

# 胃癌细胞凋亡与增殖的平衡与相关基因的关系

陈金明, 李伟华, 周海波, 冯永东, 王家顿, 谢大兴, 余 源

陈金明, 周海波, 浙江大学医学院附属第二医院外科  
浙江省杭州市 310009

李伟华, 福建省立医院外科 福建省福州市 350000

冯永东, 王家顿, 谢大兴, 余源, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科 湖北省武汉市 430030

陈金明, 男, 1969-07-15 生, 新疆维吾尔自治区尼勒科县人, 汉族, 2003 年华中科技大学同济医学院附属同济医院博士, 讲师, 主要从事肿瘤凋亡和增殖方面的研究。

通讯作者: 陈金明, 310009, 浙江省杭州市解放路 88 号, 浙江大学医学院附属第二医院外科, jmcheng.hust.tj@sohu.com

电话: 0571-87783911

收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-10

## Balance of cell apoptosis and proliferation and its association with related genes in gastric cancer

Jin-Ming Chen, Wei-Hua Li, Hai-Bo Zhou, Yong-Dong Fen, Jia-Dong Wang, Da-Xing Xie, Yuan Yu

Jin-Ming Chen, Hai-Bo Zhou, Department of Surgery, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, Zhejiang Province, China

Wei-Hua Li, Department of Surgery, Fujian Province Hospital, Fuzhou 350000, Fujian Province, China

Yong-Dong Fen, Jia-Dong Wang, Da-Xing Xie, Yuan Yu, Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Jin-Ming Chen, Department of Surgery, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, 88 Jiefang Road, Hangzhou 310009, Zhejiang Province, China. jmcheng.hust.tj@sohu.com

Received: 2005-02-14 Accepted: 2005-03-10

## Abstract

**AIM:** To investigate the balance between cell proliferation and apoptosis in gastric cancer and their association with related genes.

**METHODS:** Sixty-eight surgically resected samples were collected between 2000 and 2001, including 10 normal gastric tissues, 10 para-cancerous tissues, and 48 gastric carcinoma tissues from pathologically confirmed patients (32 males and 16 females, aged 24-74 years with mean age 54.4 years). The patients did not receive chemotherapy or radiotherapy. All of the samples were fixed in 40 g/L formalin, embedded in paraffin, and sliced into 4  $\mu$ m-thick sections. The apoptotic cells and proliferative cells were quantitatively analyzed by flow cytometry. Immunohistochemical assay (SP method) was used to detect the expression of survivin, Fas and FasL. The morphology of proliferating cells was identified by confocal microscope.

**RESULTS:** In the normal, para-cancerous and tumor groups, the ratio of apoptosis and proliferation indexes (AI/PI) were  $0.46 \pm 0.14$ ,  $0.35 \pm 0.12$ , and  $0.23 \pm 0.11$ , respectively. The difference was significant ( $F = 19.453$ ,  $P < 0.01$ ). Normal distribution was observed by frequency distribution of AI/PI in gastric carcinoma cells. Tumors exhibited a wide range of AI/PI from 0.05 to 0.46. Overall, the median and mean  $\pm$  SD of AI/PI were 0.245 and  $0.23 \pm 0.11$ , respectively. The value of Skewness and Kurtosis were 0.067 and -0.868, respectively. A stepwise decreasing trend in AI/PI was noted in clinicopathological variables, including lymph node metastasis and beyond metastasis ( $P < 0.05$  for each). Granular staining was observed in both the cytoplasm and cell membrane of survivin, Fas and FasL positive cells. The expression rates of survivin, Fas and FasL in 48 gastric cancer were 56.2%, 43.8% and 60.4%, respectively. Using the median AI/PI of 0.245, we divided the cells into two groups (greater than and less than the median AI/PI). The expression of survivin and FasL in  $>0.245$  were significantly lower than that of  $<0.245$ . On the contrary, the expression of Fas in  $>0.245$  was significantly higher than that of  $<0.245$ . The high expression of ki-67 in tumor was found by confocal microscope.

**CONCLUSION:** A stepwise decreasing trend in AI/PI may exist in tumor progression, which might be correlated with the up-regulation of survivin gene and the down-regulation of Fas gene.

**Key Words:** Apoptosis; Proliferation; Gastric cancer; Survivin; Fas/ FasL gene

Chen JM, Li WH, Zhou HB, Fen YD, Wang JD, Xie DX, Yu Y. Balance of cell apoptosis and proliferation and its association with related genes in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005; 13(9):1078- 1081

## 摘要

**目的:** 探讨在肿瘤细胞中凋亡与增殖平衡的变化 (apoptotic index/proliferative index, AI/PI) 以及与相关基因的关系。

**方法:** 取普外科手术切除的标本 68 例, 其中胃正常组 10 例, 癌旁组 10 例, 胃癌标本 48 例。术前均未接受过化疗或放疗。男 32 例, 女 16 例。年龄 24-74 (平均 54.4) 岁。术前内镜活检病检诊断, 术后病理诊断证实。标本均经

中性甲醛(40 g/L)固定, 常规石蜡包埋, 作4  $\mu\text{m}$ 厚连续切片. 应用流式细胞仪, 分别定量分析细胞的凋亡群体和增殖群体; 免疫组化方法检测 survivin, Fas 与 FasL 基因表达的变化; 共聚焦显微镜对细胞增殖进行形态学观察.

**结果:** 在从胃正常组, 癌旁组到肿瘤组细胞的演进过程中, AI/PI 分别为  $0.46 \pm 0.14$ ,  $0.35 \pm 0.12$ ,  $0.23 \pm 0.11$ . 胃正常组, 癌旁组和肿瘤组细胞相互之间, 差异有显著性( $F = 19.453$ ,  $P = 0.000 < 0.01$ ). 胃癌细胞的 AI/PI 经频数分布表分析和检验均服从正态分布. 胃癌细胞 AI/PI 范围 0.05–0.46. 中位数和均数  $\pm$  标准差分别为 0.245 和  $0.23 \pm 0.11$ . Skewness 的值为 0.067, Kurtosis 的值为 -0.868. 胃癌细胞随着恶性进展, AI/PI 总体呈下降的趋势, 与淋巴转移和远处转移相关( $P < 0.05$ ). survivin, Fas 与 FasL 基因表达阳性染色主要定位于肿瘤细胞胞质或胞膜中, 为粗细不一的棕黄色颗粒. 在 48 例胃癌中 survivin, Fas 与 FasL 的阳性表达率分别为 56.2%, 43.8% 和 60.4%. AI/PI 的中位数为 0.245, 将胃癌分为  $> 0.245$  组和  $< 0.245$  组. 结果显示相应的两组组织切片中 survivin 阳性表达率增加( $\chi^2 = 6.857$ ,  $P < 0.01$ ), 而 Fas 的阳性表达率降低( $\chi^2 = 4.148$ ,  $P < 0.05$ ) 和 FasL 的阳性表达率增加( $\chi^2 = 4.269$ ,  $P < 0.05$ ). 共聚焦显微镜显示肿瘤组织中 Ki-67 高表达.

**结论:** AI/PI 总体呈下降的趋势, 可能与 survivin 基因表达上调, Fas 基因表达下调有关.

**关键词:** 凋亡; 增殖; 胃癌; survivin; Fas/ FasL 基因

陈金明, 李伟华, 周海波, 冯永东, 王家顺, 谢大兴, 余源. 胃癌细胞凋亡与增殖的平衡与相关基因的关系. 世界华人消化杂志 2005; 13(9): 1078–1081  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1078.asp>

## 0 引言

在人体的正常组织器官, 特定组织中 AI/PI 维持着动态的平衡状态. 细胞的凋亡与增殖是紧密偶联的, 在高增殖、高分化和更具侵袭性的肿瘤中, 常观察到高的凋亡率. 近年来, 凋亡与增殖和生存状态的关系, 引起人们的密切关注<sup>[1–3]</sup>. 凋亡和增殖细胞转换平衡机制的改变将导致组织内环境稳定的紊乱. 失控的增殖和凋亡与各种肿瘤密切相关<sup>[4]</sup>. 在幽门螺杆菌引起胃上皮细胞的凋亡研究中发现, 从萎缩性胃炎、肠上皮化生到分化不良的演变中, 细胞凋亡和细胞增殖的平衡机制发生了一系列改变, 但仍能达到新的动态平衡. 而在胃癌中平衡机制被打破<sup>[5]</sup>. 我们对胃癌细胞中的凋亡群体与增殖群体同时进行联合分析, 揭示其中发生的凋亡与增殖平衡机制的破坏规律, 并探讨其与相关基因的关系如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2000–09/2001–06 华中科技大学同济医学院

附属同济医院普外科手术切除标本, 其中胃正常组 10 例(同期胃溃疡手术切除标本, 取远离溃疡、临床观察正常的胃黏膜组织), 癌旁组 10 例(取胃癌边缘 5 cm 以内的胃黏膜组织), 胃癌标本 48 例. 胃癌患者术前均未接受过化疗或放疗. 其中男 32 例, 女 16 例. 年龄 24–74 (平均 54.4) 岁. 术前内镜活检病检诊断, 术后病理诊断证实. 标本均经中性甲醛固定, 常规石蜡包埋, 作 4  $\mu\text{m}$  厚连续切片.

1.2 方法 应用流式细胞仪, 分别定量分析细胞的凋亡群体和增殖群体; 免疫组化方法检测 survivin, Fas 与 FasL 基因表达的变化; 共聚焦显微镜对细胞增殖进行形态学观察.

1.2.1 流式细胞术 手术切除的新鲜标本迅速置于 4℃ 的冷 PBS 液中, 充分清除标本上的坏死组织、黏液和残留血液. 将经过上述处理的标本重新置于清亮的冷 PBS 液中, 用手术刀片轻柔刮削组织直至 PBS 液变混浊, 先用 80 目的尼龙网过滤. 取滤液进一步用 200 目纤维膜过滤, 滤液用 PBS 液洗涤两次 ( $800 \text{ r/min} \times 5 \text{ min}$ ), 弃上清, 细胞用 800 ml/L 的冰乙醇固定, 置于 -20℃ 的冰箱中过夜. 固定细胞用 PBS 洗涤 2 次, 2.5 g/L 的 TritonX-100 处理 5 min, 再用 PBS 洗涤 2 次, 加入用 10 g/L BSA 稀释的鼠抗人 Ki-67mAb (100  $\mu\text{L}$  含  $5 \times 10^5$  细胞与 0.25  $\mu\text{g}$  抗体反应), 在 4℃ 孵育过夜. 次日细胞用 PBS 液洗涤, 加入标有 F-ITC 羊抗鼠 IgG 抗体 (Dako 公司. 用 10 g/LBSA 以 1:40 的比例稀释), 在室温下孵育 30 min, 再次洗涤细胞后, 用 10 mg/L PI 和 1.0 g/L RnaseA 室温避光染色 20 min. 抗体特异性同质对照采用同质特异性抗体鼠抗人 IgG mAb (Dako 公司). 经处理的细胞, 荧光标记成功后, 应用 FACSort 流式细胞仪 (Becton Dickson, 美国) 检测, 经 488 nm 激光激发, 被标记的细胞发射的红色 (PI) 和绿色 (FITC) 荧光同时被 FAC Sort 流式细胞仪的标准透镜接收, 应用 Cellquest 软件 (Becton Dickson, 美国), 对上述所测细胞的双参数荧光强度任一细胞群体的平均荧光强度进行分析. 凋亡群体 (apoptosis population): 应用流式细胞术, 可诱出 Sub G1 峰, 测量凋亡群体. 增殖群体 (proliferation population): Ki-67 可代表大部分增殖细胞, 测 Ki-67 阳性部分.

1.2.2 免疫组织化学染色 采用免疫组织化学 SP 法. 一抗 survivin 兔抗人多克隆抗体、Fas 兔抗人多克隆抗体、FasL 兔抗人多克隆抗体均为美国 Santa Cruz 公司产品; SP 试剂盒为美国 Zymed 公司产品, 一抗工作浓度均为 1:50. 实验步骤严格按试剂盒说明书进行. 石蜡切片脱蜡, 以微波枸橼酸盐进行抗原修复, DAB 显色, 苏木精复染, 脱水, 透明封片, 显微镜下观察, 用已知的阳性切片作为阳性对照, 用磷酸盐

缓冲液代替一抗,作为阴性对照.结果判定:在组织切片中 survivin, Fas, FasL 阳性细胞均表现为胞质或胞膜染为棕黄色.判定标准:阳性细胞数 $\leq 5\%$ 为阴性(-),阳性细胞数 $>5\%$ 为阳性(+).

**1.2.3 共聚焦显微镜观察胃癌细胞增殖的形态学** 中性甲醛固定标本,用LEICA切片机连续制备10  $\mu\text{m}$ 切片.一抗为鼠抗人Ki-67 mAb,一抗工作浓度为1:100.常规免疫组化染色后,加PI(propidium iodide),室温避光放置20 min;经双荧光标记后的组织切片封片后用Confocal(购自Leica公司)进行扫描,经488 nm激光激发,被标记细胞同时发射红色(PI)和绿色(FITC)荧光.分别被Confocal的不同透镜接收.

**统计学处理** 采用SPSS11.1统计软件包进行统计学处理.计量资料采用单因素方差分析,实验数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,当各组均数之间差异有显著性后,进一步两两比较采用 $q$ 检验.计数资料采用 $\chi^2$ 检验.

## 2 结果

**2.1 胃癌演进过程中 AI/PI 变化规律的研究** 胃正常组,癌旁组到肿瘤组细胞演进过程中, AI/PI 呈逐渐下降的趋势.胃正常组,癌旁组和肿瘤组细胞相互之间,差异有显著性( $P<0.01$ ,表1).

表1 胃癌演进过程中 AI/PI 变化规律的研究

组别	<i>n</i>	AI/PI(mean $\pm$ SD)
正常组	10	0.46 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>
癌旁组	10	0.35 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>
肿瘤组	48	0.23 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P<0.01$ .

表2 胃癌细胞 AI/PI 与临床病理的关系

临床病理	<i>n</i>	AI/PI(mean $\pm$ SD)
肿瘤大小		
$\leq 4 \text{ cm}$	20	0.25 $\pm$ 0.11
$>4 \text{ cm}$	28	0.20 $\pm$ 0.11
分化程度		
高	14	0.27 $\pm$ 0.11
中	18	0.22 $\pm$ 0.09
低	16	0.19 $\pm$ 0.10
浸润		
T1+T2	19	0.26 $\pm$ 0.12
T3+T4	29	0.20 $\pm$ 0.09
淋巴结转移		
N0	12	0.28 $\pm$ 0.12
N1	20	0.23 $\pm$ 0.09
N2-N3	16	0.17 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
远处转移		
M0	38	0.24 $\pm$ 0.11
M1	10	0.17 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$ .

**2.2 胃癌 AI/PI 分布规律与临床病理的关系** 胃癌细胞的 AI/PI 经频数分布表分析和检验均服从正态分布.胃癌细胞 AI/PI 范围 0.05-0.46.中位数和均数 $\pm$ 标准差分别为 0.245 和 0.23  $\pm$  0.11. Skewness 的值为 0.067, Kurtosis 的值为 -0.868.胃癌细胞 AI/PI 与临床病理特征的关系中, AI/PI 在肿瘤的大小、分化程度和浸润深度等病理特征中, AI/PI 呈下降的趋势,但未见统计学差异.随着肿瘤细胞的淋巴转移、远处转移,差异有显著性( $P<0.05$ ,表2).

**2.3 胃癌 AI/PI 与 survivin, Fas 与 FasL 的关系** survivin, Fas 与 FasL 基因表达阳性染色主要定位于肿瘤细胞胞质或胞膜中,为粗细不一的棕黄色颗粒(图1A-B).在48例胃癌中 survivin, Fas 与 FasL 的阳性表达率分别为 56.2%, 43.8% 和 60.4%. survivin 蛋白表达阳性的27例癌组织中有15例Fas阳性,20例FasL阳性.经Spearman等级相关分析survivin基因与Fas, FasL的表达显著性相关(相关系数分别为 $r = 0.37$ 和 $r = 0.407$ , $P<0.01$ ).根据AI/PI的中位数值0.245,将胃癌细胞分为 $>0.245$ 组和 $<0.245$ 组.结果显示相应的两组组织切片中 survivin 阳性表达率增加( $\chi^2 = 6.857$ , $P<0.01$ ),而Fas的阳性表达率降低( $\chi^2 = 4.148$ , $P<0.05$ )和FasL的阳性表达率增加( $\chi^2 = 4.269$ , $P<0.05$ ,表3).

表3 胃癌细胞 AI/PI 与 survivin, Fas 与 FasL 的关系

AI/PI	<i>n</i>	surviving(+) <i>n</i> (%)	Fas(+) <i>n</i> (%)	FasL(+) <i>n</i> (%)
$>0.245$	24	9(37.5)	14(58.3)	11(45.8)
$<0.245$	24	18(75.0) <sup>b</sup>	7(29.2) <sup>a</sup>	18(75.0) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs  $>0.245$ 组.

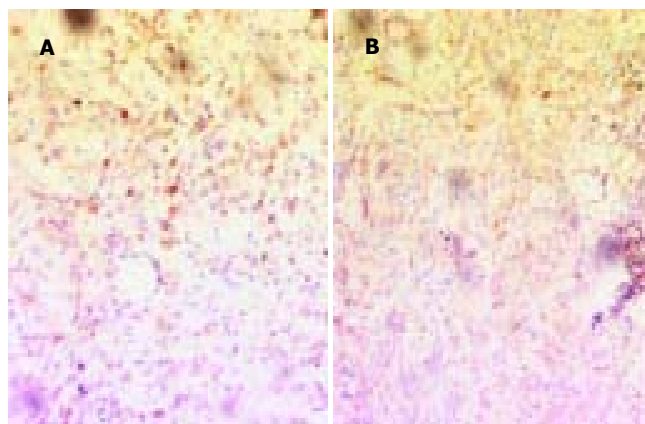


图1 胃癌 survivin, Fas 阳性表达 SP  $\times 400$ . A: survivin; B: Fas.

另共聚焦显微镜下见肿瘤组织中Ki-67高表达.由胃腺癌可见,腺体大小不等,排列紊乱,间距减少,腺体中Ki-67高表达(图2).

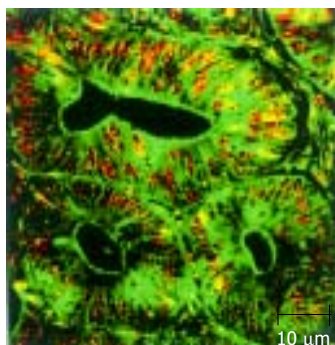


图2 胃癌组织 Ki-67 表达阳性(绿色 FITC)共聚焦显微镜  $\times 1600$ .

### 3 讨论

探讨肿瘤演化进展中细胞凋亡和增殖平衡破坏的机制, 对肿瘤生物学特性的揭示, 具有重要意义. 流式细胞术能迅速而准确地分析大的细胞群体的凋亡率和增殖率. 运用 Sub G1 法分析细胞的凋亡群体, 同时运用双参数法分析 Cyclins 和 DNA 含量或通过增殖相关蛋白区分 G0 期和增殖细胞的方法分析细胞增殖群体<sup>[6-8]</sup>. 人类 Ki-67 蛋白的表达严格与细胞增殖有关. Ki-67 核抗原是出现在除 G0 期以外(某些作者认为还包括 G1 早期)所有细胞周期中的特异性非组蛋白, 与细胞合成代谢有关, 是检测细胞增殖的常用和较好的标记物, 但他的功能意义还尚不清楚<sup>[9]</sup>. 本结果显示, 胃癌中凋亡的频数分布基本呈降低的趋势, 而增殖却呈逐渐增高的趋势, 二者密切相关. 在肿瘤的临床病理特征中, 随着肿瘤的恶性进展 AI/PI 呈下降的趋势. AI/PI 提示肿瘤细胞群体中净增细胞所占的比例. AI/PI 总体呈下降的趋势表明, 随着肿瘤细胞的恶性进展, 肿瘤细胞群体中净增细胞所占的比例越来越大. 这可能与肿瘤细胞的进化演进中, 由于固定的突变率的存在, 肿瘤细胞逐渐获得异常增殖、减少凋亡、无限复制和易侵犯和转移等能力密切相关. 但是, 肿瘤细胞生长的过程也伴随着一系列潜在的生长抑制的现象, 例如凋亡、分化、衰老、低氧和限制造成细胞的丧失<sup>[4, 10]</sup>.

特定组织中癌基因诱导的凋亡与增殖平衡的破坏在肿瘤的演化进展中起决定作用<sup>[11]</sup>. survivin 是 IAP 家族的一个新成员. 生存素具有强大的抑制细胞凋亡的功能, 能够直接抑制 caspase3 和 caspase7 的活性, 抑制 Fas, Bax, caspase 及多种化疗药物诱导的凋亡, 并在细胞的有丝分裂和胞质分裂中起重要作用<sup>[12-14]</sup>. Fas 抗原是细胞膜 I 型跨膜蛋白, FasL 是

Fas 在人体内的天然配体, 为 II 型跨膜蛋白, 他们都属于 TNF 家族. Fas/FasL 结合后可转导凋亡信号, 诱导 Fas 所在细胞的凋亡. 随着肿瘤细胞的恶性进展, 胃癌细胞 AI/PI 的降低可能与肿瘤细胞 survivin 基因表达的上调和 Fas 表达的下调的协同作用有关.

总之, 探讨肿瘤细胞凋亡与增殖的平衡及其与相关基因的关系, 对指导肿瘤的防治具有积极的意义. 如何运用现代分子生物学的手段, 修复和纠正肿瘤相关基因的结构和功能缺陷, 干预肿瘤细胞凋亡与增殖平衡的破坏, 都需进一步深入研究.

### 4 参考文献

- 1 Liu S, Edgerton SM, Moore DH 2nd, Thor AD. Measures of cell turnover(proliferation and apoptosis)and their association with survival in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7: 1716-1723
- 2 Michael-Robinson JM, Reid LE, Purdie DM, Biemer-Huttmann AE, Walsh MD, Pandeya N, Simms LA, Young JP, Leggett BA, Jass JR, Radford-Smith GL. Proliferation, apoptosis, and survival in high-level microsatellite instability sporadic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:2347-2356
- 3 Stanton KJ, Sidner RA, Miller GA, Cummings OW, Schmidt CM, Howard TJ, Wiebke EA. Analysis of Ki-67 antigen expression, DNA proliferative fraction, and survival in resected cancer of the pancreas. *Am J Surg* 2003;186:486-492
- 4 Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001;411:342-348
- 5 Xia HH, Talley NJ. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection:implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:16-26
- 6 Lockshin RA, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:545-550
- 7 Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin Hematol* 2001;38: 179-193
- 8 Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem* 1994;218: 314-319
- 9 Scholzen T, Gerdes J. The ki-67 protein:from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182:311-322
- 10 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70
- 11 Pelengaris S, Rudolph B, Littlewood T. Action of myc in vivo-proliferation and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10: 100-105
- 12 Sui L, Dong Y, Ohno M, Watanabe Y, Sugimoto K, Tokuda M. Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. *Int J Oncol* 2002; 21:315-320
- 13 Hay BA. Understanding IAP function and regulation:a view from *Drosophila*. *Cell Death Differ* 2000;7:1045-1056
- 14 Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltsersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998;58:5315-5320

编辑 潘伯荣 审读 张海宁