

胃癌变前后凋亡相关蛋白和PCNA的表达

伍银桥, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 祝庆孚

伍银桥, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 中国人民解放军总医院南楼消化科北京市 100853
祝庆孚, 中国人民解放军总医院病理科 北京市 100853
伍银桥, 男, 1964-12-01 生, 湖北省京山县人, 汉族. 1997 年军医进修学院硕士, 主要从事胃癌及癌前病变中癌相关基因异常的研究.
军队“十五”重点科研基金资助项目, No.01Z035
项目负责人: 王孟薇, 100853, 北京市复兴路 28 号, 中国人民解放军总医院南楼消化科. wu_yq56@hotmail.com
电话: 010-66937393 传真: 010-66935470
收稿日期: 2003-12-17 接受日期: 2004-02-01

Expression of apoptosis-related proteins and proliferating cell nuclear antigen during stomach canceration

Yin-Qiao Wu, Meng-Wei Wang, Ben-Yan Wu, Wei-Di You, Qing-Fu Zhu

Yin-Qiao Wu, Meng-Wei Wang, Ben-Yan Wu, Wei-Di You, Department of Gastroenterology, South Building, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Qing-Fu Zhu, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Supported by Key project grant in medical sciences from the tenth five-year plan of Chinese PLA, No.01Z035
Correspondence to: Meng-Wei Wang, Department of Gastroenterology, South Building, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. wu_yq56@hotmail.com
Received: 2003-12-17 Accepted: 2004-02-01

Abstract

AIM: To study the role of apoptosis-related gene p53, Bcl-2, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in gastric carcinogenesis.

METHODS: Immunohistochemical method (LSAB) was used to assess p53, Bcl-2, PCNA expression in specimens of 52 patients with gastric cancer and precancerous lesions.

RESULTS: In the patients with intestinal metaplasia, dysplasia and gastric cancer, the expression rates of p53 were 27.8%, 38.2% and 57.7% respectively. The expression rates of Bcl-2 were 33.3%, 50.0% and 65.4%, and PCNA indexes were 41.4 ± 13.0 , 47.9 ± 8.9 and 53.0 ± 11.9 respectively. In patients with intestinal-type carcinoma, p53 and Bcl-2 remained expressed in all precancerous tissues after development into cancer. In diffuse-type carcinoma, the positive Bcl-2 expression became negative in one patient. PCNA LI markedly increased from precancerous lesions to cancer, and a significant difference was observed in intestinal-type carcinoma ($P < 0.001$).

CONCLUSION: The expression of p53 and Bcl-2 significantly influences the development of intestinal-type gastric carcinoma, and the proliferating activity of the cancer cells gradually increase.

Wu YQ, Wang MW, Wu BY, You WD, Zhu QF. Expression of apoptosis-related proteins and proliferating cell nuclear antigen during stomach canceration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(4):770-773

摘要

目的: 探讨凋亡相关基因 p53, Bcl-2 和增生细胞核抗原 (PCNA) 在胃癌发生中的作用以及在胃癌早期诊断中的意义。

方法: 采用免疫组化 (LSAB) 方法检测 52 例胃癌变前后组织标本的 p53, Bcl-2 和 PCNA 的表达。

结果: 肠上皮化生、不典型增生和胃癌的 p53 蛋白表达分别为 27.8%, 38.2% 和 57.7%; Bcl-2 蛋白表达分别为 33.3%, 50.0% 和 65.4%; PCNA LI 分别为 41.4 ± 13.0 , 47.9 ± 8.9 和 53.0 ± 11.9 。在肠型胃癌, 癌前 p53, Bcl-2 阳性者发展到癌时仍全为阳性, 无 1 例转阴性; 在弥漫型胃癌, 癌前 Bcl-2 阳性者到癌时有 1 例转阴; PCNA LI 由癌前发展到癌时明显增高, 在肠型胃癌差异有显著性 ($P < 0.001$)。

结论: 在肠型胃癌发生发展过程中, p53, Bcl-2 蛋白表达起重要作用, 且细胞增生活性逐渐升高。

伍银桥, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 祝庆孚. 胃癌变前后凋亡相关蛋白和 PCNA 的表达. *世界华人消化杂志* 2004;12(4):770-773
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/770.asp>

0 引言

胃癌的发生发展是一个多基因变异累积逐渐演变的复杂过程, 包括癌基因的激活和抑癌基因的失活而导致无限制增生^[1-2], 同时, 肿瘤的发生与凋亡也有密切关系^[3-6]. 细胞增生与凋亡的失衡导致细胞的过度积聚, 可能是胃癌发生的病理基础^[7-9]. 为探讨凋亡相关蛋白在胃癌发生不同阶段中的作用及细胞增生活性的变化, 我们检测了凋亡相关基因 p53, Bcl-2 以及增生细胞核抗原 (PCNA) 在胃癌变前后组织标本中的表达。

1 材料和方法

1.1 材料 经胃镜下黏膜活检和 / 或手术切除胃标本的病理检查诊断为癌、资料完整、在最后诊断前具有随访结果的病例共 52 例, 均为男性, 年龄 62-82 岁 (平均 70.1 岁). 经 Lauren 分型示肠型胃癌 40 例, 弥漫型胃癌 12 例. 根据病变的不同阶段分为两个组: “癌时” 即经胃镜黏膜活检或手术切除胃标本诊断为癌当时的标本. “癌前” 即在癌诊断之前、随访时间超过 1 a、且与

发生癌部位相同的黏膜活检组织第1次经病理诊断为中重度肠上皮化生或中重度异型增生的标本, 随访时间为1-11.4 a (平均为3.7 a). 其中中重度肠上皮化生病例18例, 中重度异型增生病例34例.

1.2 方法 p53, Bcl-2 蛋白表达及PCNA均采用免疫组化LSAB法检测. 抗p53 mAb (DO-1)和抗Bcl-2 mAb购于北京中山生物技术有限公司, PCNA mAb和LSAB试剂盒为Dako公司产品. 实验步骤按试剂盒说明书进行. 阳性对照为已知阳性组织切片在同一条件下反应, 阴性对照以正常兔血清代替第一抗体. p53, Bcl-2 结果按如下方法进行评分: (1)阳性着色程度: 无着色为0, 浅着色为1, 深着色为2; (2)阳性着色范围: 无着色为0, 着色小于1/3为1, 着色大于1/3为2, 弥漫性着色为3. 然后将以上两项相加为最后结果: 大于或等于3为阳性病例. PCNA计数用PCNA标记指数(PCNA LI): $LI = \text{PCNA阳性细胞数} / \text{计数细胞总数} \times 100\%$.

统计学处理 所得数据采用 χ^2 检验、t检验.

2 结果

2.1 胃癌变前后p53, Bcl-2及PCNA的表达 从肠上皮化生、不典型增生到胃癌组织, p53和Bcl-2表达阳性率逐渐增高, 且p53, Bcl-2表达阳性率在胃癌组织与中重度肠上皮化生间差异有显著性($P < 0.05$), 而胃癌组织和不典型增生、不典型增生和肠上皮化生之间差异尚无显著性($P > 0.05$). PCNA LI在肠上皮化生、不典型增生到胃癌组织也逐渐递增, 且相互之间比较差异均有显著性意义($P < 0.05$, 表1). p53阳性着色位于细胞核, 呈棕黄色颗粒状. Bcl-2阳性着色位于细胞质, 呈棕黄色. 各切片显色分布不均, 以片状和局灶性为主, 少数为弥漫性分布. PCNA阳性着色位于细胞核, 呈棕黄色细颗粒状.

表1 胃癌和癌前组织p53, Bcl-2及PCNA的表达 $n(\%)$

分组	<i>n</i>	p53	Bcl-2	PCNA/mean \pm SD
胃癌组织	52	30 (57.7) ^a	34 (65.4) ^a	53.0 \pm 11.9 ^a
不典型增生	34	13 (38.2)	17 (50.0)	47.9 \pm 8.9 ^a
肠上皮化生	18	5 (27.8)	6 (33.3)	41.4 \pm 13.0

^a $P < 0.05$ vs 肠上皮化生.

2.2 胃癌变前后p53, Bcl-2和PCNA的自身对照 癌前p53阳性者18例到癌时仍全部为阳性, 癌前p53阴性到发展为癌时则有12例表达阳性, 主要为肠型胃癌, 而没有1例癌前p53阳性者在癌时转为阴性. 发展为弥漫型胃癌者在癌前阳性到癌时基本上仍为阴性(9/10). Bcl-2蛋白表达在肠型胃癌中, 癌前阳性者到发展为癌时仍持续阳性, 没有1例转阴性, 癌前阴性者到癌时则有9例转为阳性. 在弥漫型胃癌, 癌前Bcl-2阳性者到癌时有1例转为阴性, 癌前阴性者到癌时也有3例

转为阳性(表2). 在肠型胃癌, PCNA LI在癌时较癌前明显增加, 差异有显著性($P < 0.001$); 而在弥漫型胃癌, 虽然癌时PCNA LI较癌前也增高, 但差异无显著性($P > 0.05$, 表3).

表2 胃癌变前后p53, Bcl-2的自身对照($n = 52$)

癌前	<i>n</i>	肠型胃癌		弥漫型胃癌		
		+	-	+	-	
p53	+	18	16	0	2	0
	-	34	11	13	1	9
Bcl-2	+	23	20	0	2	1
	-	29	9	11	3	6

表3 胃癌变前后PCNA的比较(mean \pm SD)

胃癌	<i>n</i>	癌前	癌时	癌变前后差	P值
肠型	40	43.9 \pm 11.2	54.0 \pm 11.6	10.1 \pm 14.6	0.0004
弥漫型	12	46.4 \pm 10.2	49.2 \pm 12.8	2.8 \pm 14.0	0.5047

3 讨论

正常人胃黏膜上皮组织更新较快, 以细胞凋亡和增生维持着细胞总数的平衡, 倘若这一平衡失常, 就有可能导致许多疾病发生^[9]. 细胞凋亡与细胞增生平衡的失调在胃癌的发生发展过程中起重要作用^[3, 6-8]. 细胞凋亡受众多基因调控, 其中最为重要的是Bcl-2家族和p53, 这些基因的产物表达异常可促使细胞恶性增生并阻止细胞凋亡. p53基因的主要生物学功能是监护细胞基因的完整性, DNA受损时, p53基因编码产生的蛋白积聚, 复制终止, 利于DNA修复, 如修复失败, 则诱发细胞凋亡. p53基因的突变则丧失其功能, 还具有促进细胞恶性转化的功能, 导致细胞恶性增生. 用免疫组化法可检出p53蛋白的异常表达且与p53基因突变有良好的相关性^[10]. p53基因的突变常见于胃癌中, 且p53蛋白的异常表达与胃癌的进展及预后有关^[11-15]. 在胃癌前病变中也有异常表达, 多数研究结果认为p53基因突变于癌变后期才发生^[3, 16-17], 但也有人在肠化生阶段检测到p53基因突变, 认为其属于胃癌变过程中的早期事件^[18-19]. 本研究中, p53基因在中重度肠上皮化生和中重度不典型增生阶段均有阳性表达, 且随肠上皮化生 \rightarrow 不典型增生 \rightarrow 胃癌, 其阳性表达率逐渐增加. 对癌变前后的自身对照研究发现, 癌前p53阳性者18例到癌时仍全部为阳性, 癌前p53阴性到发展为癌时出现阳性者有12例, 主要为肠型胃癌, 而没有1例癌前p53阳性者在癌时转阴. 发展为弥漫型胃癌者在癌前阴性到癌时基本上仍为阴性(9/10). 结果提示从胃黏膜肠上皮化生、异型增生及其向胃癌演变过程中, p53基因的表达起着重要的作用, 特别是在肠型胃癌的发展过程中, p53的作用尤其突出, 在癌前表达阳性者将持续表达直到发生癌, 癌前p53不表达者, 在恶变的过程中, 也

可逐渐出现表达.而在弥漫型胃癌, p53的作用显得并不明显,可以持续为阴性.

Bcl-2是目前公认的一种重要的调节细胞凋亡基因^[20],他的激活和过表达能抑制细胞正常的凋亡. Bcl-2基因并不影响细胞的增生,而是通过抑制细胞凋亡而延长细胞寿命,从而增加了肿瘤发生的机会并促进肿瘤的发展. Bcl-2表达与胃癌发生发展有关^[21-26]. 本研究显示,胃癌时组织 Bcl-2阳性率为65.4%(34/52),中重度不典型增生 Bcl-2阳性率为50.0%(17/34),中重度肠上皮化生 Bcl-2阳性率为33.3%(6/18).从肠上皮化生→不典型增生→胃癌,其阳性表达率也逐渐增加.对癌变前后 Bcl-2表达的自身对照,发现在肠型胃癌,癌前 Bcl-2阳性者到发展为癌时仍持续阳性,没有1例转阴,而癌前阴性者到癌时则有9例转阳性.提示 Bcl-2表达与从肠上皮化生、异型增生到癌的发展过程相关.而在弥漫型胃癌,癌前 Bcl-2阳性者到癌时有1例转阴性,癌前阴性者到癌时也有3例转为阳性,提示在弥漫型胃癌的发生发展过程中, Bcl-2基因的表达关系不大.

肿瘤细胞的最基本特征是增生失控所致的持续不断的增生. PCNA是一种核蛋白,几乎所有处于增生状态的细胞核均有表达.他是 DNA合成酶 δ 的辅助蛋白,为细胞合成 DNA 所必需,细胞动力学研究表明其表达及合成与细胞增生周期有关, G₁期 PCNA 逐渐增多, S 期达高峰,因此他能准确地反映细胞的生长速度和状态. PCNA 阳性细胞的多少与肿瘤发展、预后均有密切关系^[27-30]. 在肿瘤的发生过程中,细胞增生活跃,处于增生状态,其 PCNA 表达明显增强,且随着疾病的发展 PCNA LI 也逐渐增加^[31]. 我们的结果也证实了这一点, PCNA 在整个胃癌的演化过程中,一直处于逐步上升状态. 发展为肠型胃癌者癌时的 PCNA LI 显著高于癌前. 在由癌前向癌的发展过程中,细胞处于增生状态,生长迅速, S 期即 DNA 合成期细胞数增多,易于出现 DNA 的损伤以及修复失败,使具有恶性潜能的细胞易于向恶性转化.

由胃黏膜肠化生和不典型增生发展到癌是一个多因素参与的过程,在癌变过程的每一阶段都存在着癌基因和抑癌基因的一系列变化,特别是肠型胃癌. 本实验显示, p53, Bcl-2 基因与肠型胃癌恶性变关系密切,在肠型胃癌发生发展过程中, p53, Bcl-2 蛋白表达可能起重要作用,且增生活性逐渐升高. 通过监测这些指标有助于早期诊断胃癌.

4 参考文献

- 1 Tamura G. Genetic and epigenetic alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in gastric cancer. *Histol Histopathol* 2002;17:323-329
- 2 Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, Naka K, Kuniyasu H, Tahara E. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol* 2000;35:111-115
- 3 Xu AG, Li SG, Liu JH, Gan AH. Function of apoptosis and

- expression of the proteins Bcl-2, P53 and C-myc in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:403-406
- 4 Li HL, Chen DD, Li XH, Zhang HW, Lu YQ, Ye CL, Ren XD. Changes of NF κ B, p-53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-552 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. *World J Gastroenterol* 2002;8:431-435
- 5 张学军, 郭礼和. 细胞凋亡失调与疾病关系的研究. *中华医学杂志* 1998;78:565-566
- 6 Tu SP, Zhong J, Tan JH, Jiang XH, Qiao MM, Wu YX, Jiang SH. Induction of apoptosis by arsenic trioxide and hydroxy camptothecin in gastric cancer cells *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2000;6:532-539
- 7 Xu AG, Li SG, Liu JH, Shen JG, Jiang B, Gan AH. Correlation between apoptosis and proliferation in gastric pre-carcinoma. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1999;79:185-186
- 8 Pan CJ, Zhong P, Huang XR, Liu KY, Wang SX. Study on the correlation between proliferation and apoptosis in atrophy and intestinal metaplasia of gastric mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:143-146
- 9 Correa P, Miller MJ. Carcinogenesis, apoptosis and cell proliferation. *Br Med Bull* 1998;54:151-162
- 10 Brambilla E, Gazzeri S, Moro D, Caron de Fromentel C, Gouyer V, Jacrot M, Brambilla C. Immunohistochemical study of P53 in human lung carcinomas. *Am J Pathol* 1993;143:199-210
- 11 Kikuyama S, Inada T, Shimizu K, Miyakita M, Ogata Y. P53, Bcl-2 and thymidine phosphorylase as predictive markers of chemotherapy in patients with advanced and recurrent gastric cancer. *Anticancer Res* 2001;21:2149-2153
- 12 Meng FJ, Dai WS, Pan BR. P53 genes expression and its correlation with metastasis and prognosis in gastric carcinoma. *Xin Xiaohuabingxue Zazhi* 1996;4:677-678
- 13 Maehara Y, Tomoda M, Hasuda S, Kabashima A, Tokunaga E, Kakeji Y, Sugimachi K. Prognostic value of P53 protein expression for patients with gastric cancer—a multivariate analysis. *Br J Cancer* 1999;79:1255-1261
- 14 Zhang L, Fu HM, Jin SZ, Huang R, Zhou CG. Overexpression of P53 and relationship between extracellular matrix and differentiation, invasion and metastasis of gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:992-996
- 15 Liu XP, Tsushimi K, Tsushimi M, Oga A, Kawauchi S, Furuya T, Sasaki K. Expression of P53 protein as a prognostic indicator of reduced survival time in diffuse-type gastric carcinoma. *Pathol Int* 2001;51:440-444
- 16 Craanen ME, Blok P, Dekker W, Offerhaus GJ, Tytgat GN. Chronology of P53 protein accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut* 1995;36:848-852
- 17 Wu MS, Shun CT, Sheu JC, Wang HP, Wang JT, Lee WJ, Chen CJ, Wang TH, Lin TL. Overexpression of mutant P53 and c-erbB-2 proteins and mutations of the p15 and p16 genes in human gastric carcinoma: with respect to histological subtypes and stages. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:305-310
- 18 Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burja I, Thomas E. *Helicobacter pylori* infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci* 2002;47:107-113
- 19 Wang DX, Fang DC, Liu WW, Luo YH, Lu R. Study on the loss of heterozygosity at YNZ22 gene and p53 gene alteration in the gastric intestinal metaplasia. *Jiefangjun Yixue Zazhi* 2001;26:36-38
- 20 Chou HK, Chen SL, Hsu CT, Chao YC, Tsao YP. Bcl-2 accelerates retinoic acid-induced growth arrest and recovery in human gastric cancer cells. *Biochem J* 2000;348:473-479
- 21 戴洁, 于淑霞, 祁晓莉, 簿爱华, 许永利, 郭中英. Bcl-2, c-myc 蛋白在胃癌前病变、胃癌中的表达. *华人消化杂志* 1998;6(特刊7):494-495
- 22 Walker C, Robertson L, Myskow M, Dixon G. Expression of the Bcl-2 protein in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas. *Br J Cancer* 1995;72:164-169
- 23 Wang YK, Ji XL, Ma NX. Expressions of P53, Bcl-2 and c-

- erbB-2 proteins in precarcinomatous gastric mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:114-116
- 24 Inada T, Kikuyama S, Ichikawa A, Igarashi S, Ogata Y. Bcl-2 expression as a prognostic factor of survival of gastric carcinoma. *Anticancer Res* 1998;18:2003-2010
- 25 Muller W, Schneiders A, Hommel G, Gabbert HE. Prognostic value of Bcl-2 expression in gastric cancer. *Anticancer Res* 1998; 18:4699-4704
- 26 Gao HJ, Bai JF, Peng YS, Sun G, Zhao HL, Lv XZ, Zhao ZQ, Xiao SD. Expression and mutual relationship of tumor suppression gene and apoptosis regulating gene in gastric carcinoma and paracancerous tissues. *Zhonghua Xiaohua Zazhi* 2000;20:178-181
- 27 Noda H, Maehara Y, Irie K, Kakeji Y, Yonemura T, Sugimachi K. Increased proliferative activity caused by loss of p21(WAF1/CIP1) expression and its clinical significance in patients with early-stage gastric carcinoma. *Cancer* 2002;94: 2107-2112
- 28 Konno S, Takebayashi Y, Aiba M, Akiyama S, Ogawa K. Clinicopathological and prognostic significance of thymidine phosphorylase and proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. *Cancer Lett* 2001;166:103-111
- 29 Maeda K, Chung YS, Onoda N, Kato Y, Nitta A, Arimoto Y, Yamada N, Kondo Y, Sowa M. Proliferating cell nuclear antigen labeling index of preoperative biopsy specimens in gastric carcinoma with special reference to prognosis. *Cancer* 1994; 73:528-533
- 30 吴华星, 赵玉兰, 潘林娜, 武春龙, 冯占军. 内镜下胃癌活检标本PCNA的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:92-93
- 31 Chiang CP, Lang MJ, Liu BY, Wang JT, Leu JS, Hahn LJ, Kuo MY. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in oral submucous fibrosis, oral epithelial hyperkeratosis and oral epithelial dysplasia in Taiwan. *Oral Oncol* 2000;36:353-359

World Journal of Gastroenterology 编委会组成

《World Journal of Gastroenterology, WJG》编辑委员会由来自 53 个国家的 179 位消化病学专家组成, 具有广泛的代表性, 特别是聘请了一批工作在临床和科研一线, 具有良好科学记录的中青年专家为评委. 分别来自以下国家: ALBANIA(1), ALGERIA(1), ARGENTINA(2), AUSTRIA(1), BELARUS(1), BELGIUM(1), BRAZIL(1), CANADA(1), CHINA(38), COSTA RICA(1), DENMARK(1), EGYPT(1), FINLAND(1), GERMANY(7), GREECE(1), HUNGARY(2), ICELAND(1), INDIA(2), IRAN(1), IRELAND(1), ISRAEL(1), ITALY(2), JAPAN(3), KENYA(1), LATVIA(1), LITHUANIA(1), MACEDONIA(1), MALAYSIA(2), MONACO(1), NEW ZEALAND(1), PHILIPPINES(1), POLAND(2), ROMANIA(1), RUSSIA(3), SINGAPORE(1), SLOVENIA(3), SOUTH AFRICA(1), SOUTH KOREA(2), SPAIN(1), SRI LANKA(1), SWEDEN(2), SWITZERLAND(2), THAILAND(1), THE NETHERLANDS(1), TURKEY(1), UNITED KINGDOM(7), UNITED STATES(55), YUGOSLAVIA(1). WJG 编委的任务是针对论文的科学性、创新性和先进性及可读性进行评价和修改, 并针对我国现阶段科学研究整体水平和科研人员英文报告撰写能力的实际情况对稿件提出具体的建设性意见; 对投送 WJG 稿件的题名、摘要、引言、材料和方法、结果和讨论等进行综合评价, 根据是否能较好地反映我国或国际消化病学临床和基础的先进水平决定所投论文是否被接受. 目前, 投送 WJG 稿件的质量差别较大, 有些论文的科学性、可读性方面的问题较多. 为此, WJG 制定了稿件评审要点, 对控制 WJG 的学术质量起到了核心作用.