

长春医学





目 次

论著

1. FTY720 对体外培养乳腺癌细胞增殖影响的研究 张淑芳 (1)
2. Survivin 及 P16 在分化型甲状腺癌中的表达及意义 朱 莉 (4)
3. 胃癌中 β -连接素、P53 的表达及相关性研究 宋晓环 (7)
4. 逍遥散提取液诱导乳腺癌 (MCF-7) 细胞凋亡实验研究 张 虹 (11)
5. 药材粉碎度对三七片中主要成分在人工胃液中溶出量的影响 张凌赢 (14)
6. 隐神经营养血管皮瓣的血供特点及应用 杨 铭 (16)
7. 远程医疗监护系统的应用研究 李 洋 (19)
8. 中医学理论的计算机仿真实验研究探索 栗久珍 (21)

经验交流

9. 浅谈公共医疗卫生资源有效配置的建立 丁建红 (23)

教学与研究

10. 关于在精神科护理学教学中进行心理健康教育实践与研究 和 平 (25)
11. 计算机教学中对学生自学能力的培养 王奇岩 (28)
12. 浅谈生物教学中学生学习兴趣的培养 高雅静 (30)
13. 情感教育对高职生化实验教学的积极作用 邹 维 (32)
14. 情景模拟在儿科护理学教学中的应用与体会 李美谊 (34)
15. 社区护士护理实践技能培训方法探讨 周银玲 (36)
16. 网络教学在医学基础课中的研究与应用 胡金秋 (38)

高校管理

17. 高职高专院校实验技术人员队伍存在问题及对策 汪春红 (40)
18. 高职院校教师继续教育问题探析 刘志红 (43)
19. 系部档案管理工作初探 陈 娟 (46)

学生工作

20. 大学生择业倾向与就业指导调研报告 胡静涛 (48)
21. 浅谈成人教育班主任职业倦怠及应对 李 璐 (50)
22. 做好辅导员工作 培养学生综合素质 张 晶 (52)

综 述

23. 计算机网络技术在医院统计工作中的应用浅析 王 川 (54)
24. 我国社区护理的发展现状及对策 刘海英 (57)

短篇与个案

25. 利巴韦林联合双歧杆菌治疗婴幼儿腹泻 216 例分析 刘颖丽 (60)
26. 内科住院病人和门诊病人心理健康状况调查比较 李 义 (62)

27. 医院护士激励需求问卷调查分析 穆亚丽 (64)
- 学生园地
28. 浅谈药用植物学电子图片采集规则 侯 钰 (66)
29. 锥体束的多方位断面标本制作 梁 康 (68)
30. 心脏结构解剖标本的制作 李成勇 (70)

CHANGCHUN MEDICAL JOURNAL

Vo. 10

No. 2

2012

Main Content

1. On the influences of FTY720 on Proliferation of breast cancer cells in vitro Zhang Shufang (1)
2. The meaning and expression of Survivin and P16 in differentiated thyroid carcinoma Zhu Li (4)
3. On expression and relative research of β -catenin and P53 in liver cancer Song Xiaohuan (7)
2. Research on the experiment of Extract of xiaoyao powder inducing apoptosis of MCF-7
..... Zhang Hong (11)
5. Influence f the degree of grinding of drug ingredients on the Migration Of the major part of Sanqi in simulated gastric fluid Zhang Lingying (14)
6. The application and feature of blood supply of skin flap pedicled with nutrient vessels of the saphenous nerve Yang Ming (16)
7. On application of Remote medical monitoring system Li Yang (19)
8. On computer simulated experiment of theory of TCM Li Jiuzhen (21)
9. On the building of Public health effective distribution of resources Ding Jianhong (23)
10. On the practice and research of promoting psychic health education in Psychiatric Nursing teaching
..... He Ping (25)
11. On Calculation of students self-taught abilities in computer teaching Wang Qiyan (28)
12. On calculation of students' interest in biology teaching Gao Yajing (30)
13. Function of emotional education in Biochemical experiment teaching in vocational education
..... Zou Wei (32)
14. Application and experience of scenario simulation in Pediatrics nursing teaching Li Meiyi (34)
15. On strategies of the training of community nursing Practice Zhou Yinling (36)
16. On application and research of web teaching in basic medical teaching Hu Jinqiu (38)
17. The existing problem in laboratory technician systems of vocational colleges ... Wang Chunhong (40)
18. On teachers' continuing education in vocational colleges Liu Zhihong (43)
19. On Department of archives management work Chen Juan (46)
20. Research on Tendency of Choosing Jobs of Students and occupational guidance Hu Jingtao (48)
21. On job burnout and counter measure of adult education Li Lu (50)
22. Accomplishing counselor work, calculating students' comprehensive quality Zhang Jing (52)
23. On application of computer networking technology in hospital statistical work Wang Chuan (54)
24. Current Situation and Countermeasures for national community nursing Liu Haiying (57)
25. analysis of cases of Ribavirin in combination with Bifidobacterium in curing infantile diarrhea
..... Liu Yingli (60)
26. 216 The comparison of Investigation on mental health status between inpatients of internal medicine and

outpatient	Li Yi (62)
27. Questionnaire Analysis of inspiration demand of nurses	Mu Yali (64)
28. On the rules of Pharmaceutical Botany Electronic picture collection	Hou Yu (66)
29. Manufacture of species of pyramidal tract multiaspect section	Liang Kang (68)
30. Manufacture of structural scalpel species of heart	Li Cheng yong (70)

【论著】

FTY720 对体外培养乳腺癌细胞增殖影响的研究

张淑芳 邹 维 孙吉凤

(长春医学高等专科学校生化教研室 吉林长春 130031)

摘 要 目的: 探讨 FTY720 对体外培养乳腺癌细胞增殖的影响。方法: 体外培养乳腺癌细胞, 将其培养液中加入不同浓度的 FTY720, 继续培养 48 小时, MTT 法检测该细胞的增殖情况; 瑞士-姬姆萨染色观察细胞形态变化; 流式细胞仪检测 FTY720 对乳腺癌细胞周期、凋亡率的影响。结果: 当 FTY720 浓度为 6400ng/ml 时, 体外培养乳腺癌细胞的增殖受到明显抑制, 抑制率为 62.0% ($P<0.05$), 而且抑制率呈浓度依赖性; 镜下可见细胞出现凋亡的形态; 流式细胞仪检测分析显示 FTY720 可将该细胞阻滞于 G1 期, 并促进其发生凋亡, 凋亡率呈浓度依赖性。结论: 在体外培养的乳腺癌细胞培养液中加入一定浓度的 FTY720, 能明显抑制该细胞的增殖并诱导其凋亡。

关键字 FTY720 乳腺癌 (MCF-7) 细胞 凋亡 抗肿瘤作用

FTY720 是冬虫夏草代谢产物 ISP-1 经化学修饰而得到的一种新的化合物^[1]。它作为一种新型免疫抑制剂被研究的较多, 而对 FTY720 抑制肿瘤细胞增殖、促进细胞凋亡的研究, 国内罕见报道。因此, 我们选择了以人乳腺癌 (MCF-7) 细胞为研究对象, 初步探讨 FTY720 对体外培养肿瘤细胞增殖抑制及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人乳腺癌 (MCF-7) 细胞 本实验室保存

1.1.2 药品与试剂 RPMI1640 培养基购于 Gibco/BRL 公司。四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO)、小牛血清及碘化丙啶 (PI)、瑞士-姬姆萨染色液购于北京鼎国生物技术公司。FTY720 购自美国 SIGMA 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌 (MCF-7) 细胞株接种于含 10% 小牛血清、100U/ml 青霉素及 100 U/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液中, 置 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养, 24-48h 换液、传代 1 次。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖抑制率 收集对数生长期的 MCF-7 细胞并调细胞浓度至 5×10^4 个/ml 接种于 96 孔培养板, 每孔加 100 μ l 细胞悬液, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养 24 h 后给药。实验设药物处理组、阴性对照组、空白对照: 药物处理组每孔加入 100 μ l FTY720 溶液使其终浓度分别达到 400、800、1600、3200、6400ng/ml, 阴性对照组不加药物, 空白对照不加细胞只加 RPMI1640 培

养液, 各浓度组均设 3 复孔, 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 48h, 每孔加入 5 mg/ml MTT10 μ l, 继续孵育 4h 后, 弃上清液, 加入 150 μ l DMSO, 轻轻振荡 10 分钟, 待蓝紫色结晶物完全溶解, 于 570nm 波长处在酶标仪上测吸光度值 (OD 值), 求平均值, 计算药物对细胞生长增殖的抑制率。细胞生长抑制率 = $(1 - \text{药物处理组 OD 值} / \text{阴性对照组 OD 值}) \times 100\%$ 。

1.2.3 瑞士-姬姆萨染色观察细胞形态 取对数生长期细胞接种于铺有盖玻片的 6 孔培养板, 加入 FTY720, 同时设阴性对照, 药物终浓度分别为 800、1600、3200ng/ml, 作用 48h, 取片风干, 滴加无水乙醇待干, 加瑞士-姬姆萨染液染色 30 秒, PBS 作用 2 分钟, 洗去染液, 无水乙醇固定, 晾干、封片, 镜检拍照。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡 取对数生长期细胞给药, 同时设阴性对照, FTY720 终浓度分别为 800、1600、3200ng/ml, 作用细胞 48h 后收集细胞, 调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml。以 1000r/min 离心 5min 弃上清, PBS 洗涤 2 次, 70% 乙醇 4℃ 固定过夜, 以 50 μ g/ml 的 PI37℃ 避光染色 30min, 用流式细胞仪检测细胞周期及凋亡。

1.3 统计学方法 用 SPSS 统计软件对结果进行分析, 实验数据取均数 $\pm$ 标准差表示, 采用方差分析和 t 检验。

2 结 果

2.1 细胞增殖抑制率 MTT 法检测显示, 浓度为 400、800、1600、3200、6400ng/ml 的 FTY720 作用 48 小时后, 对 MCF-7 细胞的增殖均有一定程度

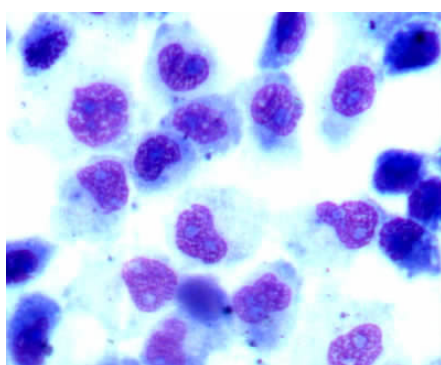
抑制作用，抑制率分别为 12.2%、23.8%、26.9%、36.3%、62.0%，呈浓度依赖性。与 400 ng/ml 组相比，1600 ng/ml 和 6400ng/ml 组 $P < 0.05$ ，组间有显著差异。(表 1)

表 1 FTY-720 对体外培养 MCF-7 细胞的抑制作用 ($\bar{x} \pm S$)

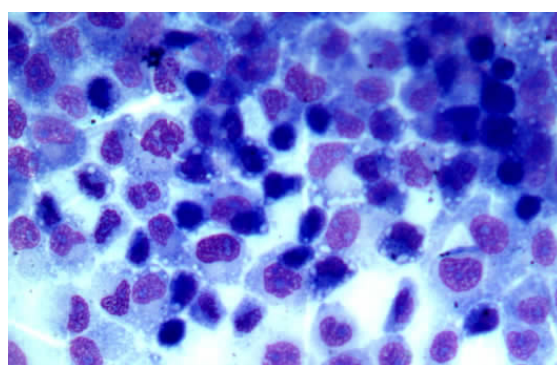
药物浓度	48 小时抑制率 (%)
400ng/ml	12.2 $\pm$ 0.022
800 ng/ml	23.8 $\pm$ 0.058
1600 ng/ml	26.9 $\pm$ 0.034*
3200 ng/ml	36.3 $\pm$ 0.025
6400 ng/ml	62.0 $\pm$ 0.028*

注：与 400ng/ml 组相比，* $P < 0.05$

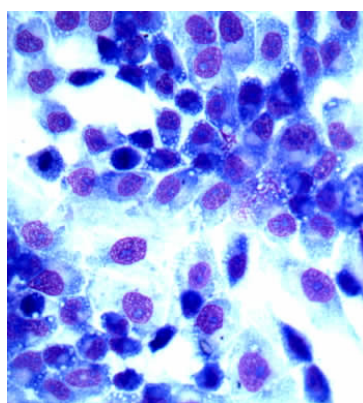
2.2 细胞形态 镜下可见 FTY720 作用 48 小时的 MCF-7 细胞染色质浓缩、分割成块状，细胞膜完整但胞浆出现发泡现象，大部分细胞发生凋亡。(图 1)



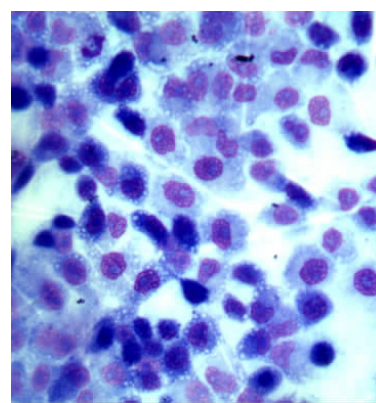
A1 对照组



A2 800 ng/ml 组



A3 1600 ng/ml 组



A4 3200 ng/ml 组

图 1 FTY-720 对 MCF-7 细胞形态影响

2.3 细胞周期及凋亡 分别用 800、1600、3200ng/ml 的 FTY720 作用 MCF-7 细胞 48h，经流式细胞仪检测分析显示，与对照组相比，随药物浓度增加，实验组处于 G1 期的细胞逐渐增多，S 期细胞

明显减少，表明 FTY720 可将其细胞周期阻滞于 G1 期；细胞凋亡率也较对照组明显增加， $P < 0.05$ (表 2)。

表 2 FTY-720 对 MCF-7 细胞周期及凋亡的影响 ($\bar{x} \pm S$)

药物浓度	G1 期 (%)	S 期 (%)	G2 期 (%)	凋亡率 (%)
对照组	57.5 $\pm$ 0.021	30.6 $\pm$ 0.031	11.9 $\pm$ 0.012	4.22 $\pm$ 0.015
800 ng/ml	60.8 $\pm$ 0.018	21.5 $\pm$ 0.026	17.7 $\pm$ 0.034	5.64 $\pm$ 0.009*
1600 ng/ml	66.3 $\pm$ 0.032	20.3 $\pm$ 0.011	13.4 $\pm$ 0.013	5.46 $\pm$ 0.002*
3200 ng/ml	67.2 $\pm$ 0.022	19.6 $\pm$ 0.042	13.2 $\pm$ 0.009	6.86 $\pm$ 0.012*

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$

3 讨论

恶性肿瘤严重威胁着人类的健康和生命, 近些年, 运用中草药治疗恶性肿瘤, 越来越被广大学者和患者接受, 是治疗恶性肿瘤的有效手段之一。临床实验证明, 中草药有较好抗肿瘤作用, 无明显毒副作用, 不仅对化、放疗起到减毒、增敏、增效的效应, 而且能预防肿瘤的复发及转移。FTY720, 是将传统中药冬虫夏草抽提物中的成分 ISP-1 进行结构改造而成的新物质, 因由日本的 Fujita 教授 (Taito 公司) 和 Yoshitomi 药品公司共同研制成功而得名^[1]。

目前, FTY720 的抗肿瘤作用已引起研究者的关注。有实验证实, FTY720 能诱导 HL-60、Jurkat、实体膀胱肿瘤细胞、人胰腺癌等多种肿瘤细胞系凋亡^[2-4]。

本研究以人乳腺癌 (MCF-7) 细胞为研究对象, 旨在初步探讨不同浓度 FTY720 对体外培养肿瘤细胞增殖抑制及凋亡的影响。本实验结果发现, FTY720 浓度为 6400ng/ml 时, 体外培养 MCF-7 细胞的增殖受到显著抑制 ($P < 0.05$), 抑制作用基本呈剂量依赖性。在此实验基础上, 我们进行了细胞形态观察及细胞周期的检测, 将不同浓度 FTY720 作用 48 小时的 MCF-7 进行瑞士-吉姆萨染色后, 与对照组相比, 镜下观察可见明显的凋亡细胞形态, 实验组细胞变小, 胞浆中出现明显发泡现象, 胞膜完整, 而且细胞染色质浓缩、分割成块状。流式细胞仪检测结果显示, 随着 FTY720 浓度增大,

MCF-7 细胞处于 G1 期的比例逐渐增多, S 期细胞逐渐减少, 细胞凋亡率也随之增大, 说明该肿瘤细胞 DNA 合成受到了抑制, 表明 FTY720 可诱导 MCF-7 肿瘤发生凋亡, 且这种作用存在剂量依赖性。

本研究结果显示, 一定浓度的中药制剂 FTY720 可抑制体外培养 MCF-7 细胞的增殖, 诱导该肿瘤细胞凋亡, 这为进一步研究其抗肿瘤作用提供了一定的实验依据, 同时, 预示着 FTY720 作为肿瘤治疗药物有着良好的应用前景。

【参考文献】

- [1] Fujita T, Inoue K, Yamamoto S, et al. A potent immunosuppressive activity found in Isaria sinclairii metabolite [J]. J Antibiot, 1994, 47 (2): 208
- [2] Suzuki S, Li XK, Enosawa S, et al. A new immunosuppressant, FTY720, induces bcl-2-associated apoptotic cell death in human lymphocytes. Immunology, 1996, 89: 518-523.
- [3] Azuma H, Takahara S, Horie S, et al. Induction of apoptosis in human bladder cancer cells in vitro and in vivo caused by FTY720 treatment [J]. J Urol, 2003, 169 (60): 2372-2377
- [4] 王瑞, 何景华. FTY720 抑制人胰腺癌 Miopac2 细胞株增殖的研究 [J]. 天津医科大学学报, 2008, 14 (4): 445-447

(责任编辑: 于景龙)

Survivin 及 P16 在分化型甲状腺癌中的表达及意义

朱莉 甘卉 宋晓环

(长春医学高等专科学校 吉林长春 130031)

摘 要 目的: 检测 Survivin、P16 在分化型甲状腺癌中的表达, 探讨其表达的意义。方法: 采用 SP 法, 检测 50 例分化型甲状腺癌中 Survivin、P16 的表达。结果: 甲状腺癌中 Survivin 阳性表达 33 例 (66.0%), P16 阳性表达 18 例 (36.0%), 其表达均与分化型甲状腺癌组织学分型无关 ($p>0.05$); Survivin 阳性表达与癌组织分化程度、临床分期和淋巴结转移有关 ($p<0.05$); 而 P16 阳性表达仅与癌组织的分化程度、淋巴结转移有关 ($p<0.05$)。结论: Survivin 的高表达、P16 的缺失表达在甲状腺癌中普遍存在, 并与甲状腺癌恶性进展和预后不良有关。

关键字 Survivin P16 分化型甲状腺癌 SP 法

甲状腺癌是最常见的头颈部及内分泌系统恶性肿瘤, 好发于女性, 据统计其发病率以每年 3% 的速度递增^[1]。Survivin 又称生存蛋白或生存素, 是凋亡抑制家族成员之一, 是迄今发现最强的凋亡抑制因子; P16 是一种重要的抑癌基因, 其表达产物 P16 蛋白对细胞生长起负调控作用。本研究采用免疫组织化学 SP 法检测 50 例分化型甲状腺癌中 Survivin、P16 的表达, 探讨其表达的意义, 以其为临床判定甲状腺癌的生物学行为提供参考。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2008 年至 2011 年我校第一、第二附属医院收治的有完整病史资料的手术切除的甲状腺癌石蜡包埋标本 50 例。按 WHO 肿瘤组织学分级和分类标准进行划分: 其中乳头状癌 24 例, 滤泡癌 26 例。

1.2 方法 标本常规甲醛固定, 石蜡包埋, 制成 4 μ m 切片。兔抗人 Survivin 多克隆抗体、鼠抗人 P16 单克隆抗体、SP 试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。采用 SP 染

色方法, 具体步骤严格按试剂盒上的说明进行。DAB 发色。以 PBS 缓冲液代替一抗做阴性对照, 用已知的 Survivin、P16 阳性的卵巢癌病理切片作阳性对照。

1.3 结果判定 以细胞内出现棕黄色颗粒为阳性判断标准。阳性细胞 $\geq 10\%$ 为阳性表达, 无阳性细胞或阳性细胞 $<10\%$ 为阴性表达。

1.4 统计学处理 所有实验数据用 SPSS11.5 统计软件进行处理, 行 χ^2 检验, $p<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 Survivin、P16 在分化型甲状腺癌中的表达见表 1

50 例甲状腺癌组织中 Survivin 阳性表达 33 例 (占 66.0%), 癌细胞胞质内出现棕黄色颗粒, 呈片状分布; P16 阳性表达 18 例 (占 36.0%), 癌细胞胞核及胞质中出现棕黄色颗粒, 呈片状、颗粒状分布。

表 1 Survivin、P16 在分化型甲状腺癌中的表达

	例数	Survivin		P16	
		+	阳性率 (%)	+	阳性率 (%)
甲状腺癌	50	33	66.0	18	36.0

2.2 Survivin、P16 的表达与分化型甲状腺癌临床病理特点的关系见表 2

表 2 Survivin、P16 的表达与分化型甲状腺癌临床病理特点的关系

项目	例数	Survivin			P	P16			P
		+	阳性率 (%)			+	阳性率 (%)		
组织学类型	乳头状癌	24	15	62.5	>0.05	9	37.5	>0.05	
	滤泡癌	26	18	69.2		9	34.6		
分化程度	高中分化	22	9	40.9	<0.05	13	59.1	<0.05	
	低分化	28	24	85.7		5	17.9		
临床分期	I-II 期	20	8	40.0	<0.05	10	50.0	>0.05	
	III-IV 期	30	25	83.3		8	26.7		
淋巴结转移	无	19	7	36.8	<0.05	12	63.2	0.05	
	有	31	26	83.9		6	19.4		

3 讨 论

甲状腺癌是一种多因素起源的癌基因与抑癌基因相互失衡导致的疾病，Survivin、P16 均为肿瘤相关基因，它们的异常表达在甲状腺癌的发生发展中发挥着重要作用。

3.1 Survivin 在分化型甲状腺癌组织中的表达特点及意义

Survivin (SVV) 又称生存蛋白或生存素，是 Altieri 等^[2]在 1997 年发现的 IA P 家族的新成员。Survivin 定位于人类染色体 17q25，因其分子量小且对凋亡的抑制作用强而备受关注。研究已经发现，Survivin 对细胞有丝分裂及细胞凋亡有特异的双重调控作用，它是正常胚胎细胞有丝分裂和细胞增殖的必要条件；但 Survivin 过度表达则失去了正常增殖周期中凋亡“开关”的限制，造成细胞增殖与凋亡平衡打破，导致癌症的发生。

本研究结果显示，50 例甲状腺癌组织中 Survivin 阳性表达 33 例 (66.0%)；在不同组织学类型的甲状腺癌中 Survivin 的阳性表达无显著性差异 ($p>0.05$)；但随着甲状腺癌分化程度降低、临床分期增高，Survivin 表达阳性率也增高 ($p<0.05$)；有淋巴结转移的 Survivin 表达阳性率 (83.9%) 明显高于无淋巴结转移的 (36.8%)，差异具有显著性 ($p<0.05$)，与王旭红^[3]、钱婀娜^[4]等研究结果一致。由此提示：Survivin 的高表达与甲状腺癌的发生与发展密切相关：Survivin 高表达，意味着甲状腺癌分化差、恶性程度高、有较高的侵袭性和不良预后。Survivin 的高表达可作为临床甲状腺癌早期诊断、恶性程度判定及预测预后的有用指标

之一。

3.2 P16 在分化型甲状腺癌组织中的表达特点及意义

P16 基因又称为多肿瘤抑制基因 (MTS1)，是 1994 年由美国 Kamb^[5]报道的一种新型抑癌基因，其编码的 P16 蛋白可与 CyclinD1 竞争结合 CDK4/6，抑制 Rb 的磷酸化过程，从而抑制细胞的分裂增殖，因此对细胞的生长起负调控作用。当 P16 由于基因变异导致表达的蛋白功能异常时，抑制作用丧失，细胞异常分裂增殖并可导致肿瘤的形成和发展。

本研究结果显示：分化型甲状腺癌中 P16 阳性表达率为 36.0%，缺失表达率为 64.0%；P16 在不同组织学类型及不同临床分期的甲状腺癌组织中的阳性表达无显著性差异 ($p>0.05$)；而在低分化甲状腺癌组织中，P16 的缺失表达较在高中分化甲状腺癌组织中的高 ($p<0.05$)，与 Yane 等^[6]、唐亚助^[7]等研究结果相符；P16 在有淋巴结转移的甲状腺癌组织中呈明显缺失表达 ($p<0.05$)，与赵雪松等^[8]研究结果相符。以上结果提示：P16 同样也参与了甲状腺癌的发生和发展，并有可能成为甲状腺癌转移和恶性进展评判的有用参考指标。

【参考文献】

- [1] Finley D, Zhu B, Barden C. Discrimination of benign and malignant thyroid nodules by molecular profiling [J] Ann Surg 2004. 240: 425-437.
- [2] Grazia Ambrosini, Altieri, Emily Y, et al. A novel anti-apoptosis gene, surviving, expressed in cancer and lymphoma

- [J] Nature Med 1997. 3 (8): 917-921.
- [3] 王旭红, 任晋军, 米玉录 Survivin 血管内皮生长因子在甲状腺癌中的表达及其与预后的关系 [J] 中国药物与临床 2010. 10 (6): 651-654.
- [4] 钱婀娜, 徐正顺, 王仰坤等 分化型甲状腺癌组织中存活素蛋白的表达与细胞增殖和凋亡的关系 [J] 癌变. 畸变. 突变 2008. 20 (3): 189-192.
- [5] Kamb A, Cruis MA, Weaver-Feldous J, et al. A cell-cycle-regulator potentially involved in genesis of many tumor types [J] Science 1994. 264 (5157): 436-440.
- [6] Yane K, Konishi N, Kitahori Y, et al . Lack of p16 /CD-KN2 alterations in thyroid carcinomas [J] Cancer Lett 1996. 101 (1): 85-92.
- [7] 唐亚助, 邹继彬 甲状腺癌中 p16 和 Rb 蛋白表达及其意义 [J] 国际医药卫生导报 2004. 10: 16-17.
- [8] 赵雪松, 贾金良, 陈征 细胞周期调控因子在分化型甲状腺癌中的表达及相关性研究 [J] 现代肿瘤医学 2008. 16 (7): 1114 - 1117.
- (责任编辑: 李新)

胃癌中 β -连接素、P53 的表达及相关性研究

宋晓环¹ 王忠超¹ 陈娟¹ 史忠新²

(1 长春医学高等专科学校 吉林长春 130031

2 北华大学附属医院 吉林吉林 130000)

摘要 目的: 探讨胃癌中 β -连接素、P53 的表达状态, 分析其与临床病理参数的关系。方法: 运用免疫组化 SP 法检测 45 例胃癌和 20 例正常胃粘膜中 β -连接素、P53 的表达。结果: β -连接素在 20 例正常胃粘膜 100% 表达, 45 例胃癌中 21 例 (46.7%) 正常表达。胃癌中 β -连接素异常表达在病理学分级、浸润深度、淋巴结转移情况中有差异, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。胃癌中 P53 阳性表达随分化程度降低、浸润深度增加及淋巴结转移而阳性强度增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 β -连接素异常表达与 P53 阳性表达间有差异, 且与阳性表达强度呈正相关, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。 β -连接素、P53 是胃癌侵袭、转移的有用的辅助指标。结论: β -连接素、P53 是影响胃癌发生发展的重要因素, 是对患者预后判断的重要指标。

关键词 P53 β -连接素 胃癌 侵袭 转移 预后 免疫

胃癌是我国消化道最常见的恶性肿瘤, 好发年龄为 40~60 岁, 已成为严重威胁人民健康的主要恶性肿瘤之一。本研究选择胃癌 45 例, 运用免疫组织化学 SP 法检测 β -连接素及 P53 基因的表达, 结合临床及病理形态学包括肿瘤的分级、浸润深度及淋巴结转移情况等进行综合分析, 并探讨其与胃癌侵袭、转移间的关系, 对指导肿瘤的切除和淋巴结清扫范围有重要的实际价值。

1 材料及方法

1.1 材料 选择 2009 年 4 月~2011 年 7 月间北华大学附属医院病理科收治的有完整资料的胃癌患者手术切除胃癌石蜡包埋组织标本 45 例, 其中男 32 例, 女 13 例, 年龄 27~73 岁, 平均年龄 46 岁。所有患者术前均未行放疗和化疗。另取 20 例胃癌切缘粘膜作为正常胃粘膜。标本经 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋切片 4 μ m。按日本胃癌病理研究规范分类: 高+中分化腺癌 23 例, 低分化 22 例; 浸润粘膜及粘膜下层 7 例, 侵及肌层者 13 例, 侵及浆膜层及浆膜层以上者 25 例; 有淋巴结转移 27 例, 无淋巴结转移 18 例。

1.2 实验所用试剂及来源 β -连接素、鼠抗人 P53 单克隆抗体均购自北京中山生物技术有限公司。

1.3 方法 采用免疫组织化学 SP 法检测: 石蜡包埋组织切片常规脱蜡, 水化后, 经 3% 过氧化氢处理, 微波抗原修复, 其余染色步骤按试剂说明书进行。苏木素轻度复染, 二甲苯透明, 中性树胶封

片, 光镜观察。用磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗做阴性对照, 结肠粘膜做阳性对照。

1.4 结果判断 细胞核出现棕黄色颗粒定为阳性, 根据抗体在切片中阳性反应细胞的比例分为: 阳性细胞数 < 10% 或完全消失的标记为 (-), 阳性细胞数 10%~90% (+), 阳性细胞数占 > 90% 的标记为 (++)。其中将 β -连接素标记 (++) 为与正常粘膜上皮表达相同; 将标记 (+) / (-) 判断为表达减弱或完全消失。

1.5 统计学处理 对免疫组织化学分析结果进行 χ^2 检验和精确概率法检验。

2 结果

2.1 β -连接素表达与胃癌病理参数之间的关系 β -连接素在 20 例正常胃粘膜中 100% 表达, 且定位于细胞膜, 在 45 例胃癌组织中 21 例 (46.7%) 表达正常, 20 例 (44.4%) 表达减弱 (+), 4 例 (8.9%) 表达丧失 (-)。多数癌组织 β -连接素表达于胞浆或胞核内, 细胞膜染色较少或消失。胃癌高、中分化组 β -连接素的 (++) 表达明显高于低分化组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 侵及粘膜及粘膜下层组和侵及肌层组 β -连接素的 (++) 表达明显高于侵及浆膜层及浆膜层以上组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 胃癌淋巴结转移组 β -连接素的 (++) 的表达明显低于胃癌无淋巴结转移组, 差异显著 ($P < 0.01$)。见表一。

表一 β -连接素表达与胃癌病理参数之间的关系

类别	例数	β -连接素正常表达 (++)	β -连接素异常表达 (+/-)
分化程度高+中分化	23	16	7
低分化	22	5	17
浸润深度			
粘膜及粘膜下层	7	6	1
肌层	13	8	5
浆膜及浆膜以上	25	7	18
淋巴结转移			
有	27	7	20
无	18	14	4

$P < 0.05$, 差异具有统计学意义

2.2 P53 表达与胃癌病理参数之间的关系 P53 在正常胃粘膜组织中无阳性表达, 在 45 例胃癌中 30 例 (66.7%) 阳性表达, 胃高、中分化腺癌组与低分化组 P53 阳性表达间有差异, 在胃癌中随病理分化程度的降低, P53 阳性表达强度逐渐增

加, 差异显著 ($P < 0.01$); 胃癌中 P53 阳性表达强度与浸润深度间呈正相关, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 胃癌中有、无淋巴结转移与 P53 阳性表达强度的关系具有显著统计学意义 ($P < 0.01$); 见表二。

表二 P53 表达与胃癌病理参数之间的关系

类别	例数	P53	
		—	+
分化程度			
高+中分化	23	12	11
低分化	22	3	19
浸润深度			
粘膜及粘膜下层	7	5	2
肌层	13	6	7
浆膜及浆膜以上	25	4	21
淋巴结转移			
有	27	6	21
无	18	9	9

$P < 0.05$, 差异具有统计学意义

2.3 β -连接素与 P53 间的关系 β -连接素异常表达与 P53 阳性表达强度间呈正相关, 有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。见表三。

表三 β -连接素与 P53 间的关系

β -连接素表达	例数	P53	
		—	+
正常表达 (++)	21	13	8
异常表达 (+/-)	24	2	22

$P < 0.01$, 差异具有显著统计学意义

3 讨论

胃癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁着人们的健康, 具特有的生物学行为。其中肿瘤细胞本身所具有的促进微血管增生、降解周围基质、下调细胞间相互粘附性等功能是促进细胞增生、侵袭和转移的基础; 其具有的侵袭、转移的恶性生物学特性也是影响临床治疗效果和导致死亡的主要原因, 而这种恶性生物学特性的表达是依赖于多因素影响和多基因调控的。

3.1 浸润是恶性肿瘤主要的生物学特征之一。已知 E cadherin/catenin 在介导同型细胞间的黏附、抑制肿瘤浸润中起重要作用, β -连接素是其中的关键成分, 其在肿瘤浸润过程中的作用已受到人们的普遍关注。 β -连接素是一种多功能的细胞内蛋白质, 它在细胞内分布的改变可反映其功能变化。一般认为, β -连接素定位在细胞膜时参与细胞间的黏附, 一旦被降解或发生细胞核的转位后, 则失去其黏附功能^[1]。此外, 当 β -连接素磷酸化障碍或 APC 基因突变等因素导致 APC、GSK 3 β 和 Axin 蛋白质复合物下调时, β -连接素不能降解, 其在细胞质内的含量增高而转位到细胞核中, 则有可能参与细胞的浸润甚至转移。关于 β -连接素与肿瘤浸润的关系, 已对胃、结直肠和胰腺等多种肿瘤组织进行了研究, 但结果不尽一致。多数研究表明, 细胞核中 β catenin 的表达与肿瘤的浸润密切相关。Wong 等^[2]用免疫组化法检测了 60 例结直肠癌中 β -连接素的表达, 发现细胞核中 β -连接素的高表达与结直肠上皮细胞从正常上皮、息肉、腺瘤到癌的演变过程具有相关性, 并与淋巴结转移有关。龚玲玲等^[3]在宫颈癌的研究中也显示淋巴结转移组中 β -连接素异常表达率明显高于无淋巴结转移组。Song 等^[4]用同样方法检测了 60 例早期胃癌中 β -连接素的表达, 结果表明 β -连接素在核中的表达与肿瘤的分化程度和浸润性有关。上述研究结果分别表明细胞中 β -连接素的异常表达与肿瘤的发生、发展过程以及肿瘤的浸润甚至转移均有关系。

本实验结果表明: β -连接素在正常胃粘膜中

100%表达于细胞膜上, 细胞质或细胞核着色较浅或不着色; 在胃癌中多为细胞核和细胞质着色, 说明胃癌组织中 β -连接素表达减弱的同时伴有结构和功能紊乱, 这与胃癌的浸润转移有关。 β -连接素 (++) 表达与胃癌分化程度呈正相关 ($P < 0.05$), 显示 β -连接素在调节细胞分化方面具有重要作用; 另外我们研究显示, β -连接素的异常表达与浸润深度、淋巴结转移及远处转移密切相关, 说明 E-钙粘蛋白-连结素复合体介导的细胞间粘附功能下降可促进癌组织浸润和转移, 其中 β -连接素表达异常对胃癌浸润深度、淋巴结转移及远处转移的影响更为重要。已有研究表明连接素对 E cadherin 功能的调节非常关键, 即使 E cadherin 表达正常, 如果连接素功能异常, E cadherin 仍无法发挥其功能, 表明 β -连接素表达减弱或消失, 有利于癌细胞的侵袭和转移。本实验结果初步提示对肿瘤细胞核或细胞膜/质中 β catenin 含量的检测, 有助于分析胃癌细胞的生物学行为, 并可能成为判断肿瘤预后的指标之一。

3.2 正常 (野生型) P53 蛋白由于其低水平表达及半衰期短, 免疫组化方法通常检测不到, 而突变型 P53 蛋白稳定且半衰期长, 故可用免疫组化方法检测到, P53 蛋白阳性表达与突变在实质上具有相同含义^[5]。本实验正是利用了突变型 P53 蛋白的这个特点进行研究, 实验结果表明, P53 阳性表达率及阳性表达强度在胃癌病理学分级、浸润深度及有、无淋巴结转移中均有差异, 差异均有统计学意义, P53 阳性及阳性表达强的患者其侵袭、转移能力强, P53 可以作为胃癌侵袭、转移及预后预测的有价值的指标之一。实验中, 我们还对 P53 与 β -连接素间的关系作了研究, 结果发现, P53 阳性的胃癌其 β -连接素的异常表达也增加, 两者间呈正相关。

综上所述 β -连接素异常表达及 P53 阳性表达的患者, 其与胃癌的组织学分级密切相关, 且癌组织侵袭与转移力增强, 两者联合检测无疑会对胃癌的预后有一个更为客观的预测。

【参考文献】

- [1] Aplin A E , Ju liano R L. Regu la tion of nucleocytoplasm ic traffic-king by cell adhesion receptors and the cytoskeleton [J]. J Cell Bi-ol, 2001, 155 (2) : 187-191.
- [2] Wong S C C, LoE S F, Chan A K C, et al. Nuclear β catenin asa potentinl prognostic and diagnestic marker in patien with colorectal cancer from Hong Kong [J]. Mol pathol, 2003, 56: 347-352.
- [3] 龚玲玲, 李红英, 曾俊。宫颈癌中 α/β -连接素的联合表达及意义 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2005, 21 (1) :

62-65.

- [4] Song B J, Park Y J, Kim H S, et al. Expression of beta-catenin and E-cadherin in early gastric cancer. Correlation with clinico-pathologic parameters [J]. Korean J Gastroenterol, 2004, 43 (2) : 82-92.
- [5] Momand JG, Zambetti GP, Olson DG, et al. The MDM2 oncogene product forms a complex with the P53 protein and inhibits P53 mediated transactiva-tion [J]. Cell, 1992, 69 (12) : 1237-1245.

(责任编辑: 于景龙)

逍遥散提取液诱导乳腺癌 (MCF-7) 细胞凋亡实验研究

张 虹

(长春医学高等专科学校教务处 吉林长春 130031)

摘 要 目的: 研究逍遥散提取液诱导乳腺癌细胞凋亡的作用。方法: 应用形态学观察和流式细胞术等方法对逍遥散提取液处理的人乳腺癌 (MCF-7) 细胞进行了检测和观察, 并运用 caspase-3 抑制剂检测凋亡。结果: 逍遥散提取液处理后 48h 细胞具有典型的凋亡形态特征; 用流式细胞仪测定细胞周期, 可见明显的凋亡峰; caspase-3 抑制剂阻碍凋亡的发生。结论: 逍遥散提取液可诱导人乳腺癌 (MCF-7) 细胞发生凋亡, 其诱导细胞凋亡的机制可能部分是通过 Caspase-3 途径。

关键字 逍遥散 乳腺癌 细胞凋亡 caspase-3

逍遥散是治疗多种妇科疾病的有效方剂, 其对乳腺癌亦有一定的疗效, 但缺少实验研究资料的支持, 若能经实验方面证明其抑制乳腺癌的结果, 既可弥补此方面中医经验医学的不足, 又可使逍遥散在预防乳腺癌中发挥重要的作用。

1 实验材料

1.1 细胞培养

人乳腺癌细胞系 (MCF-7), 由吉林省肿瘤研究所提供, 在含 10% 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料研究所) 的 DMEM 培养基, 37℃, 5%CO₂ 空气及饱和湿度条件下培养。以每 5×10⁴ 细胞/瓶接种, 24h 换液 1 次并加入相应浓度的逍遥散提取液。

1.2 药物

逍遥散由柴胡、当归、芍药、白术、茯苓、各 30g、炙甘草 15g, 煨姜、薄荷各 1g 组成。购自市售药店, 并经过严格鉴定。按上述组方取生药, 加蒸馏水回流提取 3 次, 每次分别为 60 min、30 min、30 min, 浓缩药液, 再加入 DMEM 培养液稀释, 配成浓度为 1g/ml 药液。

1.3 试剂

DMEM 培养基、四甲基偶氮唑盐 (MTT)、DMSO、RNase、PI 均为 Sigma 公司产品; 胰蛋白酶为美国 GIBCO 公司产品; caspase-3 抑制剂 (AC-DEVD-CHO) 为美国 BD 公司产品; 苏木精、伊红和姬姆萨染液等由长春化学试剂采购供应站产品。

2 实验方法

2.1 形态学观察

2.1.1 光镜形态学观察 将细胞以 2×10⁵ 个/孔接种于含盖玻片的 6 孔板中, 培养 24 h 后, 实验组加

入含 2、5、10mg/ml 逍遥散提取液的培养液, 阴性对照组仅加培养液, 每孔内液体终体积为 1.5 ml。培养 72 h 后, 取出细胞片, 常规 HE 染色, 光学显微镜观察并记录。

$$\text{细胞凋亡率}(\%) = \frac{\text{平均凋亡细胞数}}{100 \text{ 个细胞}} \times 100\%$$

2.1.2 电镜形态学观察 细胞经逍遥散提取液处理后, 分别培养 12、16 和 24 h 后, 消化, 收集细胞固定, 染色, 透射电子显微镜观察。

2.2 FCM 检测细胞周期和细胞凋亡

按照常规方法用 PI 染色, 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡^[1]。收集不同剂量逍遥散提取液作用后 48 h 的 MCF-7 细胞, 用 PBS 冲洗 2 次, 加 RNase, 37℃ 水浴 30 min 降解 RNA, 再用 PBS 洗 2 次后, 加 PI 染液, 4℃ 避光反应 30 min。用 PBS 洗涤后上机检测。用 FACScan 流式细胞仪 Cellfit 软件收取细胞 (每个样品收集 2×10⁵ 个细胞) 测定 DNA 含量的变化。

2.3 Ac-DEVD-CHO 对细胞凋亡影响测定

将细胞以 3×10³ 个/孔接种于 96 孔板, 培养 24 小时后, 实验组先加入 1mg/ml 的 Ac-DEVD-CHO 及其相应溶剂, 阴性对照组和空白组加入培养液, 每组各设 4 个平行孔, 培养 1 h 后, 实验组加入含 2、5、10mg/ml 逍遥散提取液的培养液, 每孔内液体终体积为 100μl。实验组分别培养 24、48 和 72 h, 每孔加入 MTT 溶液 (5mg/ml) 10 μl, 37℃ 继续孵育 4 h, 弃上清, 每孔加入 100 μl DMSO 混匀, 酶标仪 (λ = 490nm) 测定光吸收值 (OD 值), 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$$

3 结果

3.1 形态学观察

受逍遥散提取液不同剂量作用的 MCF-7 细胞, 经 HE 染色, 在光学显微镜下可以见到细胞缩小, 染色质被浓染, 颜色加深, 体积变小, 胞膜完整。透射电镜下可见染色质浓缩、边集; 凋亡小体形成, 凋亡细胞。

HE 染色后记录凋亡细胞数见表 1, 实验组分别同阴性对照组比较, 均有显著性差异 ($P < 0.05$), 各组间相比较也具有明显的差别。表明逍遥散提取液具有诱导 MCF-7 细胞凋亡的作用, 而且随着药物浓度的增长, 其诱导凋亡作用亦明显增强。

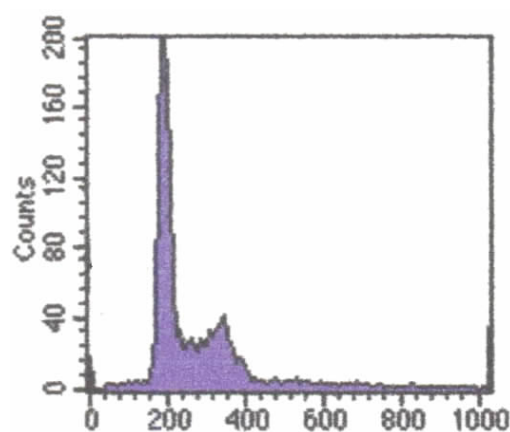
表 1 逍遥散对 MCF-7 细胞凋亡的影响

组别	剂量 (g/ml)	凋亡细胞数 ($\bar{x} \pm S$)	细胞凋亡率 (%)
阴性对照组	0	5.25 $\pm$ 1.89	5.25
逍遥散组			
低剂量组	0.002	25.75 $\pm$ 2.99	25.75
中剂量组	0.005	39.25 $\pm$ 2.21	39.25
高剂量组	0.010	47.75 $\pm$ 2.21	47.75

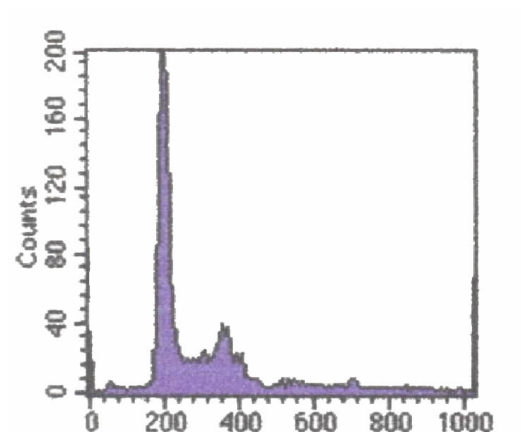
3.2 流式细胞仪检测

不同浓度逍遥散作用细胞 48 h 后, 均可见明显的亚二倍体峰 (即凋亡峰), 且随着逍遥散提取液浓度增大, 凋亡峰逐渐增高, 即凋亡细胞比例增

加。逍遥散提取液 2 mg/ml、5 mg/ml、10 mg/ml 剂量组凋亡率分别为 1.39%、3.86%、20.52%, 阴性对照组为 0.53%, 见图 1。



逍遥散提取液 0mg/ml



逍遥散提取液 2mg/ml

3.3 Ac-DEVD-CHO 对细胞凋亡的抑制作用

由于 Caspase-3 抑制剂 Ac-DEVD-CHO 抑制了细胞中 Caspase-3 的活性, 细胞凋亡无法执行,

因此细胞免遭“死亡”, 细胞生存率明显上升, 见表 2。可见逍遥散提取液诱导 MCF-7 细胞凋亡部分是通过 Caspase-3 途径。