

中表达也增高,其表达与细胞的生长状态无关.用丁酸钠诱导癌细胞分化, gp96 mRNAs 的表达则下调.说明 gp96 与肿瘤发生、发展及细胞分化之间具有相关性.表明这些基因的高表达是肿瘤细胞的重要特征,将在分子水平上为肿瘤的发生提供重要线索.

我们应用免疫组织化学和原位杂交技术对胃癌组织进行 gp96 的表达研究,结果表明, gp96 在胃癌组织和癌旁正常黏膜内均有表达,在胃癌组织的表达明显高于癌旁正常黏膜,并且与组织学类型、肿瘤分期及淋巴结转移相关.分化越差、进展越晚及有淋巴结转移时 gp96 的表达显著增高,提示 gp96 的表达可以作为肿瘤细胞的一种标志物.从我们的实验结果分析,在肿瘤的发生发展过程中,由于肿瘤组织生长快,致使肿瘤缺血、缺氧及局部酸中毒,细胞为了抵御这样恶劣的肿瘤微环境状态而产生 gp96 等热休克蛋白,高水平的 gp96 等热休克蛋白可保护肿瘤细胞战胜机体内各种不利的生理环境,在肿瘤的发生和发展中起重要作用.胃癌细胞通过增加细胞合成 gp96 的水平和改变其在细胞内的定位和分布而得以保护细胞,逃避免疫监视.因此, gp96 在癌细胞表达水平的增加可以作为癌细胞调整其抗原特性以适应生存的一种危险信号.

gp96在肿瘤细胞中的异常表达可能由于肿瘤细胞不断增生,需要他们作为分子伴侣来调节、稳定这一

增生过程. gp96 通过影响增生过程参与细胞周期、细胞间信号传导,从而使肿瘤细胞逃避免疫监视,提示可以作为判断肿瘤预后的参考指标,为研究肿瘤的发生、发展提供理论基础.

#### 4 参考文献

- 1 Robert J. Evolution of heat shock protein and immunity. *Dev Comp Immunol* 2003;27:449-464
- 2 Heike M, Frenzel C, Meier D, Galle PR. Expression of stress protein gp96, a tumor rejection antigen, in human colorectal cancer. *Int J Cancer* 2000;86:489-493
- 3 Peibin Y, Shude Y, Changzhi H. Heat shock protein gp96 and cancer immunotherapy. *Chin Med Sci J* 2002;17:251-256
- 4 Liu C, Ewing N, DeFilippo M. Analytical challenges and strategies for the characterization of gp96-associated peptides. *Methods* 2004;32:32-37
- 5 Linderorth NA, Popowicz A, Sastry S. Identification of the peptide-binding site in the heat shock chaperone/tumor rejection antigen gp96 (Grp94). *J Biol Chem* 2000;275:5472-5477
- 6 Gazit G, Lu J, Lee AS. De-regulation of GRP stress protein expression in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 1999;54:135-146
- 7 Wu YD, Song JD. The expression of glucose regulated protein-94 in colorectal carcinoma cells treated by sodium butyrate. *Cell Res* 2000;10:115-125
- 8 Tanaka K, Kondoh N, Shuda M, Matsubara O, Imazeki N, Ryo A, Wakatsuki T, Hada A, Goseki N, Igari T, Hatsuse K, Aihara T, Horiuchi S, Yamamoto N, Yamamoto M. Enhanced expression of mRNAs of antiseecretory factor-1, gp96, DAD1 and CDC34 in human hepatocellular carcinomas. *Biochim Biophys Acta* 2001;1536:1-12

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 •

## 胃癌与癌前病变 CdX2 基因蛋白表达的意义

林一帆, 王长洪, 刘杰, 胡家露, 宋福林, 陆宇平, 陈山泉, 杨卓

林一帆, 王长洪, 宋福林, 陆宇平, 陈山泉, 杨卓, 沈阳军区总医院, 中医科(国家中西医结合胃肠病重点专科) 辽宁省沈阳市 110016

刘杰, 胡家露, 中国人民解放军第四军医大学全军消化病研究所 陕西省西安市 710032

项目负责人: 林一帆, 110016, 辽宁省沈阳市沈河区文化路 83 号, 沈阳军区总医院, 中医科(国家中西医结合胃肠病重点专科). yifan\_lin@hotmail.com 电话: 024-23051101

收稿日期: 2004-04-10 接受日期: 2004-04-29

### 摘要

目的: 研究胃癌、胃黏膜异性增生组织中肠道特异性分化基因 CdX2 蛋白的表达及意义, 探讨胃黏膜癌前病变癌变的分子机制.

方法: 应用多克隆抗体 ABC 免疫组化检测胃黏膜异性型增生 36 例、慢性浅表性胃炎 35 例、肠型胃癌 30 例及未分化型胃癌 28 例 CdX2 基因蛋白的表达.

结果: CdX2 基因蛋白在慢性胃炎中表达均为阴性; 重度异型增生(68%)及肠型胃癌组(71%)CdX2 蛋白表达阳性率较轻、中度异型增生组(13%, 22%)、及未分化型胃癌组(35%)增高, 差异有显著意义( $P < 0.01$ ); 但是, CdX2 基因表达与胃癌的分期及淋巴结转移无关( $P > 0.05$ ).

结论: CdX2 基因过度表达与胃黏膜上皮细胞异型增生的形成及癌变有关, 可能是胃癌发生的早期事件, 特别是与肠型胃癌的形成关系密切.

林一帆, 王长洪, 刘杰, 胡家露, 宋福林, 陆宇平, 陈山泉, 杨卓. 胃癌与癌前病变 CdX2 基因蛋白表达的意义. 世界华人消化杂志 2004;12(8):1971-1973 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1971.asp>

### 0 引言

胃黏膜异型增生与肠上皮化生是重要的癌前病变<sup>[1]</sup>. 肠型

胃腺癌被认为经历了慢性胃炎、萎缩性胃炎、肠上皮化生到异型增生和胃癌的发展过程。肠道特异性转录因子(intestine-specific transcription factor) CdX2, 在晚近的胃黏膜癌前病变研究中, 受到极大的重视<sup>[2]</sup>, CdX2 基因在胃黏膜中的异常表达, 可造成胃黏膜肠上皮化生和异型增生, 并与胃癌的形成有关。我们检测胃黏膜异型增生与胃癌组织 CdX2 基因蛋白的表达, 探讨 CdX2 基因与胃癌发生的关系及胃黏膜异型增生癌变的分子机理。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院 1988-09/1999-12 手术及胃镜检查黏膜活检病例石蜡包埋标本 130 例, 其中胃黏膜异型增生 37 例, 慢性浅表性胃炎 35 例, 肠型胃癌 30 例及未分化型胃癌 28 例。全部标本经常规连续切片, 厚度 4  $\mu$ m, HE 染色后由两名病理医师根据 WHO 制定的标准进行病理诊断与分级。CdX2 抗体为鼠多克隆抗体, 由美国宾夕法尼亚大学医学院, 消化病研究所 Debra G. Silberg 教授(M.D.Ph.D)馈赠; ABC 与 DAB 底物试剂盒为美国 Vector Lab Inc, 产品。

**1.2 方法** 标本经常规脱蜡, 用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭内源酶, 正常牛血清减少非特异反应, 采用常规 ABC 免疫组化染色法染色。阳性反应判定标准: CdX 基因蛋白细胞核成棕红色或棕黄色, 少数细胞质出现棕黄色颗粒。阳性细胞站 10% 以上为阳性表达。

**统计学处理** 应用 SAS 6.12, 对计数资料进行  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

**2.1 胃癌组织 CdX2 基因蛋白的表达** CdX2 基因蛋白在肠型胃癌表达阳性率(70.0%)较未分化癌(35.7%)增高, 差异有显著意义( $P < 0.01$ )。但 CdX2 基因表达与胃癌的分期及淋巴结转移无关( $P > 0.05$ , 见表 1)。

表 1 胃癌组织 CdX2 基因蛋白表达情况比较  $n$  (%)

胃癌	$n$	CdX2 基因蛋白		
		阳性	阴性	阳性率(%)
肠型	30	21	9	70.0 <sup>b</sup>
未分化型	28	10	18	35.7
早期	11	6	5	54.5
进展期	47	28	19	59.6
淋巴结无转移	10	5	5	50.0
转移	48	29	19	58.3

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 未分化型。

**2.2 癌前病变及胃癌 CdX2 基因蛋白的表达** CdX2 基因蛋白在慢性胃炎中表达均为阴性, 在重度异型增生(66.6%)及肠型胃癌组(70.0%)表达阳性率较轻、中度异型增生组(13%、22%)、及未分化型胃癌组(35.7%)增高, 差

异有显著意义( $P < 0.01$ , 见表 2)。

表 2 胃黏膜癌前病变与胃癌 CdX2 基因蛋白表达情况比较  $n$  (%)

病变情况	$n$	CdX2 基因蛋白		
		阳性	阴性	阳性率(%)
慢性胃炎	35	0	35	0
轻度异型增生	15	2	13	13.3
中度异型增生	13	3	10	23.1
重度异型增生	9	6	3	66.6 <sup>b</sup>
肠型胃癌	30	21	9	70.0 <sup>b</sup>
未分化型胃癌	28	10	18	35.7

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 轻、中度异型增生及未分化型胃癌。

## 3 讨论

胃黏膜癌前病变的癌变机制, 是胃癌研究的重要课题, 肠型胃腺癌被认为经历了慢性胃炎、萎缩性胃炎, 肠上皮化生到异型增生和胃癌的发展过程, 然而, 对其演变过程的分子机理所知尚少。虽然有学者研究了在肠上皮化生及其癌变过程中间环节的微卫星不稳定性及 p53 基因突变, 但是, 二者均被认为是胃癌形成过程的晚期事件<sup>[3]</sup>。同源基因通常编码各种与生长发育、分化、增生有关的转录因子, 对于胚胎的早期正常发育具有重要意义。肠道特异性转录因子 CdX2/1 属于果蝇尾部相关同源基因家族成员。有研究表明, CdX2/1 刺激肠道特异性基因的转录, 而且可指导正常肠道上皮细胞的发育和分化, 并在维持其正常形态中起重要作用。将 CdX1 基因转入无 CdX1 基因蛋白表达的大鼠未分化肠上皮细胞系 IEC6, 可引导该细胞分化, 出现复层微绒毛结构, 并表达 CdX1 基因蛋白; 以 CdX2 建立转基因鼠动物模型, 可见转基因鼠的胃大体形态变长, 胃腔变小, 胃黏膜病理形态呈肠上皮化生, 阿尔新蓝染色阳性<sup>[2]</sup>。正常小鼠胚胎 9.5 wk 时, 肠道远端(后肠)可见 CdX2 蛋白表达, 12.5 wk 则可见弱的 CdX1 表达, 从 13.5-14.5 wk 的内胚层到上皮移行期, CdX1 表达增强, 而 CdX2 直到出生后的发育过程中, 除了远端结肠表达弱外, 均有较强的表达; CdX2/1 基因正常情况下可在十二指肠以下的肠道表达, 在胃及食管无表达。然而, 当胃与食管出现肠上皮化生时, 可见 CdX2/1 表达<sup>[4]</sup>。晚近有学者研究了 69 例胃癌和肠上皮化生 CdX2/1 基因蛋白表达情况, 结果发现, CdX2 和 CdX1 基因蛋白在肠上皮化生胃黏膜的表达率分别为 85%(41/48), 和 90%(47/52); 胃癌的表达率分别为 55%(38/69)和 74%(51/69), 胃癌的组织学类型与 CdX2 关系密切, 肠型胃癌 CdX2 表达, 明显高于未分化癌。因此认为, CdX2 和 CdX1 基因在胃黏膜肠上皮化生的形成和癌变过程中起重要作用<sup>[5]</sup>。

我们应用多克隆抗体 CdX2, ABC 免疫组化检测了胃黏膜异型增生 36 例, 慢性浅表性胃炎 35 例, 肠型

胃癌30例及未分化型胃癌28例CdX2蛋白的表达. 结果显示, CdX2 基因蛋白在慢性胃炎中表达均为阴性; 重度异型增生(68%)及肠型胃癌组(71%)CdX2 蛋白表达阳性率, 较轻、中度异型增生组(13%、22%)、及未分化型胃癌组(35%)增高, 差异有显著意义( $P<0.01$ ); 但CdX2基因表达与胃癌的分期及淋巴结转移无关( $P>0.05$ ); 此结果与文献[5]报道相似. 因此认为, CdX2基因过度表达与胃黏膜上皮细胞的肠上皮化生、异型增生的形成及癌变有关, 可能是胃癌发生的早期事件, 特别是与肠型胃癌的形成关系密切. 但是, CdX2 基因在轻、中度异型增生及未分化癌中表达较低, 此结果同时提示, 未分化癌形成及部分异型增生的形成及癌变过程, 可能还有其他机制参与或多机制协同作用所致.

#### 4 参考文献

- 1 Ruggie M, Correa P, Dixon MF, Hattori T, Leandro G, Lewin K, Riddell RH, Sipponen P, Watanabe H. Gastric dysplasia: the Padova international classification. *Am J Surg Pathol* 2000; 24:167-176
- 2 Silberg DG, Sullivan J, Kang E, Swain GP, Moffett J, Sund NJ, Sackett SD, Kaestner KH. Cdx2 ectopic expression induces gastric intestinal metaplasia in transgenic mice. *Gastroenterology* 2002;122:689-696
- 3 Leung WK, Kim JJ, Kim JG, Graham DY, Sepulveda AR. Micosatellite instability in gastric intestinal metaplasia in patients with and without gastric cancer. *Am J Pathol* 2000;156: 537-543
- 4 Silberg DG, Swain GP, Suh ER, Traber PG. Cdx1 and Cdx2 expression during intestinal development. *Gastroenterology* 2000;119:961-971
- 5 Bai YQ, Yamamoto H, Akiyama Y, Tanaka H, Takizawa T, Koike M, Kenji Yagi O, Saitoh K, Takeshita K, Iwai T, Yuasa Y. Ectopic expression of homeodomain protein CDX2 in intestinal metaplasia and carcinomas of the stomach. *Cancer Lett* 2002;176:47-55

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 •

## 免疫性肝损伤中一氧化氮诱生对 CYP2E1 表达及代谢活性的影响

薛永志, 章国良, 步秀云, 李 丹, 王 昕

薛永志, 章国良, 步秀云, 李丹, 王昕, 北京大学医学部基础医学院药理学系 北京市 100083

国家自然科学基金, No. 30171097, No. 0371665

北京大学 985 项目—人类疾病相关基因研究中心资助课题, No. A2000-1

项目负责人: 章国良, 100083, 北京市海淀区学院路38号, 北京大学医学部基础医学院药理学系, 药物代谢与遗传药理学研究室. zhanggl168@mail.bjmu.edu.cn

电话: 010-82802725 传真: 010-82802725

收稿日期: 2004-03-18 接受日期: 2004-04-20

### 摘要

**目的:** 研究BCG诱发啮齿类免疫性肝损伤过程中NO诱生对CYP2E1表达及代谢活性的影响.

**方法:** 采用尾静脉注射BCG诱发小鼠及大鼠产生免疫性肝损伤, 紫外分光光度法测定肝微粒体中CYP450全酶含量, 免疫组化法测定肝组织CYP2E1蛋白表达, HPLC法测定经CYP2E1代谢的探针药物氯唑沙宗血药浓度经时变化.

**结果:** BCG刺激可致肝组织炎性细胞浸润形成大量肉芽肿, 肝微粒体CYP450全酶含量降低, 肝脏CYP2E1蛋白表达下调, CYP2E1代谢底物氯唑沙宗血药浓度-时间曲线右移. 选择性iNOS抑制剂氨基胍可逆转BCG所致肝脏CYP450全酶含量降低, 增加CYP2E1蛋白表达, 增强CYP2E1对探针药物氯唑沙宗的代谢活性.

**结论:** NO诱生机制参与了BCG免疫性肝损伤中CYP450全酶含量降低, CYP2E1表达下调及代谢活性的下降.

薛永志, 章国良, 步秀云, 李丹, 王昕. 免疫性肝损伤中一氧化氮诱生对CYP2E1表达及代谢活性的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(8):1973-1976

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1973.asp>

### 0 引言

细胞色素P450(cytochrome P450, CYP450)药物代谢酶系超家族是参与各种外源性药物或内源性激素等氧化代谢的关键酶源, 其中主要在肝脏表达的CYP2E1是重要的CYP450酶亚型之一. CYP2E1的动物实验对人临床药物代谢动力学研究有重要价值<sup>[1]</sup>. 近年来有关感染或炎症等免疫刺激因素对CYP2E1的影响及调节机制受到关注<sup>[2-7]</sup>. BCG所致免疫性肝损伤模型, 是确实可靠的iNOS诱生模型<sup>[8-9]</sup>. 我们以NOS抑制剂氨基胍及L-NAME作为工具药, 采用免疫组化法及高效液相色谱法(HPLC)等研究手段, 在CYP450全酶含量、CYP2E1酶蛋白表达及CYP2E1代谢活性等不同环节, 探讨免疫性肝损伤中NO诱生对CYP2E1代谢调节中的作用及机制.

### 1 材料和方法

**1.1 材料** BALB/c近交系小鼠,  $\delta$ , 体质量 $20 \pm 2$  g, 及SD大鼠,  $\delta$ , 体质量 $280 \pm 20$  g, 由北京大学医学部实验动物中心提供. BCG冻干粉及氯霉素对照品购自中国药品生物制品检定所. iNOS兔抗人IgG抗体购自北京中山生物技术有限公司. CYP2E1多克隆IgG抗体