

文章编号:1005-6947(2004)04-0264-04

· 实验研究 ·

大肠癌患者血清及癌细胞胃泌素表达与其临床生物学行为的关系

江春平¹, 朱建伟², 陈玉泉², 沈洪薰², 于秀², 陈瑞新²

(1. 南京大学医学院附属鼓楼医院 普外科, 江苏 南京 210008; 2. 南通医学院附属医院 普外科, 江苏 南通 226001)

摘要:目的 观测大肠癌患者血清、癌组织中胃泌素的表达, 观察大肠癌细胞内胃泌素分泌颗粒的超微结构, 旨在探讨血清胃泌素、胃泌素型癌细胞与大肠癌临床生物学行为的关系。方法 用放射免疫法和免疫组化法检测 53 例大肠癌患者血清胃泌素、癌组织中胃泌素的表达。用免疫电镜技术观察 10 例大肠癌细胞内胃泌素分泌颗粒的超微结构。结果 与对照组比较, 大肠癌组术前血清胃泌素水平明显增高, 分化良好者增高尤为明显 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。大肠癌组织胃泌素免疫组化阳性率为 56.6% (30/53), 高分化腺癌阳性率明显高于中、低分化腺癌。胃泌素阳性胶体金颗粒见于癌细胞内不同电子密度的分泌颗粒中和微绒毛膜表面。结论 大肠癌患者血清胃泌素水平增高, 癌组织胃泌素表达阳性; 大肠癌细胞形成胃泌素分泌颗粒释放胃泌素; 血清胃泌素、胃泌素型癌细胞与大肠癌临床生物学行为有密切关系。

关键词: 结直肠肿瘤/病理学; 腺瘤/病理学; 胃泌素/血液

中图分类号: R735.35; R730.261

文献标识码: A

Relationship betwent surum gastrin and the expression of gastrin in the cancer cell with the clinical behavior of patients with colorectal carcinoma cancer

JIANG Chun-ping¹, ZHU Jian-wei², CHEN Yu-quan², SHEN Hong-xun², YU Xiu², CHEN Rui-xin²

(1. Department of General Surgery, Affiliated Drum Tower Hospital, Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China; 2. Department of General Surgery, Affiliated Hospital, Nantong Medical College, Nantong, Jiangsu 226001, China)

Abstract: Objective To determine the serum gastrin level, the expression of gastrin in colorectal carcinoma cells and observe the ultrastructure of gastrin secretory granule in colorectal carcinoma cells, in order to explore the relationship between gastrin and clinical behavior of colorectal carcinoma. **Methods** The serum gastrin and gastrin expression in colorectal carcinoma tissues of the 53 cases were examined by using radio-immunity analysis (RIA), immunohistochemistry and immunoelectron microscopic technique. **Results** Compared with control group, the preoperative level of serum gastrin in colorectal group was significantly increased, especially in well-differentiation adenocarcinoma. In the tissue of colorectal carcinoma, the gastrin expression rate was 56.6%. The expression rate of well-differentiated adenocarcinoma was higher than that in moderate and poor differentiation adenocarcinoma. Immunoelectron microscopy showed that the granules of protein A-gold (PAG) could be seen in different electro-density secretion granules in carcinoma cells, in intercellular space and on the surface of membrane of microvillus.

Conclusions The level of serum gastrin and the expression of gastrin in cancer tissues in colorectal carcinoma patients are increased. The colorectal carcinoma cells may synthesize and secrete gastrin themselves, which may be correlated with clinical behavior of colorectal carcinoma.

Key words: COLORETAL NEOPLASMS/pathol; ADENOCARCINOMA/pathol; GASTRIN/blood

CLC number: R735.35; R730.261

Document code: A

收稿日期:2003-04-08; 修订日期:2003-11-19。

作者简介:江春平(1963-),男,江苏泰州人,南京大学医学院附属鼓楼医院副主任医师,主要从事消化系统恶性肿瘤综合治疗方面的研究。

近年来,胃泌素与肿瘤的关系日益受到关注。一些研究表明胃泌素能刺激结肠肿瘤的生长。笔者应用放射免疫分析法、免疫组织化学及免疫电镜技术检测53例大肠癌患者血清及癌组织中胃泌素的表达,以探讨其与大肠癌临床生物学行为的关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源及分组

1.1.1 大肠癌组 53例。均为本院外科收治的病例,其中结肠癌20例,直肠癌33例。男28例,女25例;平均年龄56.6岁。诊断参照统一规范标准。患者术前排除消化道溃疡、恶性贫血等疾病,无长期服药及胃肠手术史,血清钙及肝肾功能正常。术前1d清晨抽取空腹静脉血2ml。均行根治手术。术中取原发灶癌组织2小块,分别置于10%甲醛液中于-30℃保存。

1.1.2 对照组 20例。均为正常健康者。男12例,女8例;平均年龄为48.5岁。均于清晨在门诊抽取静脉血2ml。其中2例内镜下取胃窦黏膜和大肠黏膜。

1.2 试剂

胃泌素放免药盒由中国同位素公司提供;兔抗人胃泌素抗体为DAKO公司产品;针对抗原为硫酸化或非硫酸化胃泌素G₁₇和G₃₄;ABC试剂盒为美国Vector公司产品;胶体金标记葡萄球菌A蛋白为北京军事医学科学院基础医学研究所提供。

1.3 放射免疫分析

标本离心取上清液,分别加入缓冲液、EDTA液、标准液、标记物抗血清,混合温育,测放射性计数。加入免疫分离剂温育,离心弃上清。测沉淀物放射性计数,绘制标准曲线计算含量。

1.4 免疫组化ABC染色

癌组织和正常黏膜组织经10%福尔马林固定,石蜡包埋;连续切片3张,分别行HE和胃泌素免疫组化染色。胃泌素免疫组化染色采用ABC法,参照Vector ABC试剂盒说明。取正常胃窦黏膜组织作阳性对照,PBS及正常兔血清替代一抗作阴性对照。阳性细胞判断标准:弱阳性(+)为少于20%癌细胞着淡棕色,其中个别细胞着棕褐色或深棕色;中

等阳性(++)为介于弱阳性和强阳性之间;强阳性(+++)为60%以上癌细胞着棕褐色或深棕色,其中少数细胞着浅棕色。

1.5 免疫电镜观察

取10例新鲜癌组织,其中5例胃泌素免疫组化染色强阳性(+++),3例中等阳性(++),2例弱阳性(+).10例中Dukes分期B期6例,C期4例。另取2例正常人胃窦黏膜组织。组织离体1min内立即浸入2.5%戊二醛溶液预固定,1%锇酸固定;Epon 812包埋制成超薄切片,收集于无支持膜镍网作葡萄球菌A蛋白金法(PAG)染色。染色步骤:1%双氧水刻蚀10min;0.05mol/L Tris盐酸缓冲液(TBS,pH 7.4含0.5% Triton X-100)5min;1%卵蛋白1min;兔抗人胃泌素(1:200)室温2h;0.05mol/L TBS换洗3次,每次5min,0.02mol/L TBS(pH 7.4,含0.1%牛血清白蛋白)5min;1%卵蛋白10min;PAG(1:7)室温2h;0.02mol/L TBS 5min;0.05mol/L TBS换洗20min;蒸馏水换洗10min;醋酸铀、柠檬酸铅短暂染色,JME-100S透射电镜观察。正常胃窦黏膜组织作阳性对照,TBS及正常兔血清代替第一抗体作阴性对照。

1.6 统计学方法

*t*检验,Ridit分析。

2 结果

2.1 放射免疫分析法

2.1.1 血清胃泌素浓度比较 大肠癌组血清胃泌素浓度显著高于对照组($P < 0.01$)(表1)。

表1 血清胃泌素浓度比较

组别	例数	胃泌素浓度(ng/L)
大肠癌组	53	123.56 ± 30.46 [†]
含胃泌素型癌细胞组	30	148.27 ± 16.42 [†]
不含胃泌素型癌细胞组	23	123.57 ± 19.56 [†]
对照组	20	45.63 ± 12.67

注:†与对照组间比较, $P < 0.01$

2.1.2 血清胃泌素浓度与大肠癌临床病理关系 血清胃泌素浓度在不同分化程度的癌组织间差异均有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$),但在不同的组织学类型与病理分期之间均无显著性差异(均 $P > 0.05$)(表2)。

表2 大肠癌组织中胃泌素表达及血清胃泌素浓度变化

组别	例数	癌组织胃泌素表达				阳性率		Ridit 值	血清胃泌素 (ng/L)
		(-)	(+)	(++)	(+++)	n	%		
组织学类型									
管状腺癌	44	20	4	9	11	24	54.5	0.5	128.62 ± 38.60
乳头状腺癌	3	1	0	0	2	2	66.5	0.6591	129.41 ± 41.42
黏液腺癌	6	2	2	2	0	4	66.6	0.4583	101.24 ± 24.61
腺癌分化程度									
高	10	1	1	3	5	9	90.0	0.7197	131.46 ± 31.42 ¹⁾
中	33	17	2	6	8	16	48.4	0.5	126.32 ± 29.47
低	4	3	1	0	0	1	25.0	0.3295	100.41 ± 26.17 ²⁾
病理分期									
A	25	11	3	5	6	14	56.0	0.5	124.61 ± 28.65
B	9	4	2	1	2	5	55.5	0.4778	128.63 ± 31.42
C	19	8	1	5	5	11	57.8	0.5242	118.64 ± 27.69

注:1)与中分化癌比较, $P < 0.05$; 2)与低分化癌比较, $P < 0.01$

2.2 胃泌素免疫组化染色

2.2.1 正常胃窦黏膜和大肠黏膜 2例正常胃窦黏膜胃泌素免疫组化均呈强阳性反应(+++)(图1)。2例正常大肠黏膜均呈阴性反应。

2.2.2 大肠癌组织 大肠癌组织胃泌素免疫组化阳性率为56.6%(30/53)。胃泌素阳性颗粒定位于癌细胞浆,呈弥漫性分布。癌细胞间着色强度有差别,同一张切片胃泌素阳性癌细胞与阴性癌细胞的形态无明显差异。癌组织间质染色呈阴性反应(图2)。

2.3 免疫电镜

2.3.1 正常胃窦黏膜 常规电镜显示胃窦黏膜中胃泌素细胞呈梨形,顶部窄伸达腺腔,核卵圆形,胞浆内分泌颗粒多呈空状,直径200~400nm,粒芯疏松,低电子密度;少数分泌颗粒体积小,致密电子密度。免疫电镜显示,胃泌素阳性胶体金颗粒主要见于体积较大的低电子密度分泌

颗粒内(图3)。

2.3.2 大肠癌细胞 大肠癌细胞呈多角形,怪形核大小不等,核仁边集,胞浆中线粒体丰富,可见空泡化游离核糖体。另见较多圆形或卵圆形分泌颗粒,直径400~1500nm,有明显界膜。据颗粒形态可分为二类:A类体积较大,均匀低电子密度,粒芯疏松或含点状丝状物质;B类体积小,均匀高电子密度,常有致密核心。癌细胞间联结不发达,部分癌细胞形成腺管结构,表面可见微绒毛,有微丝伸出小根达胞浆透明区。胶体金颗粒定位于部分分泌颗粒中,多数聚集于胞浆边缘。高分化腺癌胶体金颗粒主要定位于A类分泌颗粒(图4),低分化腺癌胶体金颗粒主要定位于B类分泌颗粒中。部分癌细胞浆内见胃泌素分泌颗粒集中于粗面内质网附近。另外在癌细胞间隙、微腺管内、微绒毛膜外也见胃泌素颗粒成排排列。

图1 正常胃窦黏膜胃泌素免疫组化染色阳性(+++)(ABC × 100)

图2 大肠腺癌组织胃泌素免疫组化癌细胞阳性染色(+++)(ABC × 100)

图3 正常胃窦黏膜免疫电镜所见:胃泌素阳性胶体金颗粒主要见于体积较大的低电子密度分泌颗粒内 (PAG × 30 000)

3 讨论

近年研究发现部分胃肠肿瘤存有胃泌素基因表达,胃泌素能促进大肠癌细胞生长,其与大肠癌的发生、发展密切相关^[1~3]。本研究显示部分大肠癌患者血清胃泌素水平增高,分化良好者增高尤为明显。动态监测血清胃泌素水平变化可能有助于大肠癌的诊断和预后判断。

本组结果表明,大肠癌组织胃泌素表达强度与分化程度有关,高分化腺癌胃泌素免疫组化阳性率为90%,明显高于中、低分化腺癌。其原因尚未清楚。有学者报道分化不良的癌细胞胃泌素前体加工成熟不全,某些酶或辅助因子功能低下,以致癌细胞内胃泌素前体蓄积,成熟胃泌素产生不足;分化良好的癌细胞具有较为完善的酶系统,致成熟胃泌素产生增加^[4,5]。癌细胞胃泌素阳性表达可成为大肠腺癌分化良好的标记,有助于其预后判断及为术后采用胃泌素受体拮抗剂内分泌治疗提供依据。

笔者应用免疫电镜技术显示大肠癌细胞形成分泌颗粒释放胃泌素;高分化腺癌细胞内胃泌素胶体金颗粒主要位于A类分泌颗粒,低分化腺癌胃泌素胶体金颗粒主要位于B类分泌颗粒。另有学者免疫电镜已证实A类分泌颗粒主要含G₁₇,B类分泌颗粒主要含G₃₄;G₁₇的生物活性较G₃₄大好几倍^[6]。由此可推测部分大肠癌血清胃泌素水平增高,分化良好者增高尤为明显的机制。

胃泌素与大肠癌临床生物学行为有密切关系。大肠癌细胞产生、分泌胃泌素,作用于自身胃泌素

图4 高分化腺癌细胞胶体颗粒的电镜观察:胃泌素阳性胶体金颗粒主要见于A类分泌颗粒内 (PAG × 20 000)

受体,形成自馈性调节。采用胃泌素拮抗剂或胃泌素受体拮抗剂等内分泌治疗可能阻断这种自馈性调节,达到抑制肿瘤细胞生长的目的,因而可望开创治疗大肠癌新的途径^[7,8]。

参考文献:

- [1] Cobb S, Wood T, Tessarollo L, *et al.* Deletion of functional gastrin gene markedly increases colon carcinogenesis in response to azoxymethane in mice[J]. *Gastroenterology*,2002,123(2):516-530.
- [2] 夏洪志,张开诚,吕新生,等. 胃泌素和胃泌素受体与大肠癌的关系[J]. *中国普通外科杂志*,1999,8(1):52-54.
- [3] Watson SA, Morris TM, Mc Williams DF, *et al.* Potential role of endocrine gastrin in the colonic adenoma carcinoma sequence [J]. *Br J Cancer*,2002,87(5):567-573.
- [4] Biagini P, Monges G, Vuaroqueaux V, *et al.* The human gastrin/cholecystokinin receptors; type B and type C expression in colonic tumors and cell lines[J]. *Life Sci*,1997,61(10):1009-1018.
- [5] Artru P, Attoub S, Levsseur S, *et al.* Gastrin-17 and G17-gly induce proliferation of LoVo cells through the CCK B/gastrin receptor [J]. *Gastroenterol Clin Biol*, 1998, 22(6-7):607-612.
- [6] Schwenger P. Cell-type-specific activation of c-Jun N-terminal kinase by salicylates[J]. *J Cell Physiol*,1999, 179(1):109-114.
- [7] He SW, Shen KQ, He YJ, *et al.* Regulatory effect and mechanism of gastrin and its antagonists on colorectal carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 1999, 5(5):408-416.
- [8] Melen-Mucha G. Effects of short term treatment with pentagastrin, proglumide, tamoxifen given separately or together with 5-fluorouracil on the growth in the murine transplantable Colon 38 cancer [J]. *Neoplasma*,2001,48(2):133-138.