

- 7 Sever-Chroneos Z, Angus SP, Fribourg AF, Wan H, Todorov I, Knudsen KE, Knudsen ES. Retinoblastoma tumor suppressor protein signals through inhibition of cyclin-dependent kinase 2 activity to disrupt PCNA function in S phase. *Mol Cell Biol* 2001;21:4032-4045
- 8 Usnarska-Zubkiewicz L, Maryniak R, Podolak-Dawidziak M, Wozniak Z, Jelen M, Ramlau R, Poreba M, Kuliczowski K. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and of nucleolar organizer regions (AgNORs) correlates with

- the morphological type of bone marrow plasma cells in multiple myeloma (MM). *Pol Arch Med Wewn* 2003;109:257-263
- 9 Tong Q, Zeng F, Lin C, Zhao J, Lu G. Growth inhibiting effects of antisense eukaryotic expression vector of proliferating cell nuclear antigen gene on human bladder cancer cells. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:1203-1206
- 10 Tabs S, Avci O. Induction of the differentiation and apoptosis of tumor cells in vivo with efficiency and selectivity. *Eur J Dermatol* 2004;14:96-102

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

FHIT 基因蛋白表达与结直肠癌及癌前期病变的临床关系

任建林, 施华秀, 王琳, 洪东旭, 陈建民, 刘明, 叶震世, 董菁, 卢雅丕, 林辉, 潘金水, 林逊汀

任建林, 施华秀, 王琳, 洪东旭, 陈建民, 刘明, 叶震世, 董菁, 卢雅丕, 林辉, 潘金水, 林逊汀, 厦门大学中山医院消化内科 福建省厦门市 361004
项目负责人: 任建林, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学中山医院消化内科.
jianlinr@msn.com
电话: 0592-2292017 传真: 0592-2292017
收稿日期: 2004-04-22 接受日期: 2004-05-09

任建林, 施华秀, 王琳, 洪东旭, 陈建民, 刘明, 叶震世, 董菁, 卢雅丕, 林辉, 潘金水, 林逊汀. FHIT 基因蛋白表达与结直肠癌及癌前期病变的临床关系. 世界华人消化杂志 2004;12(8):1964-1966

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1964.asp>

摘要

目的: 探讨脆性组氨酸三联体(fragile histidine trail, FHIT)蛋白在 45 例结直肠癌、36 例结直肠腺瘤和 23 例正常对照组中的表达情况。

方法: 标本经 40 g/L 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 采用免疫组化 SP 法检测 FHIT 在结直肠癌、结直肠腺瘤和正常对照组中的表达。

结果: 在 45 例结直肠癌中 28 例 FHIT 蛋白表达显著减少或缺失, 5 例表达减弱, 12 例表达阳性; 其中结直肠癌 Dukes A、B 和 C 期 FHIT 蛋白表达阴性比例分别为 6/11、5/12 和 17/22。在 36 例结直肠腺瘤中 7 例 FHIT 蛋白表达显著减少或缺失, 4 例表达减弱, 25 例表达阳性; 其中结直肠腺瘤伴轻、中和重度不典型增生 FHIT 蛋白表达阴性比例分别为 2/16、1/7 和 4/13。FHIT 蛋白阴性表达在结直肠癌和正常对照组(62.2% vs 4.4%, $\chi^2=25.33$, $P<0.01$)、结直肠癌和结直肠腺瘤(62.2% vs 19.4%, $\chi^2=14.19$, $P<0.01$)、结直肠癌未伴淋巴转移的 Dukes A+B 期和已伴淋巴转移的 C 期(47.8% vs 77.3%, $\chi^2=4.28$, $P<0.05$)间均有显著性差异, 而在结直肠腺瘤伴轻度不典型增生和中和、重度不典型增生(12.5% vs 25.0%, $\chi^2=0.84$, $P>0.25$), 结直肠腺瘤和正常对照组(19.4% vs 4.4%, $\chi^2=3.51$, $P>0.05$)中无显著性差异。

结论: FHIT 蛋白在结直肠癌中呈低表达或缺失, 且 FHIT 低表达与转移状况有相关关系, 提示该基因可能与结直肠癌的发生发展有关。

0 引言

FHIT 基因最近在国外成功分离并定位于染色体 3p14.2, 该基因具有不稳定性^[1-2], 在多种肿瘤中, 包括食管癌^[3]、胃癌^[4]、结肠癌^[5-7]、肺癌^[8-9]、肝癌^[10]、头颈癌^[11]、乳腺癌^[12]、胰腺癌^[13]和肾癌^[14]中, 均有改变, 以缺失为主, 包括外显子和/或内含子的缺失, 还有外源序列的插入^[15]。国外已有少量有关结直肠癌中 FHIT 基因或表达异常的报道, 对其在结直肠癌发生和发展中的作用尚有争议。我们采用免疫组化 SP 法检测结直肠癌和结直肠腺瘤中 FHIT 蛋白表达情况, 探讨 FHIT 基因与结直肠癌和结直肠腺瘤的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 厦门大学医学院第一临床学院病理科 2003-01/2003-10 存档石蜡块, 男 43 例, 女 61 例, 年龄 16-80(平均 59.5 岁)。其中结直肠癌 45 例, 结直肠腺瘤 36 例和正常对照组 23 例。结直肠癌 Dukes A 期 11 例, B 期 12 例和 C 期 22 例。FHIT 抗体为 Santa Cruz 公司产品, 购自北京中山生物工程公司。

1.2 方法 所有标本均经 40 g/L 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4 μ m 切片, 切片脱蜡至水, 在 30 mL/L 过氧化氢-甲醇中浸泡 10 min 以灭活内源性过氧化氢酶, 采用枸橼酸-微波-SP 法在 10 mmol/L 枸橼酸(pH 6.0)中煮沸 5 min, 保温 10 min, 100 mL/L 羊血清封闭。加入兔抗人多克隆 FHIT 抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 免疫组化染色按 SP 试剂盒推荐方法进行。观察 FHIT 蛋白的分布、阳性强度和阳性率。参照文献标准[16], 先按染色强度评分:

无色0分;浅黄色1分;黄色2分;棕黄色3分.再按阳性细胞所占百分比评分:阴性0分;阳性细胞 $\leq 10\%$ 1分;阳性细胞11–50% 2分;阳性细胞51–75% 3分;阳性细胞 $>75\%$ 4分.染色强度与阳性细胞相乘,乘积9–12分为表达阳性;6–8分为表达减弱;0–4分表达显著减少或缺失,表达阴性.

统计学处理 在SAS6.12软件包中进行检验,趋势性检验采用 χ^2 检验.

2 结果

在正常组织中 FHIT 基因蛋白主要表达于正常或非癌结肠黏膜和癌组织上皮细胞的胞质以及一些间质细胞如淋巴细胞、浆细胞和组织细胞的胞核和胞质中,呈棕黄色颗粒状.在23例正常对照组中有22例FHIT蛋白表达阳性,1例表达阴性,阴性表达率为4.4%(1/23,表1).

表1 FHIT 蛋白在不同肠黏膜组织中的表达

组织类型	FHIT 表达(染色强度与阳性细胞乘积)			合计
	0–4分(阴性)	6–8分	9–12分(阳性)	
结直肠癌	28	5	12	45
Dukes A 期	6	2	3	11
Dukes B 期	5	2	5	12
Dukes C 期	17	1	4	22
结直肠腺瘤	7	4	25	36
轻度不典型增生	2	2	12	16
中度不典型增生	1	1	5	7
重度不典型增生	4	1	8	13
正常黏膜	1		22	23

2.1 FHIT蛋白在结直肠癌中的表达 在45例结直肠癌中有28例FHIT蛋白表达显著减少或缺失,即阴性表达率为62.2%,5例表达减弱,12例表达阳性,且阳性表达者染色强度较正常黏膜高;其中结直肠癌Dukes A、B和C期FHIT蛋白表达阴性比例分别为6/11、5/12和17/22.结直肠癌FHIT蛋白阴性表达率显著高于正常对照组(62.2% vs 4.4%, $\chi^2=25.33$, $P<0.01$),具有显著性差异. FHIT蛋白在未伴淋巴转移的Dukes A+B期和已伴淋巴转移的C期中表达有显著性差异(47.8% vs 77.3%, $\chi^2=4.28$, $P<0.05$).

2.2 FHIT 蛋白在结直肠腺瘤中的表达 在36例结直肠腺瘤中有7例FHIT蛋白表达显著减少或缺失,即阴性表达率为19.4%,4例表达减弱,25例表达阳性;其中结直肠腺瘤伴轻度、中度和重度不典型增生FHIT蛋白表达阴性比例分别为2/16、1/7和4/13. FHIT蛋白阴性表达率在结直肠腺瘤与结直肠癌间存在显著性差异(19.4% vs 62.2%, $\chi^2=14.19$, $P<0.01$).FHIT蛋白阴性表达在结直肠腺瘤伴轻度不典型增生和中+重度不典型增生中表达无显著差异(12.5% vs 25.0%, $\chi^2=0.84$, $P>0.25$),与正常对照组比较亦无显著性差异(19.4% vs

4.4%, $\chi^2=3.51$, $P>0.05$).

3 讨论

FHIT基因定位于染色体3p14.2,其cDNA全长为1095 bp,共有10个外显子,其中5–9为编码外显子,跨越 $t(3;8)$ 易位断裂点和极脆性区域FRA3B. FHIT存在于大多数正常组织中,国外发现多种肿瘤组织中FHIT蛋白表达频繁降低或丢失,并发现与FHIT基因转录和缺失有关,提示该基因为肿瘤候选抑制基因,该蛋白有肿瘤抑制性和很强的诱导细胞凋亡能力. Capuzzi *et al*^[17]对55例胃腺癌的研究表明,49%的病例FHIT蛋白完全丢失, FHIT蛋白缺失与Lauren分类、肿瘤浸润、核分级无关,而与分期、分级、生存期相关,分期越晚、分级越高, FHIT丢失率越大, FHIT表达阴性患者存活时间明显低于FHIT表达阳性患者. Ho *et al*^[18]对48例早期肺非小细胞癌(NSCLC)的研究显示,58.3%存在FHIT表达缺失,说明FHIT变化在支气管上皮细胞生长中起重要作用.

我们研究证实结直肠癌中存在FHIT蛋白表达显著减少或缺失,其阴性表达率为62.2%,略高于国外研究结果, Hao *et al*^[16]采用免疫组化检测结肠癌和中重度不典型增生腺瘤中FHIT蛋白表达,发现FHIT蛋白阴性表达率分别为44%和17%. 赵坡 *et al*^[19]采用类似方法检测60例结肠癌中FHIT蛋白表达,发现55%结肠癌FHIT蛋白表达显著减少或缺失,说明FHIT低表达在结肠癌发生、发展中具有重要作用.我们研究中癌组织FHIT蛋白低表达在Dukes分期组中的分布差异具有显著性,提示FHIT蛋白表达减少与转移状况具有一定的相关关系,与Kuwai *et al*^[20]的研究结果相一致. Mori *et al*^[21]采用RT-PCR方法对62例结肠癌研究中,发现结肠癌异常FHIT转录本的检出率为50%. Luceri *et al*^[22]在56例结直肠癌中发现29例(55.18%)存在FHIT基因高频率的缺失、异常转录,提示FHIT基因主要通过缺失和/或异常转录参与肿瘤的发病机制.

目前有关FHIT与结直肠腺瘤的关系尚有争议,我们研究发现结直肠腺瘤FHIT阴性表达率为19.4%,与Hao *et al*^[16]的研究结果一致,但低于Morikawa *et al*^[23]的研究结果,在他的研究中,47%结直肠腺瘤存在FHIT异常表达,且与不典型增生程度有关. Saitoh *et al*^[24]检测211例腺瘤(其中22.7%为扁平凹陷型腺瘤)FHIT蛋白表达情况,发现扁平凹陷型腺瘤FHIT蛋白表达明显强于同样大小的隆起型腺瘤, FHIT在腺瘤中的表达异常,有待于进一步探讨.

4 参考文献

- Corbin S, Neilly ME, Espinosa R 3rd, Davis EM, McKeithan TW, Le Beau MM. Identification of unstable sequences within the common fragile site at 3p14.2: implications for the mechanism of deletions within fragile histidine triad gene/common fragile site at 3p14.2 in tumors. *Cancer Res* 2002;62:3477-3484

- 2 Becker NA, Thorland EC, Denison SR, Phillips LA, Smith DI. Evidence that instability within the FRA3B region extends four megabases. *Oncogene* 2002;21:8713-8722
- 3 Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Mori M, Croce CM. Allele loss and promoter hypermethylation of VHL, RAR-beta, RASSF1A, and FHIT tumor suppressor genes on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:3724-3728
- 4 Skopelitou AS, Mitselou A, Katsanos KH, Alexopoulou V, Tsianos EV. Immunohistochemical expression of Fhit protein in *Helicobacter pylori* related chronic gastritis, gastric precancerous lesions and gastric carcinoma: correlation with conventional clinicopathologic parameters. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:515-523
- 5 Kuwai T, Tanaka S, Kaio E, Hiyama T, Ito M, Kitadai Y, Sumii M, Yoshihara M, Haruma K, Chayama K. Clinical significance of Fhit expression in development of colorectal carcinoma of various macroscopic types. *Int J Mol Med* 2003;12:437-442
- 6 Andachi H, Yashima K, Koda M, Kawaguchi K, Kitamura A, Hosoda A, Kishimoto Y, Shiota G, Ito H, Makino M, Kaibara N, Kawasaki H, Murawaki Y. Reduced Fhit expression is associated with mismatch repair deficiency in human advanced colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 2002;87:441-445
- 7 Mady HH, Melhem MF. FHIT protein expression and its relation to apoptosis, tumor histologic grade and prognosis in colorectal adenocarcinoma: an immunohistochemical and image analysis study. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:351-358
- 8 朱丽琴, 刁路明, 陈德基, 李红钢, 刘绚, 邹祖玉, 李蓓芸, 王敏, 刘铭球. 非小细胞肺癌中 hMSH2、FHIT 基因表达的相关性及意义. *癌症* 2003;22:571-574
- 9 Yendamuri S, Kuroki T, Trapasso F, Henry AC, Dumon KR, Huebner K, Williams NN, Kaiser LR, Croce CM. WW domain containing oxidoreductase gene expression is altered in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2003;63:878-881
- 10 Zhao P, Song X, Nin YY, Lu YL, Li XH. Loss of fragile histidine triad protein in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1216-1219
- 11 Huang LW, Chao SL, Chen TJ. Reduced Fhit expression in cervical carcinoma: correlation with tumor progression and poor prognosis. *Gynecol Oncol* 2003;90:331-337
- 12 Yang Q, Nakamura Y, Nakamura M, Yoshimura G, Suzuma T, Umemura T, Mori I, Sakurai T, Kakudo K. Loss of Msh2 is not associated with FHIT deletion in breast carcinomas. *Anticancer Res* 2002;22:2591-2595
- 13 Tsujituchi T, Sasaki Y, Kubozoe T, Konishi Y, Tsutsumi M. Alterations in the Fhit gene in pancreatic duct adenocarcinomas induced by N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine in hamsters. *Mol Carcinog* 2003;36:60-66
- 14 Sukosd F, Kuroda N, Beothe T, Kaur AP, Kovacs G. Deletion of chromosome 3p14.2-p25 involving the VHL and FHIT genes in conventional renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:455-457
- 15 Su T, Suzui M, Wang L, Lin CS, Xing WQ, Weinstein IB. Deletion of histidine triad nucleotide-binding protein 1/PKC-interacting protein in mice enhances cell growth and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7824-7829
- 16 Hao XP, Willis JE, Pretlow TG, Rao JS, MacLennan GT, Talbot IC, Pretlow TP. Loss of fragile histidine triad expression in colorectal carcinomas and premalignant lesions. *Cancer Res* 2000;60:18-21
- 17 Capuzzi D, Santoro E, Hauck WW, Kovatich AJ, Rosato FE, Baffa R, Huebner K, McCue PA. Fhit expression in gastric adenocarcinoma: correlation with disease stage and survival. *Cancer* 2000;88:24-34
- 18 Ho WL, Chang JW, Tseng RC, Chen JT, Chen CY, Jou YS, Wang YC. Loss of heterozygosity at loci of candidate tumor suppressor genes in microdissected primary non-small cell lung cancer. *Cancer Detect Prev* 2002;26:343-349
- 19 赵坡, 吕亚莉, 胡颖川, 钟梅, 李志军, 李向红. 结直肠癌脆性组氨酸三联体蛋白表达丢失研究. *中华病理学杂志* 2002;31:124-127
- 20 Kuwai T, Tanaka S, Kaio E, Hiyama T, Ito M, Kitadai Y, Sumii M, Yoshihara M, Haruma K, Chayama K. Clinical significance of Fhit expression in development of colorectal carcinoma of various macroscopic types. *Int J Mol Med* 2003;12:437-442
- 21 Mori M, Mimori K, Masuda T, Yoshinaga K, Yamashita K, Matsuyama A, Inoue H. Absence of Msh2 protein expression is associated with alteration in the FHIT locus and Fhit protein expression in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:7379-7382
- 22 Luceri C, Guglielmi F, De Filippo C, Caderni G, Mini E, Biggeri A, Napoli C, Tonelli F, Cianchi F, Dolaro P. Clinicopathologic features and FHIT gene expression in sporadic colorectal adenocarcinomas. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:637-641
- 23 Morikawa H, Nakagawa Y, Hashimoto K, Niki M, Egashira Y, Hirata I, Katsu K, Akao Y. Frequent altered expression of fragile histidine triad protein in human colorectal adenomas. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:205-210
- 24 Saitoh Y, Waxman I, West AB, Popnikolov NK, Gatalica Z, Watari J, Obara T, Kohgo Y, Pasricha PJ. Prevalence and distinctive biologic features of flat colorectal adenomas in North American population. *Gastroenterology* 2002;122:839-840

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

正常人结肠上皮细胞体外培养和鉴定

张安平, 刘宝华, 张连阳, 王亚旭, 李春穴

张安平, 刘宝华, 张连阳, 王亚旭, 李春穴, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科 重庆市 400042

项目负责人: 刘宝华, 400042, 重庆市大坪长江支路10号, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科. lbh57268@163.com

电话: 023-68757248

收稿日期: 2004-05-12 接受日期: 2004-06-17

摘要

目的: 探讨正常人肠上皮细胞(intestinal epithelial cells,

IEC)的分离、体外培养方法, 为研究IEC以及与IEC相关疾病建立合适的细胞模型。

方法: 正常结肠黏膜取自外科手术的大肠恶性肿瘤患者距肿瘤10 cm的结肠组织, 联合运用I型胶原酶和嗜热菌蛋白酶消化分离IEC, 接种于含多种促IEC生长的营养成分的DMEM培养液内, 根据IEC和成纤维细胞贴壁时间的差