中图分类号：R735.2编号：20110126

**承德医学院**

硕士研究生毕业论文

**SIRT3、HIF-1α在胃癌中的表达及临床意义**

**Expression and clinical significance of SIRT3 and HIF-1αprotein in gastric carcinoma**

研究生：康丽影

导师：高立明主任医师

彭勇教授学科专业：肿瘤学

所在系部：临床学院

研究起止日期：2013年1月～2014年3月论文提交日期：2014年3 月

**承德医学 院**

**学位论文使用授权及知识产权归属承诺**

本学位论文在导师（或指导小组）的指导下，由本人独立完成。本学位论文研究所获的研究成果，其知识产权归承德医学院所有。承德医学院有权对本学位论文进行交流、公开和使用。凡发表与学位论文主要内容相关的论文，第一署名单位为承德医学院，试验材料、原始数据、申报的专利等知识产权均归承德医学院所有。否则，承担相应的法律责任。

研究生签名：导师签章：

年月日

**承德医学院**

**研究生学位论文独创性声明**

本论文是在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果，除了文中特别加以标注和致谢等内容外，文中不包含其他人已经发表或撰写的研究成果，指导教师对此进行了审定。本论文由本人独立撰写，文责自负。

研究生签名：导师签章

年月日

目 录

[摘 要](#_Toc68677798) 3

[结论：](#_Toc68677799) 3

[结论：](#_Toc68677800) 3

**[Abstract](#_Toc68677801)** 4

[引](#_Toc68677802)[言](#_Toc68677802) 6

[1 材料](#_Toc68677803) 6

[2 实验方法与步骤](#_Toc68677804) 7

[3 统计学分析](#_Toc68677805) 10

[1 免疫组织化学结果](#_Toc68677806) 10

[参考文献](#_Toc68677807) 16

[前](#_Toc68677808)[言](#_Toc68677808) 17

[2 实验方法与步骤](#_Toc68677809) 17

[3 分，将细胞阳性率与染色强度两者积分相乘，0分为阴性（-），1-4分为](#_Toc68677810) 19

[参考文献](#_Toc68677811) 27

[结论](#_Toc68677812) 27

[总 结](#_Toc68677813) 28

[参考文献](#_Toc68677814) 28

**SIRT3、HIF-1α在胃癌中的表达及临床意义**

摘 要

胃癌是消化系统常见的恶性肿瘤，中国胃癌发病人数约占世界胃癌发病人数的50%。近年来，虽然胃癌的综合治疗已取得了长足的进步，但是胃癌的发病率及死亡率未见明显下降。浸润和转移是影响胃癌预后的主要因素。大多数研究表明胃癌的浸润转移是多基因、多因素、多阶段改变的结果。研究胃癌发生相关基因及其蛋白表达产物，不仅对于了解胃癌发病机制十分重要，而且对于其临床分子诊断及预后也同样重要。SIRT3隶属于沉默信息调节因子2（silence information negulator2, sir2）相关酶类

Sirtuins家族，研究证实SIRT3是线粒体中最主要的去乙酰化酶，它作用于多种酶参与氧化途径的激活，调节细胞内活性氧（reactive oxygen species，

ROS）稳态，参与能量代谢并影响机体的衰老、细胞死亡和肿瘤发生。SIRT3在不同肿瘤中的表达水平不够统一，对肿瘤发生是抑制作用还是促进作用尚存争议。缺氧诱导因子-1（hypoxia -inducible factor-1, HIF-1）是缺氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内产生的一种异源二聚体转录因子。HIF-1由HIF-1α和HIF-1β两个亚单位组成，其中HIF-1α是唯一的氧调节亚单位，它决定HIF-1的活性，其靶基因参与编码葡萄糖转运蛋白、糖酵解酶及血管生成。有研究显示，肿瘤组织中SIRT3的表达缺失或降低，可以增加HIF-1α的稳定性，具体机制尚不明确。本文通过检测SIRT3、HIF-1α蛋白的表达水平，来探讨SIRT3、HIF-1α在胃癌发生及发展中的生物学作用及二者在胃癌中的相关性。

第一部分SIRT3在胃癌中的表达及临床意义**目的：**

通过检测SIRT3蛋白在胃癌中表达，分析SIRT3表达水平与胃癌临床病理学特征的相关性，探讨SIRT3在胃癌形成过程中的生物学作用。

**方法：**

收集秦皇岛市第一医院2012年1月至2013年10月手术全切除的胃癌石蜡标本80例，50例正常胃粘膜组织石蜡标本（距离癌组织5cm以上未被癌细胞侵及的切缘组织）做对照，用免疫组化方法检测SIRT3 在胃

癌组织及正常胃粘膜组织中的表达，观察SIRT3在胃癌中的表达情况，分析其表达与临床病理学特征的相关性。收集2013年1月至2013年10

月的手术切除的30例新鲜胃癌组织标本及对应的正常胃粘膜组织（距离癌灶5cm以上的癌旁组织），利用Western-blotting方法检测SIRT3在胃癌组织及正常胃粘膜组织中的表达量。

**结果：**

1免疫组化实验结果SIRT3 蛋白在胃癌组织中的阳性表达率为

53.8%(43/80)；在正常胃粘膜组织中的阳性表达率为86.0%(43/50)。胃癌组织SIRT3阳性表达率明显低于癌旁正常胃粘膜组织中，差异有统计学意义(*P*<0.05)。

2 SIRT3在胃癌组织中的表达水平与性别、年龄、肿瘤大小、分化程度无关(*P*> 0.05)；与浸润深度、有无淋巴结转移以及TNM 分期相关

（*P*<0.05）。

3 Western-blotting 实验结果SIRT3 在胃癌组织的蛋白表达量

（SIRT3/β-actin）(0.6551±0.3170)低于癌旁正常胃粘膜组织蛋白表达量

（0.8029±0.3290）， 差异有统计学意义(*P*<0.05)。

结论：

SIRT3在胃癌组织中的表达低于正常胃粘膜组织，其表达水平与浸润深度、淋巴结转移及TNM分期相关，提示SIRT3在胃癌的发生发展过程中可能起抑制作用。

第二部分HIF-1α在胃癌中的表达及临床意义、SIRT3与HIF-1α的相关分析

**目的：**

观察HIF-1α在胃癌中的表达，分析HIF-1α表达水平与胃癌临床病理学特征的相关性，分析SIRT3、HIF-1α二者在胃癌发生及发展过程中相关性。

**方法：**

用免疫组化方法检测HIF-1α在80例胃癌石蜡标本，50例正常胃粘膜组织石蜡标本的表达，观察HIF-1α在胃癌的表达情况，分析其表达与临床病理学特征的相关性。Spearman等级相关分析探讨SIRT3与HIF-1α的相关性。

**结果：**

1免疫组化结果HIF-1α在胃癌组织中的阳性表达率为75%（60/80），在正常胃粘膜组织中，无阳性表达。胃癌组织HIF-1α阳性表达率明显高于癌旁正常胃粘膜组织中，差异有统计学意义(*P*<0.05)。

2胃癌组织中HIF-1α 的表达水平与性别、年龄、分化程度无关

（*P*> 0.05）；与肿瘤大小、浸润深度、有无淋巴结转移以及 TNM 分期相关

（*P*<0.05）

3胃癌组织中SIRT3与HIF-1α的相关系数：r=-0.429（*P*<0.05），表明在胃癌中HIF-1α与SIRT3蛋白表达呈负相关。

结论：

HIF-1α在胃癌组织中的表达高于癌旁正常胃粘膜组织，其表达水平与肿瘤大小、浸润深度、有无淋巴结转移以及TNM分期有关，提示HIF-1α在胃癌的发生发展过程中可能起的是促进作用。SIRT3、HIF-1α的相关分析研究表明二者在胃癌的发展过程可能呈负相关。

**关键词：**胃癌； SIRT3； HIF-1α； 免疫组织化学法；蛋白印迹法

**Expression and clinical significance of SIRT3 and HIF-1αprotein in gastric carcinoma**

**Abstract**

Gastric carcinoma is one of the common malignant tumors in digestive system, the number of gastric carcinoma in China is about 50% of that in the world. In recent years, although comprehensive treatment of gastric carcinoma has made great progress, incidence and mortality of gastric carcinoma have no obvious decline. Its invasion and metastasis are the main factors affecting the prognosis. Most studies show that the invasion and metastasis of gastric carcinoma are a multi-gene, multi-factor and multi-stage progress. It is very important to research gastric cancer-related genes and their protein products, which is not only for understanding the pathogenesis of gastric cancer but also for clinical molecular diagnosis and prognosis. Among the sirtuins located in the mitochondria, SIRT3 is a major mitochondrial deacetylase that targets many enzymes involved in the activation of many oxidative pathways and maintain reactive oxygen species (ROS), which is involved in energy metabolic processes and responsible for aging, apoptosis, and tumorigenesis. SIRT3 expression levels are not uniform in different tumors, and whether SIRT3 mediates cancer development as a tumor promoter or a tumor suppressor remains controversial. Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), a tran-criptional complex, which generally resides in anoxic mammal and human cells, has already been identified as one critical protein directly reacting to hypoxia. HIF-1 is a heterodimer composed of HIF-1αand HIF-1βsubunits. HIF-1α is the only oxygen regulator subunit, which determines the activity of HIF-1 and activates transcription of genes encoding glucose transporters, glycolytic enzymes, and angiogenesis. Some Research shows the decease or loss of SIRT3 can inhance HIF-1αexpression in tumor tissue, but its specific mechanism was not clear. In this paper, we detected the expressions of SIRT3 and HIF-1αprotein in gastric cancer to discuss their biological effects on development of gastric cancer and the correlation

Between them.

The first part Expression and clinical significance of SIRT3 in gastric carcinoma

**Objective:**

By detecting the expressions of SIRT3 protein in gastric carcinoma to research whether it is correlated with the clinic-pathological parameters of GC, to discuss biological effects of SIRT3 on development of GC .

**Method:**

Collecting 80 cases of paraffin specimens of gastric carcinoma tissue and 50 cases of paraffin specimens of normal gastric tissue(away the tumor more than 5 centimetres) with which were surgically removed and certified in the first hospital of Qinhuangdao from January, 2012 to October, 2013. Immunohistochemistry was carried out to detect the expression of SIRT3 in the gastric carcinoma and normal gastric tissue, to observe the expression of SIRT3 and analyse correlation combined the expression of SIRT3 with clinic-pathological parameters.

Collecting 30 cases of fresh gastric carcinoma tissue and adjacent normal non-cancerous tissue(away the tumor more than 5 centimetres) which were surgically removed and certified in the first hospital of Qinhuangdao from January, 2013 to October, 2013. Western-blotting was carried out to detect the the expression of SIRT3 in the gastric carcinoma and normal gastric tissue.

**Result:**

1 The immunohistochemical result: the positive expression rates of SIRT3 protein in gastric cancer is 53.8% (43/80), the positive expression rates of SIRT3 protein in normal gastric tissue is 86.0% (43/50). The expression of SIRT3 protein in carcinomatous gastric tissue is obviously lower than that in normal gastric tissue, the difference was statistically significant(*P*<0.05).

2 The relation between SIRT3 protein and clinical date: the expression of SIRT3 showed significant relation with invasion depth, lymph node metastasis, TNM stage (*P*<0.05), and it was not related with the age, gender, tumor size, or differentiation status (*P*> 0.05).

3 The western-blotting result: the expression of SIRT3 protein (SIRT3/β-actin) in gastric carcinoma tissue (0.6551±0.3170) is lower than that in normal gastric tissue (0.8029±0.3290), the difference was statistically

Significant (*P*<0.05).

**Conclusion：**

The expression of SIRT3 is lower in gastric cancer than that in normal gastric tissue, which is negatively related with invasion depth, lymph node metastasis, TNM stage. SIRT3 may inhibit the development of gastric cancer .

The second part Expression and clinical significance of HIF-1αin gastric carcinoma and the relationship between SIRT3 and HIF-1α

**Objective:**

By detecting the expressions of HIF-1αprotein in gastric carcinoma, to research whether it is correlated with the clinic-pathological parameters of GC, to discuss biological effects of HIF-1αin the progress of GC development.

To analysis whether there is relation between SIRT3 and HIF-1α.

**Method:**

Immunohistochemistry was carried out to detect the expression of HIF-1αin the gastric carcinoma and normal gastric tissue, to observe the expression of HIF-1αand analyse correlation combined the expression of HIF-1αwith clinic-pathological parameters. Spearman rank correlation analysis was carried out to discuss about relation between SIRT3 and HIF-1α. **Result:**

1 The immunohistochemical result: the positive expression rates of HIF-1αprotein in carcinomatous gastric tissue is 75% (60/80), The positive expression rates of HIF-1αprotein in normal gastric tissue is zero. The expression of HIF-1α protein in carcinomatous gastric tissue is obviously higher than that in normal gastric tissue, the difference was statistically significant (*P*<0.05).

2 The relation between HIF-1αprotein and clinical date: the expression of HIF-1αshowed significant relation with tumor size, invasion depth, lymph node metastasis and TNM stage (*P*<0.05), and it was not related with

The age, gender and differentiation status(*P*> 0.05).

3 The correlation coefficient of SIRT3 and HIF-1αis: r= -0.429 (*P*<0.05). the expression of HIF-1α is negatively related with the SIRT3 protein in Gastric cancer（*P*<0.05）.

**Conclusion：**

The expression of HIF-1αprotein in carcinomatous gastric tissue is higher than that in normal gastric tissue, which is significantly related with

Tumor size, invasion depth, Lymph node metastasis, TNM stage. HIF-1αmay promote the development of GC. the expression of HIF-1αis seemingly negatively related with the SIRT3 protein in GC.

**Keywords:** gastric; Carcinoma;; SIRT3;; HIF-1α;; Immunohistochemistry; Western -blotting

**英文缩写**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文名称 | 中文名称 |
| ACS2 | Acetyl coenzyme a synthetase  Acetyl-CoA synthase | 乙酰辅酶 A 合成酶 2 |
| DAB | diaminobenzidine | 二胺基联苯胺 |
| GC | Gastric carcinomas | 胃癌 |
| HER-2 | Human epidermal growth factor  Receptor 2 | 人类表皮生长因子受  体 2 |
| HIF-1α | Hypoxia-inducible factor-1α | 缺氧诱导因子-1α |
| HRE | Hypoxia response element， | 乏氧反应元件 |
| MnSOD | Manganese superoxide ismutase | 锰超氧化物歧化酶 |
| PBS | Phosphate buffered solution | 磷酸缓冲液 |
| ROS | Reactive oxygen species | 活性氧 |
| Sir2 | Silent information regulator2 | 沉默信息调节因子 2 |
| SPSS | Statistical package for the social  science | 社会科学统计件包 |
| UICC | Universe Inhabit  Cancer Coalition | 国际抗癌联盟 |
| VEGF | Vascular endothelial  Growth factor | 血管内皮生长因子 |
| WB | Western- blotting | 蛋白印迹法 |

**SIRT3、HIF-1α在胃癌中的表达及临床意义**

引 **言**

胃癌在世界范围内占恶性肿瘤死因第2位，年发病人数近百万，死亡

人数近80万[1]。近几年来随着现代生活方式及环境的改变，胃癌出现了年轻化趋势。大部分胃癌早期无症状或症状轻微，据统计就诊患者中有80%-90%为中晚期病例。我国胃癌的发病人数约占世界的一半左右，虽然综合治疗使得胃癌的5年生存率有所改善，但是预后仍不理想，总体5年生存率只有20%-30%。随着肿瘤发展过程中分子生物学研究的深入发展，分子靶向治疗已经逐渐成为胃癌治疗的新手段，治疗胃癌的分子靶向药物相继问世。ToGA试验是将抗HER-2的单克隆抗体曲妥珠单抗应用于HER-2阳性胃癌患者的Ⅲ期临床试验，常规化疗方案联合曲妥珠单抗与单纯化疗组比较，中位生存时间分别为13.5个月和11.1个月，有效率分别为47.3％、34.5％。ToGA试验给HER-2阳性的胃癌患者带来了新的希望，使曲妥珠单抗成为HER-2阳性的胃癌患者的重要治疗药物，为靶向治疗的继续发展开辟了新的道路。胃癌的发生是多因素、多基因作用的结果，积极探索胃癌发生发展的分子生物学机制对于胃癌的预防和治疗有着非常重要的意义。

**第一部分**

**SIRT3在胃癌中的表达及临床意义****前言**

沉默信息调节因子Sirtuin属于高度保守的第Ⅲ类组蛋白去乙酰化家族[2]，人类Sirtuin包含七个成员，分别是SIRT1-SIRT7，每个成员都有一个约250个氨基酸残基组成的酶催化核心结构域。SIRTS不同于第Ⅰ和Ⅱ类组蛋白需要依赖NAD+对底物进行去乙酰化。哺乳动物Sirtuin可调控细胞氧化应激、代谢、衰老和凋亡，通过与p53、FOXO、PGC-1α、NK-kB、

Ku70等蛋白相互作用完成。在整个SIRTS家族中，SIRT3作为线粒体最

主要的去乙酰化酶，可与乙酰辅酶A合成酶2（ASC2）、谷氨酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶、FOXO3、Ku70 等蛋白相互作用，具有生热作用、减少

ROS产生降低膜电、可逆性调节线粒体内的复合物的活性、细胞存活、线粒体代谢、长寿、调节肝脏内脂质、抑制糖酵解等作用。近年来，SIRT3成为肿瘤方面的研究热点，在肝癌、乳腺癌、食管癌、口腔鳞癌等都有研究，研究结果不尽相同，其在肿瘤发展过程中的作用尚有争议。目前国内外关于SIRT3在胃癌中的研究报道较少，其在胃癌发展过程中的作用尚未明确。本研究通过免疫组化及Western-blotting法检测SIRT3蛋白在胃癌中的表达情况，探讨SIRT3在胃癌发展过程中的生物学作用，为胃癌的分子靶向治疗寻找新的靶点，使得研究更具有临床意义。

**材料与方法**

# 1 材料

## 1.1 标本

### 1.1.1 标本的收集

收集秦皇岛市第一医院2012年1月至2013年10月手术切除的胃癌患者的病例资料，筛选出80例病例资料完整，术前未做过任何放疗及化疗，标本经组织病理确诊为胃腺癌，均无心脏病及脑血管病，无合并其他系统疾病，病理资料完善。于病理科收集此80例胃癌石蜡标本，50例未被癌细胞侵及的正常胃粘膜组织切缘（距离癌组织至少大于5cm）作为对照。

收集秦皇岛市第一医院2013年1月至2013年10月手术切除的胃癌组织及对应癌旁新鲜组织标本各30例，癌旁组织距离癌组织病灶大于5cm。所有患者病例资料完整，术前胃镜病理活检确诊为胃癌，术前未做过任何放疗及化疗。

### 1.1.2 标本的处理

所有的石蜡标本均4μm厚连续切片。

所有新鲜的组织标本均于离体后30min之内取材，放于冻存管内，立即置于液氮中，随后于-80℃冰箱冻存。

### 1.1.3 整理病例资料

将收集的80例病例资料进行整理，其中男性46例，女性例34例，年龄

37～78岁，中位年龄61岁。胃癌患者临床分期按2003年国际抗癌联盟

（UICC）颁布的胃癌TNM分期标准：Ⅰ期16例，Ⅱ期16例，Ⅲ期33例，

Ⅳ期15例。胃癌分化程度：高分化腺癌11例，中分化腺癌26例，低分化腺癌27例，未分化癌16例。胃癌浸润深度：T1、T2组39例，T3、T4组41例。胃周淋巴结转移情况：发生淋巴结转移者57例，未发生淋巴结转移者

23例。

## 1.2 试剂

### 1.2.1 免疫组织化学试剂

二甲苯、酒精、30%过氧化氢、甲醇、PBS缓冲液、枸橼酸盐缓冲液、

ft羊血清、苏木素、中性树胶等均有秦皇岛市第一医院病理科提供。兔抗人SIRT3多克隆IgG抗体（美国Genetex公司）

即用型兔超敏二步法免疫组化检测试剂（中衫金乔生物科技有限公司）

即用型DAB显色试剂盒购（中衫金乔生物科技有限公司）

### 1.2.2 WB试剂

兔抗人SIRT3多克隆IgG抗体（美国Genetex公司）

RIPA裂解液（强）（上海碧云天）

BCA法蛋白定量试剂盒（上海捷瑞生物）预染蛋白Marker（Fermentas）

4\*蛋白上样缓冲液（P1016北京索莱宝）

ECL发光试剂盒（天根生化科技有限公司）内参抗体β-actin（Santa cruz）

羊抗兔IgG-HRP（bioworld）脱脂奶粉（BD）

X射线胶片（柯达）

甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵（APS）、甘氨酸、乙二胺四乙酸二钠

（EDTA）购买于Amresco

考马斯亮兰R-250、十二烷基硫酸钠（SDS）、四甲基乙二胺（TEMED）购买于SIGMA

## 1.3 主要仪器及设备

### 1.3.1 免疫组化仪器和设备

石蜡切片机、捞片机、烤片机（德国Leica公司），37℃恒温培养箱，医用微波炉，4℃冰箱、光学显微镜（德国Leica公司）

### 1.3.2 western blot仪器和设备电源：BIO-RADA

电泳槽：DYCZ-28A型电泳槽，NO: 0628A-063-02 Umax: 600V Imax：

200mA,北京市六一仪器厂

电泳槽（转膜）：DYCzp-40E型电泳槽，标准代码：Q/FTYY002-2004

DYC系列电泳槽，北京市六一仪器厂

离心机：THERMO Scieatific SORVALL LEGEND MICRO 017

自动多功能酶标仪：Automatic Micro-plate Reader KHB ST-360

凝胶成像系统：美国UVP 公司

# 2 实验方法与步骤

## 2.1 免疫组织化学方法

### 2.1.1 切片前的准备

洗涤液分别清洗载玻片和盖玻片，然后自来水、蒸馏水分别冲洗，将其烤干后浸泡入浓硫酸（载玻片8~12h，盖玻片6h）后，流水漂洗，蒸馏水冲洗后使用95％乙醇中浸泡24h，取出后码齐烤干，放入盒内备用。贴片前在载玻片上涂以APES，烤干，目的是为了避免在免疫染色过程中组织切片脱片。

### 2.1.2 制备石蜡切片

所选石蜡标本块由技术熟练的常规连续切片，层厚4μm，所制的蜡片，由上述制备的载玻片捞取后，置65℃烤片机中2h，以减少脱片。

### 2.1.3 HE染色选片

（1）脱蜡：石蜡切片浸入二甲苯2x8min；

（2）洗去二甲苯：浸入无水乙醇2x5min；

（3）水化：95%、80%、70%乙醇各5min，自来水水洗5min；

（4）苏木素染色5min，自来水水洗1min；

（5）1%的盐酸酒精分化10s，自来水水洗1min；

（6）1%的稀氨水反蓝10s，自来水洗1min；

（7）伊红染色5min，自来水洗；

（8）脱水：70%、80%乙醇脱水各5min，95%乙醇2x5min，无水乙醇2x5min；

（9）透明：二甲苯2x10min；

（10）封片：中性树胶封片。

（11）镜下观察，选出肿瘤典型区域。

### 2.1.4 免疫组织化学主要溶液的配置

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 0.01PBS(PH7.2-7.4) | NaCl | 9 克 |
|  | Na2HPO4 12H2O | 6 克 |
|  | Na2H2PO4 2H2O | 0.4 克 |
| 0.3%甲醛双氧水 | 3%H202 | 3ml |
|  | 加甲醛至 | 30ml |
| 0.1M 枸橼酸盐缓冲液 | C6H5Na3O7·2H2O | 3 克 |
| （pH6.0） | C6H8O7·H2O | 0.4 克 |
| DAB 显色剂 | 双蒸水 | 1ml |
|  | A 液 | 1 滴 |
|  | B 液 | 1 滴 |
|  | C 液 | 1 滴 |

### 2.1.5 免疫组织化学方法步骤

将收集的石蜡标本，4μm连续切片，经脱蜡，脱二甲苯，脱水后采用非生物素Polink-2 plus®免疫组织化学法检测胃癌组织及正常胃粘膜组织

SIRT3蛋白的表达情况。一抗为兔抗人SIRT3多克隆IgG抗体（1:800），以

PBS代替一抗作为阴性对照，已知的表达阳性的组织切片作为阳性对照。

（1）取出烤片机中的切片，浸入二甲苯2x8min，无水乙醇2x5min，

95%、80%、70%乙醇中各5min，PBS洗涤3次，每次3min。

（2）去除PBS，将切片浸入枸橼酸盐缓冲液，微波炉中最大火力

（98℃-100℃）加热至沸腾，冷却（约5~10min），将切片自然冷却至室温，PBS洗涤3次，每次5min；

（3）去除PBS，加入3%双氧水-甲醇溶液30min，灭活内源性过氧化氢酶，PBS洗涤3次，每次5min。

（4）封闭，加ft羊血清（1:10正常ft羊血清），37℃温箱孵育20min，封闭组织非特异性抗原，甩去多余液体，不做冲洗；

（5）滴加SIRT3兔抗多克隆一抗，4℃过夜，PBS洗涤3次，每次5min；

（6）去除PBS，滴加兔超敏二步法免疫组化检测试剂1(Polymer Helper)，37℃温箱孵育15min，PBS洗涤3次，每次5min。

（7）去除PBS，滴加兔超敏二步法免疫组化检测试剂2(poly-HRP anti-Rabbit IgG)，37℃温箱孵育15min，PBS洗涤3次，每次5min。

（8）去除PBS，每张切片上滴加新鲜配置的DAB显色剂，变显色边用显微镜观察，镜下控制好反应时间（2~3min），自来水冲洗终止显色。

（9）苏木素复染、脱水透明：将切片进入苏木素90s，流水冲洗5min，盐酸酒精分化20~30s，自来水反蓝5min。

（10）梯度酒精（70%，80%，90%，95%Ⅰ，95%Ⅱ，无水乙醇Ⅰ，无水乙醇Ⅱ），二甲苯透明，最后用中性树胶封片。

### 2.1.6 免疫组化结果分析

由两位资历高的病理医师进行双盲式阅片。在显微镜100倍视野下，每张切片随机选择5个区域，高倍镜下SIRT3阳性表达主要定位在胞浆，呈棕黄色颗粒状。根据棕黄色阳性信号的强弱和面积来综合判定染色结果。阳性率≤5%为0分，6%-25%为1分，26%-50%为2分，51%-75%

为3分，＞75%为4分；阳性强度黄色为1分，棕黄色为2分，棕褐色为

3分，将细胞阳性率与染色强度两者积分相乘，0分为阴性（-），1-4分为

弱阳性（+），5-8分为中度阳性（++），9-12分为强阳性（+++）。阳性表达率=阳性表达例数（弱阳性+中度阳性+强阳性）/总例数。

## 2.2 Western-blotting方法

### 2.2.1 Western-blotting主要溶液的配置

分离胶缓冲液: 12%，H2O3.3mL，30%丙烯酰胺4mL, PH8.8缓冲液

2.5ML, AP100ul, 10%SDS100ul, TEMED4ul。

浓缩胶缓冲液：5%，H2O3.4mL，30%丙烯酰胺0.83mL, PH6.8缓冲液0.63mL，AP50ul，10%SDS50ul，TEMED5ul）

电泳转移缓冲液：2.9g甘氨酸、5.8gTris碱、0.37g SDS, 200ml甲醇（临用前加），加水至总量1L。

二抗稀释液：1%的二抗稀释液（内含0.05%TWEEN 20ml）

### 2.2.2 组织中总蛋白的提取

（1）把组织剪切成细小的碎片。

（2）RIPA裂解液溶解，混匀。取适当量的裂解液，在使用前数分钟内加入PMSF，使PMSF的最终浓度为1mM。

（3）按照每20毫克组织加入250微升裂解液的比例加入裂解液。用玻璃匀浆器匀浆，直至充分裂解。

（4）充分裂解后，10000转/分，离心5分钟，取上清，放入新的1.5ml的EP管中置于-20℃冰箱中保存。

### 2.2.3 总蛋白定量检测

（1）配制工作液：根据标准品和样品数量，BCA试剂A与试剂B按照

50: 1体积配制适量BCA工作液，使其充分混匀。BCA工作液在室温下24 h内保持稳定。

（2）稀释标准品：用PBS将10µl标准品用稀释到100µl，使其最终浓度为0.0375mg/ml。将标准品按0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20µl加到96孔板的蛋白标准品孔中，加PBS 补足到20µl 。

（3）各孔加入200µlBCA 工作液，37℃放置30min。

（4）冷却到室温，用酶标仪测定A562波长，记录OD值，根据标准曲线计算出蛋白浓度。

### 2.2.4 SDS-PAGE电泳：

（1）制胶：按比例配制分离胶，缓慢地摇动溶液，充分混匀激活剂，在两层玻璃极将凝胶溶液缓慢地注入，为避免氧气进入凝胶溶液中，再在液面上小心注入一层水，静置40min。同前浓缩胶按照一定的比例配制，为防止引入过多氧气，混匀溶液时避免剧烈。轻轻地吸去位于不连续系统中下层分离胶上的水分，将凝胶溶液连续平稳的注入，然后小心插入梳子，避免在齿尖留有气泡，为保证完全聚合静制60min以上。

（2）预电泳：凝胶聚合好后，安置于电泳槽中，轻轻拔去梳子，加入电泳缓冲液后，为清除凝胶内的杂质、疏通凝胶孔径，用低电压10-20V进行20~30min的预电泳，保证电泳过程畅通。

（3）样品准备：计算出上样的体积，然后按样品：上样buffer=5: 1

的比例加入上样buffer充分混匀，沸水煮10min，使蛋白变性，冰上5min。

（4）加样：预电泳结束后依次加入标准品（Marker）和待分析样品，加样时间要尽量短，以免样品扩散，可在未加样的孔中加入等量的样品缓冲液避免边缘效应，每个泳道加5ul。

（5）电泳：加样完毕，选择80V恒压进行电泳，电泳直至溴酚蓝料前沿到达两胶交界处（约1h），更换至100V恒压电泳，电泳直至溴酚蓝染料前沿下至凝胶末端处（约3h），即停止电泳。

### 2.2.5 转膜：

（1）切胶：将完整胶放入盛有转膜液的玻璃皿内，依据marker条带确定目的蛋白所在区域，并切下该区，测量、记录其长宽。

（2）剪膜和滤纸：按切下目的蛋白区域胶的尺寸剪膜和滤纸（滤纸长宽略小于PVDF膜长宽），膜放入盛有10%甲醇的玻璃皿中10秒钟，将膜、滤纸、胶放入盛有转膜液的玻璃皿中5min。

（3）向电转槽中倒入部分电转液，将海绵浸入。按如下顺序制作―三 明治‖（注意避免两边滤纸相互接触，以免发生短路）。从正极到负极按如下顺序排列：正极-海绵-双层滤纸-PVDF膜-凝胶-双层滤纸-海绵-负极。

（其中不能留有气泡）卡紧转膜板，电转槽中倒满电转液，将转膜板浸入电转槽中，注意正负极要正确。插上电源，设定恒流20mA，时间20min转膜，转膜完毕取出膜置于4℃冰箱中过夜。

（4）膜的封闭：用TBST液洗涤膜5分钟×3次。室温下，置入5%脱脂奶粉封闭液中，摇床震动，100r/min，封闭90min。

### 2.2.6 一抗孵育：

（1）配制一抗：用TBST稀释一抗（SIRT3/TBST为1:1500 ，

β-actin/TBST为1:400）。

（2）一抗孵育：将封闭后的膜放入盛有一抗约1ml杂交袋中，室温摇床（100r/min）孵育90min。

（3）用TBST洗涤膜5min×3次。

### 2.2.7 二抗孵育：

（1）配制二抗：用TBST稀释辣根过氧化物酶标记ft羊抗兔二抗，二抗/TBST比例为1: 800。

（2）二抗孵育：将一抗孵育后的膜放入盛有二抗的杂交袋中，室温摇床（100转/分钟）孵育90min。

（3）用TBST洗涤膜5min×3次。

### 2.2.8 ECL显色

（1）配制ECL工作液：在避光的容器中按A液：B液=1: 1的比例配制。

（2）按膜：工作液=10cm2: 1ml的比例将ECL工作液覆盖到膜表面，放置1-2分钟后在凝胶成像系统中观察、拍照。

### 2.2.9 所得图片用IPP 6.0软件对western条带灰度值检测，计算目的条带的

相对灰度值（目的条带相对灰度值=目的条带灰度值/同一样品β-actin条带灰度值）。

# 3 统计学分析

数据结果采用SSPS17.0统计软件完成，均数比较采用配对*t*检验，计数资料采用χ２检验，检验水准α=0.05，*P*<0.05表明差异有统计学意义。

**结果**

# 1 免疫组织化学结果

## 1.1 SIRT3蛋白在胃癌组织、正常胃粘膜组织中的表达

SIRT3在阴性对照中无表达。阳性表达主要定位于细胞浆中，呈棕黄色颗粒。在80例胃癌组织中，SIRT3蛋白阳性表达率为53.8% (43/80)，其中强阳性10例（12.5%），中度阳性13例（16.3%），弱阳性20例（25%）。在50例癌旁组织中SIRT3蛋白阳性表达率为86% (43/50)，其中强阳性20例

（40%），中度阳性13例（26%），弱阳性10例（20%）。SIRT3蛋白在胃癌组织中的阳性表达率明显低于癌旁正常胃粘膜组织，两组比较差异有统计意义（*P*<0.05）（Tab 1）。

## 1.2 胃癌组织中SIRT3表达与临床病理学的关系

80例胃癌组织中，浸润深度T1-T2组39例，SIRT3蛋白阳性表达率为

69.2% (27/39)，高于T3-T4组39% (16/41)，两组比较差异有统计学意义

（*P*<0.05）。有淋巴结转移组57例，SIRT3蛋白阳性表达率为45.6% (26/57)，低于无淋巴结转移组73.9% (17/23)，两组比较差异有统计学意义

（*P*<0.05）. TNM分期中，Ⅰ、Ⅱ期组阳性表达率为84.4% (27/32)，高于Ⅲ、

Ⅳ期组（阳性表达率为33.3%），两组比较差异有统计学意义(*P*<0.05)。

SIRT3的表达在不同年龄、性别、肿瘤大小、分化程度差异无统计学意义(*P*> 0.05)（Tab 2）。

2 Western-blotting结果

SIRT3蛋白在胃癌组织中的表达量（SIRT3/β-actin）为0.6551±0.3170，明显低于癌旁正常胃粘膜组织0.8029±0.3290，两组间差异有统计学意义

（*P*<0.05）。

**附图**

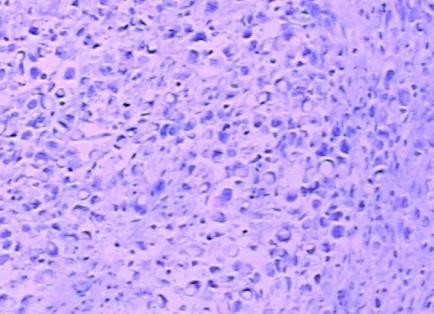


Fig.1Expression of SIRT3 in gastric carcinoma (ISH x 200)

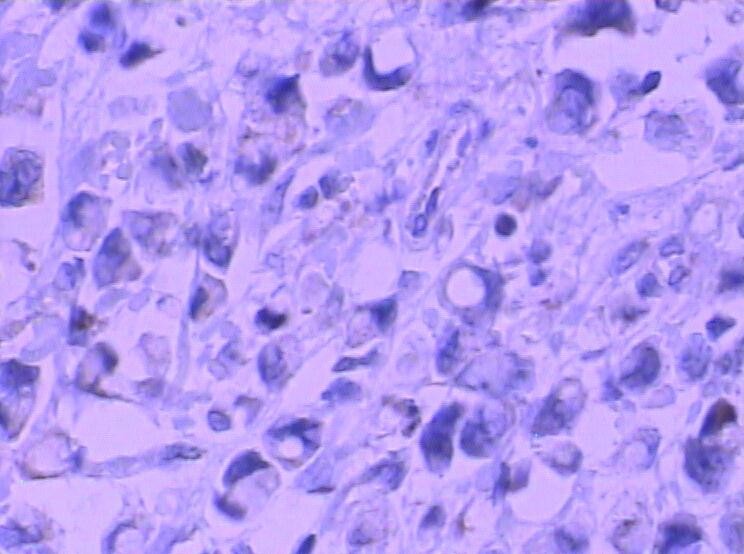


Fig.2 Expression of SIRT3 in gastric carcinoma (ISH x 400)



Fig.3 Expression of SIRT3 in normal gastric tissue (ISH x 200)



Fig. 4 Expression of SIRT3 in gastric carcinoma and normal gastric tissue examined by western-blotting（G: gastric carcinoma, N: normal gastric tissue）

**附表**

Tab1 Expression differences of SIRT3 protein between Gastric Cancer (G) and Normal Gastric tissue (N).

SIRT3 Positive

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Group | N | - | + | ++ | +++ | （%） |
| G | 80 | 37 | 20 | 13 | 10 | 53.8 |
| N | 50 | 7 | 10 | 13 | 20 | 86.0 |

χ２=10.740，*P*＜0.05

Tab2 Relationship between the expression of SIRT3 and the clinic

-pathological features in gastric cancer tissues

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Clinical-pathological features |  | SIRT3 | |  |
| N |  | χ*2* | *P* |
|  | + - | |  |
| Age |  |  | 0.134 | 0.714 |
| ≥60 | 48 | 25 | 23 |  |
| <60 | 32 | 18 | 14 |  |
| Sex |  |  | 0.334 | 0.565 |
| Male | 46 | 26 | 20 |  |
| Female | 34 | 17 | 17 |  |
| Differentiation status |  |  | 3.421 | 0.066 |
| poor-Undifferentiation | 43 | 19 | 24 |  |
| Well-moderate | 37 | 24 | 13 |  |
| Tumor size |  |  | 0.134 | 0.716 |
| ≥5cm | 32 | 18 | 14 |  |
| <5cm | 48 | 25 | 23 |  |
| Depth of invasion |  |  | 7.336 | 0.007 |
| T1-T2 | 39 | 27 | 12 |  |
| T3-T4 | 41 | 16 | 25 |  |
| Lymph node metastasis |  |  | 5.279 | 0.022 |
| No | 23 | 17 | 6 |  |
| Yes | 57 | 26 | 31 |  |
| TNM |  |  | 20.122 | 0.000 |
| Ⅰ-Ⅱ | 32 | 27 | 5 |  |
| Ⅲ-Ⅳ | 48 | 16 | 32 |  |

**讨论**

肿瘤的形成过程非常复杂，正常细胞在某种因素作用下，从细胞水平及基因水平逐渐发生变化转变成为肿瘤细胞，即所谓的恶变，并最终演变成为生长及分化都不可控制的肿瘤细胞[3, 4]。通常能够使细胞发生癌变的基因被称之为癌基因，而抑癌基因则是那些能够编码抑制肿瘤蛋白的基因。癌基因被激活与抑癌基因失去活性，在肿瘤形成过程中起决定性作用。在所有肿瘤中，胃癌以其高发生率、易转移、发现晚、预后差等为人们重视。在我国，胃癌在消化道肿瘤的发病率和死亡率均排在首位，寻找新的分子标志物对于胃癌的诊断与治疗至关重要。

在基因的表达调控中，组蛋白的乙酰化/去乙酰化修饰起着举足轻重的作用。sirt2及其存在于哺乳动物中的其他同源类似物SIRT1-SIRT7，是除了经典的Ⅰ类和Ⅱ类的组蛋白去乙酰化酶（HDAC）外，参与去乙酰化作用的Ⅲ类HDAC，其中SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT5具有去乙酰化酶活性，SIRT4、SIRT6具有ADP-核糖基转移酶活性。SIRTS是一种高度保守NAD+依赖性去乙酰化酶，作用于多种底物将组蛋白去乙酰化，还具有ADP-核糖基转移酶作用，参与机体的生物活动，通过调节新陈代谢和酶的活性使细胞的能量和氧化还原状态稳定。Sirtuin在细胞中分布广泛，功能多样化[5]。可能涉及氧化应激、DNA修复、基因稳定性，参与细胞增殖、凋亡、代谢，并且参与调控衰老、寿命[6-7]。与衰老相关的人类病理情况进展包括癌症，越来越多的研究表明，Sirtuin家族与肿瘤的发生发展密切相关。

相对于SIRT4、SIRT5, SIRT3是Sirtuins中首先被定位哺乳动物线粒体的去乙酰化酶，是目前唯一确定的与人类长寿相关的基因。SIRT3大部分定位于线粒体，具有去乙酰化酶活性，也有少量分布于细胞核中，可使组蛋白H4、Ku70去乙酰化[8]，并参与细胞抗环境胁迫过程。SIRT3基因位于11号染色体中，长度为21kb，在心肌、骨骼肌、褐色脂肪等线粒体发达组织中高表达。SIRT3的底物主要是由许多代谢相关的酶组成，包括谷氨酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶、AceCS2等。SIRT3缺失的小鼠没有表现出显著的生理异常，但它们相对于野生型小鼠来说，线粒体内存在大量的乙酰化蛋白质[9-10]，而同样作为线粒体中的去乙酰化酶SIRT4、SIRT5却没有相同的变化。研究表明，SIRT3在肿瘤的代谢中发挥重要作用。恶性

肿瘤细胞氧气充足的条件下，消耗大量的葡萄糖产生乳酸进行有氧糖酵解的特性，人们称之为Warburg效应[11]。而SIRT3正是以新陈代谢的许多酶类作为发挥去乙酰化作用的靶点，进而激活有氧代谢路径，影响肿瘤细胞的能量代谢[12]。SIRT3缺陷的小鼠使ATP的产生减少，在心脏、肝脏、肾脏中的ATP 不到50%，而细胞内活性氧（ROS）的水平增高[13-14]。

Hirschey等[15]和Jing等[16]研究发现，当小鼠长期喂食高脂肪的饮食后，线粒体中蛋白质呈高度乙酰化状态，肝脏中Sirt3 mＲNA和蛋白水平降低。能量限制时，Sirt3表达量增高。

当SIRT3缺失的动物或培养细胞遇到各种应激因素，如氧化应激、化学激素或受到电离辐射时，会出现与年龄增加相关的生理表现，例如心肌肥厚、致癌等[17-18]。虽然这些并没有明确的机制解释，但是细胞内活性氧（ROS）增加可能是潜在的原因之一。生理状态下，细胞内源性及外源性途径产生的ROS及自由基被机体多种抗氧化酶(SOD、GST、CAT等)不断清除，从而使氧化-还原保持稳定。一旦这种平衡被打破，ROS产生增多或抗氧化物酶减少，将引起各种氧化应激的发生，损伤细胞，严重时导致细胞凋亡。ROS引起的持续氧化应激引起的损伤会通过改变细胞内氧化还原状态、氧化修饰关键氨基酸残基来攻击细胞的DNA、脂质及蛋白质，导致一系列病理过程，包括神经退行性疾病、衰老、肿瘤的发生等

150余种疾病[19-20]。研究证实SIRT3作为线粒体中最主要的去乙酰化酶，它作用于多种酶参与氧化途径的激活，SIRT3能减少细胞内ROS主要依赖的MnSOD岐化反应，SIRT3去乙酰化MnSOD两个关键的赖氨酸残基，从而增强抗氧化活性，同时SIRT3还能增强MnSOD减低细胞自由基和氧化应激耐受能力[21]。上述研究表明SIRT3是细胞内活性氧的关键调节因子之一，从上述结果可以推测，SIRT3的表达减低或缺失，导致MnSOD表达降低，从而使细胞内活性氧浓度增高，高浓度ROS能够导致基因、脂质、蛋白的不稳定，利于肿瘤的发生和正常细胞的恶性转变[22-23]。

肿瘤细胞具有不断生长、耐药，抑制凋亡、血管生成、无限增殖复制、浸润和转移等生物学特征[24]。此外基因组不稳定、能量代谢的改变及免疫功能异常等都可以导致肿瘤的发生，为肿瘤生长提供微环境。SIRT3在肿瘤发生的各个阶段都可能起作用，提示SIRT3对于各种肿瘤的研究及治疗具有非常重要的潜在价值。Zhang等[25]通过免疫组化、WB及RT-PCR从蛋白和基因水平检测SIRT3 在肝癌中的表达，得出的结论是无论从蛋

23

白水平，还是基因水平，肝癌组织SIRT3的表达都低于正常肝组织，且肝癌组织中SIRT3低表达与肿瘤分化、临床分期及AFP值有关，预后分析显示肝癌中SIRT3低表达是不良预后因子。SIRT3作为肿瘤的抑制因子在肺腺癌中也有报道，SIRT3 在肺癌组织中的表达低于正常，体外研究

SIRT3高表达的A549细胞株可增加bax/bcl-2 a和bad/bcl-x/L的比率，促进AIF向细胞核内转移，同时高表达的SIRT3能够上调P53及P21蛋白的表达，降低ROS的表达[26]。同样SIRT3在乳腺癌、骨肉瘤、白血病组织中等都有不同程度的下降。然而，还有一些研究结果表明SIRT3在肿瘤发生中起到的是促进作用。Ashraf等发现SIRT3表达水平在转移淋巴结阳性的乳腺癌组织中显著高于淋巴结阴性的[27]。在纤维肉瘤[28]、膀胱癌细胞[29]中，SIRT3的表达也是增高的，然而其去乙酰化酶的活性却大大减低，进一步研究发现口腔鳞癌发生SIRT3非特异点突，使SIRT3去乙酰化酶活性降低，从而影响了氧化还原平衡[30]。

由此可知，SIRT3在多种恶性肿瘤的发展中都具有重要作用，但目前关于SIRT3在胃癌中研究报道较少。本文运用免疫组化和蛋白免疫印迹两种方法检测SIRT3蛋白在胃癌组织及正常胃粘膜蛋白表达水平，已期了解SIRT3蛋白在胃癌的生物学作用。

本研究的免疫组织化学方法结果显示，在80例胃癌组织标本中，阳性表达率为53%（43/80），其中10例强阳性表达，13例中等阳性表达，

20例弱阳性表达；在50例正常的胃粘膜组织中，阳性表达率高达86%

（43/50），43 例呈阳性表达，胃癌组织中SIRT3 蛋白阳性表达率低于正常胃粘膜组织，两组差异有统计学意义（*P*<0.05）。Western-blotting实验结果显示，胃癌组织中SIRT3蛋白表达水平（0.6551±0.3170）低于正常胃粘膜组织（0.8029±0.3290），两组差异有统计学意义（*P*<0.05）。从免疫组织化学方法和Western -blotting结果，我们推测SIRT3蛋白可能在胃癌组织是低表达的或表达缺失，在正常胃粘膜组织中呈高表达，这与Yang等[31]研究是一致的。

同时本研究对SIRT3蛋白在胃癌中的表达与临床病理学因素进行分析。对比Yang等[31]实验研究中SIRT3蛋白与胃癌的分化、浸润深度及临床分期相关，而与淋巴结转移无关。本研究结果SIRT3蛋白在胃癌的分化及淋巴转移方面与杨的结果不一致，SIRT3蛋白的表达与年龄、性别、肿瘤大小、分化程度无关（*P*> 05），与浸润深度、淋巴结转移、TNM 分

期相关（*P*<0.05）。浸润深度越深，SIRT3 的表达越低；淋巴结转移的胃癌组织SIRT3的表达水平低于无淋巴结转移的胃癌组织；临床分期越晚，

SIRT3的表达水平越低，这似乎提示SIRT3对胃癌的发生、发展过程具有一定的抑制作用。

## 小 **结**

SIRT3蛋白在胃癌中表达水平较低，而在正常胃粘膜组织中表达水平较高，且SIRT3 蛋白在胃癌中表达降低与多项临床病理指标相关，提示

SIRT3蛋白表达的缺失在胃癌发生发展中发挥某种作用，SIRT3在胃癌的发生、发展过程中可能具有一定的抑制作用，其具体作用机制有待于进一步的实验研究。

参考文献

[[1] Jemal A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Jemal%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21296855), [Bray F](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bray%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21296855), [Center MM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Center%20MM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21296855), et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[2] Finkel T, Deng C X, Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins[J]. Nature, 2009, 460(7255): 587-591.

[3] Croce CM. Oncogenes and cancer[J]. N Engl J Med, 2008, 358(5): 502-511.

[4] Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2001, 1(2): 157-162 .

[5] Michishita E, Park JY, Burneskis JM, et al. Evolutionarily conserved andnonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins[J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(10): 4623–4635.

[6] Saunders LR, Verdin E. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging[J]. Oncogene, 2007, 26(37): 5489–5504.

[7] Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function[J]. Biochem J, 2007, 404(1): 1–13.

[8] Scher MB, Vaquero A, [Reinberg D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Reinberg%20D%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17437997). SIRT3 is a nuelear NAD+-dependent histonedaetylase that translocates to the mitoehondria upon cellular stress[J]. Genes DEV, 2007, 21(8): 920-928.

[[9] Lombard DB](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lombard%20DB%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17923681), [Alt FW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Alt%20FW%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17923681), [Cheng HL](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cheng%20HL%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17923681), et al. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation[J]. [Mol Cell Biol,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17923681) 2007, 27(24): 8807-8814.

[10] Lombard DB. Sirtuins at the breaking point: SIRT6 in DNA eapair[J]. Aging (Albany NY), 2009, 1(1): 12-16.

[11] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB, et al. Understanding the Warburg effect[J]. the metabolic requirements of cell proliferation, Sc2ence, 2009 (324): 1029-1033.

[12] Verdin E, Hirschey MD, Finley LW, et a1. Sirtuinregulation of mito-chondfia: Energy production, apoptosis, and signaling[J]. Trends Biochem Sci, 2010, 35(12): 669-675．

[13] Ahn BH, Kim HS, Song S, Lee IH, et al. A role for the mitochondrial

Deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis[J]. Proc Natl Acad Sci US A, 2008, 105(38):14447–14452.

[14] Kim HS, Patel K, Muldoon-Jacobs K, et al. SIRT3 Is a Mitochondria-Localized Tumor Suppressor Required for Maintenance of Mitochondrial Integrity and Metabolism during Stress[J]. Cancer Cell, 2010, 17(1): 41–52.

[15] Hirschey M D, Shimazu T, Jing E, et al. Sirt3 deficiency andmitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome[J]． Mol Cell, 2011, 44(2): 177-190.

[16] Jing E, Emanuelli B, Hirschey M D, et al. Sirtuin-3 (Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling via altered mitochondrial oxidation and reactive oxygen species production[J]. ProcNatl Acad Sci USA, 2011, 108(35): 14608-14613.

[[17] Sundaresan NR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sundaresan%20NR%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18710944), [Samant SA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Samant%20SA%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18710944), [Pillai VB](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pillai%20VB%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18710944), et al. SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70[J]. [Mol Cell Biol,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18710944) 2008, 28(20): 6384-401. [18] [Sundaresan NR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sundaresan%20NR%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18710944), Gupta M, Kim G, et al. Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3-dependent antioxi-dant defense mechanisms in mice[J]. J Clin Invest, 2009, 119(9): 2758-2771.

[19] Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species[J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(5): 278-286.

[20] NishikawaM. Reactiveoxygenspeciesintumormetastasis[J]. CancerLett, 2008, 266(1): 53-59.

[21] Qiu X, Brown K, Hirschey MD, et al. Calorie Restriction Reduces xidative stress by SIRT3-Mediated SOD2 Activation[J]. cell etab, 2010, 12(6): 662-667.

[22] Lau AT, Wang Y, Chiu JF. Reactive oxygen species: current knowledgeand applications in cancer research and therapeutic [J]. J Cell Biochem, 2008, 104(2): 657-667.

[23] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the boilogy of ageing[J]. Nature, 2000, 408 (6809): 239－247.

[24] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer[J]. Cell, 2000, 100(1): 57–70.

[25] Zhang CZ, Liu L, Cai M, et al. Low SIRT3 Expression Correlates with Poor Differentiation and Unfavorable Prognosis in Primary Hepa- tocellular

Carcinoma [J]. [PLoS One,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Low%2BSIRT3%2BExpression%2BCorrelates%2Bwith%2BPoor%2BDifferentiation%2Band%2BUnfavorable%2BPrognosis%2Bin%2BPrimary%2BHepatocellular%2BCarcinoma) 2012, 7(12):e51703.

[26] Xiao K, Jiang J, Wang W, etal. Sirt3 is a tumor suppressor in lung adenocarcinoma cells[J]. [Oncol Rep,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23842789) 2013 (3): 1323-1328.

[27] Ashraf N, Zino S, Macintyre A, Kingsmore D, et al. Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast cancer[J]. Br J Cancer, 2006, 95(8): 1056–1061.

[28] Yang H, Yang T, Baur JA, et al. Nutrient-Sensitive Mitochondrial NAD(+) Levels Dictate Cell Survival. Cell, 2007, 130(6): 1095–1107.

[29] Li S, Banck M, Mujtaba S, et al. p53-Induced growth arrest is regulated by the mitochondrial SirT3 deacetylase[J]. PLoS ONE, 2010, 5(5): e10486.

[[30] Chen IC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chen%20IC%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23800187)1, [Chiang WF](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chiang%20WF%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23800187), [Liu SY](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Liu%20SY%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23800187) et al. Role of SIRT3 in the regulation of redox balance during oral carcinogenesis[J]. [Mol Cancer,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23800187) 2013, 12: 68.

[[31] Yang B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Yang%20B%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24287180), [Fu X](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fu%20X%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24287180), [Shao L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Shao%20L%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24287180), et al. Aberrant expression of SIRT3 is conversely correlated with the progression and prognosis of human gastric cancer [J]. [Biochem Biophys Res Commun,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24287180) 2014, 443(1): 156-160.

**第二部分**

**HIF-1α在胃癌中的表达及临床意义、SIRT3与HIF-1α的相关性研究**

前 **言**

胃癌是常见的消化系统恶性肿瘤，在我国其发病率仅次于肺癌，在消化系统恶性肿瘤排名第一。早期症状不明显，大多数病人发现已是中晚期，复发和转移是治疗失败的主要原因。肿瘤组织微环境缺氧是肿瘤发生转移的一个重要因素。缺氧诱导因子-1（hypoxia inducible factor, HIF-1）是这一过程中主要的调节因子。HIF-1在常氧环境中不断合成，但由于很快被泛素蛋白酶体系降解，几乎检测不到；在乏氧环境中，HIF-1α的稳定性升高，是肿瘤发生发展的重要转录因子。新近研究表明，即使在正常氧条件下，肿瘤中HIF-1α表达也是增高的，可调控肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭转移、以及肿瘤放疗化疗抗拒性等过程，并且影响预后。

**材料与方法**

1材料

## 1.1 标本

### 1.1.1 标本的收集

收集秦皇岛市第一医院2012年1月—2013年10月手术切除的胃癌患者的病例资料，筛选出80例病例资料完整，术前未做过任何放疗及化疗，标本经组织病理确诊为胃癌，均无心脏病及脑血管病，无合并其他系统疾病，病理资料完善。于病理科收集此80例胃癌石蜡标本，50例未被癌细胞侵及的正常胃粘膜组织切缘（距离癌组织至少大于5cm）作为对照。

### 1.1.2 整理病例资料

将收集的80例病例资料进行整理，其中男性46例，女性例34例，年龄

37～78岁，中位年龄61岁。胃癌患者临床分期按2003年国际抗癌联盟

（UICC）颁布的胃癌TNM分期标准：Ⅰ期16例，Ⅱ期16例，Ⅲ期33例，Ⅳ期15例。胃癌分化程度：高分化腺癌11例，中分化腺癌26例，低分化腺癌27例，未分化癌16例。胃癌浸润深度：T1、T2组39例，T3、T4组41

例。胃周淋巴结转移情况：发生淋巴结转移者57例，未发生淋巴结转移者

23例。

1.2试剂

二甲苯、酒精、30%过氧化氢、甲醇、PBS缓冲液、ft羊血清、苏木素、中性树胶等均有秦皇岛市第一医院病理科提供。

兔抗人HIF-1α多克隆IgG抗体（北京博奥森生物科技有限公司）

即用型兔超敏二步法免疫组化检测试剂（中衫金乔生物科技有限公

司）

即用型DAB显色试剂盒购（中衫金乔生物科技有限公司）

## 1.3 主要仪器及设备

石蜡切片机、捞片机、烤片机（德国Leica公司），37℃恒温培养箱，微波炉，4℃冰箱、光学显微镜（德国Leica公司）

# 2 实验方法与步骤

## 2.1 切片前的准备

洗涤液分别清洗载玻片和盖玻片，然后自来水、蒸馏水分别冲洗，将其烤干后浸泡入浓硫酸（载玻片8~12h，盖玻片6h）后，流水漂洗，蒸馏水冲洗后使用95％乙醇中浸泡24h，取出后码齐烤干，放入盒内备用。贴片前在载玻片上涂以APES，烤干，目的是为了避免在免疫染色过程中组织切片脱片。

## 2.2 制备石蜡切片

所选石蜡标本块由技术熟练的病理科技师常规连续切片，层厚4μm，所制的蜡片，由上述制备的载玻片捞取后，置65℃烤片机中2h，以减少脱片。

## 2.3 HE染色选片

（1）脱蜡：石蜡切片浸入二甲苯2x8min；

（2）洗去二甲苯：浸入无水乙醇2x5min；

（3）水化：95%、80%、70%乙醇各5min，自来水水洗5min

（4）苏木素染色5min，自来水水洗1min；

（5）1%的盐酸酒精分化10s，自来水水洗1min；

（6）1%的稀氨水反蓝10s，自来水洗1min；

（7）伊红染色5min，自来水洗；

（8）脱水：70%、80%乙醇脱水各5min，95%乙醇2x5min，无水乙

醇2x5min；

（9）透明：二甲苯2x10min；

（10）封片：中性树胶封片。

（11）镜下观察，选出肿瘤典型区域。

## 2.4 免疫组织化学主要溶液的配置

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 0.01PBS(PH7.2-7.4) | NaCl | 9 克 |
|  | Na2HPO4 12H2O | 6 克 |
|  | Na2H2PO4 2H2O | 0.4 克 |
| 0.3%甲醛双氧水 | 3%H202 | 3ml |
|  | 加甲醛至 | 30ml |
| 0.1M 枸橼酸盐缓冲液 | C6H5Na3O7·2H2O | 3 克 |
| （pH6.0） | C6H8O7·H2O | 0.4 克 |
| DAB 显色剂 | 双蒸水 | 1ml |
|  | A 液 | 1 滴 |
|  | B 液 | 1 滴 |
|  | C 液 | 1 滴 |

## 2.5 免疫组织化学方法步骤

将收集的石蜡标本，4μm连续切片，经脱蜡，脱二甲苯，脱水后采用非生物素兔超敏二步法免疫组织化学法检测胃癌组织及癌旁组织中HIF-1α的表达情况。一抗为兔抗人HIF-1α多克隆IgG抗体（1:100），以PBS代替一抗作为阴性对照，已知的表达阳性的组织切片作为阳性对照。

（1）取出烤片机中的切片，浸入二甲苯2x8min，无水乙醇2x5min，

95%、80%、70%乙醇中各5min，PBS洗涤3次，每次3min。

（2）去除PBS，将切片浸入枸橼酸盐缓冲液中，微波中最大火力

（98℃-100℃）加热至沸腾，冷却（约5-10min），将切片自然冷却至室温，PBS洗涤3次，每次5min；

（3）去除PBS，加入3%双氧水-甲醇溶液30min，灭活内源性过氧化氢酶0.01M PBS洗涤3min x 3次。

（4）封闭，加ft羊血清（1:10正常ft羊血清），37℃温箱孵育20min，封闭组织非特异性抗原，甩去多余液体，不做冲洗；

（5）滴加兔抗人HIF-1α多克隆IgG抗体一抗，4℃过夜，PBS洗涤3次，每次5min；

（6）去除PBS，滴加兔超敏二步法免疫组化检测试剂1（Polymer

Helper），37℃温箱孵育15min，PBS洗涤3次，每次5min。

（7）去除PBS，滴加兔超敏二步法免疫组化检测试剂2(poly-HRP anti-Rabbit IgG)，37℃温箱孵育15min，PBS洗涤3次，每次5min。

（8）去除PBS，每张切片上滴加新鲜配置的DAB显色剂，变显色边用显微镜观察，镜下控制好反应时间（2-3min），自来水冲洗终止显色。

（9）苏木素复染、脱水透明：将切片进入苏木素90s，流水冲洗5min，盐酸酒精分化20-30s，自来水反蓝5min。

（10）梯度酒精（70%，80%，90%，95%Ⅰ，95%Ⅱ，无水乙醇Ⅰ，无水乙醇Ⅱ），二甲苯透明，最后用中性树胶封片。

## 2.6 免疫组化结果分析

由两位高年资病理医师进行双盲式阅片。在显微镜100倍视野下，每张切片随机选择5个区域，高倍镜下阳性表达HIF-1α主要定位在细胞核中，呈棕黄色颗粒状。根据棕黄色阳性信号的强弱和面积来综合判定染色结果。阳性率≤5%为0分，6%-25%为1分，26%-50%为2分，51%-75%

为3分，＞75%为4分；阳性强度黄色为1分，棕黄色为2分，棕褐色为

# 3 分，将细胞阳性率与染色强度两者积分相乘，0分为阴性（-），1-4分为

弱阳性（+），5-8分为中度阳性（++），9-12分为强阳性（+++）。阳性表达率=阳性表达例数（弱阳性+中度阳性+强阳性）/总例数。

3 统计学分析

数据结果采用SSPS17.0统计软件完成，均数比较采用配对t检验，计数资料采用χ２检验，相关分析采用Spearman等级相关分析，检验水准

α=0.05，*P*<0.05提示差异有统计学意义。

**结果**

1缺蛋氧诱导因子HIF-1α蛋白在胃癌组织、正常胃粘膜组织中的表达缺氧诱导因子HIF-1α在阴性对照中无表达。阳性表达主要定位于细

胞核中，呈棕黄色颗粒，部分少数位于胞浆中。在80例胃癌组织中，HIF-1α蛋白阳性表达率为75%（60/80），其中强阳性占34例（42.5%），中度阳性占13例（16.25%），弱阳性13(16.25%)。50例正常胃粘膜组织中，HIF-1α阳性表达率为0。胃癌组织中HIF-1α蛋白的表达明显高于癌旁正常胃粘膜组织，两组间差异有显著意义（*P*<0.05）（Tab 1）。

2胃癌组织中HIF-1α表达与临床病理学的关系

80例胃癌组织中，浸润深度T3~T4组41例，HIF-1α阳性表达率为

90.2%，高于T1~T2 组（阳性表达率为59.0%），两组比较差异有统计学意义（*P*<0.05）。有淋巴结转移组57例，HIF-1α蛋白阳性表达率为87.7%，低于无淋巴结转移组（阳性表达率为43.4%），两组比较差异有统计学意义（*P*<0.05）。肿瘤大于5cm有32例，HIF-1α蛋白阳性表达率为90.1%

（29/32），明显高于肿瘤小于5cm组（阳性表达率为64.6%），两组比较差异有统计学意义（*P*<0.05）。TNM 分期中，HIF-1α 蛋白在Ⅲ、Ⅳ期组阳性表达率为91.7%（16/32），显著高于Ⅰ、Ⅱ组（阳性表达率为50.0%），两组比较差异有统计学意义（*P*<0.05）。

HIF-1α的表达在不同年龄、性别、分化程度差异无统计学意义（*P*＞

0.05）（Tab 2）。

3 SIRT3与HIF-1α相关分析

SIRT3阳性表达43例中，HIF-1α的阳性表达27例，阳性表达率62.7%

（27/43）；SIRT3阴性表达37中，HIF-1α阳性表达31例，阳性表达率

83.8%（31/37），经Spearman等级相关分析，SIRT3与HIF-1α表达呈负相关（*P*<0.05）(Tab 3)。

**附图**



Fig. 1 Expression of HIF-1αin gastric carcinoma (ISH x 200)



Fig. 2 Expression of HIF-1αin normal gastric tissue(ISH x 200)

**附表**

Tab1 The expression differences of HIF-1αprotein between Gastric Cancer(G) and Normal gastric tissue(N).

HIF-1αPositive

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Group | N | - | + | ++ | +++ | （%） |
| G | 80 | 20 | 13 | 13 | 34 | 75 |
| N | 50 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 |

χ２=69.643, *P*<0.05.

Tab2 relationship between the expression of HIF-1αand the clinic

-pathological features in gastric cancer tissue

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Clinical-athological features |  | HIF-1α |  |  |
| N |  | χ*2* | *P* |
|  | + - | |  |
| Aging |  |  | 1.111 | 0.295 |
| ≥60 | 48 | 34 | 14 |  |
| <60 | 32 | 26 | 6 |  |
| Gender |  |  | 1.705 | 0.194 |
| male | 46 | 37 | 9 |  |
| female | 34 | 23 | 11 |  |
| Diffusion status |  |  | 2.208 | 0.157 |
| Poor-Undifferentiation | 43 | 35 | 8 |  |
| well-moderate | 37 | 25 | 12 |  |
| Tumor size |  |  | 6.944 | 0.009 |
| ≥5cm | 32 | 29 | 3 |  |
| <5cm | 48 | 31 | 17 |  |
| Depth of invation |  |  | 10.423 | 0.002 |
| T1-T2 | 39 | 23 | 16 |  |
| T3-T4 | 41 | 37 | 4 |  |
| Lymph node metastasis |  |  | 17.107 | 0.000 |
| No | 23 | 10 | 13 |  |
| Yes | 57 | 50 | 17 |  |
| TNM |  |  | 17.778 | 0.000 |
| Ⅰ-Ⅱ | 32 | 16 | 16 |  |
| Ⅲ-Ⅳ | 48 | 44 | 4 |  |

Tab3 The relationship between the expression of SIRT3 and HIF-1αprotein

In gastric cancer tissues

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| SIRT3 | HIF-1α | | | |
| - | + | ++ | +++ |
| - | 6 | 3 | 7 | 21 |
| + | 2 | 3 | 5 | 10 |
| ++ | 8 | 3 | 1 | 1 |
| +++ | 4 | 4 | 0 | 2 |

R=-0.429, *p*<0.05.

**讨论**

大部分实体瘤生长过程中由于氧的供应与消耗失衡，出现缺氧[1]。缺氧可以促进肿瘤的浸润、转移及对放化疗的抗拒性[2]。HIF-1是一种介导细胞在缺氧时进行适应调节的核转录因子[3]。HIF-1是一种异源二聚体，分别由120kDa的α亚基和91～94kDa的β亚基组成，其中人HIF-1α基因位于14 号染色体（14q21～24），HIF-1α决定着HIF- 1的活性，是氧调节惟一的亚单位，HIF-1β基因则位于1号染色体（1q21），是结构单位，不参与氧的调节。HIF-1α主要存在于细胞核中，虽在胞浆中也有少量表达，但几乎不发挥作用[4]。HIF-1α对氧非常敏感，HIF-1α表达随着周围环境的氧浓度下降而增加，而且其表达增加表现转录和蛋白等水平上，但主要是后者蛋白水平的表达改变。HIF-1α 通过与血管内皮生长因子

（vascular endotheli-al growth factor, VEGF）、p53 和促红细胞生成素等下游靶基因的乏氧反应元件（hypoxia response element, HRE）结合调控肿瘤的血管生成和能量代谢[5]。既往研究表明，细胞内不断地合成HIF-1α，经过泛素-蛋白酶体系统的作用而迅速降解，于正常氧供下很难检测到HIF-1α[6]，而缺氧状态下可抑制其降解，HIF-1α大量积聚与HIF-1β结合从而形成有活性的HIF-1。但最近的研究发现，在某些恶性肿瘤，HIF-1α即使在正常供氧环境下也有表达，可能被某些致癌信号激活，比如某些癌基因(VSPC)的突变和抑癌基因(p53、VHL、PTEN)的失活[7]。HIF-1α被激活后将放大编码葡萄糖转运子和大部分糖酵解酶基因的转录信号，增加细胞进行糖酵解的容量[8]。此外HIF-1α通过激活丙酮酸脱氢酶激酶（PDK），抑制线粒体中丙酮酸脱氢酶（PDH）复合体的活性，使得进入三羧酸循环的丙酮酸生成减少[9-10]，降低细胞的氧化磷酸化水平和氧气消耗。HIF-1α可以与多种靶蛋白和基因结合双重促凋亡和抗凋亡作用。有研究发现，在缺氧状态下凋亡抑制基因bcl-2在HIF-1α正常表达的肿瘤内水平降低，且HIF-1α表达与bcl-2呈负相关，与bax呈正相关[11]。侵袭转移是恶性肿瘤的基本特性，肿瘤血管生成促进转移。低氧微环境促进肿瘤血管的生成，促进肿瘤细胞外基质（ECM）的结构改变，增强细胞运动能力，有利于肿瘤侵袭转移，研究表明HIF-1可增加MMPS的表达从而促进恶性肿瘤的转移。

有研究表明HIF-1α在多种恶性肿瘤组织中有表达，而在正常组织中无表达[7]，并发现HIF-1α可能通过激活血管生成、细胞凋亡、代谢等相

关基因对肿瘤发生、浸润、转移等发挥重要的调节作用[12-14]，并且HIF-1α的表达与预后相关。Ryan等[15]研究结果表明，HIF-1α在良性肿瘤组织中表达水平正常，在许多原发性恶性肿瘤表达增高，而在转移性肿瘤中HIF-1α 表达升高更加明显。[Imamura](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Imamura%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19030186) 研究发现体外HIF -1α 表达缺失

SW480结肠癌细胞的增长，增殖和迁移率较低，而HIF - 2a表达缺失的细胞表现出快速增长，异种移植研究发现HIF-1α缺乏整体抑制肿瘤生长，而缺乏HIF -2α刺激肿瘤的生长，因此得出结论HIF -1α促进SW480结肠癌细胞的增长[16]。WANG等[17]对1420名肺癌患者HIF -1α的表达与预后进行Meta分析，结果显示HIF -1α高表达提示预后不良。GAO等[18]运用免疫组化方法检测71例大肠癌标本HIF -1α和VEGF的表达，发现HIF -1α的阳性表达与肿瘤分期、淋巴转移及肝转移密切相关，高表达提示预后差，HIF -1α与VEGF在大肠癌组织中的表达呈正相关，提示HIF -1α在肠癌的发生过程中具有非常重要的作用，其机制可能是HIF -1α上调VEGF的蛋白表达增加大肠癌血管生成进而促进转移。韩冰等[19]研究报告显示HIF-1α在胃癌中阳性表达率为80.2%，HIF-1α在胃癌晚期、侵出浆膜及有远处转移患者中阳性表达率高，HIF-1α阳性表达患者的5年生存率为31.2%，低于HIF-1α阴性表达患者5年生存率为57.9%。

本实验结果表明，用免疫组化方法检测80例胃癌组织中HIF-1α的表达水平，其表达阳性率为75%，与癌旁组织全部阴性表达相比，差异有显著统计学意义（P<0.05）。另外本实验还提示HIF-1α在肿瘤中的表达与临床病理因素有一定关系。结果表明，高分化组HIF-1α阳性表达率为67.5%, 低于低分化、未分化组81.4%，但两组差异无统计学意义（*P*> 0.05）。HIF-1α的阳性表达与肿瘤大小有关，肿瘤直径大于5cm、小于5cm的阳性表达率分别为90.1%、64.6%，两组比较差异有统计学意义（*P*<0.05）。HIF-1α在胃癌临床分期Ⅰ/Ⅱ和Ⅲ/Ⅳ期的阳性表达率分别为50％和91.7％，差异有统计学意义（*P*<0.05）。HIF-1α随着胃癌浸润深度增加表达阳性率也明显增加，T1-T2组和T3-T4组阳性表达率分别为59%和90.2％，差异有统计学意义（*P*<0.05）；淋巴结转移组的HIF-1α表达阳性率为87.7％，显著高于淋巴结未转移组的43.4％（*P*<0.05）。本研究结果提示胃癌的进展、浸润、转移等与HIF-1α表达密切相关，HIF-1α参与胃癌恶性生物学行为调节，且可作为评估胃癌发展、转移潜在指标。

综上综述，HIF-1α在肿瘤的发展过程中发挥了重要作用，调节肿瘤

细胞能量代谢，增加糖酵解，减少肿瘤细胞凋亡，同时通过活化信号转导通路介导VEGF的表达，促进肿瘤新生血管的生成。有研究表明，SIRT3调节能量代谢和下调HIF-1α，SIRT3表达缺失或降低增加HIF-1α的稳定性[20]。在人的乳腺癌细胞中，SIRT3的表达降低或缺失，可以增加HIF-1α基因的表达，SIRT3过度表达可以抑制糖酵解和肿瘤细胞的复制[21]。在人的胃癌细胞中，SIRT3缺失表达，增加了HIF-1α表达[22]。在这项研究中，

SIRT3蛋白免疫组织化学表达阴性37例中，HIF-1α的阳性表达率为83.3%

（31/37），高于SIRT3蛋白表达阳性组（27/43）,证实了SIRT3与存在负相关，即SIRT3高表达时可以降低HIF-1α的表达，SIRT3低表达或表达缺失时使得HIF-1α稳定性增加。

## 小 **结**

HIF-1α蛋白在胃癌中有较高的阳性表达率，且表达显著高于其在正常胃粘膜组织，HIF-1α蛋白在胃癌中高表达并与多项临床病理指标相关，提示HIF-1α蛋白促进胃癌的发生发展。SIRT3蛋白与HIF-1α蛋白在胃癌中表达存在负相关，提示SIRT3表达降低或缺失增加了HIF-1α蛋白的稳定性。

参考文献

[1] Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects[J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93(4): 266–276.

[2] Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(1): 38-47.

[3] Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation[J]. [Mol Cell Biol,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1448077#%23) 1992, 12(12): 5447 - 5454.

[4] Miyazawa M, Yasuda M, Fujita M, et al. Therapeutic strategy targeting the

MTOR-HIF-1alpha-VEGF pathway in ovarian clearcell adenocarcinoma[J].

Pathol Int, 2009, 59(1):19 -27．

[5] Smith TG, Robbins PA, Ratcliffe PJ. The human side of hypoxi-a-inducible factor[J]. Br J Haematol, 2008, 141 (3): 325-334．

[6] Adams JM, Difazio LT, Rolandelli RH, et al. HIF-1: a key me-diator in hypoxia[J]. Acta Physiol Hung, 2009, 96 (1): 19-28．

[7] Zhong H, Demarzo M, Laughner E, et al. Over expression of hypoxia inducible factor 1 alpha in common human cancers and their metastases[J]. Cancer Res, 1999, 59(22): 5830-5835.

[8] Semenza, G L. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism[J]. Curr Opin Genet Dev, 2010, 20(1): 51-56.

[9] Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, et al. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption[J]. Cell Metab, 2006 (3): 187-197.

[10] Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia[J]. Cell Metab, 2006 (3): 177-185.

[11] Trisciuoglio D, Gabellim C, Desideri M, et al. Bcl-2 regulates HIF-1 alphah protein stabilization in hypoxic melanoma cells via the molecular chaperone HSP90[J]. PLOS One, 2010, 5(7): e11772.

[12] Matsumoto K, Arao T, Tanaka K, et al. mTOR signal and hypoxia

-inducible factor-1 alpha regulate CD133 expression in cancer cells [J]. Cancer Res, 2009, 69(18): 7160-7164.

[13] Lin MT, Kuo IH, Chang CC, et al. Involvement of hypoxia-inducing factor-1alpha-dependent plasminogen activator inhibitor-1 up-regulation in Cyr61/CCN1-induced gastric cancer cell invasion[J]. JBiol Chem, 2008, 283(23): 15807-15815.

[14] Xu LF, Ni JY, Sun HL, et al. Effects of hypoxia-inducible factor-1αsilencing on the proliferation of CBRH-7919 hepatoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(11): 1749-1759.

[15] Ryan HE, Poloni M, McNulty W, et al. Hypoxia -inducible factor-1 alpha is a positive factor in solid tumor growth[J]. Cancer Res, 2000, 60(15): 4010-4015.

[[16] Imamura T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Imamura%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19030186), [Kikuchi H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kikuchi%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19030186), [Herraiz MT](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Herraiz%20MT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19030186), et al. HIF-1alpha and HIF-2alpha have divergent roles in colon cancer[J]. [Int J Cancer,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=HIF-1alpha%2Band%2BHIF-2alpha%2Bhave%2Bdivergent%2Broles%2Bin%2Bcolon%2Bcancer) 2009, 124(4): 763-771. [17] [Wang Q](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wang%20Q%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24631267)1, [Hu DF](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hu%20DF%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24631267)2, [Rui Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Rui%20Y%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24631267), et al. Prognosis value of HIF-1αexpression in atients with non-small cell lung cancer[J]. [Gene,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24631267) 2014, 541(2), 69-74.

[18] Dan Cao, Mei Hou, Yong-song Guan, et al. Expression of HIF-1alpha and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications[J]. [BMC Cancer,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Expression%2Bof%2BHIF-1alpha%2Band%2BVEGF%2Bin%2Bcolorectal%2Bcancer%3A%2Bassociation%2Bwith%2Bclinical%2Boutcomes%2Band%2Bprognostic%2Bimplications) 2009, 9: 432-441.

[19] 韩冰, 徐瑞华, 史艳侠, 等. HIF-1α在胃癌组织中的表达及其临床意义[J]. 癌症2006, 25(11): 1439-1442.

[20] Bell EL, Emerling BM, Ricoult SJ, et al. SirT3 suppresses hypoxia inducible factor 1alpha and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production[J]. Oncogene, 2011, 30(26): 2986-2996.

[21] Finley LW, Carracedo A, Lee J, et al. SIRT3 Opposes Reprogramming of Cancer Cell Metabolism through HIF1alpha Destabilization[J]. Cancer cel, 2011, 19(3): 416–428.

[[22] Yang B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Yang%20B%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24287180), [Fu X](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fu%20X%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24287180), [Shao L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Shao%20L%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24287180), et al. Aberrant expression of SIRT3 is conversely correlated with the progression and prognosis of human gastriccancer[J]. [Biochem Biophys Res Commun](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24287180), 2014, 443(1): 156-160.

结**论**

[1] SIRT3蛋白在胃癌中的表达明显低于正常胃粘膜组织, 且SIRT3蛋白在胃癌中的表达水平降低或缺失与肿瘤浸润深度、淋巴转移、TNM分期相关, 提示SIRT3在胃癌的发生发展过程中所起的是抑制作用.

[2] HIF-1α蛋白在胃癌中的表达高于正常胃粘膜组织, 且HIF-1α蛋白在胃癌中的表达水平增高与肿瘤的大小、浸润深度、淋巴结转移及TNM分期相关, 提示HIF-1α蛋白高表达参与胃癌发生发展过程.

[3] SIRT3蛋白与HIF-1α蛋白在胃癌中的表达存在负相关, 提示SIRT3蛋白的表达降低或缺失增加HIF-1α蛋白的稳定性, 揭示上述指标在胃癌的浸润、转移起到一定作用, 并可作为判断浸润、转移及预后指标.

**综述**

**SIRT3与肿瘤的研究进展**

Sirtuins蛋白是一组具有NAD+依赖性的组蛋白去乙酰基转移酶，该家族多个成员具有260多个高相似度的氨基酸序列一个结构域，包括最初被发现于酵母细胞中的Sirt2 及其存在于哺乳动物中的同源类似物

SIRT1～SIRT7[1]. Sirtuin家族在细胞中分布广泛，SIRT1，6，7位于细胞核中，SIRT2位于胞浆中，SIRT3、4、5位于线粒体中。研究证实SIRT3是线粒体中最主要的去乙酰化酶，它作用于多种酶参与氧化途径的激活，通过去乙酰化调节IDH2、MnSOD等线粒体酶，调节细胞内活性氧（ROS）稳态[2、3]，调控能量代谢，并影响机体的衰老、细胞死亡和肿瘤发生。SIRT3与肿瘤的发生是近年来的研究热点，SIRT3对肿瘤发生是抑制作用还是促进作用尚存在争议。本文就SIRT3与肿瘤发生的研究现况做一总结。

SIRT3在亚细胞中的表达

SIRT3在富含线粒体组织中高表达，如骨骼肌、心肌、肝脏。SIRT3是线粒体中最有活的Sirtuin,相对于敲除SIRT4、SIRT5的小鼠，敲除SIRT3基因的小鼠比野生型小鼠线粒体中表达更多的高度乙酰化蛋白[4]。人

SIRT3有两种表达形式，一种是长约44kDa大分子形式，一个约28 kDa

小分子形式。大分子SIRT3 在线粒体基质肽酶的作用下水解生成小分子

SIRT3，后者是SIRT3的活性形式[5]。大多数研究支持SIRT3是位于线粒体中去乙酰化酶，但是还有一些研究指出SIRT3位于细胞核中。Sundaresan等提出44kDa SIRT3在细胞核、胞质及线粒体中都有表达，28 kDa SIRT3主要在线粒体中表达，在氧化应激时心肌细胞的两种形式蛋白在细胞核和线粒体中都有增高[6]。另外还有研究表明细胞核中的SIRT3在氧化应激的条件下转移到线粒体中[7-8]。尽管存在争议，SIRT3在线粒体中的重要作用是肯定的，在其他亚细胞器中的作用还有有待于进一步研究[9]。

SIRT3与肿瘤的发生

线粒体是细胞的能量工厂，是哺乳动物细胞将有机物直接氧化代谢产生ATP的场所，同时也是活性氧（ROS）的重要来源地。目前的观点认为, Sirt3可通过线粒体中乙酰化作用于ATP生成有关的酶，例如，Sirt3去乙酰化作用于乙酰辅酶A合成酶（AceCS2）使其活化，转化成乙酰辅酶

A进入细胞的物质代谢如三羧酸循环等[10-11]，调节ATP的生成。同时，在三羧酸循环的中间产物中，如异柠檬酸脱氢酶以及琥珀酸脱氢酶，也是被Sirt3去乙酰化而激活的分子，它们通过调节三羧酸循环的进程来影响产能.以上研究均说明, Sirt3调节ATP的生成过程中起着非常重要的作用。

ROS 主要由分子氧经线粒体内膜呼吸链复合体Ⅰ（NADH/biquinone

oxidoreductase）及复合体Ⅲ（ubiquinol/cytochrome coxidoreductase）传递产生[12]。正常生理条件下，机体多种抗氧化酶如MnSOD不断清除细胞内产生的ROS及自由基。SIRT3通过去乙酰化作用活化MnSOD，减少氧化应激所致的细胞损伤，使ROS在不断产生及清除中保持氧化-还原系统稳定。

Kim等指出体外SIRT3缺陷的小鼠胚胎成纤维细胞（MEFs）表现异常的线粒体活性如增加超氧化物水平及基因组的不稳定性，易被某一致癌基因感染[14]。Bell EL等研究表明过度表达的SIRT3能够降低ROS水平，使HIF-1蛋白在缺氧的条件下的稳定性降低，减弱HIF-1的转录活性，抑制肿瘤的发生[15]。恶性肿瘤细胞即使在氧气充足的条件下，也能消耗的葡萄糖，产生大量的乳酸和ATP，这种利用葡萄糖进行有氧糖酵解的现象被称为Warburg效应。Finley等指出SIRT3是Warburg effect重要调节因子，乳腺癌组织中SIRT3表达量降低，与HIF-1α稳定性增高相关[16]。HIF-1是缺氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内产生的一种异源二聚体转录因子，其中HIF-1α是唯一的氧调节亚单位[17]，其靶基因涉及肿瘤细胞能量代谢、血管生成和肿瘤转移等。SIRT3抑制ROS、HIF1-α及其靶基因在食管癌、结肠癌中也有相关报道。SIRT3作为肿瘤抑制因子在肺癌[18]、肝癌[19-20]等也有相关研究。据报道，肺癌组织SIRT3蛋白的表达明显低于对应癌旁组织，转染SIRT3肺癌细胞株提高了Bax/Bcl和bad/bcl-x/L的比率，促进AIF向细胞核中的迁移，并且过度表达SIRT3肿瘤细胞上调了p53和p21[18]. Zhang等通过免疫组化及Western杂交证明SIRT3在肝癌组织中的表达明显低于在正常组织和癌旁组织，SIRT3表达与分化程度及门静脉癌栓有关[19]。还有报道称SIRT3 低表达为肝癌独立预后不良因子[20]。

Sundaresan发现DNA修复因子Ku70为SIRT3的靶蛋白，SIRT3将Ku70去乙酰化，促使Ku70与前凋亡蛋白Bax相互作用，使Bax移位到线粒体中启动细胞凋亡[21]。因此我们可以推测低表达SIRT3的肿瘤组织，Bax与Ku70结合处于非活性状态，从而抑制肿瘤细胞的凋亡。此外，SIRT3 可以抑制ERK1/2 信号通路，亦或增强Akt 和JNK通路，还可以通过降低

Mdm2的表达和降低P53的降解上调P53蛋白水平等来抑制肿瘤的发生

[22]。

SIRT3作为肿瘤抑制因子通过参与多种细胞信号传导途径抑制肿瘤，然而，在另外的一些研究发现SIRT3 与肿瘤的发生却有着相反的作用。

Chen等研究发现SIRT3在不同口腔鳞癌细胞株中的表达高于正常口腔细胞，在口腔鳞癌组织中也得到相同的结果，然而，口腔鳞癌细胞中的SIRT3活性却低于正常细胞，继续研究发现SIRT3的V208I点突变导致了SIRT3酶活性的降低，由此得出结论SIRT3基因点突变导致SIRT3活性降低，从而影响了口腔鳞癌氧化还原平衡[23]。另外SIRT3在膀胱癌、纤维肉瘤也有表达增高。Ashraf等在乳腺癌中也有不同的发现，SIRT3在淋巴结转移的乳腺癌组织中表达增高。[Zhao等](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhao%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23871415)指出SIRT3高表达食管癌患者5年生存期低于SIRT3低表达的[24]。以上研究结果表明SIRT3对于某些肿瘤的发生有促进作用，其作用机制还不是很明确。

总 结

SIRT3作为一种新的肿瘤标记物，是通过多种途径参与肿瘤的发生和发展，在不同类型的肿瘤细胞，组织或不同的肿瘤微环境中的表达和功能都不相同。此外SIRT3还与多种肿瘤预后相关。因此研究SIRT3在肿瘤发生过程的作用机制，深入了解其在不同类型恶性中的作用，将会为肿瘤个体化治疗提供新的思路和方法。

参考文献

[1] NorthBJ, Verdin E. Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. [Genome Biol [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sir2-related%2BNAD-dependent%2Bprotein%2Bdeacetylases) [Genome Biol,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=North%2B%2BBJ%2C%2BVerdin%2BE.%2BSirtuins%3A%2BSir2-related%2BNAD-dependent%2Bprotein%2Bdeacetylases.%2BGenome%2BBiol%2B%5bJ%5d) 2004; 5(5): 224.

[2] Kim HS, Patel K, Muldoon-Jacobs K, et al. SIRT3 is amitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolismduring stress[J]. Cancer Cell, 2010, 17(1): 41-52.

[3] Someya S, Yu W, Hallows WC, et al. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction [J]. Cell, 2010, 143(5): 802-812.

[4] Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, et al. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(24): 8807–8814.

[5] Schwer B, North BJ, Frye RA, et al. The human silent information regulator (Sir) 2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase[J]. J Cell Biol, 2002, 158(4): 647–657.

[6] Sundaresan NR, Samant SA, Pillai VB, et al. SIRT3 is a stress responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku-70[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(20): 6384–6401.

[7] Scher MB, Vaquero A, Reinberg D. SirT3 is a nuclear NAD+-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress[J]. Genes Dev, 2007, 21(8): 920–928.

[8] Nakamura Y, Ogura M, Tanaka D, et al. Localization of mouse mitochon-drial SIRT proteins: shift of SIRT3 to nucleus by co-expression with SIRT5[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 366(1): 174–179.

[9] Hallows WC, Albaugh BN, Denu JM. Where in the cell is SIRT3? --functional localization of an NAD+-dependent protein deacetylase[J]. Biochem J, 2008, 411(2): e11–13.

[10] Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, et al. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation[J]. Mol CellBiol. 2007, 27 (24): 8807-8814.

[11] Hallows WC, Lee S, Denu JM. Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006,

103(27): 10230-12305.

[12] Fleury C, Mignotte B, [Vayssière JL](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Vayssi%E7%8C%ABre%20JL%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12022944). Mitochondrial reactive oxygen species in cell deathsignaling[J]. Biochimie, 2002, 84(2-3): 131-141.

[13] Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(5): 278-286.

[14] Kim HS, Patel K, Muldoon-Jacobs K, et al. SIRT3 Is a Mitochondria- Localized Tumor Suppressor Required for Maintenance of Mitochondrial Integrity and Metabolism during Stress[J]. Cancer cell, 2010, 17(1): 41–52.

[15] Bell EL, Emerling BM, Ricoult SJ, et al. SirT3 suppresses hypoxia inducible factor 1alpha and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production[J]. Oncogene, 2011, 30(26): 2986–2996.

[[16] Finley LW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Finley%20LW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21397863), [Carracedo A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Carracedo%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21397863), [Lee J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lee%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21397863), et al. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF-1αdestabilization[J]. [Cancer Cell](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Warburg%2Beffect%2B%2BSIRT3%2B2011), 2011, 19(3): 416-428.

[17] Song IS, Wang AG, Yoon SY, et a1. Regulation of glucose metabolism-related genes and VEGF by HIF-1 alpha and HIF-1 beta, but not HIF-2 alpha, in gastric cancer[J]. Exp Mol Med, 2009, 41(1): 51-58.

[18] Xiao K, Jiang J, Wang W, et al. Sirt3 is a tumor suppressor in lung adenocarcinoma cells[J]. [Oncol Rep,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23842789) 2013 (3): 1323-1328.

[[19] Zhang B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhang%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23790338), [Qin L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Qin%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23790338), [Zhou CJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhou%20CJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23790338), et a1. SIRT3 expression in hepatocellular carcinoma and its impact on proliferation and invasion of hepatoma cells[J]. [Asian Pac J Trop Med](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23790338#%23), 2013, 6(8): 649-652.

[[20] Zhang YY](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhang%20YY%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22609775), [Zhou LM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhou%20LM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22609775). Low SIRT3 expression correlates with poor diffe- rentiation and unfavorable prognosis in primary hepatocellular carcinoma [J]. [PLoS One,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23272146#%23) 2012, 7(12): e51703.

[[21] Sundaresan NR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sundaresan%20NR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18710944), [Samant SA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Samant%20SA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18710944), [Pillai VB](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pillai%20VB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18710944), et al. SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70[J]. [Mol Cell Biol,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18710944) 2008, 28(20): 6384-6401.

[[22] Zhang YY](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhang%20YY%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22609775), [Zhou LM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhou%20LM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22609775). Sirt3 inhibits hepatocellular carcinoma cell growth through reducing Mdm2-mediated p53 degradation[J]. [Biochem Biophys Res Commun,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22609775) 2012, 423(1): 26-31.

[[23] Chen IC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chen%20IC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23800187), [Chiang WF](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chiang%20WF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23800187), [Liu SY](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Liu%20SY%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23800187), et al. Role of SIRT3 in the regulation of

Redox balance during oral carcinogenesis[J]. [Mol Cancer,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Role%2Bof%2BSIRT3%2Bin%2Bthe%2Bregulation%2Bof%2Bredox%2Bbalance%2Bduring%2Boral%2Bcarcinogenesis) 2013,12:68.

[[24] Zhao Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhao%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23871415), [Yang H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Yang%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23871415), [Wang X](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wang%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23871415), et al. Sirtuin-3 (SIRT3) expression is associated with overall survival in esophageal cancer[J]. [Ann Diagn Pathol](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=cancer%2B%2B%2Bsirt3%2B%2Bzhao), 2013, 17(6): 483-485.

致**谢**

光阴荏苒，三年的研究生的学习生活将随着这篇论文答辩而结束。经历一年多时间的磨砺，硕士毕业论文终于完稿，回首这一年多来收集标本、整理资料、查阅文献、实验操作及撰写、修改论文直至最终完成的过程，我得到了许多的关怀和帮助，在这里，向所有帮助过我的老师和同学表达我最诚挚的谢意。

首先，我要感谢我敬爱的导师—高立明主任医师。在三年的研究生生涯中，幸运得到高老师的指导，师恩如水，永记于心。在选题及研究过程中都得到高老师的悉心指导；在研究工作中，又为我指点迷津，帮助我开拓研究思路，精心点拨、热忱鼓励。高老师刻苦敬业的专业精神，严谨求实的治学作风、诲人不倦的良师风范，不仅授我以知识，而且教我做人，他循循善诱的教导和不拘一格的思路给予我无尽的启迪。虽历时三载，却给以终生受益无穷之道，在此，特向我的导师高立明致以诚挚的谢意和崇高的敬意。

衷心感谢肿瘤科付占昭主任医师及全体老师在临床实践中给予我的指导和帮助。

衷心感谢燕ft大学生物医学工程系医学彭勇教授给予的悉心指导和帮助。

衷心感谢中心实验室齐曦明博士在实验方面给予对我的指导和帮助。感谢病理科张辉主任医师、赵敏博士及全体老师在临床病理诊断及病理技术方面给予我的指导和帮助。感谢普外科王益民教授及周文阔主任医师、郑文友主任医师、李高岩主任医师和手术室高雪梅老师及全体老师在我收集标本的过程中给予我的指导和大力支持。

衷心感谢秦皇岛市第一医院科教科谢永红科长及所有老师对我学习、生活等各方面提供了大量的支持与帮助！

衷心感谢承德医学院研究生部乔跃兵处长、李德臣老师、张晓英老师、景文莉老师给予我的指导和帮助。

衷心感谢我的师兄郑磊、师妹徐红梅在实验中给予我的鼓励与帮助。感谢我的家人对我的支持和鼓励，你们的支持是我最坚实的依靠！再次衷心感谢所有帮助过我的老师、学友、朋友们！

**个人简历**

**一、本人概况：**

姓名康丽影性别女民族汉

出生日期1984年04月26日籍贯河北省廊坊市

**二、个人经历**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 学习经历： |  | |
| 2005、9～2008、6 | 承德医学院 | 专科 |
| 2011、9～2014、6 | 承德医学院 | 硕士研究生 |
| 社会实践经历： |  |  |
| 2007、6～2008、6 | 承德县医院 | 实习 |
| 2008、9～2011、6 | 燕郊冶金医院 | 工作 |
| 2012、6～至今 | 秦皇岛市第一医院 | 实习 |

**三、发表论文情况：**

1重组人血管内皮抑制素注射液联合顺铂胸腔灌注恶性胸腔积液的临床观察.临床荟萃, 2013, 28（12）: 1371-1373.

2洛铂抑制胃癌SGC-7901细胞增殖及其机制的初步研究.军事医学杂志,2013, 37（8）: 609-611.

**四、承担或主研课题情况**

参与吴阶平基金，基金名称：晚期结直肠癌跨线化疗联合抗血管生成药物的临床疗效及相关因子研究。