

证的研究

胃癌中医证型与胃癌转移相关基因
E-cadherin 的关系研究孙大志^{*} 许 玲^{*} 何 金^{*} 指导:魏品康^{*}

摘要 目的:从基因蛋白表达上探索胃癌患者中医证的本质。方法:将收集到的术前胃癌患者病例资料按中医辨证分型标准确定其证型归属;用免疫组化 EnVision 二步法检测术后胃癌肿瘤标本中 E-cadherin 基因蛋白表达情况。结果:E-cadherin 在 100 例胃癌患者中的阳性表达率为 90%,证型间表达差异存在显著性($P < 0.01$);进一步两两比较,痰湿凝结型、气血双亏型与脾胃虚寒型之间无明显差异,表达较高;瘀毒内阻型与肝胃不和型无明显差异,表达较低。结论:瘀毒内阻型与肝胃不和型胃癌患者的 E-cadherin 表达偏低,此两种证型肿瘤转移形成的途径可能与 E-cadherin,即与肿瘤细胞间同质性黏附力降低相关。

主题词 胃肿瘤/遗传学 辨证分型 @ 转移相关基因

Study on Relationship between TCM Syndrome Types of Gastric Carcinoma and Gastric Carcinoma Metastasis-Related Gene E-cadherin

Sun Dazhi, Xu Ling, He Jin, et al.

(Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

Objective: To probe essence of TCM syndrome of gastric carcinoma from gene protein expression. **Methods:** Based on the collected data from pre-operative patients of gastric carcinoma, their TCM syndromes were determined by means of TCM syndrome classification criteria. E-cadherin gene protein expressions in tumor tissue after operation of gastric cancer were detected with EnVision two step immunohistochemical method. **Results:** The expression rate of E-cadherin was 90% in 100 cases of gastric carcinoma, with significant difference among different syndrome types ($P < 0.01$). There was higher expression in the types of stagnation of phlegm-dampness, deficiency of both Qi and blood and deficiency-cold of the spleen and stomach, but with no significant difference among the 3 types; There was lower expression in the two types, stagnation of toxic substance in interior and incoordination of the liver and the stomach, with no significant difference between the two types. **Conclusion:** Metastasis of the two types, stagnation of toxic substance in interior and incoordination of the liver and the stomach, is possibly related with the lower expression of E-cadherin.

Key Words Gastric tumor/ genetics; Syndrome classification; @ metastasis correlative gene

辨证论治是中医治疗的核心,目前中医对疾病的认识多是宏观的概括,尚不能深入探求其本质内涵,这从某种程度上限制了中医药的发展。中医药在治疗肿瘤,尤其改善生存质量、延长患者生存期方面显示出很大优势,因此我们拟从肿瘤转移相关基因 E-cadherin 的蛋白表达探求胃癌患者中医证的本质。

1 材料

1.1 病例来源:所有病例来源于第二军医大学长征医院普外科 2002 年 11 月 25 日~2003 年 12 月 3 日确诊为胃癌并准备第 2 天手术治疗的患者。

病例入选标准:(1)以胃镜活检病理诊断为胃癌,并准备第 2 天行胃癌手术治疗的患者;(2)术前不愿接

受胃镜检查者,而经 B 超、CT 等影像诊断后,高度怀疑胃癌,并准备手术切除治疗者。本次研究共纳入 246 例。

病例剔除标准:(1)术前高度癌疑,但手术切除胃标本病理证实并非恶性肿瘤者;(2)因各种原因第 2 天未能行手术治疗者;(3)胃转移性肿瘤者;(4)“一点癌”。本次研究共剔除 18 例,剩余 228 例,从中随机抽取胃热伤阴型、瘀毒内阻型各 16 例,其他 4 种证型各 17 例,共 100 例行免疫组化分析。

1.2 临床资料:男性 69 例,女性 31 例;年龄:≤40 岁者 7 例, >40 岁者 93 例;腺癌 79 例,黏液腺癌 12 例,印戒细胞癌 7 例,间质细胞瘤 2 例;腺癌分级:I 级 5 例,II 级 45 例,III~IV 级 7 例,IV 级 40 例,IV 级 3 例;浸润程度:1 级 9 例,2 级 26 例,3 级 43 例,4 级 22 例;无淋巴结转移者 41 例,1 处转移者 28 例,2 处转移者

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271626)

^{*} 第二军医大学长征医院中医科、病理科,上海市凤阳路 415 号(200003)

收稿日期:2004-09-20;修回日期:2005-01-17

表 1 E-cadherin 免疫组化在胃癌不同证型中的表达情况

证型	例数		E-cadherin 表达值															
痰湿凝结型	17	6	6	9	6	0	1	6	6	6	9	6	3	6	8	9	6	3
胃热伤阴型	16	2	6	6	0	4	8	2	2	4	2	8	6	4	12	4	1	/
瘀毒内阻型	16	0	0	6	12	6	0	3	0	3	3	2	0	8	1	1	1	/
气血双亏型	17	6	4	6	8	8	6	2	12	9	6	4	4	1	0	6	8	9
脾胃虚寒型	17	6	6	4	12	4	6	8	9	6	8	2	4	1	12	2	1	4
肝胃不和型	17	0	12	2	0	2	3	2	1	6	4	1	6	2	6	2	1	0

31 例;无远处转移者 84 例,1 处转移者 15 例;临床分期:Ⅰ期 26 例,Ⅱ期 19 例,Ⅲ_a期 18 例,Ⅲ_b期 19 例,Ⅳ期 18 例;肿块形 15 例,溃疡形 46 例,溃疡型肿块 33 例,局部黏膜病变 5 例,革状胃 1 例。胃热伤阴型中有 1 例不能明确是否有远处转移,临床分期亦无法确定。

辨证标准:按照 1978 年全国第一届胃癌学术会议北京市胃癌协作组制定的 6 型分法辨证^[1]。具体分为:(1)肝胃不和型;(2)脾胃虚寒型;(3)瘀毒内阻型;(4)胃热伤阴型;(5)痰湿凝结型;(6)气血双亏型。

1.3 肿瘤标本来源:源于我院普外科。与我院病理科联系,收集胃癌患者标本并以石蜡块形式保存以备。

1.4 试剂:E-cadherin:小鼠抗人 E-cadherin 蛋白一抗,浓缩型抗体,0.1ml,1:50 稀释,编号:M-0536,购自福州迈新生物技术开发公司;PBS 缓冲液:清洗用,随用随配;EDTA 缓冲液:编号:MVS-0098,购自福州迈新生物技术开发公司;免疫组化 EnVision 试剂盒:购自 DAKO 公司;苏木素复染试剂:购自福州迈新生物技术开发公司;DAB 显色试剂盒:购自福州迈新生物技术开发公司;10%中性甲醛固定液;二甲苯;3%过氧化氢甲醇溶液。

1.5 主要实验仪器:Leica 2135 石蜡切片机(德国);Shandon 全自动组织处理机(英国);MP-110-1 型电子天平(上海第二天平仪器厂);生物摄影显微镜(日本 Olympus 公司);ZH-3 型石蜡切片冷冻台(沈阳纵横高技术公司);隔水式电热恒温培养箱(60℃,型号:PYX-DHS-40×50,上海市跃进医疗器械一厂);75-2A 微量震荡器(上海医用分析仪器厂);干燥箱(上海新力仪器制造厂)。

2 方法

2.1 免疫组化制作流程(采用 EnVision 二步法):将固定在 10%中性甲醛中的人胃癌肿瘤标本经酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋,在石蜡切片机上切成 4μm 厚的连续切片,二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,蒸馏水冲洗;3%过氧化氢甲醇溶液浸泡以封闭内源性过氧化物酶,用 pH6.0 的柠檬酸缓冲液 0.01mol,高压锅中

抗原修复;加入非免疫性小牛血清,放入 37℃烤箱孵育 20 分钟;加入浓缩型第一抗体 E-cadherin(稀释 50 倍)50μl,放入冰箱 4℃孵育,过夜;加入 EnVision50μl,放入恒温箱中 37℃孵育 2 小时;切片加 50μl DAB 显色液;苏木素复染 2 分钟;1%盐酸酒精分化,温水浸洗返蓝,酒精脱水;逐级酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片。

2.2 阳性结果判定标准:用 DAB 显色,阳性为棕色,虽然阳性染色分布不均匀,强度有差别,但只要有明确阳性产物即作为阳性细胞。以任意 5 个高倍镜视野中阳性显色作为评定依据。浅棕色(+),棕黄色(++),深棕色(+++)。

2.3 评分方法:视其着色反应的强弱,与细胞表达数共同判断数值。即免疫组化着色按其强弱分为(-)、(+)、(++)、(+++),分别给予 0、1、2、3 分;细胞表达数按 0、1%~25%、26%~50%、51%~75%、76%~100%,分别给予 0、1、2、3、4 分;将每一标本的两个分值相乘,作为结果。

2.4 统计学方法:采用 SAS 统计软件包,非正态分布资料用完全随机化设计资料的非参数检验(Kruskal-Wallis H 检验),组间两两比较采用 Nemenyi 检验进行数据处理和分析。

3 结果

3.1 E-cadherin 免疫组化在胃癌不同证型中的表达值:表 1 结果显示,E-cadherin 在 100 例胃癌患者中的阳性表达率为 90%,经 Kruskal-Wallis H 检验,E-cadherin 在总体上差异有显著性($P<0.01$)。认为 E-cadherin 基因蛋白表达在证型之间存在差异性。

表 2 各证型间 E-cadherin 表达值比较($\bar{x} \pm s$)

证型	例数	E-cadherin 表达值
痰湿凝结型	17	5.82±2.35 [*]
胃热伤阴型	16	1.44±3.12
瘀毒内阻型	16	3.25±3.12
气血双亏型	17	6.00±2.89 [*]
脾胃虚寒型	17	5.76±3.21 [*]
肝胃不和型	17	3.12±3.06

与瘀毒内阻型比较,* $P<0.01$;与肝胃不和型比较,△ $P<0.01$

3.2 各证型间 E-cadherin 表达值比较:进一步两两比较推断证型间差异的分布位置不同,用 Nemenyi 检验进行分析。表 2 结果显示,痰湿凝结型与气血双亏型、脾胃虚寒型之间无明显差异,表达较高;瘀毒内阻型与肝胃不和型、胃热伤阴型之间无明显差异,且瘀毒内阻型与肝胃不和型两型表达较低。其他各组间两两比较差异均有显著性($P < 0.01$)。

1 讨论

中医证候的重要性早在唐代就有所论述^[2]。同时,中医治病必须以辨证论治为基本原则。按照分子生物学与生命的中心法则,分子生物学的任务就是从分子水平研究生命现象和疾病本质;基因处于最原始和最本质的地位,主宰和制约表型(蛋白质—细胞—有机体)程序的发生发展。生命现象、疾病、中医证候都可以从 DNA 或基因水平的研究获得最本质的答案。因此,我们从肿瘤转移抑制基因 E-cadherin 的表达来研究胃癌中医证候。

钙黏素(Cadherins)是一类钙依赖性跨膜蛋白,是细胞间紧密连接所必需的细胞—细胞间黏附分子家族^[3],主要介导同种细胞间黏附反应。Cadherins 分为多种亚型,其中 E-cadherin 是与肿瘤侵袭转移关系最为密切的抑癌基因,有实验表明,将 E-cadherin 转染给肿瘤细胞可以逆转其侵袭行为^[4,5],用抗 E-cadherin 抗体可阻断细胞—细胞间连接,从而使癌细胞获得高侵袭活性。将 E-cadherin 反译的 RNA 导入高表达钙黏附蛋白的肿瘤细胞株,可明显提高其转移能力,进一步证实 E-cadherin 确有抑制肿瘤转移能力^[1]。E-cadherin 基因突变因在桑葚胚时期细胞与细胞间黏附的缺失导致胚胎致命性损坏^[6,7],表明钙粘连蛋白在对组织分化形成过程中必不可少。且 E-cadherin 基因已被公认为抑癌基因^[8,9],当其表达下调或功能障碍时,将使同种细胞间失去黏附,对于正常组织而言,意味着不能正常发育成形;而对于上皮性肿瘤,则意味着肿瘤细胞具备侵袭性生长的特点,并容易从原发灶脱落分离,向局部淋巴结转移或远处转移。E-cadherin 表达下调或功能障碍可能是胃癌发生、发展的早期事件^[10]。Berx 等认为 E-cadherin 的突变类型在弥漫型胃癌中主要是剪切导致框内缺失^[11],新近研究发现 E-cadherin 在恶性肿瘤组织中表达下调与分化程度有关,研究资料中胃癌组 E-cadherin 阳性表达率仅有 10%,而对照组为 100%,显示胃癌中存在 E-cadherin 丢失。文献报道 E-cadherin 阳性率在胃癌为 36.96%,恶性肿瘤 E-cadherin 表达有下调的倾向,亦有报道 E-cadherin 与肿瘤分化程度有关,分化不良者 E-cadherin 阳性率明

显低于分化良好者^[12,13],特别是在肿瘤的转移灶中,癌细胞 E-cadherin 的表达减少甚至消失^[14,15]。

本实验表明,在 100 例胃癌患者 E-cadherin 基因蛋白表达的研究中发现其阳性表达率为 90%,各个证型之间 E-cadherin 表达差异有显著性($P < 0.01$)。进一步组间两两比较显示,仅痰湿凝结型、气血双亏型与脾胃虚寒型之间及瘀毒内阻型与胃热伤阴型、肝胃不和型之间差异无显著性($P > 0.05$),其他各组间两两比较差异均有显著性($P < 0.01$),进一步排序结果显示,痰湿凝结型、气血双亏型与脾胃虚寒型胃癌患者的 E-cadherin 表达较高,瘀毒内阻型与肝胃不和型胃癌患者的 E-cadherin 表达偏低。因此我们推测,瘀毒内阻型与肝胃不和型胃癌肿瘤转移形成的途径可能与 E-cadherin 有关。

参考文献

- 1 张宗岐主编. 临床肿瘤综合治疗大全. 北京:奥林匹克出版社,1995:182~184.
- 2 唐·孙思邈撰,鲁兆麟等点校. 备急千金要方. 北京:人民卫生出版社,1997:1.
- 3 Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 1991, 251(5000):1451~1455.
- 4 Frixen UH, Behrens J, Sachs M, et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*. 1991, 113(1):173~185.
- 5 曹世龙主编. 肿瘤学新理论与新技术. 上海:上海科学技术出版社,1997:752.
- 6 Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, et al. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(17):8263~8267.
- 7 Riethmacher D, Brinkmann V, Birchmeier C. A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(3):855~859.
- 8 Becker KF, Keller G, Hoefler H. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Surg Oncol*, 2000, 9(1):5~11.
- 9 Lee JH, Koh JT, Shin BA, et al. Comparative study of angiostatic and anti-invasive gene expressions as prognostic factors in gastric cancer. *Int J Oncol*, 2001, 18(2):355~361.
- 10 Yu J, Ebert MP, Mielke S, et al. Alpha-catenin expression is decreased in human gastric cancers and in the gastric mucosa of first degree relatives. *Gut*, 2000, 46(5):639~644.
- 11 Berx G, Becker KF, Hoefler H, et al. Mutations of the human E-cadherin(CDH1) gene. *Hum Mutat*, 1998, 12(4):226~237.
- 12 张军,姜希宏,马榕,等. 乳腺癌 E-cadherin 的表达与术野脱落癌细胞关系的研究. 山东医科大学学报, 2000, 38(1):53~56.
- 13 蔡建春,江绍基,陈治平,等. 钙依赖细胞黏附分子与胃癌的生长方式和分化程度的关系. 中华病理学杂志, 1994, 23(3):132~131.
- 14 Schuhmacher C, Becker KF, Reich J, et al. Rapid detection of mutated E cadherin in peritoneal lavage specimens from patients with diffuse-type gastric carcinoma. *Diagn Mol Pathol*, 1999, 8(2):66~70.
- 15 Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, et al. Cohort migration of carcinoma cell; differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets. *Histol Histopathol*, 1999, 14(4):1183~1197.