DOI:10.16016/j.1000-5404.1998.04.005

胃癌和肠化上皮组织微卫星不稳定性及bcl-2、erbB-2和p53蛋白表达的比较研究*

周晓东** 房殿春 王东旭 罗元辉 刘为纹 (第三军医大学附属西南医院消化内科)重庆,400038

提 要 **目的**:研究微卫星不稳定性(MSI)在胃癌发生中的作用及其与bcl-2、erbB-2和突变型p53蛋白表达的关系。**方法**:采用PCR-SSLP和免疫组织化学技术检测了50例手术切除胃癌和15例肠化组织标本的MSI和bcl-2、erbB-2及突变型p53蛋白表达。**结果**:胃癌MSI发生率为54%,肠化组织MSI发生率为20%,胃癌组织bcl-2、erbB、及p53蛋白阳性率分别为60%、22%和38%,肠化生组织bcl-2蛋白表达阳性率为53.3%,而p53和erbB-2均为阴性。高中分化腺癌MSI发生率(86.7%)显著高于低分化腺癌(38.7%)($P<0.05$),肠型胃癌MSI发生率(77.8%)显著高于胃型胃癌(40%)($P<0.05$);MSI与胃癌患者年龄、性别、肿瘤的部位、大小、淋巴结转移、浆膜浸润、临床分期及bcl-2、erbB-2和突变型p53蛋白表达无显著相关。**结论**:MSI在胃癌的发生中可能起重要作用,可能是胃癌发生过程中的一个早期分子改变,其致癌机制不同于bcl-2、erbB-2及p53。

关键词 胃癌;肠上皮化生;微卫星不稳定性,bcl-2基因;erbB-2基因;p53基因

中图法分类号 R735.2

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤,其发生机制颇为复杂,涉及到一系列遗传学改变,包括癌基因的激活及抑癌基因的失活等。肿瘤遗传学研究表明,基因组的不稳定性可导致肿瘤的发生,而导致基因组不稳定性的主要原因之一就是微卫星不稳定性(Microsatellite instability,MSI),近期研究显示,MSI在胃癌的发生中起重要作用[1,2]。为了研究MSI在胃癌发生中的作用,本研究采用PCR-SSLP(Simple sequence length polymorphism)技术检测了胃癌及肠化组织的MSI,并对其与突变型p53、bcl-2、erbB-2蛋白表达的关系进行了分析。

1 材料与方法

1.1 标本

收集我院1994年1月至1996年1月手术切除新鲜胃癌标本50例及肠上皮化生标本15例,每例同时收集正常胃粘膜,置-70℃冰箱保存备用。

1.2 基因组DNA的提取

采用显微解剖技术[3]收集正常、肠化及癌组织,确保癌组织中癌细胞和肠化中肠上皮化生细胞至少占70%以上,正常组织中无癌细胞及肠化细胞。采用蛋白酶K消化,苯酚/氯仿抽提法提取基因组DNA。

1.3 MSI分析

由上海细胞生物研究所合成用于扩增D17s261、D18s34、TCF-2、D5s409及D5s82位点DNA的特异性引物[4,5],采用2400型PCR仪扩增微卫星DNA,反应总体积20 μl,内含10×Buffler 2 μl、4×dNTP 0.2 mmol/L、引物各10 pmol、Taq DNA聚合酶2μ,基因组DNA100 ng,35个循环,循环参数94℃40 s,56℃40 s,72℃40 s,最后一个循环后置72℃继续反应10 min。扩增产物在1.5%琼脂糖上电泳证实无杂带后,以首次扩增产物为模板,另加α-^{32}P dCTP(脱氧胞核苷酸)0.8μ(8μCi)进行第二次扩增。取第二次扩增产物5μl与等体积上样缓冲液(98%甲酰胺、0.025%二甲苯蓝和溴酚蓝、10 mmol/L EDTANa_2)混合,95℃变性5 min后快速冷却,在10%聚丙烯酰胺凝胶(7M尿素)上电泳(55W)2 h~3 h后行放射自显影,24 h~72 h后洗片观察结果。和正常组织相比,肿瘤及肠化组织出现额外的DNA等位片段或有泳动现象即为MSI。

1.4 免疫组化染色

组织切片经微波炉抗原修复后以SP方法进行bcl-2、erbB-2和突变型p53蛋白免疫组化染色,3种抗体及SPTM试剂盒购自中山公司,以PBS代替一抗作为空白对照,正常胃粘膜作为正常对照,细胞染成棕色为阳性判断标准,bcl-2为胞浆着色,p53为胞核着色,erbB-2主要为胞膜着色,亦有胞浆着色。

1.5 统计学方法

采用χ^2、四格表确切概率法及t检验对相关数据进行统计学处理。

2 结果

2.1 胃癌及肠化组织MSI检出率

50例胃癌中各位点MSI,检出率分别为:D17s261 24%

* 国家自然科学基金资助项目,No 39470332

** 周晓东,男,35岁,主治医师,硕士

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

(12/50)、D17s799 24%(12/50)、TCF-2 20%(10/50)、D18s34 30%(14/50)、D5s409 14%(7/50)及 D5s82 20%(10/50)，见图 1。若将以上位点综合分析，50 例胃癌中检出 1 个以上位点 MSI 者 27 例，总阳性率为 54%，其中两个以上位点 MSI 均阳性者占 MSI 阳性病例的 63%(17/27)。3 例早期胃癌 MSI 均阳性，47 例进展期胃癌 MSI 阳性者 24 例，阳性率为 51%(24/47)，二者差异不显著($P>0.05$)。15 例肠上皮化生组织共检出 MSI3 例，检出率为 20%，其中 D5s82 位点检出 2 例，D18s34 位点检出 1 例，见图 2，其余位点未检出 MSI。

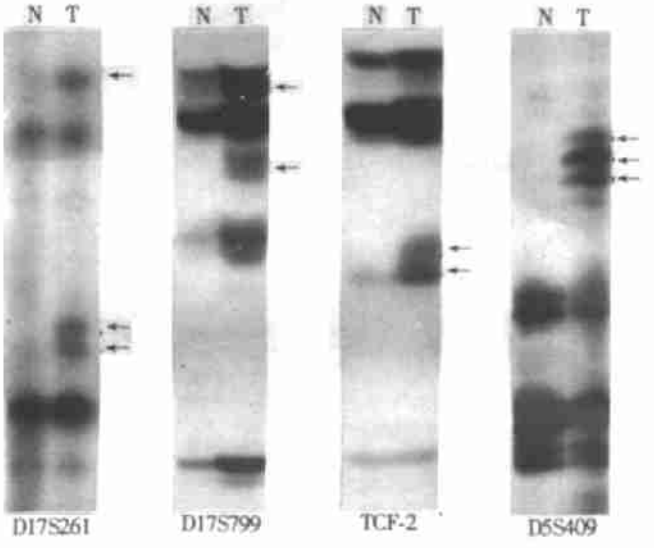


图 1　胃癌组织 MSI

N：正常组织；T：肿瘤组织

Fig 1　Microsatellite instability in gastric cancer

N: normal tissue; T: tumor tissue

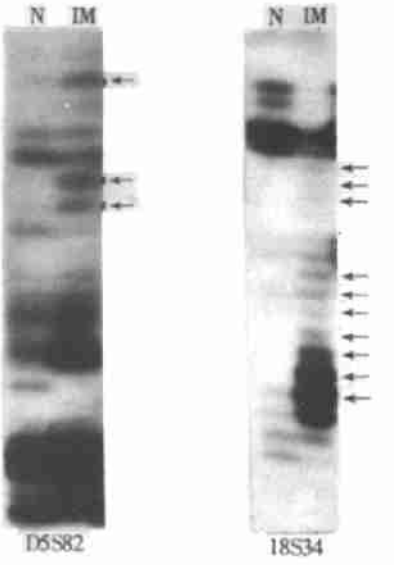


图 2　肠化组织 MSI

N：正常组织；IM：肠化组织

Fig 2　Microsatellite instability in intestinal metaplasia

N: normal tissue; IM: intestinal metaplasia

2.2　胃癌及肠上皮化生组织突变型 p53 蛋白、bcl-2 及 erbB-2 蛋白的表达

50 例胃癌中突变型 p53 蛋白、bcl-2 及 erbB-2 蛋白表达阳性率分别为 38%(19/50)、60%(30/50)和 22%(11/50)，见图 3、4。15 例肠上皮化生组织中 bcl-2 染色阳性 8 例，见图 5，阳性率为 53.3%，p53 及 erbB-2 染色均为阴性。

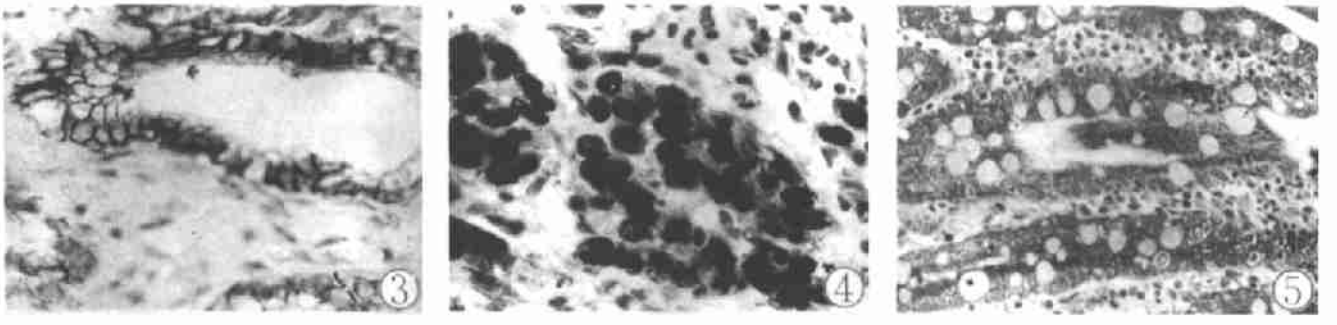


图 3　胃癌组织 erbB-2 蛋白表达　(S-P×200)

Fig 3　Expression of erbB-2 protein in gastric cancer　(S-P×200)

图 4　胃癌组织突变型 p53 蛋白表达　(S-P×200)

Fig 4　Expression of mutant p53 in gastric cancer　(S-P×200)

图 5　肠化组织 bcl-2 蛋白表达　(S-P×200)

Fig 5　Expression of bcl-2 protein in intestinal metaplasia　(S-P×200)

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

2.3 MSI和bcl-2及突变型p53蛋白表达与胃癌临床病理参数的关系，见表1

高中分化腺癌MSI发生率(86.7%)显著高于低分化腺癌(38.7%)($P<0.05$)，肠型胃癌MSI发生率(77.8%)显著高于胃型胃癌(40.2%)($P<0.05$)。MSI与胃癌发生年龄、性别、部位、大小、淋巴结转移、临床分期、浸润深度无显著相关($P>0.05$)。bcl-2、erbB-2及突变型p53蛋白的表达与胃癌各临床病理参数亦无显著相关($P>0.05$)。

表1 MSI和blc-2、erbB-2、突变型p53蛋白的表达与胃癌临床病理参数的关系

Tab 1 The relationship between microsatellite instability, expression of bcl-2, erbB-2, p53 and clinical parameters

Parameters	MIS		bcl-2		erbB-2		p53	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Size								
≤5 cm	18	14	20	12	6	26	11	21
>5 cm	9	9	10	8	5	13	8	10
Differentiation								
Well/moderate	13*	2	10	5	2	13	5	10
Poor	12	19	19	12	8	23	13	18
Mucinous	2	2	1	3	1	3	1	3
Lymph node metastasis								
Present	12	13	17	8	5	20	10	15
Absent	15	10	13	12	6	19	9	16
Serosal invasion								
Present	15	15	21	9	5	25	15	15
Absent	12	8	9	11	6	14	4	16
Clinical staging								
Stages Ⅰ-Ⅱ	13	11	13	11	5	19	7	17
Stages Ⅲ-Ⅳ	14	12	17	9	6	20	12	14
Lauyen's classification								
Intestinal	14△	4	13	5	6	12	6	12
Gastric	12	18	16	14	5	25	13	17
Mixed	1	1	1	1	0	2	0	2

*: $P<0.05$ *vs* poorly differentiated; △: $P<0.05$ *vs* gastric type

2.4 胃癌MSI与bcl-2、erbB-2和突变型p53蛋白表达的关系，见表2

将50例胃癌分为MSI阳性与MSI阴性两组，两组间bcl-2、erbB-2和突变p53蛋白的阳性检出率差异不显著($P>0.05$)。

表2 胃癌MSI与bcl-2、erbB-2和突变型p53表达的关系

Tab 2 The relationship between microsatellite instability and the expression of bcl-2, erbB-2 and p53

MSI	n	bcl-2(%)	erbB-2(%)	p53(%)
MSI+	27	14(51.9%)	5(18.5%)	10(37.0%)
MSI-	23	16(69.9%)	6(26.0%)	9(39.0%)

3 讨论

微卫星是由2～6个核苷酸组成，具有高度多态性的简单串联式核苷酸重复序列。广泛存在于原核及真核细胞的基因组中。MSI是指由于复制错误引起的简单重复序列的改变。肿瘤遗传学研究表明，细胞恶性转化与遗传物质的不稳定性有关，而遗传物质的不稳定性系错配修复基因的改变所致，由于错配修复基因的突变造成DNA频发的复制错误，导致细胞微卫星DNA发生改变。国外报道，胃癌MSI发生率在18%～39%之间[1,2]，本研究显示，胃癌MSI发生率为54%，造成这种差异的原因可能与受检者种族、地理环境及检测位点不同有关。此外，本研究发现，3例早期胃癌MSI均为阳性，进展期胃癌MSI阳性率为51%，提示MSI是胃癌发生过程中的常见改变，可能参与了胃癌的发生及发展。有关肠化组织MSI的研究国外仅见1篇报道，Semba等[6]研究发现肠化组织MSI发生率为33%，本研究显示肠化组织MSI发生率为20%，提示在胃癌发生的早期阶段即有MSI的发生，MSI可能是胃癌发生过程中的一种早期分子标志。

Nakashima等[7]报道，无淋巴结转移胃癌MSI发生率显著高于有淋巴结转移者，Seruca等[8]报道81.8%的MSI发生于胃窦部癌。本研究显示MSI与胃癌淋巴结转移及部位无显著关系，亦未能发现MSI与胃癌发生年龄、大小、浸润深度及临床分期有关，但本研究显示肠型胃癌MSI发生率显著高于胃型胃癌，与国外报道一致[8]，提示MSI可能在肠型胃癌的发生中起重要作用。

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

MSI 与胃癌分化程度的关系文献报道不尽一致[2,6]，本研究发现高分化腺癌 MSI 发生率(86.7%)显著高于低分化腺癌(38.7%)，这与 Semba 等[6]的研究结果相一致，提示 MSI 阳性胃癌恶性程度可能较低，但 Han 等[2]研究结果却与之相反，看来要得出明确结论，还需大样本多位点检测。

MSI 是否引起其他基因改变而导致胃癌发生是目前国内外研究的热点[9]，我们同时检测了抑癌基因 p53 蛋白，癌基因 erbB-2 及凋亡抑制基因 bcl-2 蛋白的表达，发现三者在胃癌中阳性表达分别为 38%、22%及 60%。肠化组织中 bcl-2 表达占 53.3%，提示这些基因异常可能参与了胃癌的发生或发展。仔细分析 MSI 与各基因蛋白表达关系，发现 MSI 与 p53、bcl-2、erbB-2 的表达并无显著相关性，这提示 MSI 与 p53、erbB-2 参与胃癌发生的机制可能有所不同。

本研究提示，MSI 是胃癌发生过程度中的一个早期事件，可能是胃癌发生的一种新机制。

参考文献

1 Rhyu M J, Park W S, Melzer S J. Microsatellite instability in human gastric carcinoma. Oncogene, 1994; 9(1): 29

2 Han H J, Yanagisawa A, Kato Y *et al*. Genetic instability in pancreatic cancer and pooly differentiated type of gastric cancer. Cancer Res, 1993; 53(23): 5087

3 Zhuang Z P, Bertheau P, Emmert-Buck M R *et al*. A microdissection technique for archival DNA analysis of specific cell population in lesions ≤1 mm in size. Am J Pathol, 1995; 146(3): 620

4 Weber J L, Kwitek A E, May P E *et al*. Dinucleotide repeat polymorphism at the D17s250, D17s261 10ci. Nucleic Acid Res, 1990; 18(14): 4640

5 Weber J L, May P E. Dinucleotide repeat polymorphism at D17s34 locus. Nucleic Acid Res, 1990; 18(11): 3431

6 Semba S, Yokozaki H, Yamamoto S *et al*. Microsatellite instability in precancerous lesions and carcinomas of the stomach. Cancer, 1996; 77(Suppl 8): 1620

7 Nakashima H, Inoue H, Mori M *et al*. Microsatellite instability in Japanese cancer, Cancer(Suppl), 1995; 75(6): 1503

8 Seruca R, Santos N R, David L *et al*. Sporadic gastric carcinomas with microsatellite instability display a particular clinicopathologic profile. Int J Cancer, 1995; 64(1): 32

9 Lin J T, Wu M S, Shun C T *et al*. Occurrence of microsatellite instability in gastric carcinoam is associated with enhanced expression of erbB-2 oncoprotein. Cancer Res, 1995; 55(7): 1428

(收稿：1997-12-31；修回：1998-05-15)

(编辑　王　红)

Comparative study of microsatellite instability and expression of bcl-2, erbB-2 and p53 protein in gastric carcinoma and gastric epithelium with intestinal metaplasia*

Zhou Xiaodong, Fang Dianchun, Wang Dongxu, Luo Yuanhui, Liu Weiwen (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To investigate the role of microsatellite instability (MSI) in the development of gastric cancer (GC) and relationship of MSI with the expression of bcl-2, erbB-2 and p53 protein. **Materials and methods**: MSI and expression of bcl-2, erbB-2 and p53 protein were studied in 50 surgical specimens of GC and 15 specimens of gastric epithelium with intestinal metaplasia (IM) with PCR-SSLP and immunohistochemistry. **Results**: MSI occurred in 54% of GC specimens and 20% of IM ones. The expression of bcl-2, erbB-2 and p53 protein was positive in 60%, 22% and 38% of GC specimens respectively. And in the specimens of IM, only erbB-2 was positive in 8 out of the 15 specimens and both bcl-2 and p53 were negative. The incidence of MSI was significantly higher in moderately-differentiated adenocarcinoma than in poorly-differentiated one ($P<0.05$). There was no significant correlation of MSI to the age and sex of the patient and the site, size, lymph node metastasis, serosa invasion and stage of GC and to the expression of bcl-2, erbB-2 and p53 protein. **Conclusion**: MSI is an early molecular marker of GC and likely to play an important role in the development of GC. Nevertheless, it exerts its effects through a different mechanism from that of bcl-2, erbB-2 and p53 genes.

Key words gastric cancer; intestinal metaplasia; microsatellite instability; bcl-2 gene; erbB-2 gene; p53 gene

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39470332

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