

胃食管反流病并发Barrett食管及食管腺癌分子生物学基础

王 雯

王雯,南京军区福州总医院消化内科 福建省福州市 350025
项目负责人:王雯,350025,福建省福州市,南京军区福州总医院消化内科.
收稿日期:2002-08-10 接受日期:2002-08-23

摘要

胃食管反流病及其并发的 Barrett 食管、食管腺癌的发病率近年明显升高,其发生机制尚未完全明了,本文综合阐述了此系列疾病发生过程中相关基因变化等分子生物学基础。

王雯.胃食管反流病并发Barrett食管及食管腺癌分子生物学基础.世界华人消化杂志 2003;11(1):78-81
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/78.htm>

0 引言

胃食管反流病(GERD)是常见的消化道动力障碍性疾病,其并发的 Barrett 食管(BE)、食管腺癌(EA)的发病率近年明显升高^[1],已引起国内外广泛重视。GERD 食管炎 BE 异型增生 恶变是公认的 EA 发病过程,但其确切机制目前尚未完全明了,可能与多种基因的改变及异常表达造成食管上皮细胞增生与分化失常有关。本文对此系列疾病发生的分子生物学基础方面的研究进展作一综述。

1 DNA 含量

DNA 含量即 DNA 倍性,正常细胞为二倍体,而当细胞内出现多倍体或非整倍体(即 DNA 含量异常)时即为细胞增生异常或恶变的表现。DNA 倍性可用流式细胞仪检测,计算机辅助图像分析病理切片亦可用来检出非整倍体的细胞,他可根据核的大小和染色程度算出 DNA 含量,并同时直接观察细胞核的形态,从而鉴别 BE 与异型增生或肿瘤细胞。Montgomery et al^[2]发现 20 例食管腺癌 DNA 含量全部为非整倍体,10 例 BE 中有 2 例为非整倍体 DNA,而反流性食管炎无 1 例为非整倍体 DNA。Reid et al^[3]的研究显示无并发症的反流性食管炎患者的食管黏膜倍性正常,良性的化生 Barrett 黏膜即可见 DNA 含量异常,而癌前性 Barrett 化生上皮此种改变常见得多,非整倍体性或 G₂/四倍体组分的升高是恶性变的独立危险因素。推测 BE 恶变为 BE 中单个的异常祖细胞发生克隆扩张,使同样非整倍体性的细胞占据黏膜的大部分。

2 染色体异常

非整倍体为含大量染色体的 DNA 含量总体异常,而许多研究发现一些 BE 及 EA 有个别染色体变化,包括 Y 染色体缺失或呈三倍体变化以及 7 号和 11 号染色体易

位。另有文献报道 BE 起源的腺癌及其周围的良性化生上皮中均可见 8 号染色体过多,17 号染色体缺失以及 Y 染色体缺失^[4],说明有些染色体异常发生于 BE 癌变早期。

3 细胞增生周期的调控基因

细胞增生异常是所有肿瘤组织的基本特征。广义说来调节细胞生长、转化的诸多因子如激素、生长因子、细胞因子等都要通过调节细胞增生周期起作用。细胞周期中各因子相互作用形成级联调控网络,其核心是依赖于细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)的活性发挥,而 CDK 活性发挥又取决于其正向调节因子细胞周期蛋白及负向调节因子 CDK 抑制蛋白(CDK-inhibitor,CKI)的水平。在 GERD 并发的 BE、EA 中,这些基因的改变及表达异常研究很多。

3.1 细胞周期蛋白 细胞周期蛋白分为 A、B、C、D、E 五种,在细胞周期的不同时相不同的细胞周期蛋白水平顺序性升高,分别与相应的 CDK 结合形成复合物,使细胞内多种蛋白磷酸化及去磷酸化,从而调节 DNA 的合成及有丝分裂,使细胞完成各个时相转换。根据调控细胞周期时相的不同细胞周期蛋白分为 G₁ 期和 M 期两类。前者包括 C、D、E 三种,可促进 DNA 合成,在 G₁/S 交界处发挥作用并启动细胞周期。其中细胞周期蛋白 D 研究较多,他在 G₁ 中期开始合成增多,与 CDK₄、CDK₆ 结合后作用于其底物 Rb 蛋白(视网膜母细胞瘤基因编码的蛋白),后者磷酸化失活并释放转录因子 E₂F, E₂F 启动进入 S 期必需的酶蛋白基因的转录从而完成 G₁ 至 S 过度。由于其在多种肿瘤组织中过度表达,且具有强促细胞增生的作用,现在细胞周期蛋白 D 已被看作癌基因。细胞周期蛋白 E 与 CDK₂ 结合,亦作用于 G₁/S 期,机制尚不明了,细胞周期蛋白 C 研究更少。动物实验显示亚硝基甲基苯胺(NMBA)致大鼠食管癌变过程中,细胞周期蛋白 D 和细胞周期蛋白 E 的表达逐渐增强,癌前病变及癌灶内均较正常黏膜明显为高^[5];对人类 Barrett 食管及 EA 的研究^[6]亦发现,46% 的 BE 及 63% 的 EA 中细胞周期蛋白 D 表达增强(基因扩增或转录增加),BE 癌变过程与细胞周期蛋白 D 高表达有密切关系。说明细胞周期蛋白表达增强可能为食管癌变过程中较早期发生的分子事件。还有研究发现 BE 癌变过程中细胞周期蛋白 D 基因突变及重排。M 期细胞周期蛋白包括 A、B 两种,在 G₂/M 交界处发挥作用,诱导细胞分裂,与肿瘤的关系亦很密切,但与食管

炎及 BE、EA 的关系研究很少。

3.2 CDK 为一类丝氨酸/苏氨酸激酶,目前发现的主要有 1-6 六种,分别与不同的细胞周期蛋白结合而起作用.其中 CDK₄、CDK₆及 CDK₂与肿瘤的发生关系最为密切,在一些肿瘤中出现过度表达,但在食管疾病中的研究较少.目前尚未发现 CDK 存在突变现象。

3.3 CKI CKI 通过与 CDK、细胞周期蛋白或细胞周期蛋白-CDK 复合物的结合而抑制 CDK 的活性,根据其结构特征分为两个家族,一类为 Ink4 家族,包括 p15、p16、p18、p19 等,可特异性抑制 CDK₄/CDK₆的活性;另一类为 Kip 家族,包括 p21、p27、p57,可抑制各种细胞周期蛋白-CDK 复合物.两类 CKI 蛋白的结构和功能各自有高度相似性,均属肿瘤抑制基因,细述如下。

4 肿瘤抑制基因

肿瘤抑制基因的失活、缺失、突变等也为 BE 相关的食管腺癌发生的重要机制。

4.1 p53 基因 p53 基因的抗癌作用已为人们熟知,他是最先被发现的与 BE 引起的肿瘤相关的肿瘤抑制基因. p53 基因位于 17p,其杂合性缺失(LOH)、突变及过度表达可导致肿瘤的发生.正常野生型 p53 蛋白半衰期仅 20 min,而突变型 p53 蛋白却延长达几小时以上,这导致核内 p53 蛋白积聚. Kim et al^[7]对人食管的研究显示 36% 的 BE、30% 的低度异型增生、85% 的高度异型增生及 90% 的 EA 中出现 p53 蛋白积聚,说明 p53 蛋白积聚发生于 BE 癌变的早期;发现联合检测 p53、PCNA(增生细胞核抗原)和 C-erbB-2 的表达用来诊断 BE 发生高度异型增生或癌的敏感性达 100%,特异性达 81%,总准确度为 83%. BE、异型增生及 EA 中常发生 p53 关键的外显子如外显子 5-9 突变,最常见鸟嘌呤转换为腺嘌呤,用 PCR-SSCP(聚合酶链反应-单链构象多态性分析)及 DNA 测序进行检测常用于检出 Barrett 上皮异型增生^[8]. 内镜下多点活检取食管组织并经流式细胞仪筛选后进行基因突变检测,发现 GERD 并发的 BE 中 p53 突变率高达 50%^[9]. 动物实验亦发现食管致癌过程 p53 基因突变率很高. GERD 并发 BE 及 EA 过程中 p53 除表达异常和突变外,杂合性缺失(17p LOH)也较常见, Gonzalez et al^[10]发现 EA 中 p53 的 LOH 率为 90%,若先用流式细胞仪检出 DNA 含量异常的细胞,再对核 DNA 进行检测发现 17p 的 LOH 发生率更高. Fein et al^[11]对无 p53 基因的小鼠和正常基因型的小鼠进行食管空肠吻合术以造成胃肠内容物食管反流,发现所有小鼠均出现反流性食管炎,但 p53 基因缺失小鼠中 50% 发生 BE 及 EA,100% 发生上皮异型增生,而正常基因型小鼠无 1 例出现这些病变,证实 p53 基因在反流性食管炎并发 BE 及 EA 的过程中起非常重要的作用。

4.2 p16 基因 p16 基因(MTS1、CDKN2、INK4)是 1993 年发现的一个比 p53 更直接与正常细胞癌变有关的肿瘤抑制基因,定位于人类染色体 9p21,其缺失和突变与多种肿瘤的发生有关,又称为多瘤抑制基因. p16 蛋白能与细胞周期蛋白 D 竞争结合 CDK₄、₆. 而后者失活, G₁-S 期过渡取决于细胞周期蛋白 D 与 p16 蛋白的相对活性. 研究发现食管癌中 p16 不表达或低水平表达. 用 Southern blot 法测定发现食管癌 p16 基因纯合性缺失发生率极高(92%),其他研究发现食管腺癌中还可见 p16 基因突变及 LOH, p16 LOH 在 EA 中发生率为 89%^[10],但在 BE 及异型增生中较少见,说明 p16 LOH 在 BE 癌变过程中较晚出现。

4.3 p21 基因 p21(CIP1, WAF1)基因定位于染色体 6p21.2,启动区含有与 p53 及 TGF- β 等结合的特异序列,可被 p53 诱导并介导 p53 的抑癌功能,其 mRNA 的表达是受 p53 或其他外源性因子在转录水平调控的,主要功能在于参与 p53 介导的 DNA 损伤后细胞周期抑制及损伤修复^[12]. p21 还可不依赖 p53 而广泛地抑制各种细胞周期蛋白-CDK 复合物,其 C 末端可与 PCNA 结合,使 PCNA 不能与 DNA 聚合酶形成复合物,抑制 DNA 复制,从而使细胞周期停滞,以量的方式调节细胞周期和细胞分化. Khare et al^[13]用半定量 RT-PCR 及免疫组化的方法研究了大鼠食管癌变过程中 p21 的表达,发现癌前病变中 p21 表达比正常上皮少 1.6 倍,而乳头状瘤中减少 3.1 倍. 用免疫组化法研究人食管癌中 p21 表达发现 44% 有不同程度的阳性;同时发现所有 p53 突变的病例 p21 表达均阴性,而 18 例无 p53 突变的病例中 11 例有 p21 表达;研究 p21 与肿瘤分化程度的关系发现高分化的食管癌出现 p21 阳性表达,而低分化癌则 p21 表达阴性;p21 阳性的病例凋亡细胞明显更多,说明人食管癌中 p21 的表达受 p53 诱导,影响癌细胞的凋亡和分化^[14,15].

4.4 其他 食管腺癌中的抑癌基因变化常与食管鳞癌中所见相平行,还包括位于染色体 5q 的 APC 基因,13q 的 Rb 基因及 18q 的 DDC 基因. APC(adenomatous polyposis coli)基因的 LOH 在 80% 的 EA 中可观察到,Rb 基因的 LOH 率为 50%. Zhuang et al^[16]研究 12 个手术切除的含正常食管上皮、胃食管交界上皮、Barrett 上皮、异型增生及癌肿的食管标本,发现正常组织及远离异型增生的 Barrett 上皮中未发现 APC 杂合性缺失,与异型增生相邻的 Barrett 上皮以及异型增生和肿瘤中都可测定出 LOH,说明 APC 的 LOH 是 BE 恶变的早期事件. Blount et al^[17]研究了 14 例 BE 伴高度异型增生或腺癌的患者,发现与同时有 17p(p53)和 5q(APC)LOH 的细胞相邻的黏膜内可散见仅有 17p 等位基因缺失的细胞,但 17p 等位基因完整的细胞内不出现 5q 杂合性缺失,说明 BE 癌变过程中 17p 等位基因缺失先于 5q 发生,这与结肠癌中 5-17p 等位基因缺失的顺序相反.Rb

蛋白在 CDK- 细胞周期蛋白复合物的作用下于细胞周期的关键点 G₁/S 和 G₂/M 而起调节作用,他又反过来调节细胞周期蛋白和 p16 的转录.Rb 的失活与细胞周期蛋白 D 激活在食管癌中可共同存在,食管癌分子发病机制可能涉及 CDK₄/ 细胞周期蛋白 D₁、Rb 和 p16 负反馈调节通路的异常^[18].

5 PCNA 和 Ki-67 抗原

二者均为调节细胞周期存在于细胞核内的蛋白,其表达与细胞的增生周期有关.PCNA 为 DNA 聚合酶的附属蛋白,在正常细胞中与细胞周期蛋白、CDK 及 p21 组成复合物调节细胞由 G₁ 期向 S 期过渡,而 Ki-67 则在 G₁/S 及 G₂/M 转换期都可检测到变化,为 BE 和异型增生、EA 时细胞增生的有用指标.Kim et al^[7] 的前瞻性研究发现 PCNA 在食管 BE 高度异型增生上皮中阳性率最高,其次为低度异型增生,无异型增生的 BE 中 PCNA 表达水平最低.Kimura et al^[19] 的研究亦表明 PCNA 在癌前病变 BE 组表达高于良性 BE 组,而食管腺癌组又明显高于前两组.正常食管复层鳞状上皮中仅基底层细胞具增生性,正常胃黏膜的增生区限于腺体基底部,而 BE 上皮的腺泡及腺管下部均有 PCNA 和 Ki-67 的表达,Ki-67 阳性细胞百分率较正常胃黏膜高(33.5% 对 12.8%)^[20],而随 BE 的异型增生程度的加重,PCNA 和 Ki-67 阳性的增生细胞逐渐向腺管上部发展以至达上皮表面.

6 癌基因

癌基因与食管癌的发生关系研究大部分是关于食管鳞状细胞癌.在对 EA 的研究中,Meltzer et al^[21] 在 mRNA 水平检测癌基因 c-Ha-ras 发现在正常食管或 BE 上皮内均检测不到他的表达,其他研究亦证实 ras 基因家族突变并不发生于 BE 及其相关的肿瘤中,说明在结肠癌内高度表达的 c-Ha-ras 基因是高度组织特异性的,癌基因在 BE 相关的肿瘤中作用不大.Kim et al^[7] 用免疫组织化学的方法检测出 c-erbB-2 癌基因在高度异型增生的 BE 内(31%)及 AE 中(10%)的表达;另一研究却发现 c-erbB-2 蛋白过度表达仅发生在 EA 中(11%),且与 EA 的预后差有关,而其周围的异型增生及 BE 上皮内均无表达^[22].c-src,c-ras,c-jun 及 c-fos 等在食管化生上皮及 EA 中的检测研究很少见.

此外,还有许多基因的改变及表达异常亦与 GERD 发生化生及恶变有关,如表皮生长因子及其受体表达的增多,转化生长因子的过度表达^[23],细胞黏附分子(如 E-钙黏蛋白)表达的减少或缺失也可确定 BE 处于向肿瘤进展的危险阶段.目前 EA 预后很差,5a 生存率低于 15%,手术后平均生存期少于 2a,但经监测发现的较早期 EA 预后明显改善,治愈率可达 80-100%^[23],5a 生存率达 65-80%.故应对高危的 GERD、BE 患者,尤伴异型增生者进行监测,分子生物学指标监测及辅

助诊断因其简便、痛苦少、易重复等优点具有广泛前景.亦可据此研究抗癌的生物化学治疗.

总之,GERD 并发 BE、EA 是多基因改变及表达异常的综合结果.分子水平研究对 BE、异型增生及 EA 的早期准确的发现、监测、治疗及预后判断均有重要意义.

7 参考文献

- Locke GR, Talley NJ, Fett SL, Zinsmeister AR, Melton LJ. Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: a population based study in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 1997;112:1448-1456
- Montgomery EA, Hartmann DP, Carr NJ, Holterman DA, Sobin LH, Azumi N. Barrett esophagus with dysplasia: Flow cytometric DNA analysis of routine, paraffin-embedded mucosal biopsies. *Pathology* 1996;106:298-304
- Reid BJ, Blount PL, Rubin CE, Levine DS, Haggitt RC, Rabinovitch PS. Flow-cytometric and histological progression to malignancy in Barrett's esophagus: Prospective endoscopic surveillance of a cohort. *Gastroenterology* 1992;102:1212-1219
- Huang Y, Boynton RF, Blount PL, Silverstein RJ, Yin J, Tong Y, McDaniel TK, Newkirk C, Resau JH, Sridhara R. Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancers. *Cancer Res* 1992;52: 6525-6530
- Wang QS, Sabourin CL, Wang H, Stoner GD. Overexpression of Cyclin D1 and Cyclin E in N-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 1996;17: 1583-1588
- Bani-Hani K, Martin IG, Hardie LJ, Mapstone N, Briggs JA, Forman D, Wild CP. Prospective study of Cyclin D1 overexpression in Barrett's esophagus: association with increased risk of adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2000;92: 1316-1321
- Kim R, Clarke MR, Melhem MF, Young MA, Vanbibber MM, Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro U Jr, Reynolds JC. Expression of p53, PCNA, and C-erbB-2 in Barrett's metaplasia and adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 1997;42:2453-2462
- Hamelin R, Flejou JF, Muzeau F, Potet F, Laurent-Puig P, Fekete F, Thomas G. TP53 gene mutations and p53 protein immunoreactivity in malignant and premalignant Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1994;107:1012-1018
- Prevo LJ, Sanchez CA, Galipeau PC, Reid BJ. p53-mutant clones and field effects in Barrett's esophagus. *Cancer Res* 1999;59: 4784-4787
- Gonzalez MV, Artinez ML, Rodrigo L, Rodrigo L, Lopez-Larrea C, Menendez MJ, Alvarez V, Perez R, Fresno MF, Perez MJ, Sampedro A, Coto E. Mutation analysis of the p53, APC, and p16 genes in the Barrett's oesophagus, dysplasia, and adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 1997;50: 212-217
- Fein M, Fuchs KH, Stopper H, Diem S, Herderich M. Duodenogastric reflux and foregut carcinogenesis: analysis of duodenal juice in a rodent model of cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21:2079-2084
- Deiry WS. p21/p53, cellular growth control and genomic integrity. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998;227:121-137
- Khare L, Sabourin CL, DeYoung BR, Wagner BA, Stoner GD. Alterations in the expression of alpha6beta4 integrin and p21/Waf1/Cip1 in N-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis. *Mol Carcinog* 1998;21:185-193
- Ohashi K, Nemoto T, Eishi Y, Matsuno A, Nakamura K, Hirokawa K. Expression of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in oesophageal squamous cell carcinomas. *Virchows Arc* 1997;430:389-395
- Hanas JS, Lerner MR, Lightfoot SA, Raczkowski C, Kastens DJ, Brackett DJ, Postier RG. Expression of the Cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1) and p53 tumor suppressor in dysplastic progression and adenocarcinoma in Barrett esophagus. *Cancer* 1999;86: 756-763
- Zhuang Z, Vortmeyer AO, Mark EJ, Odze R, Emmert-Buck MR, Merino MJ, Moon H, Liotta LA, Duray PH. Barrett's esophagus:

- Metaplastic cells with loss of heterozygosity at the APC gene locus are clonal precursors to invasive adenocarcinoma. *Cancer Res* 1996;56:1961-1964
- 17 Blount PL, Meltzer SJ, Yin J, Huang Y, Krasna MJ, Reid BJ. Clonal ordering of 17p and 5q allelic losses in Barrett's dysplasia and adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3221-3225
- 18 Fong LY, Nguyen VT, Farber JL, Huebner K, Magee PN. Early deregulation of the p16ink4a-cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4-retinoblastoma pathway in cell proliferation-driven esophageal tumorigenesis in zinc-deficient rats. *Cancer Res* 2000; 60: 4589-4595
- 19 Kimura H, Konishi K, Maeda K, Yabushita K, Kuroda Y, Tsuji M, Miwa A. Flow cytometric analysis and immunohistochemical staining for the p53 protein and proliferating cell nuclear antigen in submucosal carcinoma of the esophagus. *Hepatogastroenterology* 1999;46:285-289
- 20 Gray MR, Hall PA, Nash J, Ansari B, Lane DP, Kingsnorth AN. Epithelial proliferation in Barrett's esophagus by proliferating cell nuclear antigen immunolocalization. *Gastroenterology* 1992;103: 1769-1776
- 21 Meltzer SJ, Yin J, Manin B, Rhyu MG, Cottrell J, Hudson E, Redd JL, Krasna MJ, Abraham JM, Reid BJ. Microsatellite instability occurs frequently and in both diploid and aneuploid cell populations of Barrett's associated esophageal adenocarcinomas. *Cancer Res* 1994;54:3379-3382
- 22 Flejou JF, Paraf F, Muzeau F, Fekete F, Henin D, Jothy S, Potet F. Expression of c-erbB-2 oncogene product in Barrett's adenocarcinoma: Pathological and prognostic correlations. *J Clin Pathol* 1994;47:23-26
- 23 Wang QS, Sabourin CL, Bijur GN, Robertson FM, Stoner GD. Alterations in transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor expression during rat esophageal tumorigenesis. *Molecul Carcinog* 1996;15:144-153

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台

World Journal of Gastroenterology (ISSN 1007-9327 CN 14-1219/R) 2003 年由双月刊改为月刊, 加快刊出周期, 展示我国在国际上的食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、Hp 等方面基础和临床研究的成果。

WJG 1998 年被美国科学引文索引(SCI-E)收录。SCI-E 收录文献的作者、题目、源期刊、摘要、关键词等以外, 还收录论文的参考文献, 从而把一篇论文和其他论文之间有意义的联系勾画出来, 也就是把发表论文的两位作者和两位作者群体之间的学术联系显示出来等特点。作为一种比较客观和定量的评价方式之一, 已愈来愈受到科学界的重视。当 WJG 出版 20 天后, 国际上的胃肠病学和肝病专家即可在 ISI Web of SCIENCE(<http://www.isinet.com/isi/journals/index.html>)上看到论文的摘要、参考文献、被引用的次数、关键词、单位名称、通讯地址等信息。

WJG 1998 年被美国《医学索引》(Index Medicus / MEDLINE)收录。WJG 电子版摘要及全文在印刷版出版前 15 天, 国际上的胃肠病学和肝病专家即可在 PubMed(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>)上阅读到论文的摘要及全文, 包括彩色、黑白、线条图照片。世界胃肠病学杂志社将 WJG 和世界华人消化杂志出版的过刊和现刊全部放在 www.wjgnet.com 上供国际和国内消化病学者免费使用。WJG 是惟一全面反映我国消化学专家研究成果的平台之一, 让世界更多的学者在 PubMed 或 www.wjgnet.com 上免费看到来自我国胃肠病学和肝病专家撰写的具有中国特色的创新原始论文。

总之, WJG 提供了一个与世界胃肠病学和肝病专家进行有效的学术交流平台, 促进消化病学研究成果的快速发展。