

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)08-0737-03

胃癌组织 *Fas* 基因表达与细胞凋亡和增殖的关系刘海峰<sup>1</sup>, 刘为纹<sup>2</sup>, 陈刚<sup>2</sup>, 汪兴伟<sup>2</sup>, 姜利国<sup>1</sup>( <sup>1</sup>武警总医院消化科, 北京 100039; <sup>2</sup>第三军医大学西南医院全军消化内科中心, 重庆 400038 )Relationship between *Fas* gene expression and cell proliferation and apoptosis in gastric cancer tissueLIU Hai-Feng<sup>1</sup>, LIU Wei-Wen<sup>2</sup>, CHEN Gang<sup>2</sup>, WANG Xing-Wei<sup>2</sup>, JIANG Li-Guo<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Gastroenterology, General Hospital, Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China; <sup>2</sup>PLA Center of Digestive Medicine, Xi'an Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

**【Abstract】** AIM: To investigate the relationship between *Fas* gene expression level in human gastric carcinomas and the frequency of cell proliferation activity and the apoptosis of the tumor cells. METHODS: *In situ* hybridization and immunohistochemistry methods were used to study the frequencies of expression of *Fas* gene and proliferating cell antigen (PCNA) in 53 gastric carcinomas. An *in situ* apoptotic cell detection method (TUNEL method) was also adopted to detect the apoptotic cells. The number of apoptotic cells and PCNA cells was compared with the *Fas* protein expression in each case. RESULTS: Of the 53 gastric carcinomas, 28(52.8%) and 24(45.3%) expressed *Fas* mRNA and *Fas* protein respectively. There was no significant difference in the positivity rates obtained by these 2 methods. The apoptotic index and PCNA index of gastric carcinomas were correlated negatively ( $r = -0.982, P < 0.01$ ). With the increase in the expression of *Fas* protein, the cell proliferating activity decreased and apoptosis increased in the tumor cells. There was significant difference in apoptosis indices between *Fas* protein +++ group and -/+ group ( $P < 0.01$ ). The PCNA index in *Fas* protein group was significantly higher than that in ++ and +++ groups ( $P < 0.01$ ). CONCLUSION: *Fas* gene can promote apoptosis and inhibit cell proliferation in the devel-

opment and malignant progression of gastric carcinomas.

**【Keywords】** stomach neoplasms; *fas* gene; apoptosis; cell differentiation

**【摘要】**目的:探讨 *Fas* 基因表达水平与胃癌细胞增殖活性及细胞凋亡程度的关系。方法:胃癌组织 53 例,用原位杂交及免疫组化染色法分别检测 *Fas* mRNA、*Fas* 蛋白和增殖细胞核抗原(PCNA)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:胃癌组织表达 *Fas* mRNA 28 例(52.8%),表达 *Fas* 蛋白 24 例(45.3%),两种方法检测结果一致性非常显著( $P < 0.01$ )。胃癌 53 例增殖期细胞标记物 PCNA 表达及凋亡细胞的阳性率均为 100%,细胞凋亡和细胞增殖指数呈显著性负相关( $r = -0.982, P < 0.01$ )。随胃癌细胞 *Fas* 蛋白表达水平升高,PCNA 阳性细胞指数相应减少,肿瘤凋亡细胞指数则相应增加。*Fas* 蛋白+++组细胞凋亡指数显著高于-/+组( $P < 0.01$ ),*Fas* 蛋白组 PCNA 指数显著高于++/+++组( $P < 0.01$ )。结论:胃癌细胞 *Fas* 基因表达可引起细胞凋亡增加与增殖减少。

**【关键词】**胃肿瘤; *Fas* 基因; 细胞凋亡; 细胞分化

**【中图分类号】** R735.2

**【文献标识码】** A

## 0 引言

胃癌的发生发展与肿瘤细胞增殖及其凋亡有关系。*Fas* 抗原可介导细胞凋亡,在胃癌及胃癌前病变组织中均有表达,参与细胞凋亡的调控<sup>[1,2]</sup>。我们采用 mRNA 原位杂交和免疫组织化学染色技术检测胃癌组织中 *Fas* 基因表达,并应用细胞凋亡原位检测方法和免疫组化染色对胃癌组织中细胞凋亡、增殖的情况进行观察,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** 1994/1996 年胃远端癌手术切除标本 53 例,术前均未接受放疗或免疫治疗。每份标本的一半立即用冷冻包埋剂(OCT)包埋,液氮快速冷冻, -70℃ 冰箱保存。另一半组织标本经 40 g/L 甲醛固定,石蜡包埋 4 μm 厚连续切片,并经 HE 染色病理诊断证实。原位杂交前,将冷藏标本取出复温至 -23℃,用恒冷切片机制 6 μm 连续冷冻切片,室温

收稿日期 2004-11-29; 修回日期 2005-02-10

基金项目“军队医药卫生”九五“重点课题(96Z047);重庆市应用基础研究基金(1998-06)

通讯作者: 刘海峰(1965-)男(汉族),河北省景县人,博士,副主任医师,副教授,硕士生导师。Tel. (010)88276549 Email. haifengliu333@hotmail.com

干燥 10 min, -70℃ 保存备用。PCNA 及 Fas 多克隆抗体均购自 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'-GTGTTTCAG-GATTTAAGGTTGGAGATT-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

载玻片上涂多聚赖氨酸(1 g/L), 室温干燥, 石蜡组织贴于载玻片上, 65℃ 烤片 3 h, 二甲苯脱蜡, 乙醇逐级入水, 100 mg/L 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: 1 g/L 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, 200 mg/L ssDNA) 42℃ 预杂交 2 h, 吸弃载玻片上预杂交液, 每片滴加杂交液 50 μL, 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。显色满意后水洗终止, 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

石蜡切片免疫组化染色按 SP 法进行, 抗 PCNA 及 Fas 多抗 1:100 稀释。以 PBS 替代一抗作为空白对照, 正常血清替代一抗作为替代对照, 用已知阳性切片作为阳性对照。光镜下计数 Fas mRNA 和蛋白阳性肿瘤细胞数, 将其分为 4 个等级: - 无阳性细胞; + 阳性细胞 < 25%; ++ 阳性细胞占 25 ~ 50%; +++ 阳性细胞 > 50%。

### 1.2.3 TUNEL 染色

石蜡切片 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 DNase I 预处理 10 min, 再接上述染色步骤。光镜下观察 TUNEL 染色及 PCNA 免疫组化染色切片的显色反应, 数 5 个以上高倍视野, 不少于 500 个细胞, 计数阳性细胞数, 分别作为 TUNEL 阳性细胞(凋亡细胞)指数及 PCNA 阳性细胞(增殖细胞)指数。

统计学处理: 采用  $\chi^2$  检验、方差分析和 Spearman 秩相关分析进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 Fas mRNA 及其蛋白的表达

在胃癌组织中 Fas mRNA 原位杂交阳性信号为紫蓝色或棕蓝色颗粒, 主要集中在胞质内(Fig 1A)。Fas 蛋白免疫组化阳性信号呈棕黄色颗粒, 位于细胞质内和(或)细胞膜上, 未见核内表达(Fig 1B)。在 53 例胃癌中, 有 28 例(52.8%)不同程度地表达 Fas mRNA, Fas mRNA -, +, ++, +++ 者分别占 47.2%, 18.9%, 15.1% 和 18.9%。不同程度地表达 Fas 蛋白 24 例(45.3%), Fas 蛋白 -, +, ++, +++ 者分别占 54.7%, 15.1%, 17.0% 和 13.2%。经一致性检验表明, 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( $P < 0.01$ ), 在 53 例标本中两种方法检测结果一致者占 84.9%。

### 2.2 胃癌细胞凋亡和增殖与 Fas 蛋白表达的关系

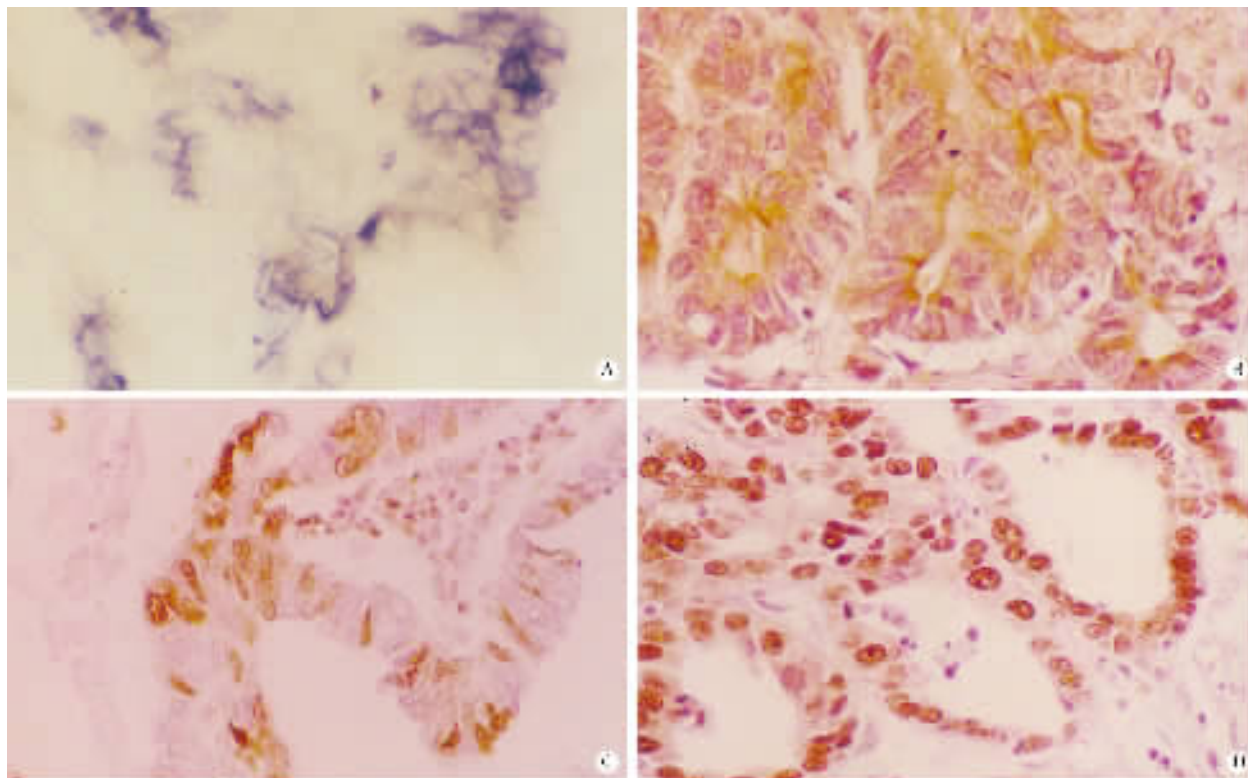
TUNEL 染色阳性反应物质呈棕黄色, 位于细胞核内, 浓缩的核质紧贴于核膜, 或核质呈现均匀的染色, 凋亡细胞呈弥漫性、簇状和(或)散在分布(Fig 1C); 未凋亡细胞非特异性染色极浅, 而坏死组织染色呈片状, 细胞轮廓不清, 染色呈均一深染的棕黄色斑片。PCNA 染色阳性物质呈棕黄色颗粒状均匀分布, 主要位于细胞核内, PCNA 阳性细胞在胃癌组织中呈弥漫性分布(Fig 1D)。53 例胃癌细胞凋亡和 PCNA 表达的阳性率均为 100%, 细胞凋亡指数为 5.8%, PCNA 指数为 47.5%。秩相关分析证实两者间呈显著性负相关( $r_s = -0.982, P < 0.01$ )。PCNA 阳性指数随胃癌细胞 Fas 蛋白表达水平升高而相应减少, 细胞凋亡指数随胃癌细胞 Fas 蛋白表达水平升高而相应增加。Fas 蛋白+++组细胞凋亡指数显著高于-组与+组( $P < 0.01$ ), 亦高于++组, 但相差无统计学意义。Fas 蛋白-组 PCNA 指数显著高于++组与+++组( ), 亦高于+组, 但相差无统计学意义(Tab 1)。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。

表 1 胃癌组织 Fas 蛋白表达与细胞凋亡和增殖的关系

Tab 1 Relationship between Fas protein expression and cell apoptosis and proliferation (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

Fas protein expression	n	Apoptotic index	PCNA index
-	29	3.8 ± 2.1	59.4 ± 14.6 <sup>d</sup>
+	8	5.2 ± 2.0	49.6 ± 11.5
++	9	8.0 ± 2.2	38.2 ± 9.0
+++	7	9.6 ± 2.4 <sup>b</sup>	33.4 ± 6.2

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs - and +; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs ++ and +++.



A : Fas mRNA ( ISH ) B : Fas protein ( SP ) C : TUNEL signals ( TUNEL ) D : PCNA ( SP ) .

Fig 1 *Fas* gene expression and apoptosis/ PCNA in gastric carcinoma tissue ×200

图1 胃癌组织 *Fas* 表达与细胞凋亡/增殖

### 3 讨论

胃癌发生发展可能伴随一系列基因的改变,进一步探讨胃癌组织 *Fas* 基因表达水平与胃癌细胞增殖活性及细胞凋亡程度的关系,有助于揭示胃癌发生的机制。在非淋巴系恶性肿瘤中的许多肿瘤细胞有广泛的 *Fas* 抗原表达,如结肠癌、乳腺癌、肝癌、肾细胞癌、膀胱癌、前列腺癌、恶性胶质瘤等<sup>[3]</sup>。*Fas* 抗原在胃癌和胃癌前病变组织中亦有表达<sup>[2]</sup>。我们发现,胃癌细胞普遍存在 *Fas* 蛋白翻译及核酸转录水平的异常表达,可能与胃癌的发生、发展及浸润性生长密切相关。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<sup>[4]</sup>,但其机制尚不明确。本结果提示,*Fas* 基因表达异常增加可促进胃癌细胞凋亡,促进强度随胃癌细胞 *Fas* 基因表达水平升高而相应增加。我们认为在胃癌发生发展过程中,*Fas* 基因表达减少或丢失可能是胃癌细胞逃避凋亡、无限增殖的机制之一。

### 【参考文献】

- [ 1 ] De Luca A , Laquinto G. *Helicobacter pylori* and gastric diseases : A dangerous association [ J ]. *Cancer Lett* 2004 213( 1 ) 1 - 10.
- [ 2 ] 刘海峰,刘为纹,房殿春. 胃癌前组织和胃癌中 *Fas* 基因表达及其与细胞凋亡的关系[ J ]. 第三军医大学学报, 2001, 23( 9 ) : 1018 - 1020.  
Liu HF, Liu WW, Fang DC. *Fas* gene expression and its relationship with apoptosis in human gastric carcinoma and precancerous lesions [ J ]. *Third Mil Med Univ* 2001 23( 9 ) 1018 - 1020.
- [ 3 ] Lim SC. *Fas*-related apoptosis in gastric adenocarcinoma[ J ]. *Oncol Rep* 2003 10( 1 ) 57 - 63.
- [ 4 ] 刘海峰,刘为纹,房殿春,等. 幽门螺杆菌感染与胃癌前病变演化的关系[ J ]. 世界华人消化杂志 2002 10( 8 ) 912 - 915.  
Liu HF, Liu WW, Fang DC *et al.* Relationship between *Helicobacter pylori* infection and gastric precancerous lesions : A follow-up study [ J ]. *World Chin Digest* 2002 10( 8 ) 912 - 915.

编辑 许昌泰