

胃肠道间质瘤端粒酶活性与细胞凋亡及 p53、Bcl-2 表达的关系

王 强, 孙 威, 秦 晔, 于泽成, 朱 健

王强, 孙威, 中国医科大学附属二院普外三科 辽宁省沈阳市 110004
秦晔, 辽宁中医学院附属医院普通外科 辽宁省沈阳市 110032
于泽成, 沈阳市第一人民医院外科 辽宁省沈阳市 110041
朱健, 沈阳市第五人民医院外科 辽宁省沈阳市 110023
项目负责人: 王强, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属二院普外三科. wangqiang2003_31
电话: 024-83955060 传真: 024-23929897
收稿日期: 2003-10-30 接受日期: 2003-12-16

摘要

目的: 探讨端粒酶活性、细胞凋亡及 p53、Bcl-2 基因表达与胃肠道间质瘤(GIST)生物学行为的关系。

方法: 分别采用端粒酶活性试剂盒、原位末端标记和免疫组织化学的方法对 38 例 GIST 标本进行端粒酶活性、细胞凋亡和 p53、Bcl-2 基因表达的检测, 并结合临床病理资料进行分析。

结果: GIST 端粒酶活性阳性率在恶性中为 85%(17/20), 在潜在恶性中为 22.8%(2/9), 在良性中为 0(0/9)($P < 0.01$); GIST 细胞凋亡指数在恶性中为 11.7 ± 5.4 , 在潜在恶性中为 30.2 ± 5.6 , 在良性中为 45.2 ± 7.2 ($P < 0.05$); 端粒酶阳性组细胞凋亡指数为 9.5 ± 5.7 , 阴性组为 22.9 ± 8.4 ($P < 0.01$); 端粒酶阳性组 p53 阳性表达率为 78.9%, 阴性组为 40.0% ($P < 0.05$); 端粒酶阳性组 Bcl-2 阳性表达率为 84.2%, 阴性组为 40.0% ($P < 0.05$)。

结论: 端粒酶活性、细胞凋亡与 GIST 良恶性有关, 他们的检测有助于 GIST 的临床病理诊断。

王强, 孙威, 秦晔, 于泽成, 朱健. 胃肠道间质瘤端粒酶活性与细胞凋亡及 p53、Bcl-2 表达的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(4):995-997
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/995.asp>

0 引言

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GIST)这一概念由 Mazur et al^[1]于 1983 年首先提出, 认为此类肿瘤起源于胃肠道固有肌层和黏膜肌层, 由梭形细胞和上皮细胞组成, 并根据其分化的不同及免疫组织化学检查结果分为肌肉型、神经型、混合型和未定型. GIST 最终诊断有赖于术后标本的病理学检查和具有特征的免疫组织化学标记物酪氨酸激酶生长因子受体(CD117 或 C-kit)和骨髓干细胞抗原(CD34)的检测. 近年来国内外对其研究逐渐增多^[1-7]. 本文通过检测 GIST 中端粒酶活性、细胞凋亡及调节基因 p53、Bcl-2 表达, 探讨其临床病理意义以及他们之间的相互关系。

1 材料和方法

1.1 材料 从我院 1996-06/2002-06 手术切除的 GIST 病例中选择诊断明确、病历完整者 38 例. 本组病例标本重新调出后, 均经同一病理医师进行复查并作免疫组织化学检测 CD117 和 CD34, 结果 CD117 阳性率为 92.1%(35/38), CD34 阳性率为 86.8%(33/38). 本组中男 23 例, 女 15 例. 27-74 岁, 平均 52.6 岁. 肿瘤部位: 胃 17 例, 小肠 11 例, 结直肠 10 例. 按纪小龙 et al^[8]提出的 GIST 分类标准, 区分为良性 GIST 9 例, 潜在恶性 GIST 9 例, 恶性 GIST 20 例. 另取 10 例正常胃肠道平滑肌组织(NSMT)作为对照, 取自胃肠道良性病变手术切除标本, 远离病变部位取材, 其中胃标本 5 例、肠标本 5 例. 标本一部分放置 -80℃低温冰箱保存, 一部分标本经 100 mL/L 甲醛溶液固定、石蜡包埋、制成 5 μm 厚组织切片. (1)试剂: 端粒酶检测试剂购于军事医学科学院放射医学研究所; 细胞凋亡检测试剂、p53、Bcl-2 单克隆抗体、生物素标记二抗购于武汉博士德生物工程公司; S-P 试剂盒为 ZYMED 公司产品. (2)方法: 端粒酶活性检测: 按试剂盒说明进行操作, 具体步骤: 取约 30-50 mg 组织, 剪碎, 裂解, 离心, 取上清. 在反应管中依次加入 TRAP 混合物 25 μL, Taq 酶 0.2 μL, 细胞提取液 1 μL, 混匀, 30℃保温 30 min, 反向引物 0.5 μL, 在 DNA 合成仪上进行 PCR 扩增. 反应条件为: 94℃变性 30 s, 35℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 循环 30 次. PCR 反应产物在 120 mg/L 聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 硝酸银染色. 细胞凋亡检测: 采用原位末端标记法, 具体步骤: 玻片预先用 0.1 g/L 多聚赖氨酸处理; 切片常规脱蜡至水化, 30 mL/L H₂O₂ 10 min, 蒸馏水洗 3 次; TBS 1:100 稀释的蛋白酶 K, 37℃, 15 min, 蒸馏水洗 2 min × 3 次; TdT 和 DIG-dUTP 湿盒中 37℃, 90 min; TBS 冲洗 6 min, 封闭液 20 min; 1:100 抗-DIG-BIOTIN 37℃, 湿盒中 30 min, TBS 洗 3 min × 3 次; DAB 显色避光 10-30 min, 水洗; 苏木精复染后脱水、透明、明胶封固. p53、Bcl-2 检测: 采用免疫组织化学 S-P 法, 按试剂盒说明进行操作. 结果判断: 端粒酶活性判断标准: 出现“梯形”条带者为阳性; 细胞凋亡判断标准: 以细胞核中有棕黄色颗粒、背景清晰者为阳性细胞, 由于后期 DNA 片段可透过核膜扩散至胞质, 故胞质亦可呈阳性. 400 倍显微镜下, 在标记良好区域选择 10 个视野计数, 每个视野计数 100 个细胞. 凋亡指数(API)=阳性细胞总和/1000 × 100%; p53、Bcl-2 判断标准: p53 蛋白表达于细胞核, Bcl-2 蛋白表达于细胞质, 均显示为棕黄色, 以着色细胞大于 20% 为阳性表达。

统计学处理 采用 χ^2 、t检验。

2 结果

2.1 端粒酶及细胞凋亡表达的检测结果 恶性GIST端粒酶阳性表达率明显高于潜在恶性GIST、良性GIST和NSMT(χ^2 检验, $P < 0.01$); 从NSMT、良性GIST、潜在恶性GIST到恶性GIST, 其API依次明显递减(先行方差齐性检验, 本组数据方差齐, 然后行t检验, $P < 0.05$) (表1)。

表1 端粒酶活性、细胞凋亡在NSMT、GIST中的表达

组别	n	端粒酶		API
		阳性(n)	阳性率(%)	(mean \pm SD)
NSMT	10	-	-	72.1 \pm 9.3
良性GIST	9	-	-	45.2 \pm 7.2
潜在恶性GIST	9	2	22.8	30.2 \pm 5.6
恶性GIST	20	17	85.0	11.7 \pm 5.4

2.2 GIST中端粒酶活性与细胞凋亡及p53、Bcl-2表达的关系 GIST中端粒酶阳性组API明显低于阴性组(先行方差齐性检验, 本组数据方差齐, 然后行t检验, $P < 0.01$), 二者间呈显著负相关; GIST中端粒酶阳性组p53阳性表达率明显高于阴性组(χ^2 检验, $P < 0.05$), 二者间呈显著正相关; GIST中端粒酶阳性组Bcl-2阳性表达率明显高于阴性组(χ^2 检验, $P < 0.05$), 二者间呈显著正相关(表2)。

表2 GIST中端粒酶活性与细胞凋亡及p53、Bcl-2表达的关系

组别	n	API (mean \pm SD)	p53 阳性表达率	Bcl-2 阳性表达率
端粒酶阳性组	19	9.5 \pm 5.7 ^a	78.9% ^b	84.2% ^b
端粒酶阴性组	19	22.9 \pm 8.4	40.0%	40.0%

^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$ vs 阴性组。

3 讨论

端粒酶是一种包含自身模板RNA的核蛋白体。活性状态下能发挥逆转录酶的作用, 特异性延长染色体末端端粒的重复DNA序列, 从而抵消或延缓端粒在正常情况随细胞分裂次数的增加而不断短缩的变化, 使细胞发生永生或恶变^[9-13]。近年来大量实验研究表明, 多数恶性肿瘤端粒酶活性阳性^[14-18], 而良性肿瘤和正常体细胞中除少数生殖细胞、造血干细胞、生发层细胞具有端粒酶活性外, 均检测不到端粒酶活性^[19-23]。端粒酶的这一特性使其敏感性和特异性超过以往任何肿瘤指标, 提示其在临床鉴别诊断和推测预后方面作用巨大。有关端粒酶与GIST的研究较少, 本组中20例恶性GIST组织中端粒酶阳性表达率为85% (17 / 20), 这一结果与Shay et al^[15]报道的人类肿瘤平均端粒酶阳性率相近, 说明端粒酶也是恶性GIST较为理想的标记物。15%(3/20)

的恶性GIST组织未检测到端粒酶阳性表达, 可能是因为存在“端粒酶旁路”机制或者可能端粒的短缩尚不足以激活端粒酶^[16-17]。在潜在恶性GIST中有2例检测到端粒酶阳性表达, 对这2例标本进行了必要的重复检测及稀释后检测, 其结果一致, 不是假阳性, 因此对这2例应密切追踪观察, 以注意其有无恶变。上述研究结果说明端粒酶活性检测可以鉴别良恶性GIST。

细胞凋亡又称程序性细胞死亡, 是指在一定生理和病理情况下, 机体为维护内环境稳定, 通过基因调控而使细胞自动消亡的过程。细胞凋亡在维持组织、器官的正常形态和功能方面起着重要的作用。若基因突变使凋亡调控信号下调, 则发生突变的细胞得以生存, 并可异常增生, 最终形成肿瘤。有研究表明^[24-30]: 细胞凋亡与肿瘤的发生、发展和转归密切相关。有关GIST细胞凋亡的研究较少, 本研究显示细胞凋亡与GIST良恶性呈显著的负相关, 即随着GIST良恶性的改变, 其细胞凋亡越来越少。

细胞每分裂一次, 端粒的长度就相应的缩短, 但端粒缩短到一定程度时, 一方面细胞失去分裂能力而发生凋亡, 而另一方面细胞中的端粒酶可能被激活, 使端粒功能得以恢复^[31], 这就是端粒酶与凋亡之间内在和必然的联系。我们将二者结合起来进行研究显示: GIST端粒酶活性与细胞凋亡之间呈显著负相关, 即肿瘤细胞端粒酶活性越高, 其细胞凋亡越少; 相反, 肿瘤细胞端粒酶活性降低, 其细胞凋亡则增加。

本研究同时还显示凋亡调节基因p53、Bcl-2表达与端粒酶活性呈显著正相关, 即p53、Bcl-2过表达时端粒酶活性增强, 这一结果与有的文献^[17, 21]报道相符, 但也有的文献^[22-23]报道其表达水平与端粒酶活性无关。

总之, 通过GIST中端粒酶活性与细胞凋亡及调节基因的检测, 可为其良恶性鉴别及预后判断提供帮助。同样以端粒酶和细胞凋亡为靶点, 筛选合适的治疗方式针对性地治疗GIST也可望成为一大措施。当然, 由于本组病例数较少, 加之端粒酶活性与细胞凋亡之间的联系可能十分复杂, 其具体情况如何尚有待于我们今后通过细胞系的研究来进一步加以证实。

4 参考文献

- Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors: reappraisal of histogenesis. *Am J Pathol* 1983;7:507-519
- 万德森. 提高对胃肠道间质瘤的诊治水平. *中华胃肠外科杂志* 2003;6:285-287
- 万德森, 伍小军, 梁小曼, 罗容珍, 潘志忠, 陈功, 卢震海, 丁培荣. 胃肠道间质瘤的外科治疗. *中华胃肠外科杂志* 2003;6:288-291
- 张成武, 赵大建, 邹寿椿, 裘华森. 胃肠道间质瘤的诊断和治疗. *中华胃肠外科杂志* 2003;6:292-294
- 张森, 万德森. 胃肠道间质瘤的诊治进展. *中华胃肠外科杂志* 2003;6:347-349
- Yan H, Marchettini P, Acherman YI, Gething SA, Brun E, Sugarbaker PH. Prognostic assessment of gastrointestinal stromal tumor. *Am J Clin Oncol* 2003;26:221-228
- Kitamura Y, Hirota S, Nishida T. Gastrointestinal stromal tumors(GIST): A model for molecule-based diagnosis and treatment of solid tumors. *Cancer Sci* 2003;94:315-320

- 8 纪小龙, 赵海路. 胃肠道平滑肌肿瘤的新认识. 华人消化杂志 1998;6:625-627
- 9 方向明, 于皆平, 罗和生. 大肠癌 hTERT 和 P16 表达与端粒酶活性的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:12-14
- 10 杨仕明, 房殿春, 杨金亮, 罗元辉, 鲁荣, 刘为纹. hTERT 反义基因对胃癌细胞端粒酶及凋亡相关基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2002;10:149-152
- 11 李贵新, 李国庆, 赵常在, 徐功立. 胃癌组织端粒酶 hTERT 与抑癌基因 P53 和 P16 表达的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:591-593
- 12 于会生, 郑国升, 孙金珍, 邵群熬, 许迎霞, 刘红凌, 李华, 任冬霞, 李素敏, 黄明周. 食管癌前病变中端粒酶的检测及意义. 世界华人消化杂志 2003;11:342-343
- 13 Kim NW. Clinical implications of telomerase in cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33:781-786
- 14 Dahse R, Fiedler W, Ernst G. Telomeres and telomerase: biological and clinical importance. *Clin Chem* 1997;43:708-714
- 15 Shay JW, Baccetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997;33:787-791
- 16 Zakian VA. Life and cancer without telomerase. *Cell* 1997;91:1-3
- 17 马晋平, 詹文华. 端粒、端粒酶与消化道肿瘤. 国外医学外科分册 1997;24:194-197
- 18 Nowak J, Januszkiewicz D, Lewandowski K, Nowicka-Kujawska K, Pernak M, Rembowska J, Nowak T, Wysocki J. Activity and expression of human telomerase in normal and malignant cells in gastric and colon cancer patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:75-80
- 19 Usselmam B, Newbold M, Merris AG, Nwokolo CU. Telomerase activity and patient survival after surgery for gastric and oesophageal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:903-908
- 20 Goytisolo FA, Samper E, Martin-Caballero J, Finnon P, Herrera E, Flores JM, Bouffler SD, Blasco MA. Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals. *J Exp Med* 2000;192:1625-1636
- 21 Mandal M, Kumar R, Pouock RE. Bcl-2 modulates telomerase activity. *J Biol Chem* 1997;272:14183-14187
- 22 Milas M, Yu D, Sun D, Pouock RE. Telomerase activity of sarcoma cell lines and fibroblasts is independent of p53 status. *Clin Cancer Res* 1998;4:1573-1579
- 23 Oishi T, Kigawa J, Minagawa Y, Shimada M, Takahashi M, Terakawa N. Alteration of telomerase activity associated with development and extension of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1998;91:568-571
- 24 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501
- 25 Terada T, Nakanuma Y. Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile duct development. *Am J Pathol* 1995;146:67-74
- 26 全俊, 胡国龄, 范学工, 谭德明. 丙型肝炎病毒核心区蛋白和细胞凋亡对 HepG₂ 细胞周期的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:350-352
- 27 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 高晋华, 王振华. 幽门螺杆菌诱导胃黏膜上皮细胞凋亡和增生与 p53 基因表达. 世界华人消化杂志 2001;9:1265-1268
- 28 潘传敬, 刘宽宇. 胃癌增生凋亡与调节基因的表达. 世界华人消化杂志 2003;11:526-530
- 29 王剑明, 邹倩, 邹生泉. 阻塞性黄疸大鼠肝组织 Bcl-2 及 Bax 的表达与细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2001;9:911-914
- 30 袁荣文, 丁庆, 姜汉英, 覃修福, 邹生泉, 夏穗生. 胰腺癌 Bcl-2, p53 蛋白表达和细胞凋亡. 世界华人消化杂志 1999;7:851-854
- 31 Wright WE, Brasiskyte D, Piatyszek MA, Shay JW. Experimental elongation of telomeres extends the lifespan of immortal normal cell hybrids. *EMBO J* 1996;15: 1734-1741

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

不同消化道癌对化疗药物敏感性的应用研究

王崇树, 魏寿江, 赵国刚, 侯华芳

王崇树, 魏寿江, 赵国刚, 侯华芳, 川北医学院附属医院普外科
四川省南充市 637000
四川省卫生厅 2001 年 /2004 年度科学基金资助课题, No. 2001(41)
项目负责人: 王崇树, 637000, 四川省南充市, 川北医学院附属医院普外科.
chongs-wang@163.com
电话: 0817-2262082
收稿日期: 2003-06-05 接受日期: 2003-07-08

摘要

目的: 通过常见消化道癌对不同抗癌药物以及不同联合用药方案的敏感性作比较, 以期寻找各自的合理的化疗用药方案, 从而指导不同消化道癌的化疗。

方法: 通过肿瘤细胞体外药敏试验(即四甲基偶氮唑盐着色法. MTT), 对 97 例食管癌、116 例胃癌、34 例肝癌以及 169 例大肠癌新鲜标本进行化疗药物敏感性检测, 并对其结果作比较。

结果: 除对丝裂霉素(mitomycin C, MMC)、顺氯氨铂(cisplatin, DDP)、5- 氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU) 加 DDP 的敏感性无差异外(P >0.05), 对其余所有药物的敏感

性均有显著性差异(P <0.01), 其中, 食管癌、胃癌及大肠癌均对 5-FU 加羟基喜树碱(hydroxycamptothecine. HCPT. OPT)、5-FU 加 MMC 最敏感, 其敏感率分别为 79.4% 和 73.2%、78.4% 和 62.7%、60.4% 和 55.6%, 肝癌则对 5-FU 加 MMC 及 5-FU 加柔红霉素(aunorubicin, DNR)最敏感, 其敏感率分别为 70.5% 和 79.4%。

结论: 不同的消化道肿瘤对不同抗癌药物的敏感性存在差异, 且联合药物的敏感性优于单药。

王崇树, 魏寿江, 赵国刚, 侯华芳. 不同消化道癌对化疗药物敏感性的应用研究. 世界华人消化杂志 2004;12(4):997-999

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/997.asp>

0 引言

如何选择对某一种具体肿瘤有效的抗癌药物, 提高术后化疗效果, 并寻找用药规律, 一直是临床肿瘤化疗界关注的问题. 我们采用 MTT 法对 416 例不同消化道癌