

• 临床检验研究论著 •

胃癌组织 GST- π 基因表达检测及临床意义分析

胡秀学, 刘 跃, 杜 娟[△]

(湖北医药学院附属太和医院检验部, 湖北十堰 442000)

摘 要:目的 探讨胃癌组织中多药耐药基因谷胱甘肽 S 转移酶(GST)- π 的表达及临床意义。方法 采用逆转录-聚合酶链反应检测 53 例胃癌组织标本和 15 例正常胃黏膜组织标本 GST- π 基因的表达, 分析其与胃癌病理特征的关系。结果 癌组织 GST- π 基因相对表达值为 0.56 ± 0.27 , 高于正常胃黏膜组织 (0.18 ± 0.13) ($t=5.30, P<0.05$); 不同分化程度胃癌组织 GST- π 基因表达程度差异具有统计学意义 ($t=2.67, P<0.05$)。结论 GST- π 基因高表达可能导致胃癌产生多药耐药性, GST- π 检测对制订化疗方案有一定指导意义。

关键词: 胃肿瘤; 抗药性, 多药; GST- π 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.19.013

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)19-2329-02

Expression and clinical significance of GST- π gene in gastric cancer tissues

Hu Xiuxue, Liu Yue, Du Juan[△]

(Department of Laboratory Medicine, Taihe Hospital, Hubei Medical University, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and clinical significance of glutathione S-transferase(GST)- π in patients with gastric cancer. **Methods** RT-PCR was used to detect the expression levels of GST- π in 53 cases of gastric cancer tissue samples and 15 cases of normal gastric mucosa tissues, and the relationship between the expression of GST- π and the clinicopathologic parameters was analyzed. **Results** The expression level of GST- π was 0.56 ± 0.27 in gastric cancer tissue samples, which was significantly higher than 0.18 ± 0.13 in normal tissues ($t=5.30, P<0.05$). The expression of GST- π intensity was related to differentiation degree ($t=2.67, P<0.05$), and with no correlation with other clinicopathologic parameters. **Conclusion** The over-expression of GST- π might underline the multidrug resistance of gastric cancer. The detection of expression could be with important significance for judging the prognosis of gastric cancer.

Key words: stomach neoplasms; drug resistance, multiple; GST- π gene

胃癌是常见消化道恶性肿瘤, 具有较高发病率和病死率^[1]。化疗是除手术治疗外最为重要的辅助治疗手段, 但多药耐药性(MDR)可降低化疗效果或导致化疗失败。谷胱甘肽 S 转移酶(GST)- π 在 MDR 形成中的作用逐渐受到重视。本研究从分子水平检测胃癌组织 GST- π 基因表达水平, 并分析其与胃癌耐药的关系, 为制订合适的化疗方案提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 胃癌患者 53 例(胃癌组), 男 30 例、女 23 例, 高分化腺癌 13 例、中分化腺癌 15 例、低分化腺癌 25 例, 肿瘤直径大于 5 cm 者 16 例、小于或等于 5 cm 者 37 例, 胃底部瘤 9 例、胃体部瘤 11 例、胃窦部瘤 33 例, 淋巴转移 34 例、无淋巴转移 19 例, 均经病理检查证实。15 例健康者纳入对照组。所有患者于接受任何抗肿瘤治疗前采集胃癌组织标本(胃切缘组织标本), 健康者于体检时采集胃黏膜组织标本。

1.2 仪器与试剂 Trizol 试剂(美国 Invitrogen), 聚合酶链反应(PCR)试剂盒(上海生工), PE7500 荧光定量 PCR 扩增仪(美国 ABI), G-BOX 紫外凝胶成像系统(美国 Gene), A3500 逆转录试剂盒(美国 Promega), ND-2000 微量核酸定量仪(芬兰 Thermo), DNA 分子标记物(北京天根)。

1.3 方法

1.3.1 引物合成 GST- π mRNA 引物^[2]: 5'-CCC ATC ATT GCA ATA GCA GG-3', 5'-TGT TCA AAC TTC TGC TCC

TGA-3', 扩增产物 325 bp; 磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物: 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3', 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3', 扩增产物 226 bp; 由北京赛百盛公司合成。

1.3.2 总 RNA 提取 按照 Trizol 试剂说明书提取组织标本总 RNA, 经 ND-2000 微量核酸定量仪测定浓度和纯度后用 0.1% 焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶解至大致相同浓度。

1.3.3 cDNA 合成 逆转录反应体系: 总 RNA 2 μ L, 10 $\times$ 缓冲液 2 μ L, 10 mmol/L dNTP 混合液 2 μ L, AMV 逆转录酶 0.6 μ L, 核酸酶(RNase)抑制剂 0.5 μ L, 随机引物 1 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L, 用无 RNase 双蒸水补足至 20 μ L; 反应条件: 42 $^{\circ}$ C 15 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min。合成的 cDNA 用无 RNase 双蒸水稀释至 100 μ L 备用。

1.3.4 PCR 扩增 PCR 扩增反应体系: 2 mmol/L dNTP 1.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2.4 μ L, 5 U/ μ L Taq 酶 0.3 μ L, 10 $\times$ 缓冲液 3 μ L, 上下游引物各 2 μ L, cDNA 5 μ L, 用无菌水补至 30 μ L; 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 5 min。

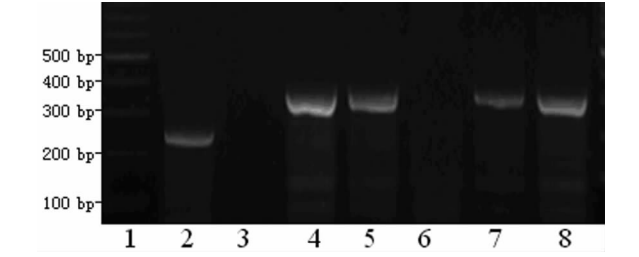
1.3.5 结果判断 取 5 μ L PCR 扩增产物与溴酚蓝指示剂充分混匀后, 采用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 100 V 电泳 1 h 后在紫外凝胶成像系统中照相并分析结果。根据目的条带与 GAPDH 条带光密度比值计算目的基因相对定量值。

[△] 通讯作者, E-mail: Djuan197345@163.com。

1.4 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件进行结果分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用两独立样本 t 检验, 显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 GST- π 基因表达检测 GST- π 癌组织和正常组织中的表达率分别为 69.8% (37/53)、13.3% (2/15); 胃癌组织呈高表达状态, 相对定量表达值为 0.56 ± 0.27 , 正常胃黏膜组织呈相对低表达或不表达状态, 相对定量表达值为 0.18 ± 0.13 , 二者比较差异有统计学意义 ($t=5.30, P<0.05$)。琼脂糖电泳结果见图 1。



1: DNA 分子标记物; 2: GAPDH; 3: 无标本; 4、5、7、8: 阳性表达。
图 1 GST- π 基因扩增产物电泳

2.2 GST- π 基因表达与胃癌临床病理特征因素的关系 不同性别及肿瘤部位、大小、淋巴转移等患者 GST- π 基因表达差异无统计学意义 ($P>0.05$), 而不同组织分化程度患者间有统计学差异 ($P<0.05$)。GST- π 基因表达与临床病理特征的关系见表 1。

表 1 GST- π 基因表达与临床病理特征的关系					
病理特征		<i>n</i>	GST- π 表达值	<i>t</i>	<i>P</i>
性别	男	30	0.59 ± 0.27	1.08	0.29
	女	23	0.51 ± 0.26		
癌组织大小 (cm)	>5	16	0.60 ± 0.30	0.29	0.48
	≤ 5	37	0.54 ± 0.26		
分化程度	高、中分化	28	0.64 ± 0.24	2.67	0.01
	低分化	25	0.46 ± 0.27		
部位	胃底+胃体	20	0.53 ± 0.26	0.69	0.49
	胃窦	33	0.58 ± 0.28		
淋巴转移	有	34	0.59 ± 0.28	0.62	0.32
	无	19	0.51 ± 0.26		

3 讨 论

肿瘤 MDR 是指肿瘤细胞可耐受具有不同结构、功能及杀伤机制的药物, 从而对多种化疗药物产生交叉耐药, 可分为原发性 MDR (存在于化疗前) 和获得性 MDR (在化疗过程中产生), 是导致肿瘤化疗失败的重要原因之一^[3]。目前 MDR 研究重点在于 MDR 基因的转录表达。研究表明, 耐药基因 GST- π 在卵巢癌、肝癌等的耐药过程均密切相关^[4-5]。本研究采用 PCR 检测 GST- π 基因在胃癌中的表达, 初步探讨其在胃癌原发性耐药中的作用。

谷胱甘肽 (GSH) 系统是细胞内重要的解毒部分, 肿瘤细胞借助 GST 催化抗肿瘤药物与 GSH 结合, 再由 GX-X 转运蛋白将其排至细胞外, 从而保护细胞免受抗肿瘤药物的损伤。

GST 包括 α 、 μ 、 π 、 ϵ 、 θ 共 5 种同工酶, 其中 GST- π 活性最高, 与肿瘤 MDR 最密切。其引起 MDR 的机制包括: (1) 结合亲脂性物质, 促进其代谢, 降低抗癌药物细胞毒作用; (2) 催化 GSH 与亲电物质 (如烷化剂) 结合, 增加抗肿瘤药物水溶性, 使其容易排出体外; (3) 还原抗癌药物产生的过氧化物, 使其转变为无抗癌作用的物质; (4) 抑制烷化剂等亲电性化疗药物, 引起癌细胞 DNA 交联, 降低抗肿瘤药物对细胞的杀伤作用^[6]。其表达增加主要介导烷化剂、铂类、丝裂霉素类等药物耐药^[7]。

本研究发现, GST- π 在胃癌组织中呈高表达, 且所有患者在取材前均未接受放化疗, 说明 GST- π 高表达可能与胃癌原发性耐药密切相关。笔者之前的研究显示耐药基因 MDR1 在胃癌中亦呈高表达, 也说明胃癌的固有耐药机制具有复杂性、多样性等特点, 是多基因、多因素、多水平共同参与的复杂过程^[8]。高、中分化腺癌患者 GST- π 表达程度高于低分化腺癌, 这与低分化腺癌的化疗疗效较好相符, 也提示高、中分化腺癌比低分化腺癌更易产生耐药性。淋巴转移与否并不导致 GST- π 表达程度的差异, 不同于笔者之前研究所证实的 MDR1 基因可用于胃癌预后判断^[8], 提示 GST- π 不能作为预后判断指标, 说明其表达程度不受与淋巴转移与否无关, 不能反映癌细胞对化疗药物的耐受性。

GST- π 基因在正常胃黏膜组织中呈低表达, 而在癌组织产生一定耐药性时呈高表达, 说明 GST- π 基因检测可了解患者机体对化疗药物的耐受情况, 有利于制定更为有效的化疗方案, 实现合理用药, 进而获得满意的化疗效果。对耐药基因进行定量分析, 不仅可了解耐药原因自身的表达情况, 也可指导临床有针对性地制订有效的化疗方案, 为肿瘤个体化治疗提供了一定的理论基础。

参考文献

[1] 陈万青, 张思维, 郑荣寿, 等. 中国肿瘤登记地区 2007 年肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2011, 20(3): 162-169.
[2] Shao J, Stapleton PL, Lin YS, et al. Cytochrome p450 and glutathione-transferase mRNA expression in human fetal liver hematopoietic stem cells[J]. Drug Metab Dispos, 2007, 35(1): 168-175.
[3] Murakami S. Molecular mechanism of multi-drug resistance[J]. Nihon Rinsho, 2008, 66(1): 193-203.
[4] Lu D, Shi HC, Wang ZX, et al. Multidrug resistance-associated biomarkers PGP, GST-pi, Topo-II and LRP as prognostic factors in primary ovarian carcinoma[J]. Br J Biomed Sci, 2011, 68(2): 69-74.
[5] 李海平, 陶建蜀, 高波, 等. 肝细胞癌中耐药基因的表达及意义[J]. 临床肝胆病杂志, 2011(9): 972-975.
[6] 张燕, 金先庆, 赵珍珍, 等. 5 种耐药基因在成人恶性肿瘤中的表达特点[J]. 重庆医科大学报, 2007, 32(10): 1023-1027.
[7] Stewart DJ. Tumor and host factors that may limit efficacy of chemotherapy in non-small cell and small cell lung cancer[J]. Crit Rev Oncol, 2010, 75(3): 173-264.
[8] 胡秀学, 赵颖, 杜汉方, 等. MDR1 基因在胃癌组织中的表达及意义[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(1): 79-81.