DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.04.021
第25卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 4
324 2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)04-0324-03

一条新肺腺癌多药耐药细胞cDNA片段在胃癌中表达的研究

李昆霖,吴国明,黄桂君,钱桂生,陈 杰 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 我们在前期工作中通过抑制消减杂交技术(Suppression subtractive hybridization, SSH)在肺腺癌细胞中发现了1条新的耐药相关基因片段。本研究主要探讨该片段在胃癌及癌旁正常组织中的表达情况。方法 利用随机引物法将新片段用地高辛标记为探针,通过组织原位杂交技术(*In situ* hybridization histochemistry, ISHH)检测其在胃癌及癌旁正常组织中的表达情况。结果 该片段在大多数(12/16例)胃腺癌组织中有表达,在癌旁正常组织中没有表达,二者之间相差非常显著($P<0.01$),而印戒细胞癌组织中无该片段表达,与腺癌相比较相差非常显著($P<0.01$)。结论 在大多数被检测的胃腺癌组织中有该片段的表达;该片段可能是一些肿瘤组织本身所具有的,即内源性表达的基因片段。

关键词:胃癌;组织原位杂交技术;多药耐药
中图法分类号:R394.2;R735.202 文献标识码:A

Expression of cDNA fragment of drug resistance-related gene of human lung adenocarcinoma in gastric cancer

LI Kun-lin, WU Guo-ming, HUANG Gui-jun, QIAN Gui-sheng, CHEN Jie (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the expression of the drug resistance-related gene fragment found in our previous studies by the suppression subtractive hybridization (SSH) in the gastric cancer and normal tissues. Methods The expression was detected by *in situ* hybridization histochemistry (ISHH) using labeled digoxigenin probes in the gastric cancer and normal tissues. Results Expression of the gene fragment was found in most of the gastric adenocarcinoma tissues detected, but not in other gastric adenocarcinoma, normal tissues and signet-ring cell carcinoma tissues. There was significant difference between gastric adenocarcinoma tissues and normal tissues ($P<0.01$), and it was the same case with gastric adenocarcinoma tissues and signet-ring cell carcinoma tissues ($P<0.01$). Conclusion The fragment is expressed in most of the adenocarcinoma tissues. It may be an endogenetic gene fragment.

Key words: gastric cancer; *in situ* hybridization histochemistry (ISHH); multidrug resistance

胃癌是临床中最常见的肿瘤之一,其治疗的关键是早期发现、早期诊断、早期治疗,但大多数病人被确诊时已是中晚期,失去了手术的最佳时期,故化疗在胃癌的治疗中发挥着重要作用。目前,化疗单药有效率仅为20%~30%,两年内复发和转移率达60%,预后差[1]。这种现象的出现可能与多药耐药(Multidrug resistance, MDR)有关。MDR的形成机制复杂。肿瘤可通过不同途径导致MDR的产生。同时,单个MDR细胞可同时存在多种抗药的机制。国内外学者对肿瘤MDR的发生机制进行了深入的研究,提出了许多耐药机制,但它们均不能完全解释MDR,故认为还可能有其它新基因存在。我们运用原位杂交组织化学技术(*In situ* hybridization histochemistry, ISHH)检测一条新的肺腺癌多药耐药细胞特异表达的cDNA片段在胃癌组织中的表达情况。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

本实验所用地高辛标记试剂盒、Anti-Dig-AP、BCIP/NBT均为罗氏公司产品;原位杂交液购自武汉博士德公司;EcoRI酶为华美公司产品;琼脂糖为上海生物工程有限公司产品;V型电泳槽购自北京东方特立科贸中心。

1.2 标本的采集与保存

共采集胃癌标本20例,每例标本包括癌组织及癌旁正常组织,均经术后病理学确诊,其中胃腺癌16例,印戒细胞癌4例,所有患者术前均未进行化疗,标本切取后立即放入液氮中

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270591);重庆市卫生局医学科研资助项目(2001)
作者简介:李昆霖(1973-),男,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事肿瘤多药耐药基因方面的研究。电话:(023)68755320
通信作者:吴国明,E-mail:guoming Wu@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2002-09-19;修回日期:2002-12-13

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

保存, 其中胃腺癌 16 例, 印戒细胞癌 4 例。

1.3　cDNA 探针的制备

在前期工作中我们已测出该 cDNA 片段的序列为 ACACCA AAAATTAAAAAATGAAATTAAATTAAAAAATGAAATGGTTACCAAG GTAATGCAGGTCAGGGGATCAAAGGTGAAGGGACACACATTATTA AAAAGAAATCCAAAAGGACGGCTGCATCATGATTCTTCTCATTAGT GTTCCAGCGGTGCCTCTCTTTTGGTAAACTTGAACATTTCGGCAGAC ATTGGCAAGCAGCTTTTTCGGTAAAAAGATTTTTACATGACTATTGC TGTTCCCATGATCATCTTCCGGCTTGTTTTCGGCAGCCATTTCCCCT CCGCGCGCCACATCCTCCTCCTCCTCGCGACCGGGACCCGAGCGGG CGCCTCGT[2]。

1.3.1　cDNA 片段的制备　　该 cDNA 片段为 337bp, 我们已将该 cDNA 片段插入到质粒(载体为 pT-Adv)中, 在本实验中先通过细菌培养对质粒进行大量扩增, 再通过碱裂解法大量提取质粒。然后用 EcoRI 酶进行酶切(18 h), 经凝胶电泳证实为所需 cDNA 片段后, 以排梳上样进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 长波紫外灯下切下含有目的片段的凝胶, 用 V 型电泳槽回收目的 cDNA 片段, V 型电泳槽回收 cDNA 片段操作按文献[3] 进行。

1.3.2　cDNA 探针的标记　　通过随机引物法用地高辛将该 cDNA 片段标记为探针(方法按试剂盒说明书进行)。

1.4　组织原位杂交步骤

组织原位杂交步骤[4]: ①冰冻切片; ②切片固定; ③依次进行 0.3% TritonX-100/PBS 漂洗、蛋白酶 K 消化、4% 多聚甲醛漂洗、PBS 漂洗、0.1 mol/L Tris-HCl 漂洗、SSC 漂洗; ④按 10μl 探针 / 切片于 45℃保温 20~24 h 进行杂交; ⑤用 SSC 进行梯度漂洗; ⑥加入 Anti-Dig-AP, 于 40℃反应 20~24 h; ⑦用 BCIP/NBT 显色, 于室温 3 h; ⑧裱片, 脱水, DPX 封片; ⑨显微镜下观察。

1.5　组织原位杂交结果的判断

在细胞质中出现蓝紫色颗粒为反应阳性。

1.6　统计学处理

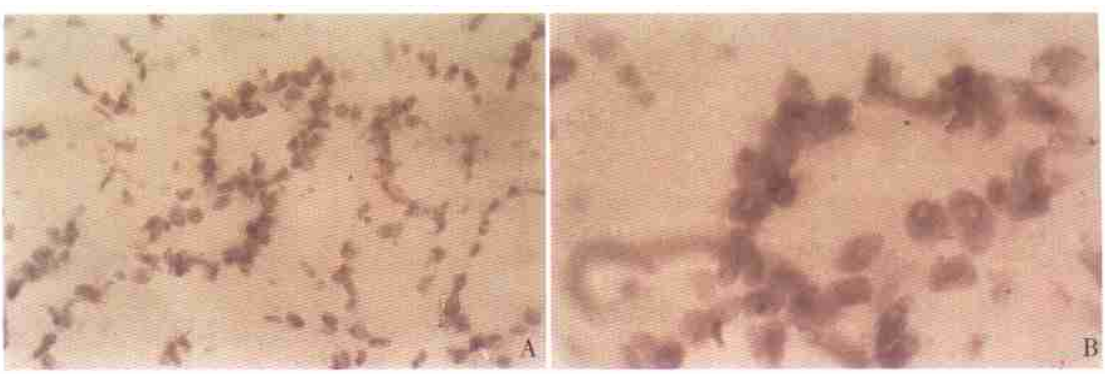
应用 SPSS10.0 软件进行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　限制性内切酶酶切结果

琼脂糖凝胶电泳显示在约 350 bp 处有一明显条带, 为目的的 cDNA 片段。

2.2　组织原位杂交结果, 见表 1 及图 1



A: BCIP/NBT× 200; B: BCIP/NBT× 100

图 1　胃癌组织原位杂交阳性结果

Fig 1　Positive result of ISSH in gastric adenocarcinoma

表 1　胃癌及其癌旁组织组织原位杂交结果

Tab 1　Results of ISSH in gastric cancer and normal tissue

	Positive	Negative
Tissues of gastric adenocarcinoma *# (16)	12(75%)	4(25%)
Gastric normal tissues (16)	0 (0%)	16(100%)
Tissues of gastric signet-ring cell carcinoma (4)	0 (0%)	4(100%)
Gastric normal tissues (4)	0 (0%)	4(100%)

*: $P<0.01$ *vs* Gastric normal tissues; #: $P<0.01$ *vs* Gastric signet-ring cell carcinoma

3　讨论

肿瘤多药耐药(Multidrug resistance, MDR)是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物产生抗药性的同时, 对结构和作用机制不同的抗肿瘤药物产生交叉耐药性[5]。MDR 按其产生的途径不同分为先天性与获得性两种, 肿瘤对化疗的先天耐药及获得性耐药是导致化疗失败的重要原因[6,7]。本实验中所用的 cDNA 片段为通过 SSH 从肺腺癌多药耐药细胞 SPC-A-1/CDDP 中获得的特异表达基因片段, 经 Northern blot 证实这条 cDNA 片段均来自于 SPC-A-1/CDDP, 在 Genbank 中未找到相似序列, 可能为新的耐药相关基因的片段[2]。组织原位杂交技术主要是检测细胞内的核酸片段, 它保持了细胞的形态结构和组织的立体构型, 适合于核酸定位和分布研究。在本实验中所用的探针为 cDNA 探针, 它检测的是细胞质中 mRNA 的表达, 图 1 显示在细胞的胞质中有蓝紫色信号表达, 而在胞核中无表达。实验结果表明: 该片段在大多数(12/16 例)所检测的胃腺癌组织中有表达(占 75%), 在癌旁正常组织及少数胃腺癌组织(4/16 例)中没有表达, 二者之间相差非常显著($P<0.01$), 说明该片段可能在大多数腺癌组织中

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

有表达,但并不是每例腺癌组织均表达该片段;而印戒细胞癌组织中无该片段表达,与腺癌相比较相差非常显著($P<0.01$)。结合患者在手术前均未进行化疗,我们推断该基因片段可能不是由药物诱导所产生的,而是一些肿瘤组织本身所具有的,即该片段可能是内源性表达的基因片段。出现这种情况,分析其原因可能为:从这条 cDNA 片段的来源看,它是起源于肺腺癌细胞,而胃癌中腺癌多见,二者之间具有一定的同源性,因此,该 cDNA 片段在胃腺癌组织中可能也有表达。其他几例胃腺癌组织中没有该 cDNA 片段的表达,其原因可能为:①同一种癌组织之间也存在一定的差异性,故有些腺癌组织中可能并不一定有该 cDNA 片段的表达;②该 cDNA 片段的表达量较少,用组织原位杂交技术检测不到,如用一些更灵敏的技术如 Northern blot 等可能能检测到。同时,该 cDNA 片段在癌旁正常组织及印戒细胞癌组织中无表达,说明该 cDNA 片段可能只在腺癌细胞中表达。

组织原位杂交技术的最大优点是它的高度特异性,可检测组织、培养的单个细胞或细胞提取物中的核苷酸含量。但 ISHH 也有一定的局限性,即影响 ISHH 实验结果的因素较多,比如取材后未及时冷冻可由于组织中 mRNA 的降解而导致假阴性结果。因此,我们拟用 Northern blot 技术进行确认。同时通过 RACEH 或末端扩增法来获取其全长基因序列,并对其编码的蛋白质功能进行研究,以进一步确认其是否为有用的新的耐药相关基因。

参考文献:

[1] 潘启超,胥 彬. 肿瘤药理学与化学治疗学[M]. 郑州:河南医科大学出版社,2000. 602-603.

[2] 陈 杰,钱桂生,黄桂君,等. 肺腺癌多药耐药细胞特异表达基因的克隆与鉴定[J]. 癌症,2001,20(4):348-353.

[3] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京:高等教育出版社,1993. 128-129.

[4] 蔡文琴,王伯沄. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都:四川科学技术出版社,1997. 417-418.

[5] Fojo A T, Ueda K, Slamon D J, *et al*. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 84(1): 265-269.

[6] Damian D, Michelutti A, Michieli M, *et al*. P-glycoprotein, lung resistance-related protein and multidrug resistance-associated protein in de novo adult actue lymphoblastic leukaemia[J]. Br J Haematol, 2002, 116(3): 519-527.

[7] Beck J F, Bohnet B, Brugger D, *et al*. Expression analysis of protein kinase C isozymes and multidrug resistance associated genes in ovarian cancer cells[J]. Anticancer Res, 1998, 18(2A): 701-705.

(编辑 王 红)

(上接 321 页)

3 典型病例

患者,男性,79 岁,因上腹痛 2 个月,加重伴黑便 1 周于 1998 年 1 月入院。患者有饥饿痛,进食可缓解,伴反酸、嗳气、胸部胀闷等症状。胃镜检查见食道 34~36 cm 处前壁有 2 cm×1 cm 肿块,中央溃烂,污苔。25 cm 处前壁直径 0.7 cm 斑块样隆起。两处活检均为食管鳞状细胞癌Ⅰ级。十二指肠球部后壁直径 1.0 cm 溃疡,周围粘膜充血肿胀。患者全身情况差,并有肺心病,肺部感染。虽经积极治疗,但患者溃疡反复出血,1 个月后因全身衰竭死亡。

患者,男性,65 岁,因进食梗阻 2 个月,加重 20 d 于 2000 年 4 月来我院。患者病初进干食有梗阻感,伴轻微胸骨后胀闷不适。其后症状加重,进半流质也有咽下困难。胃镜检查示:食管 30~35 cm 处有 5 cm×4 cm 肿块,中央溃烂,黄绿色苔,周围粘膜隆起,充血糜烂,食管腔明显狭窄;十二指肠降段两处浅溃疡,薄白苔,可见粘膜集中现象。在我院胸外科做"食管下段癌切除,胃胸腔内吻合术",术后恢复较好。

4 讨论

本研究资料显示,十二指肠溃疡中合并食管癌仅占 0.13%,确实十分少见。十二指肠溃疡多发于青年,食管癌多见于中老年,发病年龄差别可能是原因之一。另具作者统计,1 423例食管鳞癌患者中,因食管癌性狭窄、胃镜未能进入胃内、不能肯定有无溃疡的病例 413 例,占食管癌病人总数的 29%,这也许是食管癌合并十二指肠溃疡少见的又一因素。

本研究 8 例病例提示我们对年龄大、病史长,尤其是短期症状改变的十二指肠溃疡患者,应警惕癌变的可能性,应作全面的内镜检查;在发现食管癌后应对胃、十二指肠全面检查,以防漏诊;在发现十二指肠溃疡后,也不能忽视对胃和食道的全面检查,重视对可疑病灶的活检,以提高诊断率。尽管食管癌患者极少合并十二指肠溃疡,但有报道 3 例合并消化性溃疡的食管癌患者,2 例最终死于溃疡出血[1]。本研究例 1 的死亡也与溃疡出血有关。还有学者报道[2],在接受胃肠外高营养和放射治疗的 8 名患者中,有 2 名在尸检中发现有穿孔性溃疡,这也许提示食管鳞状细胞癌合并消化性溃疡预后不良。

在临床工作中,对可疑合并溃疡的食管癌患者,应及时作胃镜检查或上消化道钡餐检查,对合并溃疡者,在治疗食管癌的同时应积极进行抗溃疡治疗,以有效延长患者生存期。目前我们还不清楚十二指肠溃疡与食管癌之间有无内在的、必然的、相关的或相斥的联系,这有待于作进一步的分析。

关键词:十二指肠溃疡;食管癌
中图法分类号:R573.1;R735.1 文献标识码:B

参考文献:

[1] Moses F M, Wong R K H, Peura D A, *et al*. Squamous cell carcinoma of the esophagus associated with peptic duodenal ulcer[J]. Am J Gastroenterol, 1983, 78(11): 712-714.

[2] Hansson L E, Nyre O, Hsing A W, *et al*. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease[J]. N Engl J Med, 1996, 335(4): 242-249.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net