

的iNOS基因启动子-969位点多态性的荧光素酶报道基因重组质粒 pPGV-iNOSwt 和 pPGV-iNOSmt, 用脂质体介导法转染人肝癌细胞株 HepG2, 研究 iNOS 基因启动子-969G→C多态性的不同基因型启动子的功能活性差异. 结果发现启动子iNOSmt的活性比对照基因启动子B2-E的活性显著升高, 差异有显著性. 启动子iNOSwt的活性比对照基因启动子B2-E的活性稍高, 差异无显著性. 表明 iNOS 基因启动子 -969G→C 的多态性导致该启动子的功能活性增强, GC 基因型携带者比 GG 基因型携带者可能有更强的 iNOS 表达.

Jurgen *et al*^[1]在 1998 年研究儿童严重疟疾患者与 iNOS 基因启动子-969G→C 的多态性的关系中, 发现杂合子 GC 的频率为 17%, 轻度疟疾患者杂合子 GC 的频率为 30%, 认为这种频率的差异与 iNOS 基因启动子-969G→C 的突变后对疟疾产生抵抗有关. 他们推测杂合子 GC 基因型患者可能产生大量的 NO, 对疟疾具有杀伤作用. 本结果初步证实了 Jurgen *et al* 的推测, iNOS 基因启动子-969G→C 的多态性导致该启动子的功能活性增强, 产生大量的 NO, 发挥效应. 最近 Morris *et al*^[2]报道在 iNOS 基因启动子-756 到 -716 位点之间有一个 AAAT/AAAAT 的缺失/插入(-/+)多态性与 iNOS 基

因启动子的功能活性有关, 他们发现 iNOS 基因启动子为“+”等位基因时活性比启动子为“-”等位基因的活性高 25 倍. 认为在 iNOS 基因启动子 AAAT/AAAAT 的缺失/插入(-/+)多态性中, “+”等位基因携带者是 iNOS 基因高表达, 导致 2 型糖尿病患者出现并发症的原因. 本研究的结果与 Morris 的结果有相似之处, 即 iNOS 基因启动子多态性改变影响其功能活性. 为了区分 iNOS 基因启动子-969G→C 多态性中是否存在 iNOS 基因启动子 AAAT/AAAAT 的缺失/插入(-/+)多态性位点, 将构建的 iNOS 基因启动子-969G→C 位点多态性的荧光素酶报道基因重组质粒 pPGV-iNOSwt 和 pPGV-iNOSmt 测序的结果, 输入 GenBank 进行对比分析, 未发现有 AAAT/AAAAT 的缺失/插入(-/+)多态性相同序列. 提示 iNOS 基因启动子的这两个多态性都影响该基因启动子的功能活性.

4 参考文献

- 1 Jurgen FJ, Morduller KB, Lell B. Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against Malaria. *Lancet* 1998;351:265-266
- 2 Morris BJ, Markus A, Glenn CL. Association of a functional inducible nitric oxide synthase promoter variant with complications in type 2 diabetes. *J Mol Med* 2002;80:96-104

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 •

食管癌前病变和癌组织 P53 和 Rb 蛋白表达与年龄的关系

孙超, 王立东, 王启鸣, 李定国

孙超, 王立东, 王启鸣, 郑州大学医学院癌症研究室 河南省郑州市 450052
李定国, 上海第二医科大学附属新华医院消化内科 上海市 200092
国家杰出青年科学基金, No. 30025016
河南省高校创新人才工程基金
项目负责人: 王立东, 450052, 河南省郑州市大学路 75 号. 郑州大学医学院
癌症研究室. lidong0823@sina.com
电话: 0371-6970165 传真: 0371-6970165
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-07-06

摘要

目的: 探讨河南省食管癌高发区青年(≤ 40 岁)与中老年(≥ 50 岁)食管癌患者的 P53 和 Rb 蛋白表达变化特征及其意义.

方法: 采用免疫组化卵白素-生物素-过氧化物酶复合物(ABC)法和组织病理学方法, 分析 72 例青年和 73 例中老年患者食管鳞癌组织中 P53 和 Rb 蛋白的表达及其与病变程度和年龄之间的关系.

结果: 青年组和中老年组患者从正常食管上皮→基底细胞过度增生→间变→鳞状细胞癌演变过程中, 随着病变程度的

加重, P53 和 Rb 蛋白阳性表达率呈上升趋势, 青年组 P53 免疫阳性反应的百分率在正常上皮和各级病变组织中均低于中老年组(13% vs 47%, $\chi^2=19.162$, 21% vs 60%, $\chi^2=19.380$, 43% vs 93%, $\chi^2=16.512$, 36% vs 85%, $\chi^2=36.213$, 以上 P 值均 <0.01), 青年组 Rb 蛋白阳性表达率在正常上皮和各级病变组织中也均低于中老年组, 但二者无统计学差异($P>0.05$). 青年组 P53 和 Rb 表达共阳性率为 25%, 共阴性率为 49%, 二者表达具有明显的一致性 (Kappa 值=0.442, $P<0.01$).

结论: P53 和 Rb 可能共同参与青年患者食管上皮的癌变过程, 并在食管癌发生中发挥相互协同的作用; 该地区不同年龄组食管癌变过程中 P53 蛋白表达变化差异可能与其接触环境致癌原时间长短有关.

孙超, 王立东, 王启鸣, 李定国. 食管癌前病变和癌组织 P53 和 Rb 蛋白表达与年龄的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(9):2222-2225
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2222.asp>

0 引言

食管癌具有显著的地域性分布差异,发病率可相差500倍.河南省林州市及其毗邻的安阳、辉县等地是食管癌发病率和死亡率最高的地区之一.食管上皮癌变是由多种致癌因素长期作用,并由多种基因变化参与的多阶段进行性发展过程^[1],以中老年最常见.然而,该地区青年食管癌患者并非罕见,且近年发生率有升高趋势,与中老年食管癌患者相比,青年食管癌患者的癌细胞分化差,易发生浸润性生长和淋巴结转移,预后差^[2]. p53-Rb系统变化是河南食管癌高发区人群食管癌变过程中发生频率最高的分子生物学改变,且P53和Rb系统相互协同作用共同影响细胞增生状况和癌变^[3]. P53和Rb在青年与中老年患者的对比研究尚无报道.我们分析青年与中老年食管癌患者P53和Rb蛋白表达变化特征,籍以进一步探讨该地区青年人食管癌变的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 青年食管癌72例和中老年食管癌73例来自河南省林州市人民医院、姚村食管癌医院和安阳肿瘤医院,青年组平均年龄 6.7 ± 3.3 岁(24-40岁);中老年组 59.5 ± 6.2 (50-74岁). 所有患者术前均未接受放化疗.标本离体后立即用850 mL/L酒精固定,常规组织学脱水,石蜡包埋,5 μ m切片,进行组织病理学诊断和免疫组织化学分析.诊断标准见参考文献[4].根据细胞形态、组织结构和分化程度,将食管上皮分为:正常食管上皮(normal epithelium, NOR)、基底细胞过度增生(basal cell hyperplasia, BCH)、不典型增生(dysplasia, DYS)、鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma, SCC). P53和Rb鼠抗人mAb购自美国Santa Cruz Biochemistry公司;ABC试剂盒和DAB底物试剂盒购自美国Vector公司;小牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自美国Sigma公司.

1.2 方法 采用ABC法,石蜡切片脱蜡,梯度酒精脱水;5 mL/L H₂O₂室温下孵育20 min;加正常马血清(1:50)置湿盒内室温下孵育20 min;PBS-BSA (20 g/L) 稀释第一抗体, P53(1:1 000)和Rb(1:100),湿盒内4℃中孵育12 h; PBS-BSA (20 g/L) 稀释生物素标记的鼠二抗1:200,室温下孵育45 min; ABC室温中孵育60 min (使用前30 min配制); DAB和5 mL/L H₂O₂混合孵育,显微镜下观察结果,适时终止反应;苏木素复染1 min;酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片. P53和Rb均以每高倍视野($\times 400$ 倍)出现 $\geq 10\%$ 细胞胞核呈棕黄色而胞质不着色为阳性反应^[4-5].采用生产第二抗体的正常动物血清封闭非特异性免疫球蛋白反应,采用省略第一抗体作为阴性对照,已知的阳性切片作为阳性对照.采用SPSS 10.0统计软件处理,各组间率的比较采用 χ^2 检验,线性趋势检验, Kappa 检验,检验标准取 $\alpha=0.05$.

2 结果

2.1 P53和Rb免疫组化 P53免疫阳性反应定位于细胞

核,棕黄色染色,在正常食管黏膜上皮,阳性反应细胞多数分布于1-2层基底细胞和乳头区的基底细胞,间质未见阳性反应(图1-4).青年组患者从NOR→BCH→DYS→SCC,随着病变程度的加重, P53蛋白阳性表达率呈上升趋势,分别为13%、21%、43%和36%. SCC、DYS组与NOR组比较具有非常显著的统计学差异($P<0.01$).中老年组从NOR到各级病变, P53蛋白阳性表达率分别为47%、60%、93%和85%,各组间具有非常显著的统计学差异($P<0.01$).青年组与中老年组比较,青年组P53免疫阳性反应的百分率在形态学相似的各组中均低于中老年组($P<0.01$). Rb免疫阳性反应定位于细胞核(图5, 6).青年组和中老年组患者从NOR→BCH→DYS→SCC,随着病变程度的加重, Rb蛋白阳性表达率均呈上升趋势($P<0.01$).青年组与中老年组比较,青年组Rb蛋白阳性表达率(12%、20%、35%和40%)在NOR和各级病变组织中均低于中老年组(17%、34%、48%和52%),但二者无显著差异($P>0.05$).

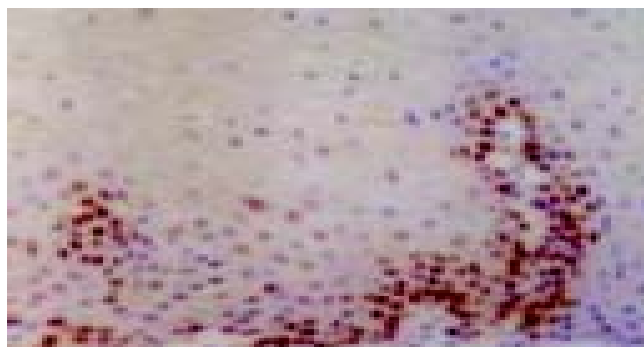


图1 P53在食管NOR中的阳性表达($\times 400$ 倍).

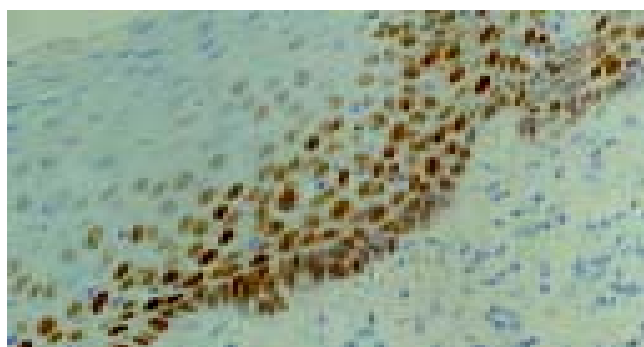


图2 P53在食管BCH中的阳性表达($\times 400$ 倍).

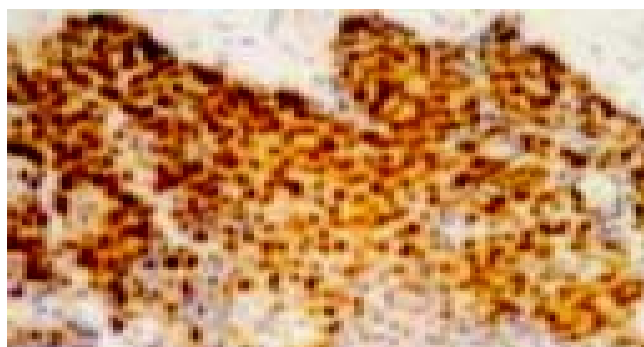


图3 P53在食管DYS中的阳性表达($\times 400$ 倍).

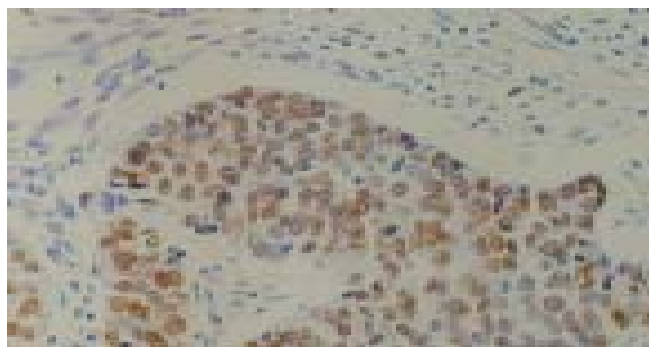


图4 P53在食管 SCC 中的阳性表达(×400 倍).

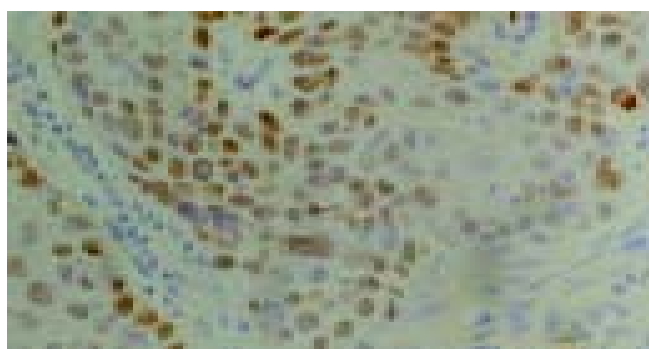


图5 Rb在食管 BCH 中的阳性表达(×400 倍).

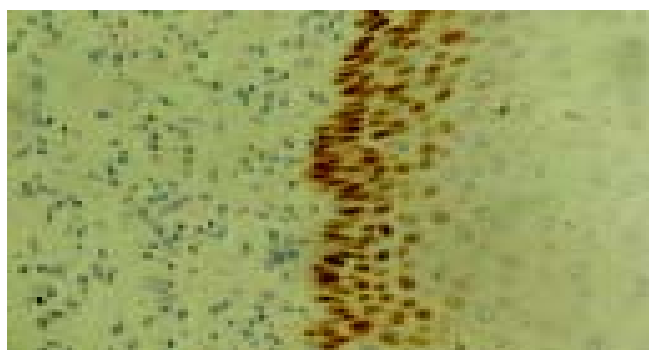


图6 Rb在食管 SCC 中的阳性表达(×400 倍).

2.2 P53 与 Rb 表达的相关性 青年组患者 P53 和 Rb 表达共阳性率为 25%，共阴性率为 49%，二者表达具有明显的一致性(Kappa 值 = 0.442, $P < 0.01$).

3 讨论

p53-Rb 肿瘤抑制基因系统包括 p53, Rb, p16, p15, p14, cyclinD1 及 p21^{waf} 等^[6-7]. p53 与 Rb 系统相互作用共同影响细胞增生状况和癌变^[8-10]. 我们先前发现, p53-Rb 系统变化是河南食管癌高发区人群食管癌变过程中发生频率最高的分子生物学改变; 食管癌组织同时发生 p53-Rb 基因功能丧失的频率约为 59%^[3]. 我们及其他实验室以往研究发现, P53 和 Rb 蛋白的阳性表达均随着食管癌变的加重而增加, 提示 p53-Rb 基因突变可能导致其蛋白抑癌功能的丧失, 细胞周期失去调控, 从而促进肿瘤的发生^[11-13]. 本研究表明, 随着病变加重, 青年组和中老年组患者的 P53 和 Rb 阳性表达率均呈上

升趋势, 具有非常显著的统计学差异($P < 0.01$), 且青年组 P53 和 Rb 在食管癌组织中的表达具有较高的一致性改变, 提示 P53 和 Rb 蛋白参与青年食管上皮的癌变过程, 是青年食管癌重要的分子学变化. p53-Rb 系统可能在青年食管癌发生中发挥相互协同的作用, 导致细胞增生调节紊乱, 诱发肿瘤.

我们还发现, 青年组 P53 免疫阳性反应的百分率在形态学相似的各组中均低于中老年组, 提示该地区不同年龄组食管癌变过程中 P53 蛋白表达变化差异可能与其接触环境致癌原时间长短有关. 与中老年组比较, 青年组接触环境致癌原时间相对短, p53 突变机率可能低, 而 p53 基因突变是 P53 蛋白聚集的主要原因^[3]. 我们先前对该地区食管癌 p53 基因突变谱分析表明, 该地区食管癌 p53 CpG 位点 G : C → A : T 的发生率高于其他地区食管癌, 而此位点的突变可能主要由亚硝基化合物诱导形成, 提示林州食管癌的发生与环境致癌因素(进食霉变食物)引起的 p53 基因突变有密切关系^[14]. 因此在基因水平进一步分析 p53 基因的突变, 可能更好地判断 P53 与青年食管癌患者的关系. 此外, 同一地区青年与中老年暴露于相似的环境, 而青年比中老年患癌提前数十年, 提示个体遗传易感因素在青年食管癌的发生中也起着重要的作用. 青年食管癌患者可能存在代谢环境中致癌因素有关的酶或 DNA 损伤修复酶功能的改变, 如基因多态变化等, 这些遗传因素的改变可能是导致在同一环境下的青年人较之老年人更早、更快发生癌变的关键因素. 作者近年的研究证实该地区人群存在 O⁶-烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶 (O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase, AGT)、谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 以及细胞色素 P4501A1 等基因多态改变^[15-16], 这些酶的改变, 提高该地区人群对食管癌的易感性. 进一步扩大样本量, 了解这些相关酶基因变化与不同年龄人群的关系, 将有助于探讨青年食管癌患者的高易感分子基础. 青年组患者 Rb 免疫阳性反应的百分率在形态学相似的各组中与中老年组比较无统计学差异, 提示 Rb 为青年和中老年食管癌变共有的分子学改变; Rb 可能协同其他分子共同影响青年食管癌的发生. 本研究对象在年龄范围上与中老年组差距不够大, 可能影响 Rb 的特异性表达. 有关 Rb 与青年食管癌变的确切关系尚需进一步研究.

4 参考文献

- 1 王立东, 郑树. 河南食管癌高发区人群食管和贲门癌变机制. 郑州大学学报 2002;37:717-729
- 2 王忠民, 杨红伟, 唐怀好. 32 例青年食管癌临床病理分析. 中国医师杂志 2003;5:169-170
- 3 王立东, 陈红, 郭丽梅. 肿瘤抑制基因 p53-Rb 系统变化与食管癌变关系研究及展望. 世界华人消化杂志 2001;9:367-371
- 4 Shi ST, Yang GY, Wang LD, Xue Z, Feng B, Ding W, Xing EP, Yang CS. Role of p53 gene mutations in human esophageal carcinogenesis: results from immunohistochemical and mutation analyses of carcinomas and nearby non-cancerous lesions. *Carcinogenesis* 1999;20:591-597

- 5 Xing EP, Yang GY, Wang LD, Shi ST, Yang CS. Loss of heterozygosity of the Rb gene correlates with pRb protein expression and associates with p53 alteration in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:1231-1240
- 6 Xing EP, Nie Y, Song Y, Yang GY, Cai YC, Wang LD, Yang CS. Mechanisms of inactivation of p14^{ARF}, p15^{INK4b} and p16^{INK4a} genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999;5:2704-2713
- 7 Cai YC, Yang GY, Nie Y, Wang LD, Zhao X, Song YL, Seril DN, Liao J, Xing EP, Yang CS. Molecular alteration of p73 in human esophageal squamous cell carcinoma: loss of heterozygosity occurs frequently; loss of imprinting and elevation of p73 expression may be related to defective p53. *Carcinogenesis* 2000;21:683-689
- 8 Mawrin C, Kirches E, Boltze C, Dietzmann K, Roessner A, Schneider-Stock R. Immunohistochemical and molecular analysis of p53, RB, and PTEN in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Virchows Arch* 2002;440:610-615
- 9 Gregorc V, Darwish S, Ludovini V, Pistola L, De Angelis V, Mihaylova Z, Bellezza G, Sidoni A, Cavaliere A, Bucciarelli E, Massaro G, Tonato M. The clinical relevance of Bcl-2, Rb and p53 expression in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2003;42:275-281
- 10 Cordon-Cardo C. P53 and RB: simple interesting correlates or tumor markers of critical predictive nature? *J Clin Oncol* 2004; 22:975-977
- 11 Wang LD, Yue WB, Zhou Y, Feng CW, Liu B, Zhou Q, Jia YY, Zheng S, Gao SS, Xie XJ, Fan ZM, Niou HM, Zhuang ZH, Yang CS, Bai YM, Qi YJ. Endoscopic screening and determination of p53 and proliferating cell nuclear antigen in esophageal multistage carcinogenesis: a comparative study between high- and low-risk populations in Henan, northern China. *Dis Esophagus* 2002;15:80-84
- 12 靳玉兰, 张伟, 刘伯齐, 王洪平, 韩志楷, 韩双廷, 曲平, 李莱, 丁镇伟, 林培中. 食管癌前病变及原位癌组织中 Ki67、p53、iNOS 的异常表达. *中华肿瘤杂志* 2001;23:129-131
- 13 Mandard AM, Hainaut P, Hollstein M. Genetic steps in the development of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Mutat Res* 2000;462:335-342
- 14 王立东, 刘宾, 郑树. 林州居民食管癌 p53 基因突变谱分析与不同地区食管癌和其他类型肿瘤的比较. *中华流行病学杂志* 2003; 24:202-205
- 15 王立东, 邹建湘, 洪钧言, 周琦, Deng CJ, Xie DW, Capasso H. 食管癌患者 O⁶-烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶基因多态性研究. *华人消化杂志* 1998;6:560-563
- 16 Wang LD, Zheng S, Liu B, Zhou JX, Li YJ, Li JX. CYP1A1, GSTs and mEH polymorphisms and susceptibility to esophageal carcinoma: study of population from a high-incidence area in north China. *World J Gastroenterol* 2003;9:1394-1397

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 •

肠内营养对胃癌术后近期的免疫和营养状况的影响

卢晓明, 牛彦锋, 王国斌, 陈道达

卢晓明, 牛彦锋, 王国斌, 陈道达, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科 湖北省武汉市 430022
项目负责人: 卢晓明. 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科. lxming62@eyou.com
电话: 027-83691466
收稿日期: 2004-05-27 接受日期: 2004-06-29

摘要

目的: 比较早期肠内与肠外营养对胃癌术后免疫和营养状况的影响。

方法: 胃癌72例分为肠内营养(EN)组26例, 肠外营养(PN)组26例及对照组(常规补液)组20例。术后24 h开始肠内或肠外营养, 检测术前和术后9 d 营养和免疫指标, 并观察术后严重并发症及肠功能的恢复。

结果: EN 和 PN 组术后 BW, PA, Alb, IgG, IgM 及 IgA 均显著高于对照组($t=2.14-9.33$, $P=0.000-0.038$, <0.05), 而 EN 组与 PN 组间差异无显著性; EN 和 PN 组术后 CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ 均显著高于对照组($t=3.07-8.60$, $P=0.000-0.004$, <0.01), 且 EN 组术后 CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ 亦显著高于 PN 组($t=2.04-2.58$, $P=0.013-0.046$, <0.05); EN 组胃肠功能恢复时间明显短于 PN 组和对照组($t=13.03-13.30$, $P=0.000$, <0.001)。

结论: 早期肠内营养可明显改善胃癌术后近期的营养和免疫状况, 在术后细胞免疫和肠功能恢复方面明显优于肠外营养。

卢晓明, 牛彦锋, 王国斌, 陈道达. 肠内营养对胃癌术后近期的免疫和营养状况的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(9):2225-2227

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2225.asp>

0 引言

近年来随着肠内营养制剂和设施的发展完善, 对肿瘤患者施行围手术期肠内营养(enteral nutrition, EN)支持得到广泛开展, 已证实对恶性肿瘤患者常见营养不良的改善及降低术后并发症方面起到积极作用, 而对肿瘤患者常伴的免疫机能下降以及手术造成的再度免疫抑制方面的研究结果不一。我们对胃癌患者早期肠内、肠外营养(parenteral nutrition, PN)后机体免疫和营养指标检测, 分析不同营养方式对胃癌患者术后免疫和营养状况的影响如下。

1 材料和方法

1.1 材料 我科2002/2003年间进展期胃癌根治性手术72