所得计量数据采用均数± 标准差表示 ,用 SPSS10.0 软件处理数据 ,两组间均数比较用 t 检验。检验水准 α =0.05 ,p<0.05 有统计学意义。

1.4 结果判定

免疫组化结果 :HRH4 蛋白主要表达于胃粘膜上皮表面 ,呈丝状环绕在腺体细胞周围。按染色强度和阳性细胞数进行评分 ,阳性强度 :无着色为 0 分 ,淡黄色 1 分 ,棕黄色 2 分 ,棕褐色 3 分 ;阳性细胞数(面积) :无着色为 0 分 ,着色面积 <1/3 为 1 分 ,1/3~2/3 为 2 分 ,>2/3 为 3 分 ,两项结果相加≥ 3 分为阳性。Real-time PCR 结果 :肿瘤组织样本中 HRH4 相对于 GAPDH 的相对 Ct 值(HRH4 Ct -GAPDH Ct)即ΔCt >6.5 的视为阴性 ,其余视为阳性。

1.5 统计学方法

采用 SPSS1 1.5 统计软件包进行数据处理 ,临床病理指标的组间差异采用 x² 检验和 Fisher 确切概率检验法 ,采用 Ct(Δ

ΔCT) 值法^[12] 计算癌变组织和对照组织中 HRH4 相对于 GAPDH 表达的相对量 ,并采用组间 t 检验法比较两组样本中 HRH4 mRNA 水平相对量。

2 结果

2.1 免疫组化观察胃腺癌组织与正常组织中组胺 H4 受体的表达

免疫组化结果显示 经相同时间的 DAB 显色后 ,失去正常组织形态的 GAC 组织中基本无法看到组胺 H4 受体蛋白的阳性表达 ,而具有正常胃腺组织形态的 ANT 组织则可看到明显的丝状分布于细胞表面的组胺 H4 受体表达 ,图 1 为代表性结果。

为了解 HRH4 阳性细胞的分布情况 ,我们对 HRH4 免疫细胞化学染色呈阳性反应的 10 张细胞培养染色标本 ,每张各取 5 个视野在 100× 光镜下 ,用方格微尺进行阳性和阴性细胞计数 ,统计结果表明 :在癌组织和癌旁组织中 HRH4 阳性表达率分别为 11.7%(7/60)和 96.7%(58/60) ,两组比较有显著性差异(x²=101.138 P<0.001)。如表 1 所示 ,HRH4 蛋白在胃腺癌组织中表达显著降低。

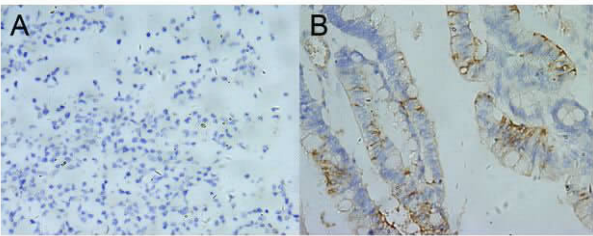


图 1 胃腺癌组织与癌旁正常组织免疫组织化学染色(200×) A :胃腺癌组织 B 癌旁正常组织

Fig.1 HRH4 Immunocytochemistry in Gastric Adenocarcinoma and Matched Adjacent Normal Tissues(200×) A: Gastric Adenocarcinoma tissue B: Adjacent Normal Tissue

表 1 胃腺癌和癌旁正常组织中 HRH4 蛋白表达情况(例 ,%)
Table1 Expression level of HRH4 protein in normal and tumor liver tissues(%)

Group	Number of cases	HRH4 expression(+)
GAC	60	7(11.7)▲
ANT	60	58(96.7)

Note: Using Fisher's Exact Test. ▲p<0.001 GC group compared with ANT group.

2.2 实时定量 PCR 法对 HRH4 mRNA 水平的测定

使用实时定量 PCR 法比较 mRNA 表达与胃腺癌组织临床病理指标的关系 ,将每一个组织样本中检测到 HRH4 相对于 GAPDH 的相对 Ct 值(CtHRH4 - CtGAPDH)即ΔCt >6.5 的视为阴性 ,其余视为阳性 ,用于与胃腺癌组织临床病理指标关联统计。如表 2 和图 2 所示 ,胃腺癌组织中 HRH4 的 mRNA/GAPDH 平均表达水平较正常组织明显下降(2- Ct=0.192 ,即癌组织相对于正常组织的比值) ,两组比较有显著性差异

($P<0.001$)。

2.3 HRH4 表达与胃腺癌组织临床病理指标的关系

如表三所示，胃腺癌组织中 HRH4 蛋白和 HRH4 mRNA 阳性表达率，III~IV 期较 I~II 期低，腹腔或腹膜后淋巴结转移较无腹腔或腹膜后淋巴结转移低，均有显著性差异。HRH4 蛋白阳性表达率与患者年龄无明显相关性。

3 讨论

人体胃肠道组织主要有三种组胺受体的分布，组胺 H1、H2 和 H4 受体^[8]。组胺可通过组胺 H1 受体调控胃肠道平滑肌的收缩、调节肠道血流等，可通过组胺 H2 受体控制胃酸分泌、促进胃肠道平滑肌舒张和调节胃粘膜血流等，然而组胺 H4 受体在胃肠道的功能尚无明确报道。

表 2 2- $\Delta\Delta$ Ct 法比较胃腺癌组织相对于对照组织的 mRNA 表达量

Talbe2 2- $\Delta\Delta$ Ct Method used to analyse the results of Realtime-PCR in analysis of HRH4 mRNA

Group	Average HRH4 Ct	Average GAPDH Ct	Ct(average CtHRH4-CtGAPDH)	Ct(Average Ct-adjacent normal tissue Ct)	2- $\Delta\Delta$ Ct representing relative expression of HRH4 in cancer tissue
ANT	29.86± 0.49	24.12± 0.41	5.76± 0.51	0.0± 0.51	1.0(0.92-1.08)
GAC	32.89± 0.64	23.65± 0.37	9.12± 0.71	3.37± 0.68	0.193(0.180-0.205)*

Note: ▲ $p<0.001$ ANT

表 3 HRH4 蛋白及 HRH4 mRNA 表达与胃腺癌 TNM 分期和胃周淋巴结转移的关系(例)

Table 3 Correlation between TNM staging, lymph nodes metastasis of gastric adenocarcinoma and HRH4

Clinical Pathologic Index	Number of cases	HRH4 protein		x ²	P	HRH4 mRNA		x ²	p
		+	-(%)			+	-(%)		
TNM staging									
T1-T2	21	6	15(28.6)	8.96	0.0027	8	13(38.1)	10.68	0.0011
T3-T4	39	1	38(2.6)			2	37(5.1)		
Local lymph nodes metastasis									
-	14	6	8(42.9)	17.23	<0.001	5	9(35.7)	7.91	0.0049
+	46	1	45(2.2)			3	43(6.5)		

在胃肠道肿瘤的发生发展过程中，常有组胺分泌水平的异常，这与组氨酸脱羧酶(histidine decarboxylase，HDC)活性改变有关^[13]。组胺水平的升高又可参与胃肠道肿瘤的增殖^[14]，最初这被认为与组胺 H1 受体和组胺 H2 受体有关。然而，一些最近的研究表明 2000 年后才发现的新型组胺受体 H4 受体也参与肿瘤细胞的增殖调控^[5,6]，而且在某些消化道肿瘤中有异常表达^[8]，提示了该受体在胃肠道肿瘤发生发展过程中的潜在作用。本文通过应用原位杂交和 Real-time PCR 的方法对胃腺癌组织中 HRH4 基因的蛋白和 mRNA 表达水平进行了研究，观察到 HRH4 在癌旁正常组织中的表达呈阳性，而在胃腺癌组织中 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低，为组胺 H4 受体在胃癌组织中的异常表达提供了确实的实验依据。胃腺癌组织中 HRH4 蛋白和 mRNA 在 III-IV 期较 I-II 期低，在有胃周淋巴结转移组较无胃周淋巴结转移组低，这些都说明 HRH4 的表达水平与肿

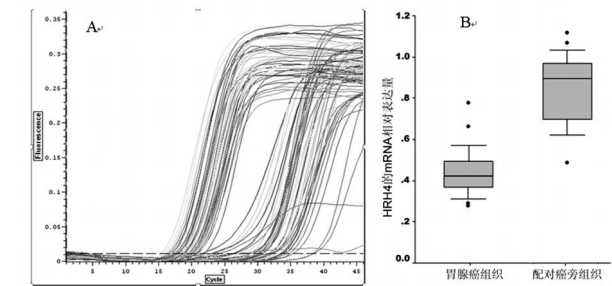


图 2 实时荧光定量 PCR 法比较配胃腺癌组织和配对正常组织中 HRH4 的 mRNA 表达水平

Fig.2 Realtime-PCR analysis of HRH4 mRNA level in paired cancer and adjacent normal tissues.

瘤细胞的恶性程度存在负相关，HRH4 的表达越低表达预示胃癌细胞分化越低，预后越差。因此 HRH4 基因的表达情况可能可为反映胃癌生物学行为和估计患者预后的提供部分线索。

由于组胺和组胺 H4 受体对肿瘤增殖有调控作用，在表达明显下降或缺失的胃腺癌细胞中重新建立 HRH4 基因的表达或能降低肿瘤细胞的恶性程度，有待进一步的研究。

参考文献(References)

[1] Repka-Ramirez MS. New concepts of histamine receptors and actions [J]. Curr Allergy Asthma Rep,2003, 3:227-231
[2] Li MK, Luo XX, Xie JJ. A new member of histamine receptor family: H4 receptor[J]. Sheng Li Ke Xue Jin Zhan, 2003, 34:53-54
[3] Oda T, Morikawa N, Saito Y, et al. Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes[J]. J Biol Chem, 2000, 275(47): 36781-36786

(下转第 51 页)

- expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Nrf2 is involved in the protective effect of curcumin against oxidative damage[J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43:535-545
- [7] Pugazhenth S, Akhov L, Selvaraj G, et al. Regulation of heme oxygenase-1 expression by demethoxy curcuminoids through Nrf2 by a PI3-kinase/Akt-mediated pathway in mouse beta-cells[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007,293: E645-55
- [8] 李强 赵曙光 王旭霞 等.姜黄素激活转录因子 Nrf2 对人肝细胞氧化应激的影响[J].*胃肠病学和肝病杂志*,2010,19(2):154-156
Li Qiang, Zhao Shu-guang, Wang Xu-xia, et al. Effect of curcumin on intracellular ROS in cultured human hepatocyte by upregulating the activity of Nrf2 [J].*Chin J Gastroenterol Hepatol*,2010,19 (2): 154-156(In Chinese)
- [9] 李强 赵曙光 王旭霞 等. 姜黄素对人肝细胞氧化应激及胰岛素抵抗的影响[J].*山西医科大学学报*,2010, 42(4):300-303,382
Li Qiang, Zhao Shu-guang, Wang Xu-xia, et al. Effect of curcumin on intracellular reactive oxygen species and insulin resistance in cultured human hepatocytes [J]. *Journal of Shanxi Medical University*, 2010, 42(4):300-303,382 (In Chinese)
- [10] Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression[J]. *Free Radic Biol Med*, 2004,36:1199-1207
- [11] Chan K, Han XD, Kan YW. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001,98:4611-4616
- [12] Itoh K, Chiba T, Takahashi S. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements[J].*Biochemical*,1997 24(30): 313-322

(上接第 83 页)

- [4] Zampeli, E. and E. Tiligada. The role of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 157(1): 24-33
- [5] Cricco G, Mohamad NA, Sambuco LA, et al. Histamine regulates pancreatic carcinoma cell growth through H3 and H4 receptors [J]. *Inflamm Res*, 2008, 57 Suppl 1: S23-24
- [6] Medina V, Croci M, Crescenti E, et al. The role of histamine in human mammary carcinogenesis: H3 and H4 receptors as potential therapeutic targets for breast cancer treatment [J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7 (1): 28-35
- [7] Boer K, Helinger E, Helinger A, et al. Decreased expression of histamine H1 and H4 receptors suggests disturbance of local regulation in human colorectal tumours by histamine [J]. *Eur J Cell Biol*, 2008, 87(4): 227-236
- [8] Wirts CW. Histamine gastric analysis as a screening method in gastric cancer detection[J]. *Am J Med Sci*, 1955, 229(1): 1-7
- [9] La Vecchia C, Negri E, D'Avanzo B, et al. Histamine-2-receptor antagonists and gastric cancer risk[J]. *Lancet*, 1990, 336(8711): 355-357
- [10] Sander LE, Lorentz A, Sellge G, et al. Selective expression of histamine receptors H1R, H2R, and H4R, but not H3R, in the human intestinal tract[J]. *Gut*, 2006, 55(4): 498-504
- [11] Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [12] Kenneth J, Livak TDS. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-Delta Delta CT Method [J]. *METHODS*, 2001, 25: 402-408
- [13] Masini E, Fabbroni V, Giannini L, et al. Histamine and histidine decarboxylase up-regulation in colorectal cancer: correlation with tumor stage[J]. *Inflamm Res*, 2005, 54 Suppl 1: S80-1
- [14] Medina MA, Quesada AR, Nunez de Castro I, et al. Histamine, polyamines, and cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, 57 (12): 1341-1344