DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.007
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
1018 2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)09-1018-03

胃癌前组织和胃癌中Fas基因表达及其与细胞凋亡的关系

刘海峰,刘为纹,房殿春 (第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨胃癌前组织及胃癌中Fas基因表达状况及其与细胞凋亡的关系。方法 应用原位杂交和免疫组织化学技术检测10例正常胃粘膜、72例慢性胃炎和53例胃癌中Fas基因的表达,并采用凋亡细胞原位检测方法对组织切片中的凋亡细胞进行观察和比较。结果 正常胃粘膜无Fas基因表达。Fas mRNA在肠化生组织中的表达率为75.00%,显著高于萎缩性胃炎(37.50%,$P<0.01$)和胃癌(52.83%,$P<0.05$)。Fas蛋白在肠化生组织中的表达率为80.56%,显著高于萎缩性胃炎(37.50%,$P<0.01$)、异型增生(55.00%,$P<0.05$)和胃癌(45.28%,$P<0.01$)。χ^2检验表明两种方法检测阳性率差异无显著性。凋亡细胞原位检测结果显示,Fas蛋白表达阳性萎缩性胃炎、肠化生和胃癌组织中的凋亡细胞指数显著高于Fas蛋白阴性组($P<0.05$及$P<0.01$),Fas蛋白表达状态与细胞凋亡指数呈正相关($r=0.393$,$P<0.01$)。结论 Fas基因对胃癌前组织及胃癌细胞凋亡具有促进性调控作用,细胞凋亡调控异常在胃癌发病中可能起重要作用。

关键词:胃肿瘤;癌前病变;基因表达;细胞凋亡
中图法分类号:R329.28;R394.2;R735.2 文献标识码:A

Fas gene expression and its relationship with apoptosis in human gastric carcinoma and precancerous lesions

LIU Hai-feng, LIU Wei-wen, FANG Dian-chun (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the relationship between Fas gene expression and the frequency of apoptosis in different stages of malignant transformation of gastric epithelium in precancerous lesions and gastric carcinomas. **Methods** *In situ* hybridization and immunohistochemical methods were used to study the frequencies of expression of Fas gene in 10 cases of normal gastric mucosa, 72 chronic gastritis and 53 gastric carcinoma. Meanwhile, *in situ* apoptotic cell detection was adopted to detect the apoptotic cells in these lesions, and the number of apoptotic cells was compared with the Fas gene expression in each case. **Results** Fas gene didn't express in normal gastric mucosa. *In situ* hybridization revealed that the positive frequency of Fas gene expression in intestinal metaplasia was significantly higher than that in atrophic gastritis and gastric carcinoma ($P<0.01$ and $P<0.05$), and the expression rate at the protein level of Fas gene products as detected by immunohistochemical method in intestinal metaplasia was significantly higher than that in atrophic gastritis, gastric dysplasia and gastric carcinoma ($P<0.01$ and $P<0.05$). There was no significant difference between the positive rates obtained by these 2 methods. Comparing the Fas expression and apoptotic cell number in these specimens, the apoptotic index in Fas expression positive group was higher than that in Fas negative group ($P<0.01$). **Conclusion** Results suggest that Fas gene can promote apoptosis in gastric carcinoma and its precancerous lesions. The abnormal regulation of apoptosis may play an important role in the pathogenesis of gastric carcinoma.

Key words: stomach neoplasma; precancerous lesion; gene expression; apoptosis

为探讨细胞凋亡相关基因Fas在胃癌发病中的作用,我们应用原位杂交和免疫组织化学染色技术从核酸转录、蛋白表达两个水平对不同胃粘膜病变中的Fas基因表达状况进行检测,并应用细胞凋亡原位检测方法对不同胃粘膜病变中细胞的凋亡情况进行观察,探讨其与Fas蛋白表达之间可能的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

收集我院1994—1996年胃镜活检标本和胃癌手术切除标本共135例。其中正常胃粘膜10例,慢性胃炎伴萎缩者16例,伴肠化生者36例,伴中、重度异型增生者20例,胃癌53例。胃镜活检标本均取自胃窦部,53例胃癌均为胃远端癌。胃癌患者在手术前均未接受化疗、放疗或免疫治疗。组织标本经100 ml/L福尔马林固定,石蜡包埋,4 μm厚连续切片,并经HE染色病理诊断证实。兔抗人Fas多克隆抗体购自Santa Cruz公司;S-P免疫染色试剂盒购于福建迈新生物工程公司;地高辛标记及检测试剂盒以及细胞凋亡原位检测试剂盒均为Boehringer Mannheim公司产品。Fas寡核苷酸探针由中科院上海生物工程研究中心合成。探针序列为:5′-CTGTTTCAGGATTTAAGGTTG-GAGATT-3′。探针标记按试剂盒说明进行,探针标记后分别作探针显色灵敏度及杂交灵敏度检测。

1.2 方法

1.2.1 原位杂交 参照Polak等[1]的方法加以改进。所用载玻片和盖玻片经认真清洗,高压消毒,载玻片上涂多聚赖氨酸(1 g/L),室温干燥,石蜡组织直接贴于载玻片上,65 ℃烤片3 h,二甲苯脱蜡,乙醇逐级入水后,用浓度为100 mg/L的蛋白酶K消化,37 ℃ 20 min;4 ml/L多聚甲醛后固定5 min,依次用2×SSC、三蒸水处理后,乙醇逐级脱水;滴加预杂交液(500 ml/L甲酰胺;6×SSC,5 ml/L SDS,5×Danhardt溶液:聚乙烯吡咯烷酮1 g/L,牛血清白蛋白1 g/L,水溶性聚蔗糖-400 1 g/L,200 mg/L

基金项目:全军"九五"医药卫生重点课题资助项目(96Z047);重庆市应用基础研究基金资助项目
作者简介:刘海峰(1965—),男,河北省景县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事胃癌及胃癌前病变的基础与临床研究,发表论文46篇。电话:(023)65318301—73055
收稿日期:2001-05-30;修回日期:2001-08-30

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

ssDNA), 42 ℃预杂交 2 h, 吸弃载玻片上预杂交液, 每片滴加 50 μl 杂交液, 置于湿盒中 42 ℃杂交过夜。杂交后按下述程序严格冲洗: 0.1 ml/L SDS 2× SSC 42 ℃ 10 min 2 次, 500 ml/L 甲酰胺2× SSC 室温 10 min 2 次, 500 ml/L 甲酰胺 0.5× SSC 室温 10 min 2 次, 0.2× SSC 室温 5 min 1 次, 0.1× SSC 室温 2 min 1 次。然后按试剂盒说明进行显色, 结果满意后水洗终止, 封片。除阳性对照外, 设无探针阴性对照及 RNase 处理后的阴性对照。

1.2.2　免疫组化染色　　染色程序按 S-P 法操作常规进行, 第一抗体原液按 1∶100 稀释。设立阳性对照、空白对照和替代对照。光镜下观察免疫组化染色切片的显色反应, 计数 500 个细胞中的阳性细胞数, Fas 抗原表达阳性细胞数≥10%判为阳性, <10%判为阴性。

1.2.3　凋亡细胞原位检测(TUNEL 染色)　　石蜡切片脱蜡, 逐级入水, 蛋白酶 K(20 mg/L) 37 ℃消化 20 min, PBS(pH 7.4)洗 5 min, 3 次; 滴加 TUNEL 反应液 37 ℃孵育 1 h, PBS 洗 5 min, 3 次; 滴加抗荧光素抗体-过氧化物酶联结物 37 ℃ 30 min, PBS 洗 5 min, 3 次; DAB 显色, 苏木素复染, 封片。阴性对照设以 PBS 替代 TUNEL 反应液的空白对照, 阳性对照切片经 DNaseⅠ预处理 10 min, 再接上述染色步骤。

1.2.4　统计学处理　　采用 χ^2 检验、t 检验和相关分析。

2　结果

原位杂交阳性信号为紫蓝色或棕蓝色颗粒, 在不同胃粘膜病变中呈片状或灶状分布, 主要集中在胞浆内, 见图 1, 2。免疫组化阳性信号呈棕黄色颗粒, 位于细胞浆内和/或细胞膜上, 未见核内表达, 见图 3。正常胃粘膜无 Fas 基因表达。Fas 基因在不同胃粘膜病变中有不同程度的表达。Fas mRNA 在肠化生组织中的表达率显著高于萎缩性胃炎及胃癌($P<0.01$ 及 $P<0.05$), 亦高于异型增生, 但相差无统计学意义, 见表 1。肠化生组织 Fas 蛋白表达率显著高于萎缩性胃炎、异型增生和胃癌($P<0.01$ 及 $P<0.05$), 异型增生 Fas 蛋白表达率亦高于胃癌, 但相差无统计学意义, 见表 2。四格表 χ^2 检验表明, 原位杂交及免疫组化两种方法对 Fas 基因表达检测结果一致性非常显著($P<0.01$), 135 例标本中两种方法检测结果一致者占 82.22%(111/135), 同时发现两法的差异则未达到显著界限($P>0.05$)。

TUNEL 染色阳性反应物质呈棕黄色, 位于细胞核内, 浓缩的核质紧贴于核膜, 或核质呈现均匀的染色, 凋亡细胞在不同胃粘膜病变中呈弥漫性分布、簇状分布和/或散在分布, 见图 4; 未凋亡细胞非特异性染色极浅, 而坏死组织染色呈片状, 细胞轮廓不清, 染色呈均一深染的棕黄色斑片。比较不同胃粘膜病变中 Fas 蛋白表达阳性组和阴性组的细胞凋亡指数, 发现萎缩性胃炎、肠化生及胃癌组织中 Fas 蛋白表达阳性组显著高于其阴性组($P<0.01$ 及 $P<0.05$), 异型增生组织中 Fas 蛋白表达阳性组亦高于其阴性组, 但相差无统计学意义, 见表 3。经秩相关分析发现, Fas 蛋白表达状态与细胞凋亡指数呈正相关($r=0.393$, $P<0.01$)。经连续切片观察, Fas 蛋白表达与细胞凋亡在多数病例具有同域性。

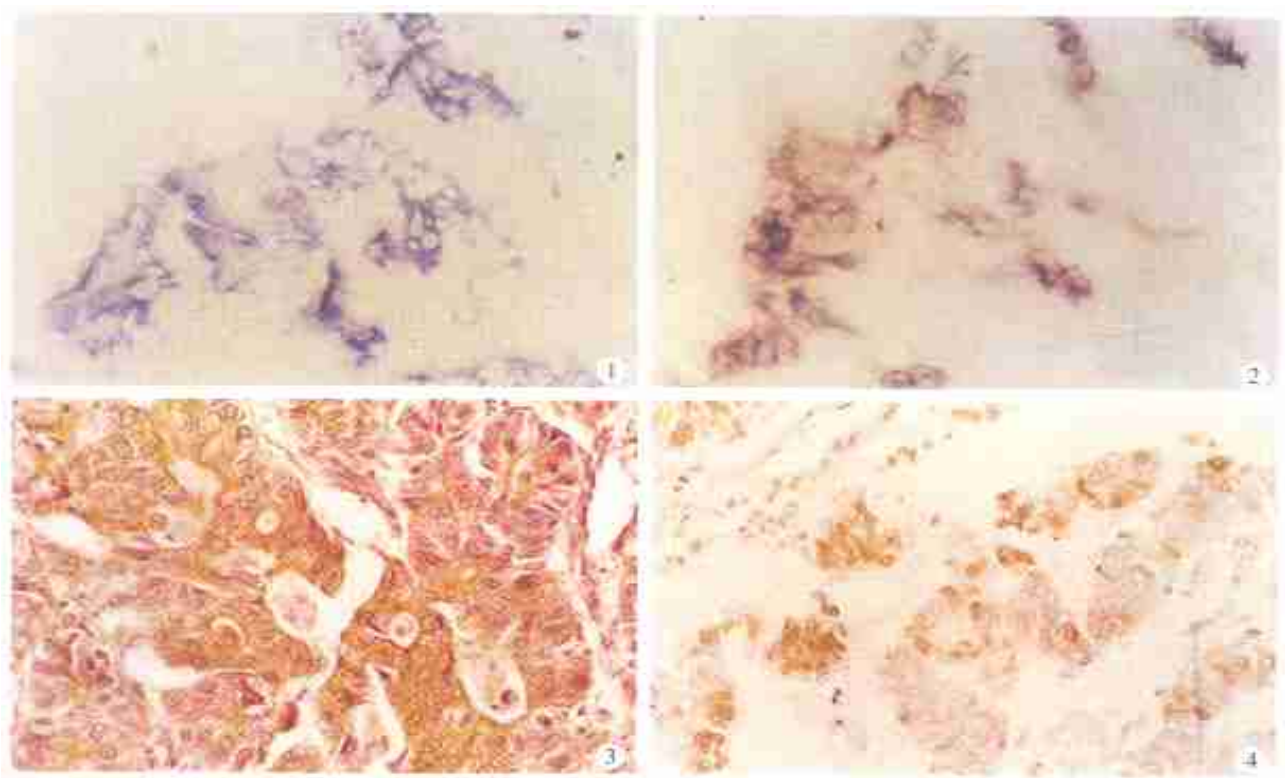


图 1　肠化生组织, **Fas mRNA** 表达阳性　　(ISH× 200)

Fig 1　Fas mRNA expression positive in intestinal metaplasia　　(ISH× 200)

图 2　胃癌组织, **Fas mRNA** 表达阳性　　(ISH× 200)

Fig 2　Fas mRNA expression positive in gastric carcinoma　　(ISH× 200)

图 3　胃癌组织, **Fas** 蛋白表达阳性细胞呈弥漫性分布　　(S-P× 200)

Fig 3　Gastric carcinoma, Fas protein expression positive cell diffusely distributed　　(S-P× 200)

图 4　胃癌组织, 凋亡细胞呈簇状分布　　(TUNEL× 200)

Fig 4　Gastric carcinoma cells with TUNEL signals distributed in clustered form　　(TUNEL× 200)

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

表1 Fas mRNA在不同胃粘膜病变中的表达

Tab 1 Fas mRNA expression in gastric epithelium of normal mucosa, precancerous lesions and gastric carcinomas

Group	n	Fas mRNA positive	Expression rate(%)
N	10	0	0.00
CAG	16	6	37.50**
IM	36	27	75.00
Dys	20	10	50.00
GC	53	28	52.83*

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* IM;

N: Normal gastric musoca; CAG: Chronic atrophic gastritis; IM: Intestinal metaplasia; Dys: Gastric dysplasia; GC: Gastric carcinoma

表2 不同胃粘膜病变中Fas蛋白免疫组化结果

Tab 2 Fas protein expression in gastric epithelium of normal mucosa, precancerous lesions and gastric carcinomas

Group	n	Fas protein positive	Expression rate(%)
N	10	0	0.00
CAG	16	6	37.50**
IM	36	29	80.56
Dys	20	11	55.00*
GC	53	24	45.28**

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* IM

表3 不同胃粘膜病变中Fas蛋白表达与细胞凋亡的关系

Tab 3 Relationship between Fas protein expression and apoptosis

Group	Fas protein positive		Fas protein negative	
	n	Apoptotic index(%)	n	Apoptotic index(%)
CAG	6	15.68±4.79**	10	10.39±3.83
IM	29	15.76±5.35*	7	10.21±4.21
Dys	11	9.03±4.53	9	6.81±3.46
GC	24	8.21±3.46*	29	3.75±2.11

*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ *vs* Fas protein negative group

3 讨论

胃癌的发生发展可能伴随着一系列基因的改变，探讨胃粘膜癌变过程中细胞凋亡相关基因Fas的表达状况，有助于揭示胃癌发生的机制。近几年，Fas抗原作为细胞凋亡的启动分子已经成为国际上研究的热点。已有研究发现，Fas基因可在多种组织中表达，但表达水平变异很大，多为弱表达。Fas基因在不同组织类型肿瘤细胞中的表达具有明显的异质性[2~4]，在许多淋巴系恶性肿瘤细胞中Fas基因表达量极高，在非淋巴系恶性肿瘤中的许多细胞也有广泛的Fas基因表达，如结肠癌、乳腺癌、肾细胞癌、肝癌、膀胱癌、恶性胶质瘤、前列腺癌等[2~7]，迄今为止，Fas基因在胃癌前病变组织及胃癌中的表达状况及其与细胞凋亡的关系尚少见文献报道。本研究发现，正常胃粘膜无Fas基因表达，在胃癌前病变及胃癌中Fas基因在mRNA和蛋白水平均有不同程度的表达，Fas蛋白与Fas mRNA检测结果有密切关系，提示在胃粘膜癌变过程中不仅存在Fas蛋白水平表达异常，而且存在核酸转录水平的异常，Fas蛋白异常表达的原因还应包括Fas基因转录异常的因素。

细胞凋亡是由基因调控的细胞主动死亡过程，此过程的异常与肿瘤的发生发展有密切关系，一种组织中细胞的凋亡易感性决定于多种凋亡相关基因产物的水平和相互的作用，存在多种调定点构成的复杂调控系统[8]。我们既往的研究工作已经证实，胃粘膜癌变过程中不仅存在活跃的细胞增殖，而且存在细胞凋亡的异常，细胞过度增殖和(或)细胞凋亡减少是胃癌发生的生物学基础[9]。但胃粘膜癌变过程中细胞凋亡异常的机制尚不明确，可能与细胞凋亡相关基因调控失常有关。本研究发现，Fas蛋白表达状态与细胞凋亡指数呈正相关，Fas蛋白表达阳性萎缩性胃炎、肠化生、胃癌组织中的凋亡细胞指数显著高于其阴性组。表明Fas基因参与了对胃粘膜细胞恶性转化过程中细胞凋亡的调控，对胃癌前组织及胃癌细胞凋亡具有促进性调控作用，Fas基因表达异常可能是胃粘膜癌变过程中细胞凋亡异常的主要调控机制之一，细胞凋亡调控异常在胃癌发病中可能起重要作用。

参考文献：

[1] Polak J M, McGee J O. *In situ* hybridization: Principles and practice[M]. New YorK: Oxford University Press, 1990. 59—65.

[2] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor[J]. Science, 1995, 267(5 203): 1 449—1 456.

[3] Reimer T, Herrnring C, Koczan D, *et al*. FasL: Fas ratio-a prognostic factor in breast carcinomas[J]. Cancer Res, 2000, 60(4): 822—828.

[4] Petak I, Tillman D M, Harwood F G, *et al*. Fas-dependent and independent mechanisms of cell death following DNA damage in human colon carcinoma cell[J]. Cancer Res, 2000, 60(10): 2 643—2 650.

[5] Wu X X, Mizutani Y, Kakehi Y, *et al*. Enhancement of Fas-mediated apoptosis in renal cell carcinoma cells by adriamycin[J]. Carcer Res, 2000, 60(11): 2 912—2 918.

[6] Fulda S, Meyer E, Debatin K M. Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO/Fas)-induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1-converting enzyme inhibitory protein expression[J]. Cancer Res, 2000, 60(14): 3 947—3 956.

[7] Higaki K, Yano H, Kojiro M. Fas antigen expression and its relationship with apoptosis in human hepatocellular carcinoma and noncancerous tissues[J]. Am J Pathol, 1996, 149(2): 429—437.

[8] Liu H F, Liu W W, Fang D C, *et al*. Clinical significance of Fas antigen expression in gastric carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 1999, 5(1): 90—91.

[9] 刘海峰，刘为纹，房殿春. 胃癌及其胃癌前病变中细胞凋亡与细胞增殖间关系的研究[J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(8): 649—651.

（编辑 薛国文）

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