

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2010. 01. 017

胃癌组织三叶因子家族的表达与细胞增殖和凋亡的相关性

冯丽英, 秦玉彩, 马 丽, 尹 希, 孙泽明, 田 惠

Relationship Between Expression of Trefoil Factor Family and Gastric Epithelial Cell Proliferation and Apoptosis in Gastric Cancer

FENG Li-ying, QIN Yu-cai, MA Li, YIN Xi, SUN Ze-ming, TIAN Hui

Department of Gastroenterology, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Abstract: Objective To investigate the expression of TFF1, TFF2, TFF3 and to investigate the relationship between TFF1, TFF2, TFF3 and cell proliferation, cell apoptosis in gastric cancer. **Methods** The expression of TFF1, TFF2, TFF3 and PCNA were measured by immunohistochemical staining (SP) in gastric cancer(40 specimens) and similar normal gastric mucosa(20 specimens), intestinal mataplasia in gastric mucosa(30 specimens), displasic gastric mucosa(24 specimens), and apoptosis determined by terminal deoxy-nucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling(TUNEL). **Results** In similar normal gastric mucosa, intestinal mataplasia mucosa, displasic mucosa and gastric cancer, the levels of TFF1 and TFF2 expression and apoptotic index had a decreasing tendency($P<0.05$, respectively). By contrast, TFF3 was not detected in similar normal gastric mucosa. The expression level of TFF3 had a increasing tendency in the gastric mucosa of intestinal mataplasia, displasic gastric mucosa and gastric cancer($P<0.05$). The level of apoptotic index had an increasing tendency from normal gastric mucosa to intestinal mataplasia mucosa, but decreasing tendency from displasic gastric mucosa to gastric cancer. There was a negative correlation between the expression of TFF1 and TFF2 and proliferating index, but a positive corrolation between the expression of TFF1 and TFF2 and apoptotic index in gastric cancer(both $P<0.05$). There was a positive correlation between the expression of TFF3 and proliferating index, and a negative correlation between the TFF3 and apoptotic index in gastric cancer. **Conclusion** TFF might play various roles in the course of gastric cancer via influencing cell proliferation and apoptosis.

Key words: Gastric cancer; Trefoil factor family; Cell proliferation; Cell apoptosis

摘 要:目的 探讨三叶因子 1(TFF1)、三叶因子 2(TFF2)、三叶因子 3(TFF3)在胃癌组织中的表达及其与细胞增殖、凋亡的相关性。**方法** 检测 40 例胃癌组织、20 例正常胃黏膜、30 例肠上皮化生及 24 例不典型增生胃黏膜中 TFF1、TFF2、TFF3 和增殖细胞核抗原(PCNA)的表达及其细胞凋亡情况。**结果** TFF1、TFF2在正常胃黏膜、不典型增生胃黏膜、肠上皮化生胃黏膜及胃癌组织中均有表达,两者表达强度依次均呈递减趋势(均 $P<0.05$)。TFF3 在正常胃黏膜没有表达,而在肠上皮化生胃黏膜、不典型增生胃黏膜和胃癌组织中均有表达,表达强度依次呈递增趋势($P<0.05$)。胃癌组织中 TFF1、TFF2 表达与细胞增殖指数呈负相关($r=-0.55, r=-0.38$, 均 $P<0.05$),与细胞凋亡指数呈正相关($r=0.58, r=0.48$, 均 $P<0.05$);TFF3 的表达与细胞增殖指数呈正相关($r=0.55, P<0.05$),与细胞凋亡指数呈负相关($r=-0.48, P<0.05$)。**结论** TFF 可能通过影响胃癌细胞的增殖和凋亡,在胃癌发生、发展中起不同的作用。

关键词: 胃癌;三叶因子家族;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号: R392. 11; R735. 2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)01-0063-03

收稿日期:2008-09-03;修回日期:2008-12-03
基金项目:河北省科技攻关资助项目(05276101D-49)
作者单位:050000 石家庄,河北医科大学第二医院消化内科
作者简介:冯丽英(1959-),女,硕士,主任医师,主要从事慢性胃病和胃癌的研究

0 引言

三叶因子家族(trefoil factor family, TFF)包括三叶因子 1(trefoil factor1, TFF1)、三叶因子 2(trefoil factor 2, TFF2)、三叶因子 3(trefoil factor 3, TFF3)。近年发现 TFF 与多种肿瘤,如乳腺癌、大肠癌等的发

生发展有关^[1-2],但其在胃癌中的作用观点不一,对细胞增殖凋亡的影响尚未阐明。为此,我们检测胃癌发生不同阶段的胃黏膜组织 TFF1、TFF2、TFF3 的表达以及细胞增殖与凋亡情况,探讨 TFF 在胃癌中的作用及与细胞增殖和凋亡的相关性。

1 资料与方法

1.1 病例选择

收集 2005 年 2 月~12 月间就诊于我院的 74 例患者的胃镜活检标本,其中功能性消化不良患者 20 例(正常胃黏膜组);慢性浅表性胃炎伴肠上皮化生 30 例(肠上皮化生组);慢性萎缩性胃炎伴轻、中度不典型增生 24 例(不典型增生组),男 41 例,女 33 例,年龄为 31~78 岁,平均 56.5 岁;同期获取在我院外科住院手术的胃癌患者手术后标本 40 例(胃癌组)其中男 29 例,女 11 例,年龄为 45~80 岁,平均 62.5 岁。入选病例均经病理证实并符合 2000 年全国慢性胃炎研讨会共识意见^[3]。排除严重心脑血管疾病和其他肿瘤患者。

1.2 检测方法

所有标本 HE 染色观察组织学情况。用免疫组织化学染色 SP 法检测 TFF 和增殖细胞核抗原(PCNA),鼠抗人 TFF1 单克隆抗体和 SP 试剂盒,购自北京中杉金桥生物技术公司;兔抗人 TFF2 多克隆抗体由澳大利亚 Western 医院 Giraud 教授惠赠;兔抗人 TFF3 多克隆抗体由北京大学生命科学院蛋白质工程和植物基因工程实验室茹炳根教授惠赠;组织细胞凋亡检测用切口末端标记法(TUNEL),试剂盒为武汉博士德生物工程公司产品,所有操作方法及步骤按试剂盒说明书进行。

1.3 结果判断

TFF 阳性信号定位于细胞质,呈黄色或棕黄色,表达水平采用染色强度评分与阳性细胞百分率评分的积分表示,每张切片选取 5 个高倍视野计数阳性细胞数和计数细胞总数阳性细胞百分率=阳性细胞数/计数细胞总数×100%为。阳性细胞百分率分 0~3 级:≤5%为 0 分,>5%~25%为 1 分,>25%~50%为 2 分,>50%为 3 分。染色强度分 0~2 级:0:完全

阴性,与背景一致;1:染色呈淡黄色,略高于背景;2:染色呈黄色或棕黄色,明显高于背景。每张片子的染色强度与阳性细胞百分率得分相乘为其最后得分。两项相乘后分 4 级:0~1 分为(-),2 分为(+),3~4 分为(++),5 分以上为(+++)。细胞增殖和凋亡阳性染色均定位于细胞核,呈棕黄色,显微镜下数 5 个高倍视野,分别计数阳性细胞数和细胞总数。增殖指数(proliferating index, PI) = 阳性细胞数/细胞总数×100%,凋亡指数(apoptotic index, AI) = 阳性细胞数/细胞总数×100%。

1.4 统计学方法

应用 SPSS12.0 统计软件, TFF 表达用秩和检验,以平均秩次表示蛋白表达的综合强度;细胞增殖和凋亡的比较采用方差分析,与 TFF 的相关性用 spearman 等级相关分析。 $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 TFF 蛋白的表达

TFF1、TFF2 在正常胃黏膜、肠上皮化生、不典型增生胃黏膜及胃癌组织中均有表达,从正常胃黏膜、肠上皮化生、不典型增生到胃癌组织,两者表达强度(用平均秩次表示)呈逐渐递减趋势(均 $P<0.05$)。TFF3 在正常胃黏膜没有表达,在肠上化生、不典型增生胃黏膜及胃癌组织中均有表达,表达强度依次(用平均秩次表示)呈逐渐递增趋势($P<0.05$),见表 1。

2.2 PCNA 表达及其与 TFF 的相关性

PCNA 在正常胃黏膜、肠上皮化生、不典型增生及胃癌组织中均有阳性表达,PI 逐渐上升($P<0.05$)。胃癌组织中 TFF1、TFF2 表达均与 PI 呈负相关($r = -0.55, r = -0.38$, 均 $P<0.05$), TFF3 的表达与 PI 呈正相关($r = 0.55, P<0.05$),见表 2。

2.3 细胞凋亡及其与 TFF 的相关性

AI 从正常胃黏膜到肠上皮化生胃黏膜表达逐渐上升,但在不典型增生到胃癌组织,呈逐渐下降趋势($P<0.05$)。胃癌组织中 TFF1、TFF2 表达与 AI 呈正相关($r = 0.58, r = 0.48$, 均 $P<0.05$), TFF3 表达与 AI 呈负相关($r = -0.48, P<0.05$)。

表 1 TFF1、TFF2、TFF3 在不同胃黏膜病变中的表达
Table 1 Expression of TFF1, TFF2 and TFF3 in physiological and different pathological gastric mucosa

Groups	n	TFF1				Mean score	TFF2				Mean score	TFF3				Mean score
		(-)	(+)	(++)	(+++)		(-)	(+)	(++)	(+++)		(-)	(+)	(++)	(+++)	
Normal gastric mucosa	20	0	1	9	10	76.4	0	0	12	8	79.8	20	0	0	0	0
Intestinal metaplasia	30	3	4	16	7	57.2	2	3	21	4	60.1	12	11	6	1	35.8
Displastic gastric mucosa	24	2	6	9	7	56.1	0	6	17	1	53.4	7	6	6	5	47.6
Gastric cancer	40	3	14	15	8	9.41	12	2	23	3	46.9	10	3	14	13	56.2

表 2 各组胃黏膜组织细胞增殖和凋亡的比较

Table 2 PI and AI in pathological gastric mucosa of each group

Groups(n)	PI($\bar{x} \pm s$)	AI($\bar{x} \pm s$)
Normal gastro-mucosa	9.99 $\pm$ 2.29 [▲]	7.54 $\pm$ 1.66 [▲]
Intestinal mataplasia	20.22 $\pm$ 3.61 ^{△▲}	26.74 $\pm$ 3.81 ^{△▲}
Displastic gastro-mucosa	38.04 $\pm$ 3.76 ^{△▲}	20.86 $\pm$ 4.16 ^{△▲}
Gastric cancer	63.27 $\pm$ 3.99 [#]	4.23 $\pm$ 2.64 [△]

Note: Compared with normal group, $\triangle$: $P<0.05$, $\#$: $P<0.01$; Compared with gastric cancer group, $\blacktriangle$: $P<0.05$

3 讨论

3.1 TFF 在不同阶段胃黏膜中的表达及其与胃癌的相关性

TFF 在胃癌的发生发展中究竟发挥了怎样的作用目前尚不清楚。多数研究^[4-6]认为 TFF1、TFF2 蛋白在胃癌组织中表达减少或缺如,也有研究报道 TFF2 在胃癌组织表达增多^[7];体外研究显示 TFF1 可抑制胃腺癌细胞系 AGS 的生长^[8],敲除 TFF1 基因,大鼠的胃表层上皮细胞严重增生,部分形成胃腺癌,提示 TFF1 可抑制胃癌形成^[9]。还有研究认为^[10] TFF2 也可能是一肿瘤抑制基因的候选基因。Yamachika 等^[11]应用免疫组织化学法研究了 209 例早期胃腺癌患者,发现 55% 的胃癌患者 TFF3 表达增加,且 TFF3 表达增加的胃癌患者预后不良。Chan 等^[12]发现阻断胃癌细胞系(SNU-1) TFF3 的表达可抑制胃癌细胞的生长,这些似乎说明 TFF3 有促进胃癌发生的作用。我们的研究结果显示 TFF1、TFF2 蛋白在正常胃黏膜、肠上皮化生、不典型增生胃黏膜和胃癌中的表达强度依次逐渐降低,而 TFF3 蛋白表达强度依次逐渐增强,提示 TFF1、TFF2 在胃癌发生过程中含量逐渐减少,抑癌作用减弱,或许是导致胃癌形成的机制之一,表明 TFF1、TFF2 可能都是胃癌抑制因子;而 TFF3 表达逐渐增高,可能促进胃癌的形成,三者共同作用于胃癌的发生发展。TFF 在胃癌组织中表达异常的机制不明,有待进一步研究。

3.2 TFF 蛋白表达与细胞增殖、凋亡的相关性

机体细胞增殖、凋亡失衡是肿瘤发生的重要机制^[13]。研究发现 TFF1 有抑制胃腺癌细胞系增生和促进凋亡的双重作用^[14]。在 TFF2 缺陷鼠模型实验中,实验鼠的胃黏膜增生减低^[15],提示 TFF2 有刺激鼠胃黏膜增生的作用,增加了胃癌发生的危险性,也有研究报道 TFF2 只促进肠上皮迁移,未发现其影响细胞增殖。TFF3 对胃癌细胞增殖、凋亡的影响未见报道。本研究发现,胃癌组织低表达的 TFF1、TFF2 与细胞增殖指数呈负相关,与凋亡指数呈正相关;高表达的 TFF3 与细胞增殖指数呈正相关,与凋亡指数呈负相关。提示 TFF1、TFF2 可

能有抑制细胞增殖和促进凋亡作用,TFF3 可能有促进细胞增殖和抑制细胞凋亡作用。本研究结果显示在胃癌发生中 TFF1、TFF2 表达逐渐减少,可能使其不能抑制胃癌细胞增殖和促进胃癌细胞凋亡而致胃癌的发生;而 TFF3 表达逐渐增多,可能通过促进胃癌细胞增殖和抑制其凋亡而致胃癌的发生、浸润、和转移。这一推测有待于进一步研究证实。

参考文献:

[1] Urruticoechea A, Agular H, SoleX, et al. Pre-clinical validation of early molecular markers of sensitivity to aromatase inhibitors in a mouse model of post-menopausal hormone-sensitive breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2008,109(3):463-470.

[2] Yio X, Zhang TY, Babyatsky MN, et al. Trefoil factor family-3 is associated with aggressive behavior of colon cancer cells [J]. Clin Exp Metastasis, 2005,22(2):157-165.

[3] 中华医学会消化病学分会. 全国慢性胃炎研讨会共识意见 [J]. 胃肠病学, 2000,5(2):77-79.

[4] Shu-qing S, Jian-ting C, Jian-ming Y, et al. Expression of trefoil factors 1 and 2 in precancerous condition and gastric cancer [J]. World J Gastroenterol 2006,12(19):3119-3122.

[5] Katoh M. Trefoil factors and human gastric cancer [J]. Int J Mol Med, 2003,12(1):3-9.

[6] 刘贵生, 龚均, 程鹏, 等. 胃黏膜肠化及胃癌中三叶因子 1、2 表达的组织芯片技术研究 [J]. 第四军医大学学报, 2005,26(15):1390-1393.

[7] Halldorsdottir AM, Sigurdardottir M, Jonasson JG, et al. Spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia (SPeM) associated with gastric cancer in Iceland [J]. Dig Dis Sci, 2003,48(3):431-441.

[8] Calnan DP, Weetley BR, May FE, et al. The trefoil peptide TFF1 inhibits the growth of the human gastric adeno-carcinoma cell line AGS [J]. J Pathol, 1999,188(3):312-317.

[9] Lebevre O, Chenard MP, Masson R, et al. Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein [J]. Science, 1996,274(5285):259-262.

[10] Dhar DK, Wang TC, Maruyama R. Expression of cytoplasmic TFF2 is a marker of tumor metastasis and negative prognostic factor in gastric cancer [J]. Lab Invest, 2003,83(9):1343-1352.

[11] Yamachika T, Werther JL, Bodian C, et al. Intestinal trefoil factor: a marker of poor prognosis in gastric carcinoma [J]. J Clin Cancer Res, 2002,8(5):1092-1099.

[12] Chan MW, Chan VY, Leung WK, et al. Anti-sense trefoil factor family-3 (intestinal trefoil factor) inhibits cell growth and induces chemosensitivity to adriamycin in human gastric cancer cells [J]. Life Sci, 2005,76(22):2581-2592.

[13] 康颖, 刘红光, 曾谷清, 等. 白杨素对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 肿瘤防治研究, 2007,34(9):656-658.

[14] Bossenmeyer-Pourie C, Kannan R, Ribieras S, et al. The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis [J]. J Cell Biol, 2002,157(5):761-770.

[15] Farrell JJ, Taupin D, Koh TJ, et al. TFF2/SP-deficient mice show decreased gastric proliferation, increased acid secretion and increased susceptibility to NSAID injury [J]. J Clin Invest, 2002,109(2):193-204.