DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.020

论著

文章编号:1000-5404(2000)01-0046-03

正常胃粘膜、癌旁胃粘膜及胃癌组织 Cx32 mRNA 表达及意义

秦 荣,晏才杰 (第三军医大学附属新桥医院普通外科,重庆 400037)

提 要 目的:探讨正常胃粘膜、癌旁粘膜、癌组织中 Cx32 mRNA 的表达及意义。方法:应用免疫组化、原位杂交、斑点杂交检测相关指标。结果:在正常胃粘膜中,Cx32 及 Cx32 mRNA 均以胃粘膜浅层上皮细胞表达最强,并沿胃小凹向下减少;PCNA 阳性细胞中 Cx32 及 Cx32 mRNA 未见表达;正常胃粘膜、癌旁胃粘膜、癌组织中 Cx32 mRNA 的表达依次下降($P<0.01$)。结论:胃粘膜 Cx32 与 Cx32 mRNA 表达规律相似,其表达多少提示细胞成熟状态。

关键词 胃粘膜;Cx32;增殖细胞核抗原

中图法分类号 R394.2;R735.2 文献标识码 A

Expression of connexin32 mRNA in normal, juxtacancerous and cancerous gastric mucosa and its significance

QIN Rong, YAN Cai-jie (Department of General Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037)

Abstract Objective: To investigate the changes in expression of connexin32 (Cx32) mRNA in normal, juxtacancerous and cancerous gastric mucosa. Methods: Immunohistochemistry, *in situ* hybridization and dot-blot hybridization were used. Results: In normal mucosa, Cx32 was present mainly in the gastric lumen epithelial mucus cells and in a decreasing gradient from the top of the foveloar cells to the neck of the glands. Cx32 mRNA had the similar distribution. Cx32 was not seen in proliferating cell nuclear antigen(PCNA) positive cells and decreased expression of Cx32 mRNA was found in juxtacancerous and cancerous gastric mucosa. Conclusion: The expression of Cx32 is coherent to that of Cx32 mRNA in gastric mucosa. The extent of the expression can provide information for maturation of gastric mucus cells.

Key words gastric mucosa; Cx32; PCNA

胃粘膜表层上皮细胞脱落后即由其深层细胞向表层移行补充,对这种体现细胞成熟的动态过程增殖、分化等方面的研究,可以加深对这些指标改变在胃疾病中作用的认识。间隙连接(Gap junction)对细胞稳态的维持及细胞生长分化非常重要[1]。胃粘膜间隙连接蛋白 Cx32 的减少参与了胃疾病包括胃癌的发生[2],而正常及病变胃粘膜 Cx32 mRNA 的表达规律尚不清楚。本实验检测了正常胃粘膜 Cx32 mRNA 表达,并结合 Cx32、增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)表达探讨其意义;并对癌旁胃粘膜、癌组织中 Cx32 mRNA 表达变化进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 标本来源

正常胃粘膜组织 10 例取自我院胃十二指肠溃疡手术标本的切缘组织,胃癌组织及癌旁组织各 10 例取自我院胃癌切除标本,以 10%的福尔马林液固定,常规脱水、包埋、连续切片,HE 染色,病理证实。在采集上述标本的同时,收集其相邻的胃粘膜组织,-70℃ 储存备用。

1.2 免疫组化方法

Cx32 及 PCNA 免疫组化采用 S-P 法,参照试剂盒说明进行。抗 Cx32 单抗由日本 Marsaru Iwai 博士惠赠,抗 PCNA 单抗及 S-P 试剂盒购自北京中山公司。以 PBS 代替一抗作阴性对照,DAB 显色。

1.3 探针的制备及标记

含 Cx32 cDNA 的 pGEM-3 质粒由美国 D Paul 教授惠赠,用 JM109 菌行质粒的转化、扩增,以碱裂解法提取质粒,纯化后经 *EcoR* Ⅰ酶切,回收目的片段(1 500 bp),见图 1。Cx32 cDNA 探针标记按宝灵曼公司试剂盒说明进行操作。

1.4 原位杂交及斑点杂交

Cx32 原位杂交采用石蜡切片进行,以不加 Cx32 cDNA 探针及应用了 RNA 酶的切片作为空白对照及阴性对照,甲基绿复染。斑点杂交:将相同量的胃粘膜组织制成悬液,常规提取总 RNA,具体杂交方法参照文献[3]进行,杂交结果用图像分析仪进行图像分析。

作者简介:秦 荣(1969.8),男,河北省兴隆县人,硕士,主治医师,主要从事进展期胃癌的转移和治疗方面的研究,发表论文 3 篇。电话:(023)68755114-74605

收稿日期:1999-06-09;修回日期:1999-09-29

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

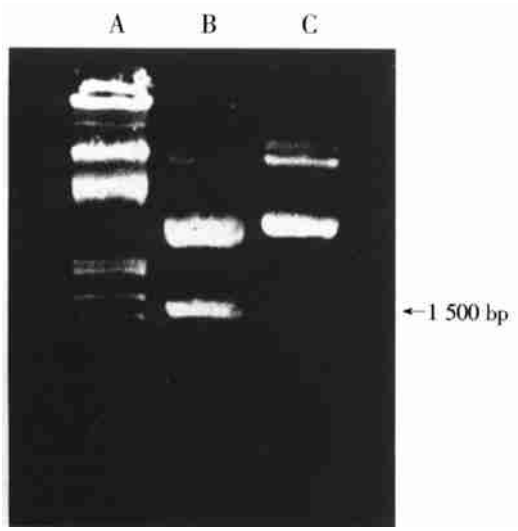


图 1　质粒酶切电泳图谱

Fig 1　pGEM-3 digested with *EcoR* I

A：λDNA/*EcoR*I＋*Hind* Ⅲ Marker；B：pGEM-3＋*EcoR*I；C：pGEM-3

1.5　统计学方法

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPLM 软件包进行方差分析。

2　结果

Cx32 阳性染色位于细胞侧面或胞浆中，呈颗粒状或细线状，胃粘膜浅层上皮细胞阳性细胞最多，并有沿胃小凹向下递减趋势，见图 2。PCNA 阳性细胞细胞核呈棕黄色，集中在胃粘膜增殖区，沿胃小凹向上骤减，至胃小凹上部及胃粘膜浅层上皮细胞则见不到阳性染色，见图 3。Cx32 mRNA 阳性染色呈紫蓝色，位于胞浆，分布以胃粘膜浅层上皮细胞最强，并有沿胃小凹向下依次减弱的趋势，见图 4，正常胃粘膜、癌旁胃粘膜及癌组织的 Cx32 mRNA 斑点杂交结果，见表 1，3 组组间差异具有显著性（$P<0.01$）。

表 1　正常胃粘膜、癌旁胃粘膜及癌组织 Cx32 mRNA 斑点杂交结果分析　（$n=10$）

Tab 1　Analysis of Cx32 mRNA dot-blot hybridization in normal, juxtacancerous and cancerous gastric mucosa　（$n=10$）

Group	Mean optical density
Normal gastric mucosa	71.7860 ± 5.9679
Juxtacancerous gastric mucosa	31.5310 ± 5.7942*
Cancerous gastric mucosa	11.1950 ± 2.3919*#

*：$P<0.01$ *vs* normal gastric mucosa；

#：$P<0.01$ *vs* juxtacancerous mucosa



图 2　正常胃粘膜组织 **Cx32** 免疫组化染色　（S-P× 200）

Fig 2　Cx32 expression in normal gastric mucosa (S-P× 200)

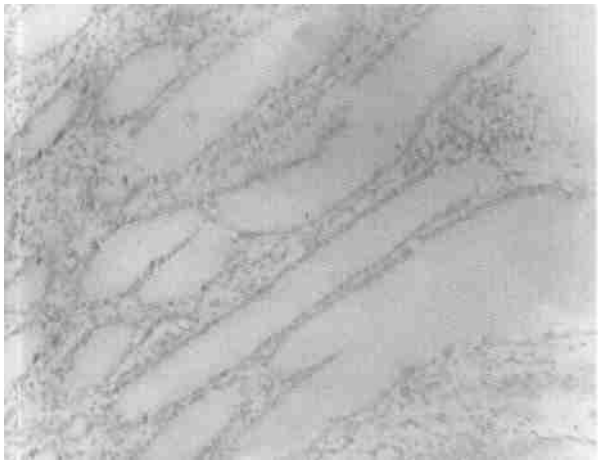


图 3　正常胃粘膜 **PCNA** 免疫组化染色　（S-P× 100）

Fig 3　PCNA expression in normal gastric mucosa (S-P× 100)



图 4　正常胃粘膜 **Cx32 mRNA** 原位杂交　（ISH× 100）

Fig 4　Cx32 mRNA expression in normal gastric mucosa　（ISH× 100）

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

3 讨论

本研究结果表明:在胃粘膜组织中,Cx32 mRNA 与 Cx32 表达规律一致, 其表达多少提示细胞的成熟状态。

间隙连接是沟通相邻细胞侧面的通道, 这一膜通道具有高度的对称性, 由相邻的细胞各提供一个半通道,即连接子(Connexon)组成,一对连接子各自向外突出, 密闭构成的通道使间隙连接在相邻细胞间形成 1 个 2~3 nm 的间隙。每个连接子又是由 6 个连接蛋白(Connexin,Cx)寡聚而成[4]。事实上,Cx 的种类很多,不同组织组成间隙连接的连接蛋白有可能不同[5], Cx32 被认为是胃粘膜中的主要连接蛋白。当连接蛋白表达水平变化时, 有关其 mRNA 表达水平的变化结论不一。有报道间隙连接缺乏时, 其 mRNA 仍可为高表达[6], 也有结论认为其蛋白改变时有相应的核酸变化作为基础[7]。本结果显示:在正常胃粘膜中,Cx32 蛋白与 Cx32 mRNA 表达一致。

PCNA 是一种 36×10^3u 的核蛋白, 其出现与细胞增殖有关,在静止期,其量很少,G_1 晚期开始增多,S 期达高峰, G_2 及 M 期则明显下降, 故可用以评定细胞的增殖状态[8]。PCNA 染色阳性显示了胃粘膜的增殖区,在该区内检测不到 Cx32 及 Cx32 mRNA 阳性染色。Cx32 及 Cx32 mRNA 阳性染色在分布上, 表现为从胃小凹向上逐渐增多的趋势,均以胃浅层上皮细胞表达最强,这说明 Cx32 及 Cx32 mRNA 表达与胃粘膜上皮细胞的成熟过程密切相关, 同时检测 Cx32 与 PCNA 可以了解胃粘膜上皮细胞的增殖与成熟状态。

文献报道癌旁组织中肠化及不典型增生病变的机率较高[9], 在蛋白表达水平上已经发现肠化及不典型增生组织中,Cx32 阳性表达较正常胃粘膜下降[2,10],故推测在癌旁组织中 Cx32 mRNA 表达减少,可能与癌旁肠化及癌旁不典型增生灶中 Cx32 mRNA 的含量下降有关。在癌粘膜中 Cx32 mRNA 缺乏,而癌粘膜中 Cx32 蛋白表达阴性[2]。这说明胃癌粘膜中也存在着 Cx32 mRNA 与 Cx32 表达的一致,Cx32 表达水平的改变参与了胃癌的发生。有研究显示[11]:连接蛋白 mRNA 表达水平的变化不伴有基因组 DNA 丢失或突变,而是基因水平下调,这种下调可用药物恢复,故上述结果进一步提示在胃癌发生早期, 如果能上调 Cx32 mRNA 水平,有使病灶逆转的可能。

(本实验在我校全军复合伤研究所完成,得到多位老师的指导和帮助,在此表示衷心地感谢!)

参考文献

[1] Kumar N M, Gilula N B. The gap junction communication channel[J]. Cell, 1996, 84(3):381—388.

[2] Uchida Y, Matsuda K, Sasahara K, *et al*. Immunohistochemistry of gap junctions in normal and diseased gastric mucosa of humans [J]. Gastroenterology, 1995, 109(8):1492—1496.

[3] 鄂 征. 组织培养和分子生物学技术:点印记杂交[M]. 北京:北京出版社, 1995. 414.

[4] Sosinsky G E. Molecular organization of gap junction membrane channels[J]. J Bioenerg Biomembr, 1996, 28(4):297—308.

[5] Willecke K, Haubrich S. Connexin expression systems :To what extent do they reflect the situation in the animal[J]. J Bioenerg Biomembr, 1996, 28(4):319—326.

[6] Eldridge S R, Martens T W, Sattler C A, *et al*. Association of decreased intercellular communication with the immortal but not the tumorigenic phenotype in human mammary epithelial cells[J]. Cancer Res, 1989, 49(15):4 326—4 331.

[7] Wilgenbus K K, Kirkpatrick C J, Knuechel R, *et al*. Expression of Cx26, Cx32 and Cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues[J]. Int J Cancer, 1992, 51(4):522—529.

[8] Woods A A L, Hall P A, Shepherd N A, *et al*. The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histologic grade S+G2+M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis[J]. Histopathology, 1991, 19(1):21—23.

[9] 徐光炜. 胃癌[M]. 北京:人民卫生出版社, 1987. 106—115.

[10] 秦 荣, 晏才杰. 胃癌组织间隙连接蛋白的免疫组化研究[J]. 中国胃肠外科杂志, 1999, 2(1):47—48.

[11] Lee S W, Tomasetto C, Paul D, *et al*. Transcriptional down-regulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human manmary tumor cell lines[J]. J Cell Biol, 1992, 118(5):1 213—1 221.

(编辑 王 红)

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