

致谢: 感谢天津第三中心医院肝胆研究所张金卷博士在实验中给予的指导和帮助。

4 参考文献

- 1 赵彩彦, 李丽. 瘦素与脂肪性肝病. 中华肝胆病杂志 2004;12:510-512
- 2 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114:842-845
- 3 曾民德. 重视非酒精性脂肪性肝病的研究. 中华肝胆病杂志 2003;11:69
- 4 Yu AS, Keffe EB. Nonalcoholic fatty liver disease. *Rev Gastroenterol Disord* 2002;2:11-19
- 5 van Hoek B. Non-alcoholic fatty liver disease: a brief review. *Scand J Gastroenterol* 2004;39(Suppl 241):56-59
- 6 曾民德. 脂肪肝发病机制“二次打击”的假设. 肝脏 2001;6:145
- 7 李跃华, 吴翠贞, 阙玲莉. 丹参素增强肝细胞生长及其在药物性肝细胞损伤中的保护作用. 南京医科大学学报(中文版) 1996;16:346-348
- 8 王南, 蔡海江, 朱宇, 陈秀英. 丹参素对牛主动脉平滑肌细胞氧化修饰LDL的抑制作用. 南京医科大学学报 1994;14:529-531
- 9 Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-1192
- 10 Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, Klein AS, Bulkley GB, Bao C, Noble PW, Lane MD, Diehl AM. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 1998;12:57-65
- 11 Memon RA, Hotamisligil GS, Wiesrock SM, Uysal-Teoman K, Faggioni R, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. Upregulation of uncoupling protein 2 mRNA in genetic obesity: lack of an essential role for leptin, hyperphagia, increased tissue lipid content, and TNF- α . *Biochem Biophys Acta* 2000;1484:41-50
- 12 Straczkowski M, Kowalska I, Dzienis-Straczkowska S, Stepień A, Skibinska E, Szelachowska M, Kinalska I. Changes in tumor necrosis factor- α system and insulin sensitivity during an exercise training program in obese women with normal and impaired glucose tolerance. *Eur J Endocrinol* 2001;145:273-280
- 13 Xie HS, Lutt WW. Insulin resistance caused by hepatic cholinergic interruption and reversed by acetylcholine administration. *Am J Physiol* 1996;270:E858-E863
- 14 黄双盛, 吴勇杰. 丹参的抗氧化与抗炎作用研究进展. 中国中药信息杂志 2002;9:88-89
- 15 王文俊, 吴咸中, 姚智, 李会强. 人黄芩素、丹参素对单核细胞分泌炎症细胞因子的调节. 中国免疫学杂志 1995;11:370-372

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

人食管鳞癌中细胞周期调节基因蛋白的表达

金春亭, 张林西, 李海军, 李玉珍, 武欣, 范婕, 左东升, 王淑强

金春亭, 张林西, 李海军, 李玉珍, 武欣, 范婕, 左东升, 王淑强, 河北省北方学院病理学教研室 河北省张家口市 075029
河北省自然科学基金课题, No. C2005000664
河北省普通高等学校博士科研资助基金课题, No. B2004101
通讯作者: 张林西, 075029, 河北省张家口市市长青路 14 号, 河北北方学院病理学教研室. linxizhang@sohu.com
电话: 0313-8041652 传真: 0313-8045177
收稿日期: 2005-06-10 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 探讨细胞周期调节基因 cyclin D1、CDK4、cyclin E 和 p27Kip1 在我国食管鳞癌(SCC)中的表达特点及其在食管上皮癌变中的可能作用。

方法: 应用流式细胞术对 81 例食管鳞癌中 cyclin D1、CDK4、cyclin E、p27Kip1 的表达进行检测, 并对结果进行定量分析。

结果: cyclin D1、CDK4、cyclin E 蛋白在正常食管上皮的表达都较低, 在异型增生上皮中有所增高, 而在 SCC 中表达都较高, 且随分化程度的降低而逐渐增高, 组间差异显著(分别为 $F = 28.369$, $P < 0.01$; $F = 9.016$, $P < 0.01$; $F = 22.667$,

$P < 0.01$)。p27Kip1 在正常食管上皮中表达最高, 随分化程度的降低而显著减少, 组间差异显著($F = 5.783$, $P < 0.01$)。p27Kip1 表达分别与 cyclin D1、CDK4 和 cyclin E 基因表达呈显著负相关($r = -0.380$, -0.242 , -0.333 ; $P < 0.05$), 而后三种基因表达之间呈显著正相关(cyclin D1 与 CDK4 $r = 0.711$, $P < 0.01$; cyclin D1 与 cyclin E $r = 0.638$, $P < 0.01$; CDK4 与 cyclin E $r = 0.430$, $P < 0.01$)。

结论: 在食管鳞癌中细胞周期调节基因 cyclin D1、CDK4、cyclin E 和 p27Kip1 表达异常与食管上皮细胞癌变密切相关。

金春亭, 张林西, 李海军, 李玉珍, 武欣, 范婕, 左东升, 王淑强. 人食管鳞癌中细胞周期调节基因蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1909-1912
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1909.asp>

0 引言

细胞周期调节基因与细胞癌变的关系, 是近年来生命科学领域的研究热点之一。目前, 已发现在癌变过程中有多

种细胞周期调控因子表达异常.但是,对于多种细胞周期调节基因在食管上皮癌前病变及食管鳞癌(squamous cell carcinoma, SCC)中的表达特点及可能的作用、多种细胞周期调节基因表达的相互关系,目前少见报道.为此,本研究运用新鲜食管癌手术切除标本,研究了细胞周期调节基因蛋白 cyclin D1、CDK4、cyclin E、p27Kip1 在食管 SCC 及癌前病变中的表达情况,为食管癌的早期癌变研究提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院附属医院2001-08/12食管癌患者手术切除标本81例.男50例,女31例,年龄30-71岁,平均年龄 55 ± 0.6 岁.其中高分化SCC 39例,中分化SCC 18例,低分化SCC 24例.同时取切端正常食管黏膜5例,癌旁组织10例.术后立即取材,以100 mL/L中性甲醛固定,常规脱水、浸蜡、包埋,并进行连续切片,HE染色,由2位富有经验的病理医师分别进行病理组织学分级诊断.同时在相同部位取材,以700 mL/L冷乙醇固定,进行流式细胞仪检测.癌旁上皮经组织学证实都有明显的不典型增生.患者术前未经放疗或化疗. cyclin D1、CDK4、cyclin E、p27Kip1 都是小鼠 IgG 单抗, Santa Cruz 公司产品;羊抗鼠 IgG-FITC, Jackson ImmunoResearch 公司产品.以上抗体工作液浓度均为1:100.

1.2 方法 基因蛋白表达的流式细胞仪检测:具体方法按文献[1]进行.基因蛋白表达的定量分析: cyclin D1、CDK4、cyclin E、p27Kip1 基因蛋白表达的定量分析:以荧光指数(Fluorescence Index, FI)表示他们的相对含量,公式为: $FI = (\text{样品基因蛋白表达的平均荧光强度} - \text{对照样品平均荧光强度}) / \text{正常样品平均荧光强度}$.

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件进行统计分析.组间显著性检验采用单因素方差分析(ANOVA),组间多重比较采用 Scheffe 法.基因表达之间的相关分析采用 Pearson 法. $P < 0.05$ 时表示差异有显著性.

2 结果

2.1 cyclin D1基因表达 cyclin D1在正常及异型增生上皮中的表达都很低,而在不同分化SCC中表达较高,且随分化程度降低显著增高,在低分化SCC中表达最高(表1),组间差

异非常显著($F = 28.369$, $P < 0.01$).尤其是正常及异型增生组分别与不同分化SCC各组间差异显著($P < 0.05$).

2.2 CDK4基因表达 CDK4的表达随分化程度降低而逐渐增高,在正常上皮组中最低,在低分化SCC中最高(表1),组间差异非常显著($F = 9.016$, $P < 0.01$).特别是正常上皮组和异型增生组分别与中、低分化SCC组间,高分化与低分化SCC组间差异显著($P < 0.05$).

2.3 cyclin E基因表达 cyclin E表达在正常上皮中很低,异型增生上皮中有明显增高,而在不同分化SCC中的表达都较高(表1),组间差异非常显著($F = 22.667$, $P < 0.01$).尤其是正常和异型增生组分别与不同分化的SCC各组间差异显著($P < 0.05$).

2.4 p27Kip1基因表达 p27Kip1表达在不同分化组间的差异具有显著性($F = 5.783$, $P < 0.01$).其表达在正常上皮中最高,异型增生上皮中减少,而在不同分化SCC中的表达则随着分化程度的降低明显减少,在低分化SCC中表达最低(表1). cyclin D1、CDK4、cyclin E和p27Kip1表达趋势见图1.

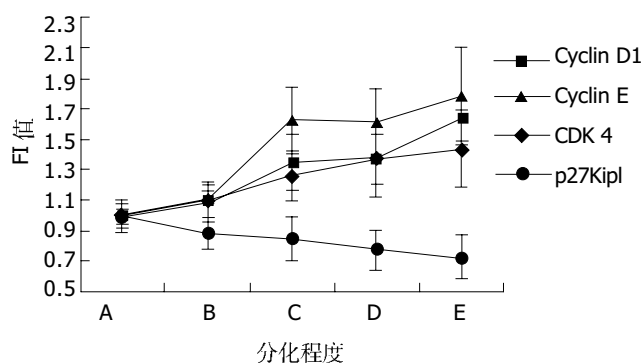


图1 细胞周期调节基因在食管鳞癌中的表达.

2.5 基因表达的相关性分析 对流式细胞仪检测结果进行的相关性分析显示, p27Kip1 表达分别与 cyclin D1、CDK4、cyclin E 基因表达呈显著负相关(相关系数分别为 $r = -0.380$; $r = -0.242$; $r = -0.333$; $P < 0.05$).后3种基因表达之间呈显著正相关(cyclin D1与CDK4相关系数 $r = 0.711$, $P < 0.01$; cyclin D1与cyclin E相关系数 $r = 0.638$, $P < 0.01$; CDK4与cyclin E相关系数 $r = 0.430$, $P < 0.01$).

表1 食管鳞癌中细胞周期调节基因的表达(mean \pm SD)

分组	n	cyclin D1 FI	CDK4 FI	cyclin E FI	p27Kip1 FI
A 正常上皮	5	1.00 \pm 0.02 ^a	1.00 \pm 0.05 ^c	1.00 \pm 0.08 ^e	1.00 \pm 0.10
B 异型增生	10	1.08 \pm 0.12 ^a	1.10 \pm 0.12 ^c	1.11 \pm 0.05 ^e	0.89 \pm 0.10
C 高分化SCC	39	1.35 \pm 0.18	1.26 \pm 0.16	1.63 \pm 0.22	0.85 \pm 0.15
D 中分化SCC	18	1.37 \pm 0.16	1.37 \pm 0.24	1.61 \pm 0.22	0.78 \pm 0.13
E 低分化SCC	24	1.64 \pm 0.15	1.44 \pm 0.25	1.79 \pm 0.32	0.73 \pm 0.14 ^a

^a $P < 0.05$ vs C、D和E组; ^c $P < 0.05$ vs D组和E组; ^e $P < 0.05$ vs C、D和E组; ^a $P < 0.05$ vs A组.

3 讨论

在食管癌的形成及逐步演进过程中,可有多分子事件发生.其中可能有细胞周期调节基因的表达异常.细胞周期调节失控是肿瘤发生的重要机制之一.参与细胞周期调控的因子主要有:细胞周期蛋白(cyclin)、细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent-kinase, CDK)和CDK抑制因子(cyclin dependent-kinase inhibitor, CKI),其中CDK是调节细胞周期的核心成分.CKI通过与cyclin、CDK或cyclin-CDK复合物的结合,抑制CDK的活性,调节细胞周期进程.

cyclins是具有细胞周期特异性的一组蛋白.各型cyclin分别与不同的CDKs有特殊亲和力.cyclin D1所表达的蛋白在细胞周期中是G₁期细胞增殖信号的关键蛋白,可与CDK4构成cyclin D1/CDK4复合体,使Rb抑癌基因产物磷酸化而失活,从而使细胞进入周期.若cyclin D1或/和CDK4表达明显增加,cyclin D1/CDK4促细胞增殖活性大大增强,过多的细胞进入细胞周期,造成食管上皮的过度增殖以至癌变.有报道认为cyclin D1参与人体多种肿瘤的形成^[2].本研究通过对食管癌及癌前病变细胞中cyclin D1及CDK4蛋白表达的检测发现,随着食管上皮向癌的发展,蛋白表达明显增高,提示cyclin D1或/和CDK4基因蛋白过度表达参与食管上皮早期癌变的形成,可能是一个较好的早期诊断分子标志物.Kitahara *et al*^[3]认为cyclin D1, CDK4过度表达及p16基因缺失可能参与食管癌细胞的自主生长;另有报道^[4-5]认为, cyclin D1基因蛋白过度表达和/或p16蛋白表达缺失是食管SCC的预后指标.不同学者对cyclin D1基因蛋白在食管癌中的作用还不够一致^[6-9].进一步说明对食管癌前病变及食管癌进行cyclin D1研究的必要性.亚硝酸盐是中国食管癌高发区重要的致癌因素之一^[10]. Youssef *et al*^[11-12]对甲基苄基亚硝胺诱发的大鼠食管癌进行cyclin D1检测发现, cyclin D1过度表达,并证实食管癌变中cyclin D1过度表达发生在早期.

cyclin E是G₁期的另一个细胞周期蛋白,表达时间稍晚于cyclin D1,可与CDK2特异结合形成CDK2/cyclin E复合体,从而激活CDK2,促进细胞周期向前进展.但目前关于cyclin E在食管癌中的研究较少.本研究发现,cyclin E随食管上皮异型性增高其表达含量逐渐增高,在低分化SCC中表达最高,其表达与病理学分级密切相关.提示cyclin E基因蛋白在食管癌变中可能有重要作用. Anayama *et al*^[13]对食管癌中cyclin E等基因表达研究发现,其与临床病理参数无关. Matsumoto *et al*^[14]认为cyclin E和CDK2与肿瘤预后无明显关系. cyclin E在食管癌中有高表达,但是目前尚未确定cyclin E与食管癌临床病理参数之间的关系,有待进一步研究.

p27Kip1是一个重要的细胞周期抑制蛋白,属于CDK抑制因子(CKI),已在一些恶性肿瘤中作过研究,特别是乳癌、肺癌、膀胱癌和前列腺癌^[15]. p27Kip1基因

蛋白能广泛抑制各种cyclin和CDK的活性,但主要是抑制cyclin E-CDK2等G₁期激酶复合物,使细胞不能通过G₁期.我们发现, p27Kip1的表达在正常上皮中最高,在SCC中则随分化程度的降低其表达显著减少.提示p27Kip1表达降低参与食管SCC形成及进展.有研究认为p27Kip1缺失发生在早期癌变过程,在异型增生上皮表达减少,侵袭转移性强的癌更倾向于p27Kip1表达缺失^[15-16]. p27Kip1表达缺失可能与食管癌组织分化及患者预后较差有关^[16-18],可能是此病的一个独立预后指标^[18].但也有研究^[19]发现61%食管癌中有p27Kip1蛋白高表达,且与肿瘤浸润、淋巴结转移及患者预后较差有关.

因此,在食管SCC及癌前上皮中有cyclin D1、CDK4、cyclin E蛋白及p27Kip1蛋白等细胞周期调控蛋白表达的紊乱,促进细胞增殖的cyclin D1、cyclin E及CDK4表达异常增高,而负性调节基因p27Kip1表达显著减少.导致过多细胞进入细胞周期,细胞增殖活性增强以致癌变.而正常细胞周期的控制需要cyclins、CDK4和抑制蛋白之间的平衡^[20]. p27Kip1表达分别与cyclin D1、cyclin E及CDK4表达呈负相关,而后三者之间表达呈正相关,也说明细胞周期调节蛋白表达紊乱.对食管上皮癌前病变及食管癌中多种细胞周期相关基因分子标志的研究,将有助于揭示食管癌的早期癌变机制,提高食管癌的早期诊断水平.

4 参考文献

- 1 张林西,左连富,齐凤英,林培中,刘江惠,刘淑霞.环氧化酶-2与p53在食管上皮癌变及鳞癌细胞中的表达. *肿瘤* 2003;23:111-114
- 2 Motokura T, Arnold A. Cyclin D and oncogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3:5-10
- 3 Kitahara K, Yasui W, Yokozaki H, Semba S, Hamamoto T, Hisatsugu T, Tahara E. Expression of cyclin D1, CDK4 and p27KIP1 is associated with the p16MTS1 gene status in human esophageal carcinoma cell lines. *J Exp Ther Oncol* 1996;1:7-12
- 4 Itami A, Shimada Y, Watanabe G, Imamura M. Prognostic value of p27 (Kip1) and CyclinD1 expression in esophageal cancer. *Oncology* 1999;57:311-317
- 5 Takeuchi H, Ozawa S, Ando N, Shih CH, Koyanagi K, Ueda M, Kitajima M. Altered p16/MTS1/CDKN2 and cyclin D1/PRAD-1 gene expression is associated with the prognosis of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res* 1997;3:2229-2236
- 6 Kunisaki C, Shimada H, Akiyama H, Nomura M, Matsuda G, Ono H. Prognostic factors in esophageal cancer. *Hepatogastroenterology* 2004;51:736-740
- 7 Wu MY, Zhuang CX, Yang HX, Liang YR. Expression of Egr-1, c-fos and cyclin D1 in esophageal cancer and its precursors: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *World J Gastroenterol* 2004;10:476-480
- 8 Zuo LF, Lin PZ, Qi FY, Guo JW, Liu JH. Flow cytometric analysis of DNA, telomerase content and multi-gene expression in esophageal epithelial dysplasia. *World J Gastroenterol* 2003;9:2409-2412
- 9 Guner D, Sturm I, Hemmati P, Hermann S, Hauptmann S, Wurm R, Budach V, Dorken B, Lorenz M, Daniel PT. Multigene analysis of Rb pathway and apoptosis control in esophageal squamous cell carcinoma identifies patients with good prognosis. *Int J Cancer* 2003;103:445-454

- 10 王东旭, 李伟. 食管癌病因学进展. 世界华人消化杂志 2000;8:1029-1030
- 11 Youssef EM, Hasuma T, Morishima Y, Takada N, Osugi H, Higashino M, Otani S, Fukushima S. Overexpression of cyclin D1 in rat esophageal carcinogenesis model. *Jpn J Cancer Res* 1997;88:18-25
- 12 Wang QS, Sabourin CL, Wang H, Stoner GD. Overexpression of cyclin D1 and cyclin E in N-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 1996;17:1583-1588
- 13 Anayama T, Furihata M, Ishikawa T, Ohtsuki Y, Ogoshi S. Positive correlation between p27Kip1 expression and progression of human esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1998;79:439-443
- 14 Matsumoto M, Furihata M, Ishikawa T, Ohtsuki Y, Ogoshi S. Comparison of deregulated expression of cyclin D1 and cyclin E with that of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and CDK2 in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1999;80:256-261
- 15 Chetty R. p27 Protein and cancers of the gastrointestinal tract and liver: an overview. *J Clin Gastroenterol* 2003;37:23-27
- 16 Shibata H, Matsubara O, Wakiyama H, Tanaka S. The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Pathol Res Pract* 2001;197:157-164
- 17 Yasunaga M, Tabira Y, Nakano K, Iida S, Ichimaru N, Nagamoto N, Sakaguchi T. Accelerated growth signals and low tumor-infiltrating lymphocyte levels predict poor outcome in T4 esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2000;70:1634-1640
- 18 Shamma A, Doki Y, Tsujinaka T, Shiozaki H, Inoue M, Yano M, Kawanishi K, Monden M. Loss of p27 (KIP1) expression predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 2000;58:152-158
- 19 Kagawa Y, Yoshida K, Hirai T, Toge T. Significance of the expression of p27Kip1 in esophageal squamous cell carcinomas. *Dis Esophagus* 2000;13:179-184
- 20 Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366:704-707

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

成年猪胰岛分离纯化方法的改良

黄跃南, 郭欣, 田素礼, 吴德全, 单世光

黄跃南, 田素礼, 吴德全, 单世光, 哈尔滨医科大学附属二院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150086
郭欣, 哈尔滨市中医医院外科 黑龙江省哈尔滨市 150076
通讯作者: 黄跃南, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 246 号, 哈尔滨医科大学附属二院普外三科, dr-huangyuenan@163.com
电话: 0451-86605575
收稿日期: 2005-06-06 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 改良成年猪胰岛分离纯化技术, 以优化胰岛制备方法。

方法: 采用体、尾部区段猪胰腺胰管内灌注复合胶原酶震荡消化(胶原酶 V+DNA 酶)和改进的 Dextran 不连续密度梯度离心法分离纯化猪胰岛, 并进行生物学活性测定和形态学观察。

结果: 胰腺被消化组织平均 15 ± 3.4 g, 消化后胰岛获得量 4130 ± 976 IE/g 胰腺组织, 纯化后胰岛获得量为 2320 ± 669 IE/g 胰腺组织, 胰岛纯度 80% 左右。胰岛素释放试验结果显示分离纯化后胰岛功能良好。病理切片, HE 染色显示细胞团结构完整, 细胞核清晰可见, 胞质丰富。

结论: 经本方法分离纯化获得的猪胰岛具有较高的产量和纯度、结构完整、功能良好, 可满足大动物移植实验和临床移植的需要。

黄跃南, 郭欣, 田素礼, 吴德全, 单世光. 成年猪胰岛分离纯化方法的改良. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1912-1914
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1912.asp>

0 引言

异种胰岛移植是近年来应用胰岛移植治疗胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)的一个研究热点, 同种移植^[1]和干细胞移植^[2]有其较多的局限性, 而猪就成为最有希望的临床异种胰岛移植的动物供体。成年猪的胰岛缺少完整的包膜环绕, 分离和纯化过程较为复杂, 胰岛结构和功能完整性极易在此过程中被破坏, 因此需进一步研究和改进成年猪胰岛分离纯化技术, 以获得足量结构完整、功能良好的胰岛细胞, 从而满足大动物移植实验和临床移植的需要。本研究旨在探讨和改良成年猪胰岛分离纯化技术^[3-4], 以优化胰岛制备方法。

1 材料和方法

1.1 材料 成年杂种猪, 猪龄 12 mo, 体质量 150 kg 左右, 由哈尔滨市肉联厂提供。猪被屠宰放血后, 在相对无菌条件下迅速取出胰腺, 保存于 4℃ Hanks 液中送至实验