

胸苷酸合成酶对结肠癌 5-Fu 化疗耐药影响的前瞻性研究

陈新¹, 林文博², 沈幼珠³

The Influence of Thymidylate Synthase (TS) in Colon Carcinoma on the 5-Fu Chemotherapy Resistance: A Prospective Study

CHEN Xin, LIN Wen-bo, SHEN You-zhu

1. Department of Pathology, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China; 2. Nan'an Hospital of Fujian Province; 3. 1st Hospital of Zhao'an city

Abstract: **Objective** To investigate the reason of the 5-Fu drug resistance, and to provide the influence of TS in colon carcinoma with the level of cell culture. **Methods** To proceed the 5-Fu drug susceptibility test with MTT method to 30 cases in vitro culture colon carcinoma cell; to be examined by immunohistochemical stain and observed the expression of TS; and then compare with them. **Results** In vitro culture colon carcinoma cell scores corresponding to the expression of TS, the sensitivity to 5-Fu was obviously higher than the low expression. **Conclusion** The positive expression of TS has a significant influence on colon carcinoma patients at the selection of chemotherapy.

Keywords: Colon carcinoma; MTT; Immunohistochemical; Thymidylate synthase (TS); 5-Fu; Cell culture

摘要:目的 探讨结肠癌对 5-Fu 产生耐药的机理,从细胞培养水平上进一步论证胸苷酸合成酶对 5-Fu 化疗产生耐药的影响。方法 应用 MTT 法对体外培养的 30 例结肠癌细胞进行 5-Fu 药敏试验,再应用 SP 免疫组化法对 30 例结肠癌进行胸苷酸合成酶检测,然后将两个结果进行比较。结果 胸苷酸合成酶高表达组体外培养的结肠癌细胞对 5-Fu 的敏感性明显低于 TS 低表达组。结论 胸苷酸合成酶表达程度的高低对临床结肠癌患者化疗药物的选择有一定的指导意义。

关键词: 结肠癌; MTT; 免疫组织化学; 胸苷酸合成酶 (TS); 5-Fu; 细胞培养

中图分类号: R735.3⁺5 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)08-0480-02

0 引言

5-Fu 广泛应用于肠道恶性肿瘤的化学治疗,由于它疗效确切一直处于其他化疗药无法替代的地位,目前仍是肠道恶性肿瘤的首选化疗药。但一些结肠癌病例对 5-Fu 为主的化疗并不敏感,为提高对 5-Fu 原发性和继发性耐药患者的治疗效果,有必要从细胞水平上阐明 5-Fu 耐药机制,找出能用于评价 5-Fu 化疗敏感性的指标。

1 材料与方法

1.1 材料 选取我院术前未进行 5-Fu 化疗的结肠癌新鲜标本 30 例,其中男性 21 例,女性 9 例,再将所有结肠癌根治术标本经 10% 福尔马林液固定,石蜡包埋。

1.2 试剂 RPMI1640 培养基干粉,胎牛血清,MTT,透明质酸酶,胰蛋白酶,型胶原蛋白酶,DNA

酶,220nm 薄膜滤菌器,以上试剂均来自华美生物工程公司北京分公司。

绵羊抗人 TS 蛋白单克隆抗体,AP 标记的兔抗绵羊二抗(美国 Rockland 公司),生物素代兔抗绵羊二抗(美国 K.P.L 公司)。SP 试剂盒,DAB 显色试剂盒(福州迈新公司)。

1.3 方法

1.3.1 肿瘤细胞培养 无菌条件下取手术根治切除的结肠癌组织,置于含有 500U/ml 青霉素,500μg/ml 链霉素清洗(10min),将肿瘤组织剪成 1mm³ 碎块后,置于含有型胶原蛋白酶(200U/g)型 DNA 酶(100U/g),型透明质酸酶(1500U/g)的 RPMI1640 培养基(4,20h),离心(1000r/min,5min)两次,收集单个细胞用 RPMI1640 液将细胞洗两遍后,以 5×10⁵ 个/ml 活细胞数接种于培养瓶中,加入 20% 胎牛血清(FBS),置于 CO₂ 培养箱中(37,5%CO₂),次日培养细胞贴壁,3 天更换一次生长液,计算肿瘤细胞群体倍增时间(36h),不用传代,直接用原代细胞进行实验。将细胞悬液浓度为 2×10⁴/ml 加入 96 孔培养板中,每孔 200μl,置

收稿日期:2003-07-04; 修回日期:2003-09-22

基金项目:福建省青年科研基金资助项目(2001-1-21)

作者单位:1.350001 福州,福建省立医院病理科;2. 福建省南安市医院病理科;3. 福建省赵安第一医院病理科

于二氧化碳培养箱中(37℃,5%CO₂,2h);在96孔板中加入5-Fu(150μg/ml),每孔20μl,置于二氧化碳培养箱中(37℃,5%CO₂,36h);吸弃上清每孔加入MTT应用液(5mg/ml)20μl,培养4h后,每孔再加200μl的酸化异丙醇终止反应,以上步骤均严格遵循无菌操作原则,最后用酶标仪测定每孔及光度值(测定波长540nm),以未加5-Fu进行药敏的癌细胞为对照组。

1.3.2 免疫组化染色 采用S-P法进行免疫组化染色;将30例结肠癌石蜡切片脱蜡至水,无须抗原修复,直接浸入3%H₂O₂内源性酶处理10min,PBS洗3×5min;10%正常羊血清封闭10min,PBS洗3×5min;加一抗(绵羊抗人TS蛋白单克隆抗体1:300稀释)1h,PBS洗3×5min;加生物素标记的二抗(兔抗绵羊1:400稀释)10min,PBS洗3×5min;加SP溶液,10min,PBS洗3×5min;DAB显色,苏木素复蓝,中性树胶封片。

1.3.3 结果判断 TS蛋白表达阳性区域在细胞浆中出现棕黄色的阳性颗粒。随机选取4个中倍视野(10×10),计算400个细胞浆中阳性细胞的百分数,当阳性细胞数目<5%为(-),5%~25%为(+),25%~50%为(++),50%~75%为(+++),>75%为(++++)。计算每例结肠癌细胞体外培养的5-Fu药敏试验的抑制率(%):抑制率(%)=(1-试验孔OD₅₄₀/对照孔OD₅₄₀)×100%

2 结果

30例结肠癌组织TS蛋白表达均为阳性,根据肿瘤细胞阳性数分为两组:高表达组(+++~++++),低表达组(+~++) ,见表1。

表1 TS蛋白高表达组与低表达组比较

级别	例数	表达程度
高表达组	19	+++ ~ ++++
低表达组	11	+ ~ ++

表2 TS表达与体外培养的癌细胞5-Fu抑制率的关系

级别	例数	5-Fu抑制率	t	P
高表达组	19	0.21 ±0.026	8.347	0.0076
低表达组	11	0.52 ±0.019		

从表2可以看出TS高表达组的体外培养癌细胞5-Fu抑制率明显低于低表达组,差别具有统计上的意义(P<0.05)。

3 讨论

5-Fu广泛应用于肠道恶性肿瘤的化学治疗,由于它疗效确切,一直处于其他化疗药无法替代的地

位,但一些结肠癌病例对5-Fu为主的化疗并不敏感,其对5-Fu单药治疗的有效率仅20%^[3],本文想通过体外细胞培养,从活细胞水平上论证胸苷酸合成酶对结肠癌5-Fu化疗耐药的影响。

MTT法的原理是以黄色的四氮唑盐可被活细胞线粒体中的与辅酶NADP相关的脱氢酶过厚,即接受氢原子而成为不溶性的甲罂颗粒,而死细胞无此功能,无甲罂颗粒形成,因此用酶标仪测定的OD₅₄₀值越高,说明肿瘤细胞的耐药性越强,药物抑制率越低。

胸苷酸合成酶(TS)是由两个相同亚单位组成的聚体蛋白质,每个亚单位的分子量为36Kda,Hori等研究发现TS基定位于为类第18号染色体上^[1]。TS的功能是催化尿嘧啶脱氧核苷(dUMP)甲基化为胸腺嘧啶脱氧核苷(dTMP),这是dTMP从头合成途经中关键的步骤,而dTMP又是DNA的生物合成所必需的,因此,通过对TS进行抑制就能达到抑制DNA的生物合成,进而抑制细胞生长或增殖的作用。5-Fu正是通过对TS进行抑制而发挥其抗癌活性的。5-Fu进入体内后经过一系列酶促反应,最后转变为其活性代谢产物5-氟尿嘧啶脱氧核苷(5-FudUMP),它在辅因子5,10-亚甲基四氢叶酸存在下,能与TS结合形成等价的三联复合物TS-FdUMP-CH₂FH₄,影响dUMP与TS的结合,从而抑制了dTMP的合成,使DNA的合成受限,导致细胞生长受到抑制甚至死亡^[1]。

许多学者研究表明,癌组织中TS的表达水平与患者的预后呈负相关,TS的表达可以作为判断癌症患者预后的指标^[2,4-7],Tachikawa和Takenoue等对肠癌患者的研究结果显示TS低表达组对5-Fu的敏感性优于高表达组,其预后也明显优于TS高表达组^[8,9]。Copur等^[10]对人类H630肠癌细胞株与其继发5-Fu耐药株H630-R1,H630-R10,H630-R等进行比较,结果显示随着细胞株耐药性的增加,细胞中的TS水平也明显增加,这也从另一方面说明了TS对细胞耐药性的影响。

本研究课题从活细胞水平上对胸苷酸合成酶对结肠癌5-Fu化疗耐药的影响进行了更进一步的探讨,结果显示结肠癌TS高表达组的体外培养的癌细胞对5-Fu化疗药物的敏感性明显低于TS低表达组的体外培养的癌细胞,这种差别具有统计学上的意义(P<0.05),这说明TS高表达组的患者对5-Fu化疗的敏感性可能明显低于TS低表达组,因此容易产生耐药,与文献报道是相符的,进一步论证了胸苷酸合成酶的表达程度对临床结肠癌患者在化疗药物上的选择有一定的指导意义。

(下转第484页)

消化道肿瘤的发生发展。其作用机理之一是诱导肿瘤血管生成,使肿瘤浸润转移能力增强^[7]。Jaime等^[8]报道除肿瘤细胞本身外,在肿瘤血管系统和临近肿瘤的血管系统中均可检测到 COX-2。另外 COX-2 还通过抑制凋亡发生及抑制机体的免疫功能等方面参与肿瘤的发生发展^[7]。

已有研究表明 iNOS 在多种肿瘤组织中有高表达^[9]。iNOS 是诱导型一氧化氮合酶,其催化合成的一氧化氮(NO)作为细胞间信号传递的重要调节因子,可促进血管内皮细胞分裂,诱导肿瘤血管生成,参与肿瘤的发生发展^[10]。

但有关 COX-2、iNOS 与消化道肿瘤的分化程度及淋巴结转移等的关系报道不一,这可能与肿瘤基因调控的复杂性等多方面因素有关,尚有待进一步明确。本研究结果显示,COX-2、iNOS 的表达强弱与食管癌的分化密切相关,分化越差,过表达越明显;而与淋巴结转移无关。COX-2 与 iNOS 呈明显正相关,说明二者可能在促肿瘤血管生成方面有协同作用。

参考文献:

[1] 左连富. 流式细胞术与生物医学[M]. 辽宁:辽宁科学技术出版社,1996.73-75,247.

- [2] 金惠铭,卢建,殷莲华. 细胞分子病理生理学[M]. 郑州:郑州大学出版社,2002.210-211,378.
- [3] ZimmermannKC,SarbiaM,WeberAA,etal.Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma[J].Cancer Res,1999,59(1):198-204.
- [4] PrescottSM,FitzpatrickFA.Cyclooxygenase-2 and cancerogenesis[J].Bio physActa,2000,1470(2):69-78.
- [5] TsuiS,KawanoS,SawaokaH,etal.Evidence for involvement of cyclooxygenase-2 in proliferation of two gastrointestinal cancer cell lines[J].Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids,1996,55(3):179-183.
- [6] LouY,WuK,SunA,etal.Significance of COX-1,COX-2 and iNOS expression in superficial gastritis, gastric mucosal atypical hyperplasia and gastric carcinoma[J].Chin J Dig,2000,20(4):223-226.
- [7] 花亚伟,赵凤凯,韩少良,等.胃癌组织 COX-2、bcf2 和 ki-67 的表达及其临床意义[J].实用肿瘤杂志,2000,17(5):323-325.
- [8] MasferrerJL,LeahyKM,KokiAT,etal.Antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors[J].Cancer Res,2000,60(5):1306-1311.
- [9] JenkinsDC,CharlesIG,ThomsenLL,etal.Roles of nitric oxide in tumor growth[J].Proc Natl Acad Sci USA,1995,92(10):4392-4396.
- [10] ZicheM,MorbidelliE,MasiniE,etal.Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance B[J].J Clin Invest,1994,94(5):2036-2044.

[编辑:安凤,校对:贺文]

(上接第 481 页)

参考文献:

- [1] HoriT,TakahashiE,AoyasawaD,etal.Regional expression of human thymidylate synthase (TS) gene on chromosome band 18p11.32 by in situ hybridization[J].Hum Genet,1990,85(3):576-580.
- [2] LenzHJ,LeichmanCG,DanenbergKD,etal.Thymidylate synthase mRNA level in adenocarcinoma of the stomach: a predictor for primary tumor response and overall survival[J].J Clin Oncol,1996,14(1):176-182.
- [3] MaderRM,Resistance to 5-fluorouracil[J].Gen Pharmacol,1998,31(5):661-665.
- [4] YehKH,ShunCT,ChenCL,etal.High expression of thymidylate synthase is associated with the drug resistance of gastric carcinoma to 5-fluorouracil-based systemic chemotherapy[J].Cancer,1998,82(9):1626-1631.
- [5] JohnstonPG,LenzHJ,LeichmanCG,etal.Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors[J].Cancer Res,1995,55(7):1407-1412.

- [6] DariesMM,JohnstonPG,KaurS,etal.Colorectal liver metastasis: thymidylate synthase staining correlates with response to hepatic arterial floxuridine[J].Clin Cancer Res,1999,5(2):325-328.
- [7] LeichmanC.G.Thymidylate synthase as a predictor of response[J].Oncology-Huntingt,1998,12(4):43-47.
- [8] TachikawaD,ArimasandFutamiK.Immunohistochemical expression of thymidylate synthase as a prognostic factor and as a chemotherapeutic index in patients with colorectal carcinoma[J].Anticancer Res,2000,20(5):4103-4107.
- [9] TakenouT,NagawaH,MatsudaK,etal.Relation between thymidylate synthase expression and survival in colon carcinoma, and determination of appropriate application of 5-fluorouracil by immunohistochemical method[J].Ann Surg Oncol,2000,7(3):193-198.
- [10] CopurS,Aibak,DrakeJC,etal.Thymidylate synthase gene amplification in human colon cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil[J].Biochem Pharmacol,1995,17:49(10):1419-1426.

[编辑:李奇明,校对:刘红武]