

[文章编号] 1000-4718(2006)07-1353-06

胃癌 DNA 倍体分析及其 TIMP-2 和 E-cadherin 在胃癌中的表达*

张景芳¹, 张原平², 郝风云³, 张采欣⁴, 李玉军⁵, 纪祥瑞⁵

(¹ 山东省泰山医学院病理教研室, ² 山东省泰安市口腔医院, 山东 泰安 271000; ³ 山东省潍坊市人民医院病理科, 山东 潍坊 261000; ⁴ 山东省青岛市市立医院病理科, ⁵ 山东省青岛大学附属医院病理科, 山东 青岛 266021)

[摘要] 目的:研究胃癌中 DNA 倍体及其 TIMP-2 和 E-cadherin 的表达,探索胃癌侵袭转移的分子基础和可能机制。方法:采用免疫组化技术检测 E-cadherin、TIMP-2 在 99 例胃癌,16 例癌周正常黏膜,16 例胃癌远处转移和 25 例胃癌转移阳性的淋巴结中表达情况;选取其中 47 例胃癌,6 例癌周正常黏膜及 4 例胃癌远处转移标本采用流式细胞术检测 DNA 倍体及 S 期分数。结果:TIMP-2 表达与 Borrmann's 分型、淋巴结转移和浸润深度有关;E-cadherin 表达与肿瘤细胞分化、Lauren's 分型、Borrmann's 分型、淋巴结转移和浸润深度有关。DNA 异倍体率与分化和淋巴结转移有关,S 期分数(SPF)与肿瘤大小、分化及淋巴结转移有关。而且在癌与癌周非癌黏膜之间 E-cadherin 表达、DNA 异倍体率和 S 期分数的差别具有统计学意义;TIMP-2 与 E-cadherin 之间无相关性;E-cadherin 表达与 DNA 倍体及 S 期分数呈正相关。结论:随着肿瘤的演进和异质化,TIMP-2 和 E-cadherin 的异常表达及 DNA 异倍体和高 S 期分数也相应逐渐增加,提示它们在胃癌演进过程中起着关键作用,可以作为胃癌生物学行为的客观标志物。而且,这几种因素间的相互作用更加速了肿瘤演进过程。

[关键词] DNA 倍体;金属蛋白酶 2 组织抑制剂;钙粘着糖蛋白类;胃肿瘤

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

DNA ploidy analysis and the expression of TIMP-2 and E-cadherin in gastric carcinoma

ZHANG Jing-fang¹, ZHANG Yuan-ping², HAO Feng-yun³, ZHANG Cai-xin⁴, LI Yu-jun⁵, JI Xiang-rui⁵

(¹ Department of Pathology, Taishan Medical University, ² Department of Prosthodontics, Taian Hospital of Stomatology, Taian 271000, China; ³ Department of Pathology, Weifang Municipal People's Hospital, Weifang 261000, China; ⁴ Department of Pathology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266000, China; ⁵ Department of Pathology, The Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266021, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate DNA ploidy and the expression of TIMP-2 and E-cadherin in gastric carcinoma in order to understand its molecular basis and probable mechanism of invasion and metastasis. **METHODS:** Immunohistochemical methods were used to detect the expression for TIMP-2 and E-cadherin in 99 cases of gastric carcinoma, 16 cases of adjacent noncancerous mucosa, 16 cases of distant metastases and 25 cases of metastatic lymph nodes. Flow cytometry DNA ploidy and S-phase fraction (SPF) analysis was performed on 47 cases of gastric cancer, 6 cases of adjacent noncancerous mucosa and 4 cases of distant metastasis cancer with the use of formalin-fixed paraffin embedded specimens. **RESULTS:** The expression of TIMP-2 was significantly correlated with Borrmann's classification, LN metastasis and the depth of invasion. The expression of E-cadherin was significantly correlated with tumor cell differentiation, Lauren's classification, Borrmann's classification, LN metastasis and the depth of invasion. There was a positive relationship between DNA aneuploid rate and differentiation and LN metastasis. There was a positive relationship between SPF that is higher than 15% and tumor size, differentiation and LN metastasis. And there was a significantly difference between carcinoma and noncarcinoma when the expression of E-cadherin, DNA aneuploid rate and SPF were analyzed. There was no correlation between

[收稿日期] 2004-09-29

[修回日期] 2005-03-17

* [基金项目] 山东省教育厅课题资助 (No. 03K02)

Tel: 0538-6222047

TIMP-2 and E-cadherin. There was a positive relationship between DNA ploidy or SPF and the expression of E-cadherin. **CONCLUSION:** As the development of tumor progression and heterogeneity, the abnormal expression of TIMP-2 or E-cadherin or the rate of DNA aneuploid or higher SPF gradually correspondingly increases, suggesting that they play a crucial role in gastric carcinoma progression. Furthermore, each factor influences one another and further accelerates the process of tumor progression.

[KEY WORDS] DNA ploidy; Tissue-inhibitor of metalloproteinase-2; Cadherins; Stomach neoplasms

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,在中国、日本甚至西方国家其5年生存率仅是10% - 19%^[1]。有关胃癌发生、演进和转移的机制正在研究之中^[2]。细胞间黏附的丧失和细胞外基质的降解是肿瘤侵袭和转移的重要因素,钙黏附素家族是一钙依赖大黏附分子家族,其介导同型细胞间的黏附从而抑制侵袭和转移。其中以上皮型钙依赖黏附素(E-cadherin)最为重要,也成为研究肿瘤细胞侵袭和转移的热点之一。组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, TIMPs)是基质金属蛋白酶(MMPs)的天然抑制剂,近来研究表明TIMPs不仅有抑制功能,而且是一多功能分子,对肿瘤演进具有明显的双向作用,对某些肿瘤TIMP-2水平的增高反而提示较差的预后^[3]。E-cad基因和TIMP-2基因均属于肿瘤抑制基因,本实验拟采用免疫组化方法检测分析E-cadherin和TIMP-2两指标在胃癌、癌周正常黏膜、转移阳性淋巴结和远处转移癌中的表达情况,并且结合采用流式细胞术分析胃癌、癌周正常黏膜及远处转移癌中DNA倍体及S期分数(SPF)分布情况,以便更深入地了解肿瘤演进的分子和细胞学机制,试为提高临床胃癌病人的预后及生存质量、降低术后复发率提供一个新思路。

材 料 和 方 法

1 病例与标本

收集青岛大学医学院附属医院病理科2000年4月至2003年9月间存档石蜡原发性胃癌手术标本中99例典型组织块,胃癌远处转移16例,癌周正常黏膜16例,胃癌淋巴结转移25例,所有患者术前均未经过化疗和放疗。所有标本共计156例,均为4%中性甲醛固定24-48h后石蜡包埋。其中男性87例,女性28例(115例中,99例为胃原发癌,16例为远处转移癌),男:女约为3.2:1,年龄32-82岁,中位年龄58.2岁。石蜡标本各切4μm连续切片3张,分别用于免疫组化和HE染色。E-cadherin、TIMP-2和MMP-9的阳性对照分别采用正常胃上皮、直肠癌和乳腺癌组织。阴性对照采用PBS(0.01mol/L,pH7.4)代替I抗。

从用于免疫组化的石蜡标本中选取47例胃癌,6例癌周正常黏膜及4例胃癌远处转移的标本作为流式细胞术研究对象。每一样本各切50μm各5片,并且在每一样本中各加1片50μm同样固定和包埋的淋巴结作为内标准准备做单细胞悬液。

2 抗体和其它化学试剂

山羊抗人TIMP-2多克隆抗体、兔抗人E-cadherin单克隆抗体均为Santa Cruz公司产品;SP免疫组化试剂盒为Zymed公司产品;DNA染色试剂盒为Beckman Coulter France S. A. 公司产品。

3 免疫组化染色及评分

采用SP法,根据说明操作。其中TIMP-2和E-cadherin I抗浓度分别1:30和1:120。TIMP-2阳性细胞可见胞浆呈棕黄色颗粒沉着,根据染色强度和染色细胞分布进行评分。由两个独立的观察者进行盲评,染色分级参考Daniela^[4]的方法,其中阴性(-):无细胞着色;阳性(+):阳性细胞<20%;阳性(++):阳性细胞占21%-50%;阳性(+++):阳性细胞>50%。E-cadherin阳性细胞呈细胞膜连续性着色,参考Li等^[5]的方法,其中0分:无细胞膜着色;1分:阳性着色位于胞浆;2分:阳性着色减少;3分:正常细胞膜着色,其中0-2分为阴性。

4 流式细胞术样本制备及结果参数

采用改良的Hedley程序,50μm石蜡切片脱蜡和水化、0.5%的胃蛋白酶(pH1.5)消化、离心(1500r/min,5min)、过滤得单细胞悬液;然后孵育于DNA染色液中30min后上机(Beckman Coulter, FCM)检测20000个细胞。流式细胞术检测参数采用DNA倍体和S期分数(SPF),根据DNA指数判定二倍体或异倍体^[13]。

5 统计学处理

采用SPSS 11.0软件统计分析,采用χ²检验。

结 果

1 免疫组化结果(表1及图1-6)

TIMP-2的表达在Borrmann I-II型和Borrmann IV型中阳性率分别为66.7%和20.0%,在淋巴结转移阳性标本中和阴性标本中其阳性率分别为

32.1% 和 56.5% ,在胃癌局限于黏膜层者及胃癌侵及浆膜层或胃周脂肪者其阳性率分别为 71.4% 和 33.8% 。 E - cadherin 的表达在高分化、低分化胃癌或胃印戒细胞癌中阳性率分别为 75.0%、30.6% 或 27.6% , $P < 0.01$;在 Lauren 肠型和弥漫型胃癌中其阳性率分别为 53.7% 和 13.6% ,在 Borrmann I - II 型、Borrmann III 型和 Borrmann IV 型中阳性率分别为 55.6%、42.9% 和 25.0% ,在淋巴结转移阳性标本中

和阴性标本中其阳性率分别为 32.1% 和 54.3% ,在胃癌局限于黏膜层者、胃癌侵及黏膜下或肌层者及胃癌侵及浆膜层或胃周脂肪者其阳性率分别为 85.7%、48.1% 和 35.4% 。而且在癌与癌周非癌黏膜 E - cadherin 的表达的差别具有统计学意义,阳性率分别为 42.4% 和 87.5% , $P < 0.01$;由表 3 可见 E - cadherin 表达阳性者 TIMP - 2 阳性率增高,相关系数为 0.07 , $P > 0.05$ 。

表 1 TIMP - 2 和 E - cadherin 与胃癌组织病理特征和临床特征的联系

Tab 1 The relationship between TIMP - 2 or E - cadherin and histopathological features and clinical features in gastric carcinoma

	n	Positive rate(%)			n	Positive rate(%)	
		TIMP - 2	E - cad			TIMP - 2	E - cad
Tumor cell differentiation				Tumor size			
Well	16	62.5	75.0 [#]	≥5 cm	53	41.5	39.6
Moderate	18	55.6	61.1	<5 cm	46	45.7	45.7
Poor	36	38.9	30.6	Lymph node metastasis			
Signet - ring cell	29	31.0	27.6	Negative	46	56.5 ^Δ	54.3 ^Δ
Tumor recurrence				Positive	53	32.1	32.1
Primary carcinoma	91	44.0	44.0	Metastasis			
Recurrent carcinoma	8	37.5	25.0	Primary tumor	99	43.4	42.4
Carcinoma and noncarcinoma				Metastatic LN	25	36.0	20.0
Gastric carcinoma	99	43.4	42.4 ^Δ	Metastatic carcinoma	16	43.8	37.5
Noncarcinoma gastric mucosa	16	31.3	87.5	Depth of invasion			
Lauren's classification				Mucosa	7	71.4 ^Δ	85.7 ^Δ
Intestinal type	67	46.3	53.7 ^{**}	Submucosa or muscular	27	59.3	48.1
Diffuse type	22	36.4	13.6	Layer			
Mixed type	10	40.0	30.0	Serosa or perigastric fat	65	33.8	35.4
Borrmann's classification				TNM stage			
I - II type	9	66.7 [*]	55.6 [*]	I stage	8	50.0	62.5
III type	70	47.1	42.9	II stage	16	43.8	50.0
IV type	20	20.0	25.0	III - IV stage	75	42.7	38.7

[#] $P < 0.01$ vs poor cell differentiation or signet - ring cell group; ^{**} $P < 0.05$ vs diffuse type; ^{*} $P < 0.05$ vs IV type; ^Δ $P < 0.05$ vs serosa or perigastric fat; ^Δ $P < 0.05$ between subgroups.

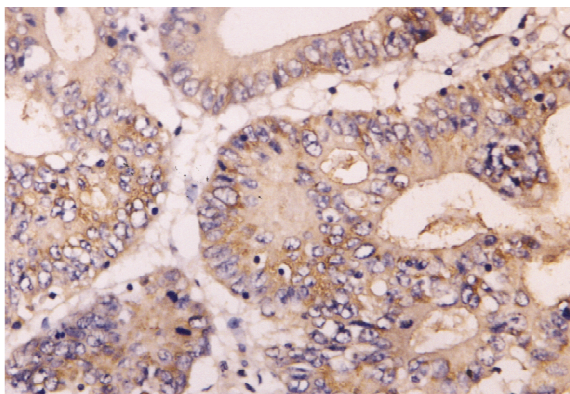


Fig 1 TIMP-2 expression in gastric carcinoma (SP, × 400). TIMP-2 expression showed moderate or diffuse distribution in neoplastic cells.

图 1 TIMP-2 在胃癌中表达

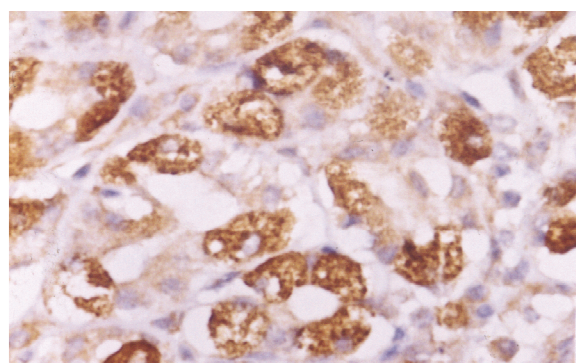


Fig 2 TIMP-2 expression in noncarcinoma gastric mucosa (SP, × 400). TIMP-2 expression showed focal or moderate distribution in noncancerous mucosa cells.

图 2 TIMP-2 在胃癌癌周黏膜中的表达

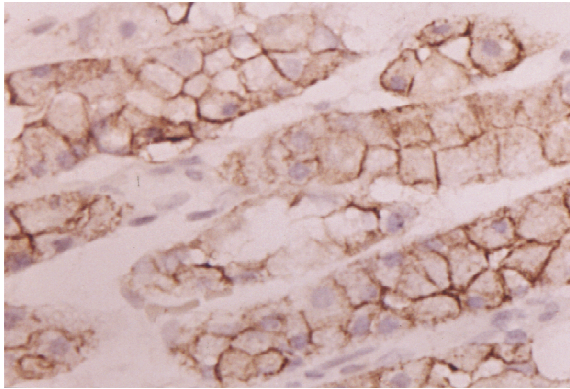


Fig 3 E-cadherin expression in noncarcinoma gastric mucosa (SP, $\times 400$).
E-cadherin expression showed strong membranous staining in noncancerous mucosa cells, especially at the intercellular border.

图 3 E-cadherin 在胃癌周黏膜中的表达

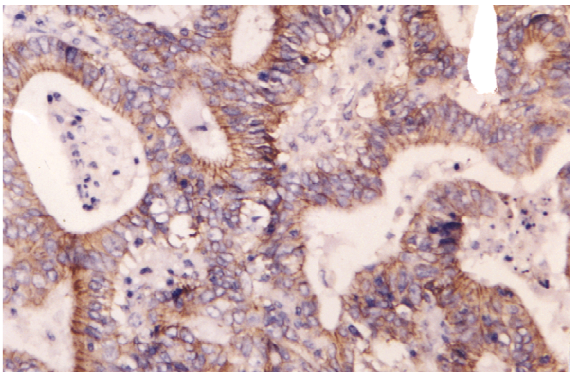


Fig 4 E-cadherin expression in gastric carcinoma (SP, $\times 400$).
Decrease in e-cadherin expression was observed in moderate differentiated neoplastic tissues.

图 4 E-cadherin 在胃癌中表达

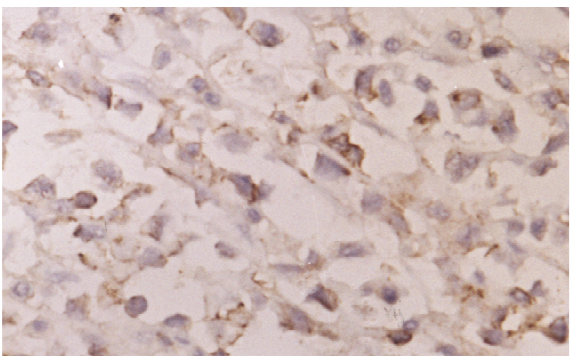


Fig 5 E-cadherin expression in gastric carcinoma (SP, $\times 400$).
E-cadherin reductive or lost or abnormal membranous expression which showed cytoplasm or nucleus staining in poorly differentiated neoplastic tissues.

图 5 E-cadherin 在胃癌中表达

2 DNA 倍体结果(表 2 及图 7)

DNA 异倍体率与肿瘤分化和淋巴结转移有关;S 期分数(SPF)与肿瘤大小、分化和淋巴结转移有关;而且在癌与癌周非癌黏膜之间 DNA 异倍体率和 S 期分数的差别具有统计学意义。

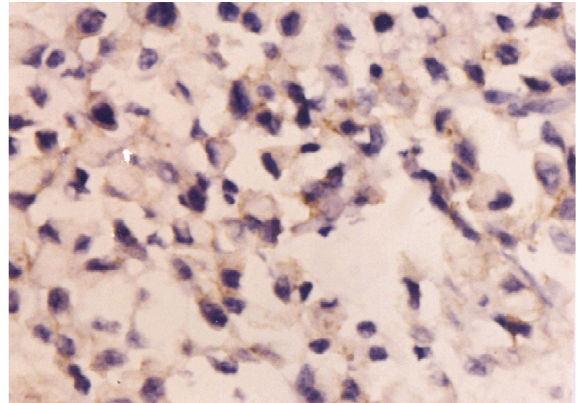


Fig 6 E-cadherin expression in gastric carcinoma (SP, $\times 400$).
E-cadherin reductive or lost or abnormal membranous expression in metastatic LN from poorly differentiated gastric carcinoma.

图 6 E-cadherin 在胃癌中表达

3 免疫组化与 DNA 倍体结果相关性

DNA 倍体及 S 期分数与 E-cadherin 存在相关性(相关系数 r 值分别为 -0.27 和 -0.31 , $P < 0.05$),但与 TIMP-2 无相关性(相关系数 r 值分别为 -0.99 和 -0.12 , $P > 0.05$),这些结果表明 DNA 异倍体率和 S 期分数越高, E-cadherin 表达却越低。

表 2 DNA 倍体和 SPF 与胃癌组织病理特征和临床特征的关系

Tab 2 The relationship between DNA ploidy or SPF and histopathological features and clinical features in gastric carcinoma

	<i>n</i>	Aneuploid rate (%)	<i>n</i> (SPF >15%)
Tumor size			
≥5 cm	29	65.5	25*
<5 cm	18	55.6	7
Differentiation			
Well or moderately	19	42.1*	9*
Poorly or signet ring cell type	28	75.0	23
Depth of invasion			
Mucosa	7	28.6	3
Muscular layer or perigastric fat	40	67.5	29
LN metastasis			
Negative	30	80.0 [#]	24*
Positive	17	29.4	8
Metastasis			
Primary carcinoma	47	61.7	32
Metastatic carcinoma	4	100	3
Carcinoma and noncarcinoma			
Gastric carcinoma	47	61.7*	32*
Noncarcinoma gastric mucosa	6	16.7	1

* $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$ between subgroups.

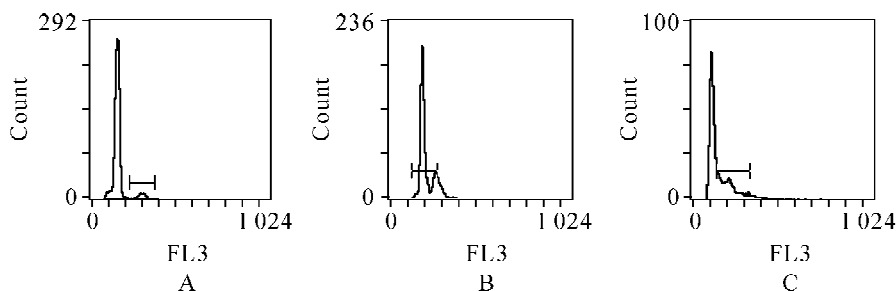


Fig 7 The histograms from FCM. There is a large diploidy peak and a smaller tetraploidy peak in A, a aneuploidy peak in B and higher SPF in C.

图7 流式细胞术直方图

讨 论

本研究显示 E-cadherin 在胃癌和癌周黏膜中的阳性率分别为 42.4% 和 87.5%，恶性转化的细胞 E-cadherin 表达下调导致细胞间黏附性丧失及细胞移动和增生能力增强，导致侵袭和转移。本结果证实 E-cadherin 与肿瘤分化和 Lauren 分型相关，而且淋巴结转移阳性病例中 E-cadherin 异常表达率明显高于淋巴结转移阴性病例，低分化或弥漫型胃癌中 E-cadherin 的异常表达率（即染色位于细胞胞质或胞核）明显高于高分化或肠型胃癌，这结果支持强的 E-cadherin 染色与肿瘤较好分化和肿瘤细胞黏附性有关，而染色丧失或染色部位改变则与肿瘤较低分化、失黏附及高侵袭能力有关。E-cadherin 不仅通过与其 β -catenin 的作用参与从肿瘤早期到进展期的全过程，而且其可以（至少部分地）上调细胞依赖激酶抑制因子 p27 而诱导终止细胞周期^[6]。Carpenter 等^[7]发现在癌相关良性上皮中 E-cadherin 位于核旁，并认为是胃腺癌演进过程中的一个早期改变。本实验也发现 E-cadherin 在胃癌中的核旁分布现象，尤其在分化较差的肿瘤中更为突出。E-cadherin 表达与肿瘤细胞失分化、失黏附及侵袭性有关，这提示 E-cadherin 表达丧失在肿瘤细胞获得潜在的侵袭和转移的细胞形态的过程中有着重要意义。由于膜 E-cadherin 被降解，使膜 E-cadherin 表达下降而血清可溶性 E-cadherin 水平升高，所以血清 E-cadherin 的较高水平提示肿瘤晚期或采取保守治疗^[8]。一有关胃癌的研究显示 TIMP-1 和 TIMP-2 在肿瘤中的阳性率分别为 41% 和 57%，而在正常黏膜中为阴性，而且 TIMP-2 表达与肿瘤分期、组织分型、淋巴结转移及生存率无关^[9]。本研究结果显示 TIMP-2 表达与浸润深度和淋巴结转移有关，而其表达在癌与癌周黏膜间的差别无统计学意义，我们的结果与上述报道不同，一方面原因可能在

于实验方法或抗体不同，另一方面可能在于 TIMP-2 的双重效应：即 TIMP-2 不仅抑制 MMPs 活性，而且具有促进细胞生长和生存的作用，而此作用则与其抑制 MMPs 的活性不相一致^[10]。

E-cadherin 和 TIMP-2 基因都属于肿瘤抑制基因^[11-13]，但是本研究结果显示 E-cadherin 和 TIMP-2 间没有协同作用或相关性，这两者间是否确实不存在相关性仍需对大量病例进行深入研究。

根据 DNA 含量及其分裂复制循环过程大概分为 G_1/G_0 期、S 期和 $G_2 + M$ 期。如果 DNA 含量发生微小的异常变化，就有可能导致恶性肿瘤。近年研究表明，癌细胞 DNA 定量分析可作为肿瘤患者预后的独立指标^[14]。根据本实验结果，SPF 和肿瘤的大小、分化及淋巴结转移有关，认为处于 DNA 合成期的细胞（S 期细胞）的比例间接反映了细胞的增殖和侵袭行为。正常或接近正常的 DNA 模式常和组织的较高分化有关，而异常的 DNA 模式则常与组织的较低分化有关。在肿瘤中异倍体率高达 61.7%，明显高于非肿瘤组织（16.7%）。这些结果提示 DNA 模式是一有用的早期癌变或预后的标记。DNA 倍体及 SPF 与 TIMP-2 表达之间的差别无统计学意义，但与 E-cadherin 免疫组化结果之间的差别有统计学意义，这一结果与汪泳等^[15]的胃癌病人肿瘤细胞 DNA 含量与 E-cadherin 的表达强度有明显相关性的结果相一致，原因部分可能在于 DNA 含量和 E-cadherin 均与肿瘤分化有关。

[参 考 文 献]

- [1] Hansson LE, Sparen P, Nyren O. Survival in stomach cancer is improving: results of a nationwide population-based Swedish study[J]. *Ann Surg*, 1999, 230(2): 162-169.
- [2] Chen XY, van Der Hulst RW, Shi Y, et al. Comparison of precancerous conditions: atrophy and intestinal metaplasia in *Helicobacter pylori* gastritis among Chinese and

- Dutch patients[J]. Clin Pathol, 2001, 54(5): 367 - 370.
- [3] Grignon DJ, Sakr W, Toth M, et al. High levels of tissue inhibitor of metalloproteinases -2 (TIMP -2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer[J]. Cancer Res, 1996, 56(7): 1654 - 1659.
- [4] Massi D, Franchi A, Paglierani M, et al. Expression and prognostic significance of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in primary neuroendocrine carcinoma of the skin[J]. Human Pathol, 2003, 34(1): 80 - 88.
- [5] Li YJ, Ji XR. Relationship between expression of E - cadherin - catenin complex and clinicopathologic characteristics of pancreatic cancer [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(2): 368 - 372.
- [6] Rak JW, Florenes VA, Slingerland JM, et al. E - cadherin dependent growth inhibition is mediated by the cyclin dependent kinase inhibitor p27 (KIP1)[J]. J Cell Biol, 1998, 142(2): 557 - 571.
- [7] Carpenter PM, Al - Kuran RA, Theuer CP. Paranuclear E - cadherin in gastric adenocarcinoma [J]. Am J Clin Pathol, 2002, 118(6): 887 - 894.
- [8] Chan AO, Chu KM, Lam SK, et al. Soluble E - cadherin is an independent pretherapeutic factor for long - term survival in gastric cancer[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(12): 2288 - 2293.
- [9] Murray GI, Duncan ME, Arbuckle E, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer [J]. Gut, 1998, 43(6): 791 - 797.
- [10] Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations [J]. Science, 2002, 295(5564): 2387 - 2392.
- [11] Lee HS, Lee HK, Kim HS, et al. Tumor suppressor gene expression correlates with gastric cancer prognosis [J]. J Pathol, 2003, 200(1): 39 - 46.
- [12] 娄金丽,林洪生,邱金瑛,等. 威麦宁抗小鼠 Lewis 肺癌转移作用及分子机制的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(4): 627 - 631.
- [13] 朱彩荣,曾祥凤,陈亚进,等. MMP - 2、TIMP - 2 和 vEGF - C 在肝细胞性肝癌中的表达及其与淋巴结转移关系的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(7): 1336 - 1339.
- [14] Danesi DT, Spano M, Fabiano A, et al. Flow cytometric DNA ploidy, p53, PCNA, and c - erbB - 2 protein expressions as predictors of survival in surgically resected gastric cancer patients[J]. Cytometry, 2000, 42(1): 27 - 34.
- [15] 汪泳,张方信,朱任之,等. E - 钙黏附素和 DNA 含量与胃癌侵袭、转移的关系的研究[J]. 中国综合与临床, 2003, 19(7): 633 - 636.

新书介绍

北京大学医学部生理与病理生理学系吴立玲教授主编的《病理生理学应试指南》(第二版)已由北京大学医学出版社出版发行。

《病理生理学应试指南》(第二版)是医学院校各专业本科生复习病理生理学和自测的辅导材料,也是研究生入学考试、同等学力人员申请硕士学位、临床医学学科综合水平全国统一考试及其他病理生理学考试的参考资料,对教师进行教学辅导也有一定的参考价值。

本书定价 22.80 元,欲购者可与北京大学医学出版社发行部联系,电话:010 - 82802230