



第十三届中国科协年会第 18 分会场

癌症流行趋势和防控策略研究研讨会

中国·天津 2011.9.21~22

大会论文——

肿瘤基础



胃癌防治研究： S100A6 作为胃癌肿瘤标志物

张连海, 王晓红, 季加孚

(北京大学肿瘤医院, 北京市肿瘤防治研究所, 北京大学临床肿瘤学院, 北京市 100142)

摘要: 已有报道发现 S100A6 在多种肿瘤中表达异常。S100A6 可以通过与靶蛋白结合发挥多种生物学功能。本文研究 S100A6 在胃癌中的表达并探讨其临床意义。结果发现 S100A6 在胃癌中的高表达率高于对照标本, S100A6 与淋巴结转移和肝脏转移等因素相关。S100A6 的表达与胃癌患者的生存相关。在转移性淋巴结标本中, S100A6 显著增高。针对 S100A6 的表达异常的组织中, S100A6 基因表达与部分 CpG 位点的甲基化以及组蛋白修饰状况有关。干预该基因的表达有望成为药物治疗的新靶点。

关键词: 胃癌; S100A6; 预后; 甲基化; 组蛋白

S100A6 MAY SERVE AS A BIOMARKER FOR GASTRIC CANCER

ZHANG Lianhai, WANG Xiaohong, JI Jiafu

(Beijing Cancer Hospital, Beijing Institute for Cancer Research, Peking University School of Oncology, Beijing 100142, China)

Abstract: S100A6 has been found expressed in a variety of tumors. S100A6 may function through many downstream proteins. This study aims to investigate the expression status of S100A6 in relation to the clinicopathological features of gastric cancer patients. The results showed that the S100A6 expression was increased in gastric cancer tissues compared with that in non-cancerous tissues. Statistical analysis demonstrated a correlation between S100A6 high expression and various clinicopathological features, such as positive lymph node involvement, and liver metastasis, and also revealed that S100A6 was significantly related to prognosis. Further exploration found a close relationship between S100A6 expression and the methylation status of the CpG sites in promoter /first exon, and the level of histone H3 acetylation status. In conclusion, our results suggested that S100A6 plays an important role in the progression of gastric cancer and may serve as a potential therapeutic target.

Keywords: gastric cancer; S100A6; survival; methylation; histone

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,严重威胁着人民群众的生命健康。胃癌的复发和转移是影响疗效的重要因素,多数胃癌患者死于肿瘤复发或转移。普遍认为只有深入研究胃癌的分子机理才能从根本上有效地判断预后,提高诊疗效果。我们前期利用高密度基因芯片技术对胃癌相关基因进行了较为全面、大样本的研究。在既往的试验基础上,我们选择其中几个候选基因例如 S100A6 作为下一步验证研究的重点。

首先,我们选取胃癌石蜡组织标本为研究对象,利用免疫组化验证了 S100A6 在胃癌组织中表达水平的改变。进一步扩大样本,选取配对的 28 例胃癌肝转移标本以及 30 例转移性淋巴结,利用免疫组化验证了 S100A6 在胃癌转移标本中的表达情况。研究表明,与正常组织相比,在胃癌组织中 S100A6 的 mRNA 和蛋白质水平均上调。免疫组化结果显示,S100A6 在肿瘤细胞核和/或细胞浆中高表达(67.5%,112/166)。在转移性淋巴结标本中,S100A6 高表达率为 100%(30/30)显著高于对应的胃癌标本(66.7%,20/30, $P=0.001$)。而在肝转移结节中,

S100A6 的高表达率(26/28, 92.9%)高于配对的胃癌标本(24/28, 85.7%),但两者没有显著差异($P=0.388$)。进一步对临床资料分析结果表明,S100A6 与淋巴结转移($P=0.037$)和肝脏转移($P=0.024$)等因素相关。应用 Kaplan-Meier 单因素分析 S100A6 与胃癌患者 5 年生存率的相关性。S100A6 高表达组病例 5 年生存率(49.65%)明显低于低表达组的 5 年生存率(18.62%, $P=0.0004$)。经过 Cox 回归分析表明,S100A6 是一个独立预后因子($P=0.026$)。

为明确其上调的原因我们研究了 S100A6 基因 CpG 位点的甲基化以及组蛋白修饰状况。此外,为了明确其在胃癌中作用的机制,我们通过 ChIP-Chip 方法筛查了其可能影响的下游因子。表观遗传对肿瘤相关基因的表达调控对肿瘤的发生发展起着重要的作用。目前关于 S100A6 表达调控的研究主要集中与 CpG 位点的甲基化以及组蛋白的修饰,但关于影响 S100A6 表达调控的具体

CpG 位点以及组蛋白修饰方法尚未被筛选出。为了研究 S100A6 在胃癌中表达上调的原因,我们首先通过免疫组化、RT-PCR 以及 Western-blot 检测了 S100A6 在胃癌细胞系中的表达,挑选出 S100A6 低表达以及高表达的细胞系并检测了不同细胞系中 S100A6 基因启动子及外显子和内含子区 CpG 位点的甲基化状态的不同。同时我们采用染色体免疫共沉淀法(ChIP)检测了组蛋白 H3 甲基化以及乙酰化修饰对 S100A6 表达的影响。结果显示,在胃癌细胞系中大多数 S100A6 的 CpG 位点呈去甲基化状态。只有在 S100A6 低表达的细胞系中 promoter/exon1 (P/E1) 区 7th 和 8th 以及 exon2/intron2 (E2/I2) 区的 2nd-5th 位点呈现甲基化状态。此外,组蛋白 H3 的乙酰化修饰在 S100A6 表达差异的细胞系中有明显不同。为了进一步确认 CpG 位点甲基化以及组蛋白修饰对 S100A6 表达调控的作用,我们在 S100A6 低表达细胞系中加入了 5-azacytidine 和 trichostatin A,结果显示二者均可显著影响 S100A6 表达水平。总之,表观遗传调控参与了 S100A6 的表达。S100A6 可调节细胞骨架成分、细胞生长以及分化,并对细胞增殖发生作用,但关于其机制还不是很明了。我们探讨了 S100A6 是否可以通过刺激 rRNA 基因的转录进而影响胃癌细胞的增殖。首先,我们通过免疫电镜以及激光共聚焦显微镜观察了 S100A6 在核仁的表达定位。结果发现 S100A6 表达于细胞浆中内质网、线粒体等细胞器和胞核,包括核仁。通过 S100A6 细胞转染观察体外 S100A6 与细胞增殖的关系,并分析其在胃癌石蜡组织切片中其与 Ki67 的表达相关性。统计结果显示,S100A6 与肿瘤细胞增殖(Ki-67 增殖指数)相关($P=0.043$)。S100A6 转染后通过 MTT 实验也发现 S100A6 过表达后细胞增殖能力明显增强。随后的研究我们证明 S100A6 表达与 45S pre-rRNA 的表达水平呈正相关。此外,S100A6 在 rDNA 可能的结合位点也被检测,结果表明 S100A6 在整个 rDNA 范围均具有结合力,尤其在 8kb 区域特别丰富,且在两个 S100A6 不同表达水平的细胞系之间结合明显不同。总之,S100A6 可能会结合到 rDNA



序列,然后促进 rDNA 到 rRNA 的转录,进而影响胃癌细胞的增殖。

此外,我们还观察了体外 S100A6 对细胞转移以及侵袭的调控。将 S100A6 基因转染入胃癌细胞株 AGS 后,通过细胞侵袭实验检测了细胞侵袭能力的改变。结果发现 S100A6 高表达后细胞侵袭能力较细胞转染前明显升高。通过 ChIP-Chip 方法,应用启动子芯片,我们检测了 S100A6 可能的下游因子。对其进行 GO 分型后结果显示 1328 个细胞因子被筛查出,其中 57 个因子与细胞增殖相关,25 个因子与细胞迁移相关,2 个因子与细胞浸润有关。挑选 Cdk5、FLJ12438、CCNB1 和 MCM7 等因子,检测 S100A6 过表达后对其表达的影响,进一步检测 S100A6 可能与这些因子启动子部位的结合位点,分析发现可能的结合位点附近均有 Sp1 结合位点。所以我们推测 S100A6 可能间接地结合到 Sp1 结合位点进而调节一些下游相关因子的表达。

总结:S100A6 在胃癌中表达上调,肿瘤组织 S100A6 高表达预示患者预后不佳。肿瘤组织中 S100A6 基因表达的机制可能与部分 CpG 位点的甲基化以及组蛋白修饰状况有关。

参考文献

- [1] Emberley ED, Murphy LC, Watson PH: S100 proteins and their influence on pro-survival pathways in cancer, *Biochem Cell Biol* 2004, 82:508-515.
- [2] Slomnicki LP, Nawrot B, Lesniak W: S100A6 binds p53 and affects its activity, *Int J Biochem Cell Biol* 2009, 41:784-790.
- [3] Yang YQ, Zhang LJ, Dong H, Jiang CL, Zhu ZG, Wu JX, Wu YL, Han JS, Xiao HS, Gao HJ, Zhang QH: Upregulated expression of S100A6 in human gastric cancer, *J Dig Dis* 2007, 8:186-193.
- [4] Lesniak W, Slomnicki LP, Kuznicki J: Epigenetic control of the S100A6 (calyculin) gene expression, *J Invest Dermatol* 2007, 127:2307-2314.
- [5] Guo Y, Engelhardt M, Wider D, Abdelkarim M, Lubbert M: Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on proliferation, differentiation and p15/INK4b regulation of human hematopoietic progenitor cells, *Leukemia* 2006, 20:115-121.
- [6] Ito T: Role of histone modification in chromatin dynamics, *J Biochem* 2007, 141:609-614.

一种早期诊断癌症新方法的 应用基础研究

徐汉友

(河南省南阳纺织集团有限公司职工医院内科, 河南省南阳市 473125)

摘要:总结一种早期诊断癌症新方法的方案,以利于进一步研究和临床应用及预防。**方法:**根据当今肿瘤研究成果,设计一种新的癌症早期诊断方法的方案。**结果:**分别用两种不同的抗一种正常抑癌基因所产生的蛋白质抗体,如: Rb 蛋白质和 p53 蛋白质,通过亲和层析,分别和放射性同位素元素标记的病变标本的 Rb 蛋白质和 p53 蛋白质发生抗原抗体反应,分别测定 4 次抗原抗体反应的 Rb 蛋白质和 p53 蛋白质的放射性强度,而不发生抗原抗体反应的 Rb 蛋白质和 p53 蛋白质则不能被测定,从而判断 Rb 蛋白质及其基因和 p53 蛋白质及其基因的结构及功能异常,由此来早期诊断癌症。**结论:**目前,肿瘤学研究的成果认为,Rb 和 p53 蛋白质及其基因发生异常改变是引起癌症的起始原因,因此,本文作者设想通过放射性同位素、免疫学等方法来测定患者病变组织 Rb 和 p53 蛋白质发生异常的改变,从而确诊患者此处病变已经发生极早期癌变或早期癌变,达到早期手术治愈治疗和预防的目的。这种临床应用方法理论上来说非常有意义,值得进一步研究及应用于临床和推广及预防。但在临床应用之前,需要通过大量精确的实验室研究,从而确定各实验阶段的剂量标准,同时,应同数字化电脑化等高科技相结合,制成一个高精密的仪器,来实行此种科学快速早期癌症的诊断。Rb 基因和 p53 基因及其所表达的蛋白质是否发生异常改变检测后,就可以根据检测结果来指导临床进行早期治愈治疗或作观察及预防治疗,其判断方法如下:①若 Rb 基因和 p53 基因及其所表达的蛋白质全部发生异常改变,就可以进行早期手术治愈治疗。②若仅 Rb 基因或 p53 基因及其所表达的蛋白质发生异常改变,就可以作临床重点观察及重点预防治疗,同时定期复查。③若 Rb 基因和 p53 基因及其所表达的蛋白质全部未发生异常改变,只作临床观察及一般预防治疗。本研究方法适用于对食管癌、胃癌、乳腺癌、小细胞肺癌、直肠癌、结肠癌、骨肉瘤等癌症的早期诊断的研究及临床应用及预防。依照上述实验方案,其它抑癌基因及其所产生的蛋白质,当必要时,也可以测定。另外,本方案的研究方法也值得重视和进一步研究,她用抗原抗体免疫反应的方法,来探测蛋白质的结构和功能是否发生异常改变,从而探测相应基因的结构和功能是否发生异常改变,她是一种新的、简单的和特殊的分子生物学研究方法。

关键词:癌症;分子诊断; Rb 蛋白质; p53; 免疫学;蛋白质构型



A NOVEL MOLECULAR METHOD FOR EARLIEST DIAGNOSING CANCERS

XU Hanyou

(Department of Internal and Emergency Medicine, Workers' Hospital of Nanyang Textile Corporation, Nanyang 473125, China)

Abstract: The author of article invented a molecular method for diagnosing cancers in earliest stage of carcinogenesis to treat the cancer well. Referenced the scientific achievements of cancer research up to now, the author designed the novel invention. Up to now, the mortality and morbidity of majority cancers have not been controlled. Some kinds of cancers' mortality and morbidity even are going up. As the cancer control has not reached satisfied achievements. The early diagnosing cancer has been being much too important and imperative. If one earliest diagnosing method could diagnose the cancers in situ or before the stage of cancers in situ. The cancers treatment might almost be cured. The author of this paper has been studying and learning the oncology from his graduate study time and his working time when he created a new invention for diagnosing cancers in situ or before the stage of cancers in situ. Using two different normal Rb protein antibodies and two different normal p53 antibodies, develops antigens and antibodies immune reactions respectively, with specimen of Rb proteins and p53 by special analysis method. After comparing the two reactions of Rb proteins' and the two reactions of p53's by application of Affinity Chromatography and Flow Scintillation Counter, the structures and functions of Rb genes and proteins, p53 genes and proteins can be judged. So the cancers can be diagnosed earliest. This invention for diagnosing cancers in earliest stage of carcinogenesis could be used for many kinds of cancers to be diagnosed in the same method. The new research method of molecular biology used by author in this paper is worth to be developed further. It is first reported by the author in this article. Which is identified through a MEDLINE search of the English-language literature on the title or on the key words.

Keywords: Cancer; Molecular diagnosis; p53; Retinoblastoma protein; Immunoassay; prevention; Molecular method, structure of protein.

1 前言

癌症给人的生命健康造成了极为严重的危害,使患者早死、致残及忍受巨大的痛苦,等众多危害大大降低了患者的生活质量,人类在与癌症做漫长的斗争中,花费了大量的人力和财力,在世界范围内通过几代人的艰苦不懈努力,在癌症的研究中取得了一些可贵的成绩,但到目前为止,癌症的发病机理仍没有搞清,癌症的治疗效果仍不理想。因此,人类在攻克癌症难关的过程中不得不研究癌症的发病

机理,同时研究癌症的早期诊断及提高癌症的临床治疗效果,期望癌症研究中的机理研究、诊断研究及治疗、预防研究能互为帮助,互为利用,不断总结经验,使癌症研究防治更有效和有意义。

在目前癌症研究的现状下,癌症的发病机理还没有搞清,癌症的治疗绝大部分效果仍很差,癌症的预防效果不好。因此,在此现状下癌症的早期诊断就显得非常重要,若有一种癌症的早期诊断方法能在癌症发生的原位癌期或其之前就能把其确诊,或在

癌症发生的癌前病变期就能确诊患者病变必将要发展为癌症,那么,在此期间的及时确诊和治疗,癌症的治愈率理论上将几乎达到 100%。

本文就作者在从事肿瘤学的专科学习和研究中,及以后的工作中,设想了一种早期诊断癌症的新方法,从分子生物学水平进行癌症的早期诊断,现未见此方面的研究报导,望本人的此项设想研究能使广大同行参考利用,为攻克癌症做贡献。

2 癌症早期诊断设想的原理

目前,发病机理的研究,大多数癌症科学工作者主张细胞癌基因和抑癌基因功能异常学说,这一学说的基本而简单的解释就是:人体细胞在外界生物、物理和化学等因素长期不断地作用下,使细胞的抑癌基因功能被异常抑制,而细胞癌基因功能被异常激活,致使细胞癌变。

在目前癌症细胞分子生物学抑癌基因的研究中,Rb 基因和 p53 基因研究得最多,被认为是最主要的抑癌基因。研究发现有很多种常见的癌症 Rb 基因和 p53 基因有丢失或突变等功能异常改变现象,Rb 基因和 p53 基因功能的异常抑制改变是癌变的起始原因。Rb 基因和 p53 基因的丢失或突变等功能异常改变,表现在其表达的蛋白质的结构一定要发生相应的改变,这种改变大部分是分子量变小和构型改变,无论 Rb 基因和 p53 基因发生哪一种异常改变,其翻译的蛋白质的相应肽段将不被翻译、异常翻译、构型异常或蛋白质完全不能表达。

本文作者设想,用不常发生异常变化的 Rb 基因和 p53 基因各一个外显子表达的蛋白质的相应肽链制备相应的抗体(I 抗),同时,用常发生异常变化的 Rb 基因和 p53 基因各一个外显子表达的蛋白质的相应肽链制备相应的抗体(II 抗),分别用 Rb 蛋白质和 p53 的肽链制备相应的 I 抗和 II 抗,分别用放射性同位素硫或碘标记的同等量可疑癌症标本表达的 Rb 蛋白质和 p53 进行抗原抗体免疫反应,在用适

当的方法分别测定发生抗原抗体免疫反应的 Rb 蛋白质和 p53 的放射性强度,以此来分析 Rb 基因和 p53 基因所表达的蛋白质的结构是否发生异常改变,从而推测 Rb 基因和 p53 基因是否发生异常改变,若 Rb 基因和 p53 基因及其所表达的蛋白质的结构发生异常改变,就可确定此标本所取的器官组织处,将发生或已经早期发生恶性肿瘤,应立即采取有效措施治愈它。

为了简明期间,本文作者只以 Rb 基因和其蛋白质有关方面内容为例,来阐明如何推测 Rb 基因和 p53 基因是否发生异常改变,因为,在这方面 Rb 基因和 p53 基因及其所表达的蛋白质是类同的。

制备的 I 抗和 II 抗,分别同时和标本中的 Rb 蛋白质发生抗原抗体免疫反应后,再分别测定发生抗原抗体免疫反应的 Rb 蛋白质的放射性强度,就可对 Rb 蛋白质的性质作出分析,分析方法如下:①若用 II 抗检测的放射性强度比 I 抗的低或 II 抗检测的放射性强度完全缺失,就说明此患者有 Rb 蛋白质结构和功能异常,因此,可以推断此患者有 Rb 基因已发生丢失,突变等结构和功能异常改变。②若用 I 抗检测的放射性强度比 II 抗的弱或 I 抗检测的放射性强度完全缺失,就说明此患者有 Rb 蛋白质结构和功能异常,因此,可以推断此患者有 Rb 基因已发生丢失,突变等结构和功能异常改变。③若 I 抗和 II 抗无抗原抗体免疫反应发生,那么,就不能检测到 Rb 蛋白质的放射性强度,就说明此患者有 Rb 蛋白质结构和功能异常,因此,可以推断此患者有 Rb 基因已发生丢失,突变等结构和功能异常改变。④若 I 抗和 II 抗抗原抗体免疫反应发生后,检测到 Rb 蛋白质的放射性强度一样,基本上可以排除 Rb 基因和其蛋白质有异常改变,对于此种情况的病变,可观察一段时间或进行改换 II 抗和(或)I 抗后,再进行检测。

用同样的方法再检测 p53 基因及其所表达的蛋白质是否发生异常改变。



Rb 基因和 p53 基因及其所表达的蛋白质是否发生异常改变检测后,就可以根据检测结果来指导临床进行早期治愈治疗或作观察及预防治疗,其判断方法如下:①若 Rb 基因和 p53 基因及其所表达的蛋白质全部发生异常改变,就可以进行早期手术治愈治疗。②若仅 Rb 基因或 p53 基因及其所表达的蛋白质发生异常改变,就可以作临床重点观察及重点预防治疗,同时定期复查。③若 Rb 基因和 p53 基因及其所表达的蛋白质全部未发生异常改变,只作临床观察及一般预防治疗。

根据上述癌症早期诊断设想的原理和判断方法,就能对仅发生分子水平病变,开始发生癌变,但还没有瘤变的极早期癌变病变,做极早期诊断,达到早期手术治愈治疗的目的。

3 试验研究方案

根据以上原理及当今可以开展的实验研究条件和技术,制定本早期诊断癌症新方法设想的试验研究方案,为了简明起见,本文作者只以 Rb 蛋白质有关方面内容为例,来阐明试验研究方案,因为,在这方面,Rb 基因和 p53 基因所表达的蛋白质是类同的。

3.1 抗原的制备

要想制备 Rb 蛋白质为抗原的抗体,用于本研究的抗原抗体免疫反应,就必须先制备 Rb 基因适当外显子生成的肽段,现 Rb 蛋白质的氨基酸序列已经搞清,选择适当外显子翻译生成的两个肽段作为抗原,选择的原则已如前所述。肽段目前有能人工合成,可能将有肽段作为商品出售。

3.2 抗体的制备

目前有关 Rb 蛋白质抗体的制备方法和抗体的种类很多,有多克隆的,也有单克隆的,多克隆和单克隆抗体的制备方法各不相同。根据 Rb 蛋白质肽段抗原不同而制备出相应的不同种抗体。用于本研究的抗体,无论是多克隆或单克隆,都可以用,但制备

多克隆抗体成本要低得多。

抗体制备简单的流程图如下:肽段制备→肽段加抗原佐剂,制成完全抗原→抗原免疫兔→提取相应的抗体→验证并提纯抗体,备用。

3.3 标本的制备

对于可疑癌变的组织,特别是癌前病变和原位癌,应尽快、尽早活检取标本,组织标本的取材方法,应根据现代或现有最有效的方法来进行。

3.4 标本放射性元素的标记

对于 Rb 蛋白质的标记,有两种方法,一种是放射性同位素 S 元素的标记,此元素的标记需要把活体标本与含有放射性同位素 S 元素的培养液进行短时间的活体细胞培养,使 Rb 蛋白质含有放射性同位素 S 元素。另一种方法是放射性同位素 I 元素的标记,此种放射性元素的标记是把活体标本细胞粉碎处理,放射性同位素 I 元素直接标记到 Rb 蛋白质上。这两种方法哪一种最好?本文作者认为,可能用放射性同位素 S 元素标记较精确。

3.5 亲和层析方法的应用

用同等量放射性同位素元素标记的 Rb 蛋白质抗原,在亲和层析的实验方法下,分别与 I 抗和 II 抗发生抗原抗体免疫反应,达到分离及提纯有放射性元素标记的 Rb 蛋白质的目的,才能准确地完成下一步的研究和应用。

3.6 流式闪烁计数器的应用

按照该仪器的使用方法,测出分别和 I 抗和 II 抗发生抗原抗体免疫反应、亲和层析分离及提纯的 Rb 蛋白质的放射性强度,从而判断出 Rb 蛋白质的结构和功能是否异常。在测定时应设空白对照。

用同样的方法再准备、检测及判断 p53 蛋白质是否发生异常改变。

4 临床应用探索

从上述一系列实验研究准备,到患者病变用本方法进行诊断,以现有肿瘤学研究的成果作原理,可

以从理论上来说本早期诊断癌症的方法直接应用于临床有相当高的应用价值。但为了更科学地、更精确地防治癌症研究,有必要进行临床应用试验研究,即进行随机临床病例对照研究,以确定本研究方法有切实可行的科学效果应用于临床。随机临床病例对照最好以同种癌症大规模的用本方法进行早期诊断和治疗为研究组,研究组包括 Rb 和 p53 蛋白质同时发生异常改变的患者和仅 Rb 或仅 p53 蛋白质发生异常改变的患者。而对照组为 Rb 和 p53 蛋白质的发现同研究组的患者,但研究组做上述方法治疗,而对照组做常规方法治疗,然后统计学处理两组病例的癌症发病率和死亡率,进行显著性检验,从而可清楚地验证本早期诊断癌症方法的科学性。

5 结论

目前,肿瘤学研究的成果认为,Rb 和 p53 蛋白质及其基因发生异常改变是引起癌症的起始原因,因此,本文作者设想通过放射性同位素、免疫学等方法来测定患者病变组织 Rb 和 p53 蛋白质发生异常的改变,从而确诊患者此处病变已经发生极早期癌变或早期癌变,达到早期手术治愈治疗和预防的目的。这种临床应用方法理论上来说非常有意义,值得进一步研究及应用于临床和推广及预防。但在临床应用之前,需要通过大量精确的实验室研究,从而确定各实验阶段的剂量标准,同时,应同数字化电脑化等高科技相结合,制成一个高精密的仪器,来实行此种科学快速早期癌症的诊断。

本研究方法适用于对食管癌、胃癌、乳腺癌、小细胞肺癌、直肠癌、结肠癌、骨肉瘤等癌症的早期诊断的研究及临床应用及预防。

依照上述实验方案,其它抑癌基因及其所产生的蛋白质,当必要时,也可以测定。

另外,本设想的研究方法也值得重视和进一步研究,她用抗原抗体免疫反应的方法,来探测蛋白质的结构和功能是否发生异常改变,从而探测相应基

因的结构和功能是否发生异常改变,它是一种新的、简单的和特殊的分子生物学研究方法。

参考文献

- [1] Tidy JA, Wrede D. Tumor suppressor genes: new pathways in gynecological cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 1992; 2: 1-8.
- [2] Batinac T, Gruber F, Lipozencic J, et al. Protein p53--structure, function, and possible therapeutic implications. *Acta Dermatovenerol Croat*. 2003; 11: 225-230.
- [3] Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci*. 2004; 25: 177-181.
- [4] Lai S, Benedict WF, Silver SA, et al. Loss of retinoblastoma gene function and heterozygosity at the RB locus in renal cortical neoplasms. *Hum Pathol*. 1997; 28: 693-697.
- [5] Ioachim E, Assimakopoulos D, Agnantis NJ, et al. Altered patterns of retinoblastoma gene product expression in benign, pre-malignant and malignant epithelium of the larynx: an immunohistochemical study including correlation with p53, bcl-2 and proliferating indices. *Anticancer Res*. 1999; 19: 541-545.
- [6] Xing EP, Yang GY, Wang LD, et al. 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.
- [7] Anton M, Horky M, Blaha O. The role of tumour suppressors and viral oncoproteins in cervical carcinogenesis. *Ceska Gynecol*. 2000; 65: 275-278.
- [8] Flesken-Nikitin A, Choi KC, Eng JP, et al. Induction of carcinogenesis by concurrent inactivation of p53 and Rb1 in the mouse ovarian surface epithelium. *Cancer Res*. 2003; 63: 3459-3463.
- [9] Olivier M, Hussain SP, Caron de Fromental C, et al. TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. *IARC Sci Publ*. 2004; 157: 247-270.
- [10] Yuan LW, Tang W, Kokudo N, et al. Disruption of pRb-p16INK4 pathway: a common event in ampullary carcinogenesis. *Hepatogastroenterology*. 2005; 52: 55-59.
- [11] Cenci M, Pisani T, French D, et al. PRb2/p130, p107 and p53 expression in precancerous lesions and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Anticancer Res*. 2005; 25: 2187-2192.
- [12] Girod SC, Pfeiffer P, Ries J, et al. Proliferative activity and loss of function of tumour suppressor genes as 'biomarkers' in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1998; 36: 252-260.
- [13] Kawakubo H, Ozawa S, Ando N, et al. Alterations of p53, cyclin D1 and pRB expression in the carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2005; 14: 1453-1459.



基于癌周免疫微环境的 预测模型的建立与验证

周 闯,董琼珠,周海军,王 骥,贾户亮,钦伦秀
(复旦大学附属中山医院肝癌研究所,上海 200032)

摘要:目的:肝癌患者预后预测仍然困难,本研究建立基于癌周免疫微环境的预测模型,检验其对肝癌预后预测的效果。方法:实时定量 PCR 技术(qRT-PCR)检测肝癌癌旁组织中 27 个免疫炎症相关因子(包括 17 个预测标签因子和文献报告的 10 个复发转移相关因子)mRNA 表达水平,应用生物信息学机器学习方法构建有效的预测模型,分析肝癌患者细胞因子表达水平与肝癌复发及预后的关系,检验其预测效果。结果:选取 180 例肝癌切除患者癌旁肝组织,分为训练组($n=80$)和测试组($n=100$)Cox 风险比例回归模型分析 27 个因子分别对预后的影响,影响大小排序后 CSF-1,HLA-DRA,TNF,SPP1,IL-6 为前 5 位,构建预测模型。以 mRNA 表达水平的中位数为临界值,训练组根据临界值分为高风险组和低风险组,Kaplan-Meier 分析显示高风险组总生存期短于低风险组($P<0.0001$)。测试组分为高复发风险组(68 例)和低风险组(32 例)。高复发风险组总生存期显著低于低风险组($P=0.002$)。单独应用预测因子的对测试组 100 例的预测效能通过 ROC 曲线评价,预测准确率 74.7%。在另一个随机、独立的肝癌患者队列(200 例)中进行验证,预测准确性 72.3%。结论:5 个细胞因子的预测模型预测肝癌术后 3 年总生存期有较高的准确率,有助于预测高危患者,对其进行重点检测和有效干预,为临床个体化干预治疗提供有效的依据。

关键词:外科学;肝细胞肝癌;预后预测

PREDICTION OF TUMOR SURVIVAL IN PATIENTS OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA BY DETECTING IMMUNITY CYTOKINE GENE EXPRESSION LEVELS IN NONCANCEROUS HEPATIC MICROENVIRONMENT

ZHOU Chuang, DONG Qiongzhu, ZHOU Haijun, WANG Ji, JIA Huliang, QIN Lunxiu
(Liver Cancer Institute and Zhongshan Hospital, Institutes of Biomedical Sciences,
Fudan University, Shanghai, 200032 China)

Abstract: Objective: Hepatocellular carcinoma (HCC) is a common malignancy, but the prognosis remains poor due to metastasis and recurrence after curative hepatectomy. The aim of this study is to explore whether a more refined cytokine gene expression profile of noncancerous liver tissue could predict survival of HCC after curative hepatectomy. **Methods:** 27-cytokine gene expression profile in noncancerous liver tissue from 180 patients was analyzed with RT-PCR arrays. Supervised hierarchical clustering and log-rank test to were used analyze the prognostic ability of the cytokine gene profile. Methods of bioinformatics were used to build a predicting model, then optimal factors were explored. **Results:** Cox analyzed effect on survival CSF-1, HLA-DRA, TNF, SPP1, and IL-6 were ranked in the first five sites. The mRNA-based predictor with logistic regression method, which employed the 5 cytokine gene expression, was excellent survival predictor in gene dataset accuracy (74.7%) on testing dataset. The survival predictor was validated by real time RT-PCR on another independent cohort of surgical HCC patients (accuracy=72.3%). **Conclusion:** 5-cytokine predict model of immunity-associated gene signature should allow a sensitive and specific monitoring of survival in HCC after curative hepatectomy.

Keywords: surgery; hepatocellular carcinoma (HCC); prognosis prediction

原发性肝癌(简称肝癌)是全球最常见的恶性肿瘤之一,在中国,肝癌的发病率占肿瘤发病率的第三位,而其死亡率为第二位。虽然肝癌研究与治疗已取得很大进展,根治切除术后的十年生存率已提高到30%左右,但肝癌根治性切除术后5年转移复发率为61.5%,即使是小肝癌也达43.5%。因此发现肝癌的预后因子,准确区分患者,已成为进一步提高肝癌生存率的关键。有研究表明,肿瘤的复发转移与肿瘤周围微环境有密切关系。我所前期发现癌旁组织17个免疫炎症相关细胞因子表达谱可以准确预测肝癌术后早期复发。基于前期研究成果,本研究拟进一步在转录水平分析癌周免疫细胞因子表达构成、优化肝癌预后预测指标,为其向临床应用转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象

选取2002~2006年在复旦大学附属中山医院肝外科实施根治性手术切除的肝癌患者的癌旁组织,患者为首次诊断肝癌,术前术后未接受其他化学治疗、生物治疗、无门脉、静脉主干转移。有完整的临床病理和随访资料,末次随访时间为临床2010年6月。手术后切取距离肿瘤边缘2cm以上新鲜标本,体积约0.5cm³大小,液氮冻存,后转移至-80℃保存,避免反复冻融。患者签订了知情同意书。

1.1.2 子生物学试剂及仪器

Trizol:购自Invitrogen, USA。

PCR仪:GeneAmp PCR system9700HT型,美国ABI公司产品。

1.2 方法

1.2.1 癌旁肝组织总RNA提取和cDNA制备

1.2.2 Taqman探针RT-PCR检测27个因子表达
按表1配制实时定量PCR反应混合液



表1 实时量 PCR 反应混合液的配制

各组成部分	每个反应所需体积(μl)
cDNA template	4.5
Taqman master mix	5
Taqman 探针	0.5

ABI7900HTPCR 仪使用程序设定:

95°C 10 min;

94°C 15 s, 60°C 30 s, 进行 40 个循环。

运行结束后,导出结果包括扩增曲线,Ct 值。通过传统的 ΔCt 法(即目的基因的 Ct 值减去内参照基因的 Ct 值),计算目标基因在癌旁组织中的表达量。

1.3 统计学方法

用 SPSS16.0 统计软件进行统计学分析。Cox 比例风险模型用于单、多因素分析。生存率曲线用 Kaplan-Meier 法绘制并以 log-rank 法进行组间比较,受试者工作特征曲线(receiver operator characteristic curve, ROC)及曲线下面积(area under the curve, AUC)用于判断预测指标作为诊断标准的可行性。利用生物信息学分析,应用支持向量机(SVM)学习法对进行患者分类构建预后预测模型。

生存期按月计算,它被定义为从诊断至患者死亡或末次随访信息的时间。单因素分析采用 Kaplan-Meier 生存分析和 Log-rank 检验。对单因素分析有意义的变量进行多因素 Cox 回归分析。所有结果均以双尾检验 $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 肝癌患者临床病理特征分析

见表 2。

表 2 180 例肝癌患者的临床病理特征

临床病理特征	复发组 R (n = 91)	无复发组 RF (n = 89)	P 值 (R vs RF)
性别			
男	80	75	0.523
女	11	14	

年龄(岁)			
>50	45	55	0.102
≤50	46	34	
组织学			
I ~ II	65	64	1.000
III	26	25	
包膜			
完整	45	43	0.883
不完整	46	46	
AFP(ng/mL)			
<20	32	33	0.877
≥20	59	56	
癌栓			
镜下	26	46	0.002
无	65	43	
肿瘤大小(cm)			
≤5	50	59	0.130
>5	41	30	
肿瘤数目(个)			
单个	75	78	0.405
多个	16	11	
HBsAg			
阴性	3	4	0.719
阳性	88	85	
BCLC 分期			
极早期	6	6	0.460
早期	41	48	
中期	44	35	

2.2 RT-PCR 检测 27 个细胞因子基因表达结果及预测分子标签构建、验证

2.2.1 180 例早期 HCC 癌旁组织免疫炎症细胞因子表达分析

应用 RT-PCR 相对定量法分析 27 个基因表达情况,首先应用 Cox 风险比例回归模型分析它们对复发的影响,27 个因子排序后 CSF-1, HLA-DRA,

TNF, SPP1, IL-6 为前 5 位, 即应用这 5 个免疫炎症相关细胞因子可以区别患者预后(图 1)。

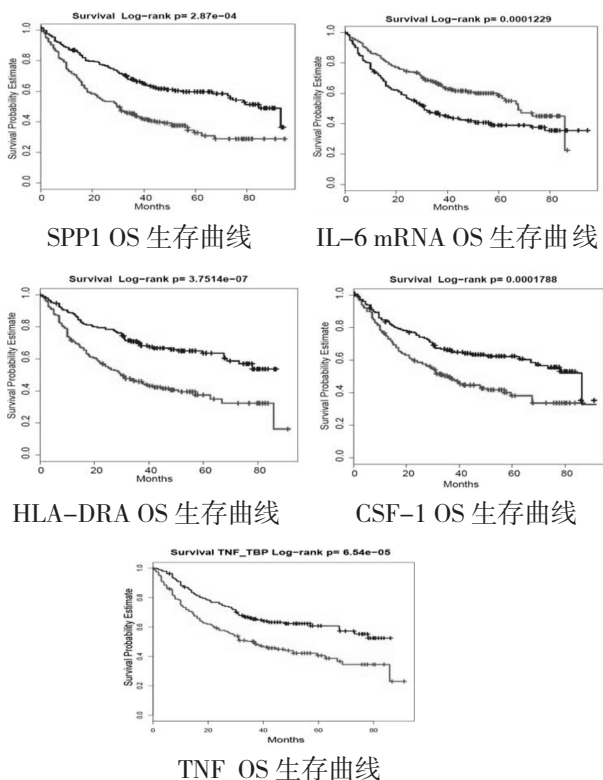


图 1 CSF-1, HLA-DRA, TNF, SPP1, IL-6 mRNA OS 生存曲线

2.2.2 基因 mRNA 表达谱复发预测模型的构建

基于 CSF-1, HLA-DRA, TNF, SPP1, IL-6 最显著基因表达情况, 应用有监督的聚类分析表明, 这 5 种基因的表达谱可以较有效的区分肿瘤术后预后情况(图 2)。

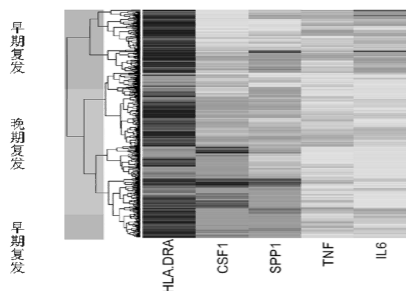


图 2 CSF-1, HLA-DRA, TNF, SPP1, IL-6 表达系统聚类图

无监督系统聚类构建预后预测模型。应用三种分类器: 支持向量机(SVM)、Rweka(J48)、Logistic 回归机器学习法对训练组进行训练, 最终得到 5 个预测基因列表及其贡献度如表 3 所示。

表 3 预测基因列表及其贡献度

基因名称	贡献度	P 值
IL6	0.299212598	0.001
HLA_DRA	0.141732283	0.125
CSF1	0.244094488	0.074
SPP1	0.188976378	0.035
TNF	0.125984252	0.147

(1) 利用 SVM 算法对 5 个预测基因做预测模型, 并选用径向基核函数(radical basis function):

$$k(x, x_j) = \exp(-\gamma |x - x_j|^2)$$

其中, $k(x, x_j)$ 表示径向基核函数, x 表示某个病人的基因表达值, x_j 表示每个基因的表达值, 核参数 $\gamma=19$ 。

(2) 预测计算公式如下:

$$P = \sum k(x, x_j) Y_j + C$$

其中, $k(x, x_j)$ 表示径向基核函数, Y_j 为基因的贡献度, C 为惩罚因子(为 LIBSVM 中对错误分类的惩罚常数)。根据 SVM 的预测结果和基因的贡献度加权投票后的总分 P 值, 如果 P 值大于等于 0.879 为高风险, 小于 0.879 为低风险。

2.2.3 预测模型在测试组验证

我们进一步在测试组(100 例)中检验 5 个 mRNA 细胞因子预测因子的检测效能, Cox 风险比例模型分析预测因子与生存、复发的关系。基于 mRNA 表达谱可以将测试组分为高复发风险组(68 例)和低复发风险组(32 例)。为了验证模型的稳定性, 运用 Leave-one-out 及 10 倍交叉验证方法, 结果显示: 高复发风险组总生存期显著低于低分显著($P=0.002$)。5 因子 mRNA 表达预测标签的复发预测效能通过 ROC 曲线评价, 准确度 74.7%, 敏感度 73.6%, 特异

度 75.1 %。

本实验所有患者临床病理特征在复发多因素风险回归中仅有肿瘤大小具有意义显著 ($P < 0.0001$)，一般病理特征对于患者复发预测显然没有显著意义，我们应用 Cox 风险回归分析 5 个细胞因子 mRNA 表达预测因子是否作为独立预测因子。多因素分析发现 5 个基因预测因子对生存影响 $HR = 2.346$, ($95\%CI = 1.731 - 3.179$; $P = 0.0001$)。其他临床病理特征均无显著性。

2.3 独立样本(200 例)验证

为了检验这一模型的预测效能,在另一个随机、独立的肝癌患者队列进行了预测能力的检验,以及中位数值作为高危复发和低危复发组的分界点。结果显示:高复发风险组总生存期显著低于低分显著 ($P = 0.002$)。5 个细胞因子 mRNA 表达预测因子的复发预测效能通过 ROC 曲线评价,敏感度 74.1 % 特异度 70.1 % 准确度 72.3 % (图 4)

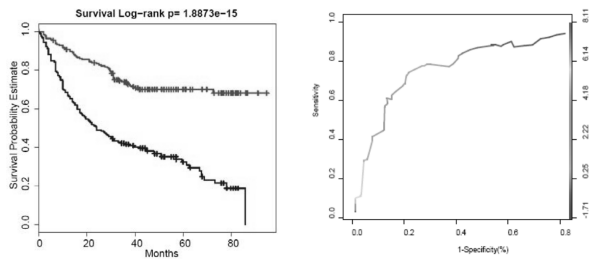


图 4 独立验证组 200 例患者 OS 生存曲线及 ROC 曲线

3 讨论

肝癌是一种异质性很强的恶性肿瘤,具有相同临床病理特征的患者,预后却千差万别。目前常用的肝癌预后预测标记包括肿瘤分期和组织病理学指标,其中组织病理学指标往往不能提供足够的预后信息,而肿瘤分期,如 TNM 分期,虽是目前最常用的肿瘤预后标记,但对肝癌预后的预测尚显不足。众多基于基因芯片的分子预测模型中,不仅没有相互重

合的基因,而很多基因无明确功能^[1]。因此,临床上迫切需要更准确地预测肝癌复发转移的方法或手段。相对于异质性极高的癌细胞来说,微环境非肿瘤细胞基因组较稳定,在不同类型肿瘤间的差异小。因此,基于免疫/炎症微环境预测模型的稳定性、预测效能将超过传统的以癌细胞为基础的预测模型,甚至可以在不同的肿瘤之间通用。

近年来癌周微环境在肿瘤发生及进展中的作用成为肿瘤研究的热点。肿瘤细胞与微环境之间动态的相互作用是肿瘤发生发展过程中必不可少的:微环境调控肿瘤细胞生长、决定其转移潜能和转移靶器官、并影响疗效^[2]。Hoshida 等^[3]利用 200 多例石蜡包埋癌旁组织的表达谱筛选出 132 个基因预测肝癌晚期复发。通过基因芯片表达谱研究,我研究所发现一组与肿瘤预后相关基因,其中很多包含在炎症免疫相关通路,进一步应用实时荧光定量 PCR 技术检测 17 个细胞因子表达情况,最终构建 17 个细胞因子表达谱预测模型,可以准确预测肝癌术后复发^[4]。Chew 等^[5]研究发现肝癌免疫微环境与 HCC 的术后生存密切相关,肿瘤浸润淋巴细胞的活化与增值对于肝癌的进展起到非常重要的作用。虽然探索这些预测模型在实验室取得巨大的成功,但是从实验室到临床依然需要优化与筛选。

本研究在前期研究的基础上运用高通量、高精度的 RT-PCR 技术优化细胞因子表达谱,筛选出一组由 5 因子组成的有效的预后预测标签,可以较为准确的预测术后的生存情况。在不同的预后患者之间 IL-6, TNF, SPP1, HLA-DRA 及 CSF-1 在癌周肝组织中的表达具有显著差异。此预测模型在与临床预后相关的指标同时纳入多因素风险回归模型中时,它可以作为独立的预后因子。

既往的研究多关注于肝癌术后复发转移,但现今临床实际中最关注的是怎么样能够获得较好的总生存率,即使是带瘤生存。我们的研究得出的结果显

示癌周的炎症免疫状态与 HCC 术后的总生存明显相关,它独立于肝硬化程度及肝功能等临床指标。通过这项研究发现,发现了的癌周预后预测基因标签,则可判断患者愈后的差别。基因工具将被用于选出易感人群而进行个体化治疗;另外,对于经过手术治疗的患者中,基因标签内某些特定的基因也有望成为辅助治疗的靶点。Kulbe 等通过采用 RNA 干扰技术发现,当 $TNF\alpha$ 的产生被阻断时,肿瘤的生长及播散被明显抑制^[6]。通过反义寡核苷酸和 SiRNA 等技术抑制 CSF-1 的表达将可以延长负瘤小鼠的生存时间并且减少肿瘤相关巨噬细胞的浸润和新生血管的生成^[7-8]。

为了检验这一模型的预测效能,在另一组随机、独立的肝癌患者队列中进行了预测能力的检验。结果发现,此模型同样可以将验证组患者区分复发转移风险显著不同的高风险和低风险组,即验证了该模型的稳定性、有效性和通用性。由于微环境非肿瘤细胞基因组较稳定,在不同类型肿瘤间的差异小,这一基于免疫微环境特征的预测模型必将在肝癌中有着广泛的应用前景,可加速科研向临床转化速度,指

导临床治疗。

参考文献

- [1] Iizuka N, Hamamoto Y, Oka M. Predicting individual outcomes in hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2004;364(9448):1837-1839.
- [2] Wyekoff J, Wang W, Lin EY, et al. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(19):7022-7029.
- [3] Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, et al. Gene Expression in Fixed Tissues and Outcome in Hepatocellular Carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359: 1995-2004.
- [4] Budhu A, Forgues M, Ye QH, et al. Prediction of venous metastases, recurrence, and Prognosis in Hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment[J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(2):99-111.
- [5] Chew V, Tow C, Teo M, et al. Inflammatory tumour microenvironment is associated with superior survival in hepatocellular carcinoma patients[J]. *J Hepatol*, 2010, 52(3): 370-379.
- [6] Kulbe H, Thompson R, Wilson JL, et al. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 585-592.
- [7] Aharinejad S, Abraham D, Paulus P, et al. Colony-stimulating factor-1 antisense treatment suppresses growth of human tumor xenografts in mice[J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 5317-5324.
- [8] Aharinejad S, Paulus P, Sioud M, et al. Colony-stimulating factor-1 blockade by antisense oligonucleotides and small interfering RNAs suppresses growth of human mammary tumor xenografts in mice[J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 5378-5384.



12 项肿瘤标志物蛋白 芯片法检测肺癌的临床价值

刘锦程, 施常备, 陈其亮

(陕西省结核病防治院陕西省第五人民医院, 西安 710100)

摘要:目的:探讨多肿瘤标志物蛋白芯片检测法在肺癌诊断中的应用。方法:对 89 例肺癌患者蛋白芯片结果进行分析。结果:CA19-9、CEA、CA125、SF 阳性表达率较高,分别为 17.9%、38.2%、26.9%、22.4%,联合检测阳性率为 55.1%。结论:C-12 蛋白芯片法多肿瘤标志物检查在肺癌诊断、监测中有重要的临床价值。

关键词:肿瘤标志物;蛋白芯片法;肺癌

12 TUMOR MARKER PROTEIN CHIP ASSAY VALUE OF LUNG CANCER

LIU Jincheng, SHI Changbei, CHEN Qiliang

(Shaanxi TB Prevention and Treatment Hospital, Xi'an 710100, China)

Abstract: Objective: To investigate the multi-tumor marker proteinchip detection of lung cancer diagnosis. **Method:** 89 cases of lung cancer protein microarray analysis. **Results:** CA19-9, CEA, CA125, SF positive expression rate was higher, 17.9%, 38.2%, 26.9%, 22.4%, the joint testing positive was 55.1%. **Conclusion:** C-12protein chip method checks multiple tumor markers in lung cancer diagnosis, monitoring has important clinical value.

Keywords: tumor markers; protein chip; lung cancer

肿瘤近年有不断增加的趋势,早发现、早诊断、早治疗是关键。肺癌是发病率较高的恶性肿瘤,5 年生存率仍低于 15%,因此早治疗就显得更为重要。但是单项肿瘤标志物检测阳性率低,联合检查可以明显提高诊断阳性率。蛋白芯片是一种集微电子、微机

械化学物理论技术计算机为一体,分析过程为连续化、集成化、微型化的蛋白分析技术,具有高速度、高通量、高灵敏的特性^[1]。本研究对 89 例肺癌患者应用蛋白芯片进行的 12 项肿瘤标志物联合检查结果进行分析,并评价各项指标的临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集 2009 年 5 月至 2010 年 5 月在本院病理证实为肺癌患者 89 例。男性 67 例,女性 23 例,年龄 23~77 岁,平均年龄 51.3 岁。其中腺癌 41 例,鳞癌 35 例,腺鳞癌 2 例,未分化癌 6 例,小细胞肺癌 5 例。

1.2 检测方法

空腹采集外周血 2mL,离心分离血清,4℃冰箱保存且在 4 d 内检测完毕。检测时取待测血清或标准品 100μL 加入芯片的小方格内,按照蛋白芯片说明书步骤操作,最后用 HD-2001A 蛋白芯片检测仪检测。试剂盒来自湖州数康有限公司。

1.3 阳性判断标准

一项或一项以上肿瘤标志物的检测值高于正常值视为阳性,以下两项情况需要排除:(1)单独一项铁蛋白值增高;(2)全部指标都呈强阳性,或除了 PSA、F-PSA 外其他指标都呈阳性者的携带嗜异性抗体者^[2]。

1.4 统计学分析

所有指标均以均值($\bar{x} \pm s$)表示,选用 SPSS13.0 进行分析。

2 结果

对各项检查结果、单项阳性率及联合阳性率进行统计。

肿瘤标志物	均值 ± 标准差	正常参考值	阳性率 /%
CA199	27.42 ± 54.29	<35.00 KU/L	17.9(16 例)
NSE	4.25 ± 9.15	<13.00 ng/mL	4.5(3 例)
CEA	16.26 ± 35.10	<5.00 ng/mL	38.2(34 例)
CA242	13.35 ± 38.06	<20.00 KU/L	6.7(6 例)
铁蛋白	2.9.29 ± 268.29	<322 ng/mL	22.4(20 例)
β-HCG	0.72 ± 1.26	<3.00 ng/mL	2.2(2 例)
AFP	9.57 ± 30.86	<20.00 ng/mL	4.8(4 例)

F-PSA	0.28 ± 0.39	<1.00 ng/mL	1.1(1 例)
PSA	1.71 ± 3.13	<5.00 ng/mL	1.1(1 例)
CA125	52.11 ± 120.29	<35.00 KU/L	26.9(24 例)
HGH	2.37 ± 4.17	<7.50 ng/mL	4.8(4 例)
CA15-3	13.08 ± 4.6	<35.00 KU/L	4.9(5 例)
12 项联合检查			55.1(49 例)

3 讨论

肿瘤标志物是指在恶性肿瘤发现和增殖过程中,由肿瘤细胞的基因表达而合成分泌的或是由机体对肿瘤反应而异常产生或升高的,反映肿瘤存在和生长的一类物质,这类物质在正常人体内并不存在或含量很低,而在肿瘤患者体内含量明显升高,其在肿瘤的辅助诊断、鉴别诊断、疗效观察、监测复发以及预后评价具有很高的应用价值。肿瘤细胞生物的复杂性和多态性,使同一种肿瘤可以表现出几种肿瘤标志物,而不同肿瘤又可以出现同一种肿瘤标志物,因此联合检测多种肿瘤标志物血清检测是必要的^[3]。

蛋白芯片技术的多种肿瘤标志物定量检测系统,已经广泛应用于临床,该检测系统在肺癌的疗效评价和预后判断是否有一定价值,目前缺乏相关报道^[4]。

本研究结果显示,单个肿瘤标志物表达阳性率普遍较低,CEA 也只有 38.2%,CEA 存在于多种肿瘤,肺腺癌能直接产生,检测准确率为 40%~50%,其与 CA125、CA153、CA242 联合诊断肺癌有意义^[5],12 项肿瘤标志物联合检查阳性率为 55.1%,明显高于单项指标。

国际多中心研究和国内部分学者研究证实,当肺癌组织类型不明确时,联合检测 CEA、NSE、CYFRA211 筛选诊断可明显提高敏感性^[6]。本实验所用 HGH、FPSA、PSA、HCG 阳性率低,而特异指标



CYFRA211、FGF、M2-PK 等未选用。病理类型分析可知,腺癌居多,因此 CEA、SF、CA125 三者联合检出率稍高,未列入鳞癌敏感指标,这可能也是影响阳性检出率的原因之一。

也有学者认为^[1],蛋白芯片法也存在局限性,其线性范围窄,特异性并不很高,不适于临床确诊,还需要结合临床及影像提高早期诊断率。但作为疗效评价、预后判断和复发监测而言,蛋白芯片法有较好的临床应用价值。

参考文献

[1] Sanders G.h.w,ManzA.Chip-based Microsystems for genomic

and proteomic analysis[J]. Trends.And chem.,2000;19(6):364-378.

[2]路丹,赵晓丹,姜秋颖,等.肿瘤标志物蛋白芯片检测系统在肺癌诊断中的价值[J].中国肺癌杂志,2006,2,9(1):84-86.

[3]孔宪涛,肿瘤标志物应用进展与评价[J].实用肿瘤杂志,2002,17:289-292.

[4]王伟,汪安兰,刘建国,等.Ⅲ期非小细胞肺癌中 C-12 的检测及其预后意义[J].现代肿瘤医学,2006,3,14(3):281-283.

[5]王容丽,李代渝.联合检测 CA125 和 NSE 在肺癌诊断和预后的意义[J].实用肿瘤杂志,1999,13(2):145.

[6] Toa p,Fomier M,Micel R,et al Tumour markers CEA NSE SCC TAP and.CYFRA211 in respectable non small cell lung cancer [J].Anticancer Res,1999;19(4c):3613-3618.

[7]沈云松,赵崇吉,台虹,等.C-12 多种肿瘤标志物蛋白芯片检测系统的临床评价[J].现代检验医学杂志,2003,12,18(6):11-12.

携带人癌胚抗原(576-669 段)和热休克蛋白 70 样分子融合基因的重组腺病毒治疗肿瘤的实验研究

刘书逊,江金霞,刘娟,夏梦,于益芝,曹雪涛

(第二军医大学,医学免疫学国家重点实验室 & 免疫学教研室,上海 200433)

摘要:本文的前期研究发现,含有癌胚抗原 CEA₅₇₆₋₆₆₉ 段和全长的 Hsp70L1 蛋白的融合蛋白能够有效地诱导 CEA 抗原特异性 CTL 的产生和 Th1 免疫应答反应,因此可以用于 CEA 阳性肿瘤的治疗。鉴于 Hsp70L1 蛋白是胞内天然表达的分子,并且肿瘤抗原主要通过抗原的胞内途径进行加工呈递,因此我们通过同源重组方法构建了携带特异性肿瘤抗原 CEA₅₇₆₋₆₆₉ 和 Hsp70L1 融合基因的腺病毒载体(AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1),并利用此重组腺病毒载体转染人树突状细胞(dendritic cell, DC)和外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),观察 AdCEAhsp70L1 修饰的树突状细胞(AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1-DC)的表型特点、功能状态以及诱导 CEA 特异性 CTL 的活性,以及 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 修饰的 PBMC(AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1-PBMC)对肿瘤细胞的杀伤活性。研究证明,AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1-DC 具有成熟 DC 的表型特征和功能,可以有效诱导针对 CEA₅₇₆₋₆₆₉ 抗原特异性的杀伤性 T 细胞生成,后者能够有效的杀伤 CEA+ 肿瘤细胞。此外,AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1-PBMC 能够有效地杀伤多种肿瘤细胞,其中 NK 细胞的活性明显增强。因此,AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1-DC 或者 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 体内直接应用可以作为治疗性疫苗,应用于 CEA+ 或者多种肿瘤的治疗。

关键词:热休克蛋白 70 样分子;癌胚抗原;重组腺病毒;树突状细胞;肿瘤免疫



THE THERAPEUTIC EFFECT OF RECOMBINANT ADENOVIRUS CARRYING FUSION GENE ENCODING HUMAN CEA₅₇₆₋₆₆₉ AND HEAT SHOCK PROTEIN 70-LIKE PROTEIN ON TUMOR: ACT ON DENDRITIC CELLS AND NK CELLS

LIU Shuxun, JIANG Jinxia, LIU Juan, XIA Meng, YU Yizhi, CAO Xuetao
(National Key Laboratory of Medical Immunology & Institute of Immunology,
Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective: Recombinant fusion protein containing the CEA₅₇₆₋₆₆₉ fragment of the carcinoembryonic antigen and human heat shock 70-like protein 1 (Hsp70L1) has been revealed to have potent capability to induce CEA-specific CD8⁺ CTL and Th1 responses. The aim of this study is to investigate whether intracellular expression of CEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 has the ability to induce CEA-specific CTL and Th1 response, and thereby to induce anti-tumor immunity. **Methods:** Recombinant adenovirus carrying fusion gene of CEA₅₇₆₋₆₆₉ and Hsp70L1 were constructed, and anti-tumor activity of AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1-transfected dendritic cells (AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1-DC) or peripheral blood cells (AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1-PBMC) was evaluated. **Results:** AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1-transfected DC displayed mature DC feature, characterized by high expression of CD86 and HLA-DR and potent induction of allo-T responses, and had potent capability to induce CEA-specific CTL which mediated cytotoxicity to CEA⁺ tumor cells. AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1-transfected PBMCs had potent cytotoxicity to several tumor types, of which CD56⁺ NK cells were obviously activated. **Conclusion:** *In vitro* administration of AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 or AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1-DC provide potential novel therapeutic methods to be used in the treatment of tumors.

Keywords: heat shock protein 70-like protein; CEA; recombinant adenovirus; dendritic cell; tumor immunity

1 前言

肿瘤视为当今社会威胁人类健康的首位死亡因素,探索其发病机制以及寻找有效的治疗手段是当今生物医学领域所面临的巨大挑战之一。对肿瘤抗原的免疫识别和免疫应答是诱导抗肿瘤免疫应答的中心环节,因此如何增强机体对肿瘤的免疫识别和

应答能力,激发出有效的抗肿瘤抗原的免疫应答,成为攻克肿瘤的关键,这是当前免疫学领域的共识,也成为抗肿瘤新药研发的一个中心环节。机体内的抗肿瘤免疫主要来自于:属于适应性免疫系统的识别肿瘤抗原的特异性杀伤性 T 细胞以及属于固有免疫系统的 NK 细胞。如何增强这两大类免疫效应细胞

对肿瘤抗原的识别以及激活它们的杀伤功能是肿瘤免疫治疗的宗旨。

树突状细胞是机体中功能最多多样性的抗原提呈细胞,是联络固有免疫和适应性免疫的桥梁^[1]。成熟树突状细胞主要发挥激发和增强免疫应答的功能,介导体内抗感染和抗肿瘤免疫应答;未成熟的树突状细胞主要发挥负向调控免疫应答的功能,介导自身免疫耐受^[1]。树突状细胞的成熟状态受控于体内微环境,当微环境因素激活树突状细胞内的促进成熟的信号后,树突状细胞则成熟;反之,激活其内部抑制成熟的信号后,树突状细胞则展现未成熟特征。许多肿瘤疾病患者存在免疫功能的低下,这源于肿瘤释放的多种免疫抑制性因子,这些免疫抑制性因子强烈抑制了树突状细胞的成熟,此外一些肿瘤细胞具有低免疫原性的特点,这些特点共同导致了肿瘤逃避和抑制机体免疫系统的识别和攻击^[2]。因此,如何改善肿瘤患者体内的免疫抑制状态和增加肿瘤抗原的免疫原性是设计和发展抗肿瘤新药的先进手段。

热休克蛋白(Heat shock protein, hsp)是一类在生物进化中高度保守、广泛存在于原核及真核生物中的一类蛋白质,是生物细胞应激反应的诱导产物,hsp 在机体的免疫反应过程中发挥着重要作用,通过参与抗原加工递呈、促进抗原提呈细胞和 T 细胞活化等重要的生理过程,与机体的抗肿瘤免疫、抗感染免疫、自身免疫性疾病等生理及病理机制密切相关,是一类重要的免疫分子^[3]。

我们经对人树突状细胞的大规模测序,自主发现的一种新型免疫分子,与热休克蛋白 70 分子具有同源性,命名为人热休克蛋白 70 样分子(Hsp70L1)。前期研究发现,重组的 Hsp70L1 分子在体外应用能够诱导人树突状细胞成熟活化,非特异的增强 Th1 型免疫应答的功能^[4]。将人癌胚抗原 CEA 的部分基因与 Hsp70L1 全长基因的融合基因,经体外原核表达的融合蛋白(CEAhsp70L1)在体内和体外应用可以

显著地诱导出抗 CEA 特异性的 CTL 应答^[5]。虽然该融合蛋白显示了具有很好的诱导抗 CEA 特异性免疫应答的活性,但是该融合蛋白体外表达的效率较低,目前尚未建立成熟的大规模的制备工艺。更重要的是,hsp70L1 是天然表达在胞内的分子,而且肿瘤抗原的加工递呈主要通过 MHC-I 介导的胞内途径进行,而许多研究表明热休克蛋白可以作为伴侣分子促进 MHC-I 类途径介导的胞内抗原的加工递呈^[6],是否 Hsp70L1 分子也具有这种功能,目前是能够不清楚。在此基础上,我们构建了携带该融合基因的重组腺病毒,研究了该重组腺病毒(AdCEAhsp70L1)经体外转染树突状细胞(AdCEAhsp70L1-DC)的诱导抗原特异性免疫应答以及抗 CEA 阳性肿瘤的活性,以及 AdCEAhsp70L1 转染的外周血单个核细胞(PBMC)中 NK 细胞的活性以及对肿瘤细胞的杀伤活性。

2 实验试剂和方法

2.1 主要实验试剂和仪器

人外周血单个核细胞主要购于长海医院血库。人重组 GM-CSF 和 IL-4 主要购置于 Peprotech 公司。免疫磁珠购于 Miltenyi Biotech 公司。CAP-1-HLA-A.1 四聚体购自 ProImmune 公司;ELISPOT 试剂盒(IFN- γ)和免疫荧光抗体购自 B.D.Pharmingen 公司。流式细胞仪(FACSCalibur)购自 B.D.Bioscience 公司。

2.2 单核细胞来源 DC(MoDC)的诱导

MoDC 的体外诱导详见参考文献^[4]。

2.3 重组腺病毒转染

收集培养 6d 的 MoDC 或新鲜分离的 PBMC,调整浓度为 107 个细胞/mL;按照 MOI=10-1000:1,分别用 AdLacZ 或 AdCEAhsp70L1 感染,4h 后洗去游离病毒,继续培养 24h,然后收集 MoDC 或 PBMC。

2.4 CEA 抗原特异性 CTL 的诱导

选取 HLA-A2 阳性外周血单个核细胞,如上获得 HLA-A2+MoDC,并进行重组 Ad 感染,48h 后收集

MoDC,分装成4份;一份与自身CD3+T淋巴细胞按照1:20的比例混合培养,其余3份冻存。培养7d后,复苏一支冻存的MoDC,将其按照同样比例加入到混合培养体系中,培养3d后,添加人IL-2(100U/mL),继续培养。同法进行第3个循环的刺激。在21d后,进行如下检测:1)HLA-A2.1-CAP-1四聚体;2)CEA₅₇₆₋₆₆₉抗原特异性CD8+T细胞分泌IFN- γ 的ELISPOT检测;3)杀伤CEA阳性肿瘤检测。

2.5 流式细胞仪检测

细胞表面和胞内分子标记和检测参见文献^[4]。在杀伤实验中,肿瘤细胞预先用CFSE标记,在杀伤结束后,于上机前5min加入7-AAD,然后分析CFSE+7-AAD+细胞比例。

2.6 WB检测

抗CEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1由京天成生物技术有限公司制备。蛋白裂解物制备、SDS-PAGE电泳、转膜、免疫印记和检测见参考文献^[4]。

2.7 ELISPOT检测

分离AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1转染的自身MoDC与T共培养体系中的CD8+T淋巴细胞,与复苏的AdCEAhsp70L1转染的自身MoDC按照5:1比例培养,体系中添加人CEA₅₇₆₋₆₆₉蛋白(10 μ g/mL),培养至包被有抗人IFN- γ 的96孔培养板,培养3d后终止,按照ELISPOT说明书进行IFN- γ 分泌斑点的检测。

3 实验结果

3.1 重组腺病毒转染的人树突状细胞表达CEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1的水平

应用重组腺病毒分别感染人MoDC,在48h后采用WB检测融合基因和蛋白CEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1的表达。如图1,AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1感染的人MoDC表达CEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1融合蛋白的水平显著高于未转染组和AdLacZ转染组。表明,AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1感染的人MoDC可以特异性的在胞内高表达CEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1蛋白。

AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1分别以MOI=10,100,300感染人MoDC,48h后WB检测CEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1的表达(66KD)。上述结果来自3次独立实验中的一个代表性实验。

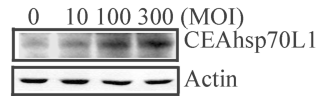


图1 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1感染的人MoDC特异性高表达CEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1蛋白。

3.2 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1基因修饰的人MoDC具有成熟DC的表型和功能

我们应用流式细胞仪检测了AdCEAhsp70L1转染的人MoDC的表型以及刺激同种T淋巴细胞增殖的水平。AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1转染的人MoDC表达共刺激分子CD86,MHCII分子-HLA-DR,以及粘附分子CD54,结果显示,与未感染组和AdLacZ组比较,重组腺病毒AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1基因修饰的人MoDC表达共刺激分子CD54、CD86和MHC-II分子的水平上调(图2A)。与未感染组和AdLacZ组比较,重组腺病毒AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1基因修饰的人MoDC刺激同种CD3+T淋巴细胞增殖的水平上调(图2B)。上述结果表明,重组AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1基因修饰的人MoDC的具有成熟活化DC的功能特点。

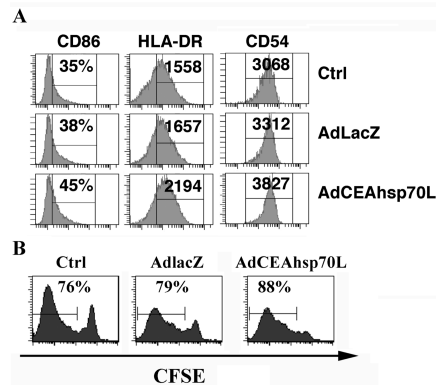


图2 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1基因修饰的人MoDC高表达CD86,HLA-DR和CD54,以及具有更强的刺激同种T淋巴细胞增殖的活性

A: FACS 检测 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 基因修饰的人 MoDC 表达 CD86, HLA-DR 和 CD54 的水平; B: AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 基因修饰的人 MoDC 与 CFSE 标记的同种 CD4+T 细胞以 1:20 比例共培养 5 d, 然后 FACS 检测 T 细胞的增殖。上述结果来自 3 次独立实验中的一个代表性实验。

3.3 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 基因修饰的人 MoDC 能够诱导 CEA 抗原特异性 CTL 产生, 并杀伤 CEA 阳性肿瘤细胞

因为 CEA₅₇₆₋₆₆₉ 含有人 HLA-A2.1 限制性表位 CAP-1 (CEA605-613), 因此我们选取 HLA-A2+ 的 MoDC, 进行 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 转染, 获得 HLA-A2+ 的 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 基因修饰 MoDC。然后与自身 CD3+T 淋巴细胞混合培养。在完成 3 个循环的自身 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 基因修饰 MoDC 刺激后, 我们分别采用 Tetramer 染色和 FACS 方法、ELISPOT 方法、以及杀伤实验验证经的 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 基因修饰 HLA-A2+MoDC 刺激的自身 T 细胞中是否含有识别 HLA-A2.1-抗原肽(CAP-1)的特异性 T 淋巴细胞、以及对 CEA 阳性肿瘤的杀伤活性。如图 3A: 与未感染、AdLacZ 感染组比较, AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 基因修饰 MoDC 组能够明显诱导识别 HLA-A2.1-抗原肽(CAP-1)的特异性 CD8+T 细胞的生成; 如图 3B: 与未感染、AdLacZ 感染组比较, AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 基因修饰的人 MoDC 诱导的 CD8+T 细胞在 CEA₅₇₆₋₆₆₉ 抗原刺激后, 出现 IFN- γ 斑点的数量和斑点大小明显增加; 如图 3C: 与未感染、AdLacZ 感染组比较, AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 基因修饰的人 MoDC 诱导的 CD8+T 细胞杀伤 CEA+ 肿瘤细胞株 (LS174T 和 SW480) 的水平显著增加。综上表明, AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 基因修饰的人 MoDC 组能够显著诱导识别 CEA 抗原特异性的 CD8+T 细胞生成, 并能够杀伤 CEA+ 肿瘤细胞。

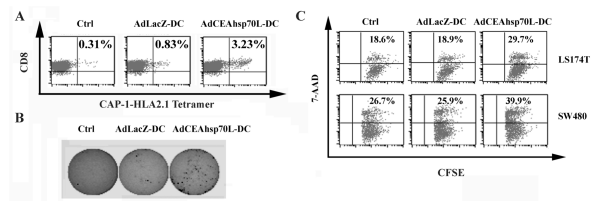


图 3 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 基因修饰的人 MoDC 能够诱导识别 HLA-A2.1 限制性 CAP-1-抗原肽特异性 CD8+T 产生, 诱导 CEA 抗原特异性 Th1 应答, 以及杀伤 CEA 阳性肿瘤细胞的 CTL

AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 基因修饰的人 HLA2.1+ MoDC 与自身 T 淋巴细胞在 1:20 比例共培养 7 d, 然后补充 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 基因修饰的人 HLA2.1+ MoDC, 继续培养 7 d, 如此经过 3 个循环共 21 d, 进行如下检测: A: FACS 检测 T 细胞中识别 HLA-A2.1 限制性 CAP-1-抗原肽特异性 CD8+T 细胞比例; B: 在抗原 CEA₅₇₆₋₆₆₉ 存在下, 共培养体系中的 T 细胞与自身 MoDC 共培养 3 d, ELISPOT 检测 IFN- γ 水平; C: 共培养体系中的 T 细胞与 CFSE 标记的 CEA 阳性肿瘤细胞共培养 18 h, FACS 检测肿瘤细胞的凋亡情况。上述结果来自 3 次独立实验中的一个代表性实验。

3.4 重组 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 基因修饰的人 PBMC, 对肿瘤细胞的杀伤能力明显增加

鉴于机体内的抗肿瘤免疫主要效应细胞是 CD8+CTL 和天然免疫系统的 NK 细胞, 此外, 将来应用重组 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 治疗肿瘤有可能采用静脉途径, 因此我们观察了 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 介导的 CEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 基因修饰的 PBMC 是否对肿瘤细胞具有杀伤效应。如表 1, 与未转染组和 AdLacZ 转染组比较, AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 转染的 PBMC 对各种肿瘤细胞均具有更强的杀伤效应, 提示 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 有可能通过作用于 NK 细胞, 介导 NK 细胞的功能活化, 非特异性的杀伤肿瘤。为了验证此设想, 我们进一步观察了 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 转染的



NK 细胞分泌 IFN- γ 水平, 发现与未转染组和 Ad-LacZ 转染组比较, AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 转染的 PBMC 中分泌 IFN- γ 的 CD56+NK 细胞比例显著上升(图 4)。表明 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 介导的 CEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 基因修饰可以增强 NK 细胞杀伤肿瘤细胞的功能。

表 1 重组腺病毒转染的人 PBMC 对肿瘤细胞的杀伤

肿瘤类型	CFSE+7-AAD+ 肿瘤细胞比例(%)		
	未转染组	AdLacZ 转染组	AdCEA ₅₇₆₋₆₆₉ hsp70L1 转染组
7721	9.33(1.56)	26.77(5.86)	38.44(6.89)*
Lovo	22.62(18.26)	30.99(15.63)	49.20(12.47)*
LS174T	8.38(4.23)	15.49(4.85)	49.87(18.65)*
MCF7	16.47(5.63)	7.69(2.56)	30.77(6.96)*
SW48	19.05(6.83)	28.57(7.86)	57.88(3.69)*
SW480	17.18(12.03)	27.27(10.36)	41.76(5.89)*
SW620	28.70(12.63)	22.84(13.10)	45.58(7.97)*

注: 采用重组腺病毒 (AdLacZ 和 AdCEAhsp70L1) 分别转染人 PBMC (MOI=300), 24 h 后与 CFSE 标记的肿瘤细胞(100:1)共培养 18 h, FACS 检测肿瘤细胞的死亡情况(CFSE+7-AAD+%)。*: P<0.05。

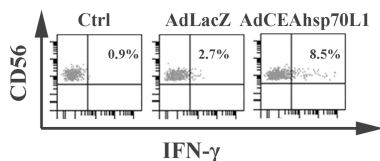


图 4 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 转染的 PBMC 中分泌 IFN- γ 的 CD56+NK 细胞比例

采用重组腺病毒(AdLacZ 和 AdCEAhsp70L1)分别转染人 PBMC(MOI=300), 24 h 后加入 BFA, 6 h 后 FACS 检测 CD56+NK 细胞分泌 IFN- γ 的比例。上述结果来自 3 次独立实验中的一个代表性实验。

4 讨论

本文课题进行了携带融合基因的重组腺病毒治

疗肿瘤的体外药效学研究。该融合基因兼具免疫佐剂效应和肿瘤特异性抗原两个特征: 免疫佐剂效应是由 hsp70L1 基因所编码的产物介导; 肿瘤抗原由多种肿瘤疾病都表达的肿瘤相关抗原-CEA 的部分基因所编码的一段 CEA 蛋白介导, 这段 CEA 蛋白含有已证实的肿瘤抗原肽和潜在的肿瘤抗原肽。研究证实, 携带这两种基因的重组腺病毒具有潜在的抗肿瘤效果, 其作用机制一方面通过作用于树突状细胞诱导肿瘤抗原特异性免疫应答反应, 另一方面通过激活 NK 细胞, 以抗原非特异性方式杀伤肿瘤细胞。因此, AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 或者经转染患者自身 DC, 可以作为治疗性疫苗激发体内抗肿瘤免疫应答, 为临床治疗肿瘤提供了新的药物设计思路。

以上的体外药效学研究结果为进一步深入研究基于 hsp70L1 的免疫识别和免疫活化机制提供了支持依据。前期研究发现, 细胞外 hsp70L1 的佐剂效应可能通过 TLR4 和 CD40 分子介导的信号途径诱导 DC 的功能成熟^[4]。然而, 基于重组腺病毒转染, 该分子主要以胞内表达形式存在, 是否这种胞内过表达还是通过外吐 hsp70L1 然后通过上述受体介导 DC 成熟, 还是通过胞内某种途径介导 DC 成熟, 还需要进一步甄别和探讨。此外, 重组腺病毒转染的树突状细胞可以通过激发出抗原特异性的免疫应答, 是否 hsp70L1 也能够作为分子伴侣参与到 NHC-I 类途径介导胞内抗原的加工递呈过程, 也需要进一步的研究。除了作用于 DC, 我们还发现, 该重组腺病毒转染的 PBMC 具有很强的抗肿瘤活性, 其中 NK 细胞的功能发生明显的活化。NK 细胞的功能活化取决于其细胞表面的活化受体和抑制性受体介导信号的强弱^[7], 因此我们的研究发现提出了一个令人感兴趣的问题, 是否胞内的 hsp70L1 能够诱导 NK 倾向于表达活化性受体, 或者抑制抑制性受体的表达, 如果是, 其分子机制是什么?

许多肿瘤细胞可以通过下调 MHC-I 分子而逃

避抗原特异性 CTL 的识别。既然 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 转染的 DC 能够上调 DC 表面的 MHC-I-抗原肽的表达, 是否该重组腺病毒转染肿瘤细胞后也具有这种效果。如果是, 这就为我们基于该重组腺病毒的基因治疗方案提供了另一个可以尝试的途径—瘤内注射, 探讨瘤内注射、或联合静脉注射等其他途径方式, 观察基于该重组腺病毒的多种基因治疗方案的抗癌效果。因此, 在临床前研究中还需要完善多种免疫治疗方案, 寻找到具有最佳抗癌效果的免疫治疗方案。

在应用 AdCEA₅₇₆₋₆₆₉hsp70L1 治疗肿瘤的新药研发中, 还有许多尚未解决的问题, 我们的最为担心的一个问题是, 因为 Hsp70L1 具有非特异性的免疫佐剂效应, 是否增加体内产生自身免疫应答的危险性。由于腺病毒介导了 CEA 抗原的转移, 是否 CEA 抗原能够异位表达在其他正常组织, 从而激发体内的针对自身组织的免疫应答。所以, 在该重组腺病毒的安全性评价中, 需要着重考虑这种可能性, 观察体内产生针对自身组织的自身抗体等自身免疫应答反应指标。

综上, 本文课题进行了一个兼具免疫佐剂效应和肿瘤特异性抗原两种特点的重组腺病毒的抗癌药效学研究, 发现该重组腺病毒能够在体外激发出肿瘤抗原特异性 CTL 和 NK 细胞介导的非特异性杀伤肿瘤的活性, 为我们下一步完善基于该重组腺病毒

的基因治疗方案提供了可靠的依据, 也为我们提出了深入探讨基于 Hsp70L1 的分子机制的问题, 同时在推动该重组腺病毒进入临床治疗肿瘤过程中还需要关注自身免疫应答等危险性, 相信随着上述问题的逐步阐明, 有可能为将来的临床治疗肿瘤提供一个新的基因治疗新药。

参考文献

- [1] Bousso P. T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies[J]. *Nat Rev Immunol.* 2008 8(9):675-684.
- [2] Ma Y, Aymeric L, Locher C, Kroemer G, Zitvogel L. The dendritic cell-tumor cross-talk in cancer [J]. *Curr Opin Immunol.* 2011, 23(1):146-152.
- [3] Calderwood SK, Theriault JR, Gong J. Message in a bottle: role of the 70-kDa heat shock protein family in anti-tumor immunity [J]. *Eur J Immunol.* 2005 Sep;35(9):2518-2527.
- [4] Wan T, Zhou X, Chen G, An H, Chen T, Zhang W, Liu S, Jiang Y, Yang F, Wu Y, Cao X. Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant. *Blood.* 2004, 103(5):1747-1754.
- [5] Wu Y, Wan T, Zhou X, Wang B, Yang F, Li N, Chen G, Dai S, Liu S, Zhang M, Cao X. Hsp70-like protein 1 fusion protein enhances induction of carcinoembryonic antigen-specific CD8+ CTL response by dendritic cell vaccine [J]. *Cancer Res.* 2005, 65 (11): 4947-4954.
- [6] Tobian AA, Canaday DH, Boom WH, Harding CV. Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross-presentation of chaperoned peptide to CD8+ T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages[J]. *J Immunol.* 2004 May 1;172(9):5277-5286.
- [7] Eagle RA, Trowsdale J. Promiscuity and the single receptor: NKG2D[J]. *Nat Rev Immunol.* 2007, 7(9):737-744.



饲喂来福美胶囊后小鼠对 药物损伤的耐力实验

赵岩, 赵维诚

(辽宁省肿瘤医院, 辽宁省肿瘤研究所, 沈阳市)

摘要:目的: 观察饲喂来福美胶囊后小鼠对抗药物对机体损伤的调节与修复作用, 并从氧化损伤角度探讨其可能机制。方法: 饲喂来福美后小鼠使用环磷酰胺建立损伤模型, 观察不同剂量来福美对上述模型动物不同指标的影响。结果: 实验数据展示了来福美胶囊的调节作用。结论: 来福美具有明显增强机体对抗药物损伤后的细胞修复作用。

关键词: 生物酶; 谷胱甘肽; 超氧化物歧化酶; 氧自由基; 环磷酰胺; 游泳时间

THE PRIMARY RESTORATION MECHANISM OF LIFE ENZYME ON CP-DESTORIED MICE MODEL

ZHAO Yan, ZHAO Weicheng

(Cancer Hospital of Liaoning Province, Cancer Institute of Liaoning Province, Shenyang, China)

Abstract: Objective: To study the adjustment and repiremet effect of Life Enzyme in CP-destoried mice model, and to explore the possible mechanisms. Changes in the physiological function of experimental animals were observed by feeding Life Enzyme and administrating CP at the same time. **Methods:** The whole experimental animals were divided into four groups including the control, CP, Life Enzyme and Life Enzyme +CP. **Results:** There were significant differences in weight, PLT, SOD in liver and swimming time of experimental groups compared with the control. ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$). **Conclusion:** When cells were destoried by CP, Life Enzyme could restore it.

Keywords: enzyme; glutathione(GSH),superoxide dismutase(SOD),oxygen radicals,cyclophamid(CP), swimming time(ST)

观察喂服来福美胶囊后小鼠对抗药物对机体损伤的调节与修复作用,并从氧化损伤角度探讨其可能机制。来福美是一种从发芽玉米中提取的纯天然植物保健品,含有丰富的植物激素、天然色素、蛋白多肽、微量元素、生物酶(谷胱甘肽是唯一可抵御非生物自由基的物质)等,对机体有较强的抗氧化、抗衰老及免疫增强作用,这些天然物质具有预防细胞和器官衰老和抗病生理功能;可在脂质氧化过程中清除氧自由基(生物氧自由基和非生物氧自由基)对细胞和器官造成的损伤;有文献报道:在对临床患者遇到辐射损伤,药物损伤后有较强的修复能力,本产品可诱发机体产生强有力应激反应,而宿主的应激反应,对控制相关病变具有十分重要的作用。为了验证来福美胶囊对机体损伤的调节与修复作用,课题组采用 SPF 级 KM 种小鼠,经来福美胶囊进行干预后,制造药物损伤模型,再来福美胶囊进行修复作用的观察实验。同时每组 6 只小鼠进行耐力实验,观察受试动物游泳开始至死亡的时间。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 受试药物:来福美为白色胶囊,批号:2009/12/23,批准文号:卫食健字(2003)第 0457 号,执行标准:O/DKLF.J.001-2002,胶囊内为白色疏松颗粒,易溶于水,含量以 sod 计为 378800U/100 克,样品由辽宁成大生物技术有限公司提供,实验室普通冰箱 4℃ 下避光、密封保存,实验前去胶囊用生理盐水配制。化疗药物:注射用环磷酰胺针剂(CP),0.2g/支,内为白色粉末,透明玻璃瓶包装铝塑封口;批号 08071721,批准文号:国药准字 021057,购自江苏恒瑞医药股份有限公司。对照药物:匹多莫得口服液,规格 400/7mL/每支,样品内为红色透明液体,透明玻璃瓶包装白塑封口;批号:09013,进口注册证号:H20070015,购自普利化学工业公司 意大利多泊药业有限公司。溶剂对照:氯化钠注射液,批号:07080604,批准文

号:国药准字 H21020984,250mL/支,购自沈阳志鹰制药厂。剂量分组:实验组的高剂量为 1.8g/kg,中剂量为 1.2g/kg,低剂量为 0.6g/kg;对照组的匹多莫得口服液低剂量为 13.3mg/kg;中剂量为 133mg/kg;高剂量为 267mg/kg;生理盐水对照(NS),使用等容量的生理盐水。剂量确定:1)来福美药物剂量根据厂家提供临床有效剂量 0.6g/kg(人体质量按 60kg 计);2)匹多莫得口服液,说明书提供临床有效剂量为 13.3mg/kg;3)化疗剂量根据《医学动物学实验方法》。

1.1.2 试剂盒:谷胱甘肽(GSH)(除蛋白)测定试剂盒购自南京建成科技有限公司,批号:20110104。超氧化物歧化酶(SOD)测试盒购自南京建成科技有限公司,批号:20110104。

1.1.3 仪器:20-2 型日立分光光度计。

1.1.4 实验材料:动物:SPF 级 KM 种小鼠,体质量(20±2)g,每次实验用同一性别,由中国科大学实验中心提供。实验动物生产许可证号:SYXK(辽)2008-0005,小鼠随机分组,每组 16 只(其中 6 只用于耐力实验),实验室饲养观察 1 日后用于实验。饲料为小鼠颗粒料,由沈阳实验动物颗粒饲料厂提供。实验室温度:22~24℃,相对湿度 40%~45%,塑料鼠盒体积 29cm×18cm×12cm,不锈钢丝顶盖,白色塑料水瓶,不锈钢嘴胶塞封口,饮用水为实验室饮用水。

1.1.5 实验:实验组分高、中、低三个剂量,以生理盐水配制,每日口服灌胃给药 0.2mL/只,连续 45 d 后,制做损伤模型(化疗模型全过程停药 10 d;放疗模型全过程停药 3 d);继续给药 45 d。对照组分高、中、低三个剂量,以生理盐水配成 ng/mL,每日口服灌胃给药 0.2 mL/只,连续 45 d,制做损伤模型(化疗模型全过程停药 10 d;放疗模型全过程停药 3 d);继续给药 45 d。每天上午观察记录小鼠的一般体症,摄食量,饮水量及死亡情况,发现有中毒反应及行为异常的动物,取出单笼饲养,重点观察,如有死亡或濒临死亡的动物,及时做尸检,行大体观察及病理组织学



检查。100 d 后观察各组受试动物游泳开始至死亡的时间。血清及肝脏、脾脏、肾等脏器做超氧化物歧化酶(SOD)活力测定(黄嘌呤氧化酶法)。小鼠损伤模型建立:化疗药为环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司 0.2g/瓶)以生理盐水配成 2mg/mL,备用,腹腔给药 0.2mL/只,共用药 5 d。

1.2 统计方法

采用 EXCEL 数据库录用数据,SPSS11.5 进行实验数据处理及统计分析。数据统计描述主要以形式表示。根据数据的正态性和方差齐性,采用单因素方差分析,LSD 进行组间多重比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 实验动物一般状态观察

来福美胶囊各剂量组及其他各组一般状态良好,实验组前 5 d 尿量正常,后逐渐增多,十余天后尿量明显高于其他组尿量。实验组每日饮水量明显高于其他组,饮食量各组间无显著差异。体质量在各组间未见显著性差异($P>0.05$,图 1)

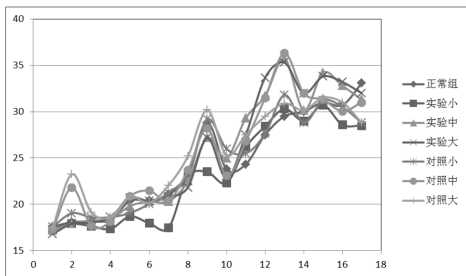


图 1 来福美胶囊对动物体质量的影响($\bar{x} \pm s$)

2.2 来福美胶囊对小鼠游泳时间(ST)的影响

饲喂来福美胶囊能延长小鼠游泳时间,增加小鼠的耐力(表 1)。

表 1 来福美胶囊对小鼠游泳时间的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 / 只	游泳时间 /m	延长率 /%
空白	6	23.94 ± 11.31	
实大	6	39.87 ± 10.32	63.50
实中	6	40.26 ± 6.49	73.91

实小	6	43.77 ± 8.99	86.95
对大	6	36.54 ± 10.26	56.52
对中	6	37.81 ± 6.94	60.86
对小	6	38.42 ± 5.36	65.22

注:与空白组相比,* $P<0.05$

2.3 对抗氧化物酶类超氧化物歧化酶 SOD 的影响

来福美大中小剂量组对比正常组,血清中代表机体抗氧化状态的 SOD 值皆降低,且降低程度依次减少,说明来福美的 SOD 未被机体吸收,被吸收的是其他可被吸收的抗氧化物,机体对其他可被吸收的抗氧化物吸收增多,意味着对自身 SOD 的需求减少。肝脏、肾脏的 SOD 值也遵循同样的规律,但脾脏 SOD 值不同,由于脾脏是机体的第二造血器官,一旦环磷酰胺对造血系统产生损害时,脾脏马上出现应激反应,病理切片中可见到脾脏的应激反应能力;因此,来福美的口服抗氧化作用主要来自非 SOD 成分。对照组有相似的现象(表 2)。

表 2 不同浓度来福美对鼠血清、肝脏、肾脏及脾脏对超氧化物歧化酶 SOD 的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	血清(u/mL)	肝脏(u/mg)	肾脏(u/mg)	脾脏(u/mg)
实大	112.72 ± 33.074	105.158 ± 6.980	143.318 ± 4.010	299.176 ± 33.033
对中	112.89 ± 24.304	81.856 ± 8.417	104.608 ± 5.267	187.748 ± 5.870
实中	141.66 ± 13.658	104.984 ± 3.258	143.650 ± 14.646	270.900 ± 24.515
正常	183.22 ± 12.499	152.204 ± 6.600	144.570 ± 8.556	201.292 ± 15.535
实小	160.68 ± 22.544	109.206 ± 2.838	128.770 ± 8.164	193.534 ± 29.990
对大	128.66 ± 8.090	104.228 ± 2.417	140.712 ± 17.062	216.530 ± 20.473
对小	168.11 ± 12.900	102.260 ± 2.775	141.064 ± 6.483	174.752 ± 12.143

2.4 病理结果

由于环磷酰胺对机体所造成的毒副损伤,机体各脏器必然产生一系列的应激反应,肝、肾细胞在进行损伤后的修复时,由于实验动物予先给与支持性干预,所以肝、肾损伤和修复的能力都优于空白组,脾脏作为机体的血库,产生的生理应激反应非常强,从病理切片中可见脾窦充血,大量的巨噬细胞,

实验组优于空白组。

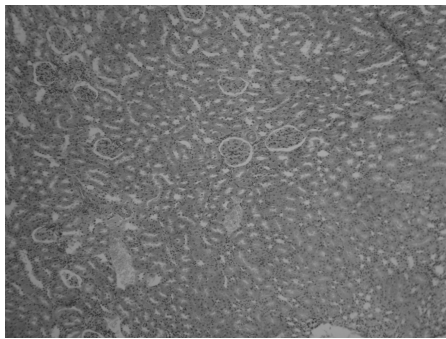
3 讨论

来福美胶囊是由玉米中提取的纯天然植物保健品,在发芽过程中富含大量的多不饱和脂肪酸和维生素 E^[1-2]、蛋白多肽、微量元素、生物酶等人体必需的营养素,这些天然物质进入机体后可调动机体产生一系列的应激反应,具有预防细胞和器官衰老和抗病生理功能;说明书提示本品含有大量 SOD、GSH 等酶类,在机体内,由超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、谷胱甘肽 S-转移酶(GST)等组成的抗氧化酶系统的协同作用,能够清除多余的活性氧物种(ROS)使得 ROS 浓度维持在正常的生理范围内,维持氧化-抗氧化平衡,这对于细胞行使正常的生理功能及适应各种生长环境至关重要。SOD(超氧化物歧化酶)是一种源于生命体的活性物质,能消除

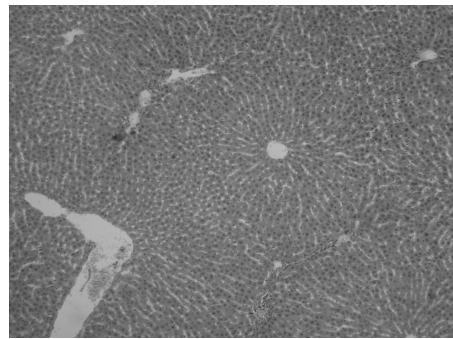
生物体在新陈代谢过程中产生的有害物质;SOD 具有抗衰老的特殊效果。SOD 是生物体内抗氧化能力最强的酶类,其活性的高低与衰老、肿瘤和突变密切相关^[3]。而自由基的活性之一,表现在脂质过氧化作用,主要攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,造成组织细胞膜毒性反应^[4],化疗剂则可能通过活性氧自由基发挥这种细胞毒作用。饲喂来福美补充了多不饱和脂肪酸和维生素 E 等营养素,可能阻断了这种攻击作用,或干扰细胞氧化和脂质氧化的途径^[4],从而保护和促进了抗氧化活性。

饲喂来福美补充了大量的多不饱和脂肪酸和维生素 E^[1-2]、蛋白多肽、微量元素、生物酶等人体必需的营养素,使小鼠游泳时间延长,这种抗疲劳的作用可能与多不饱和脂肪酸有关^[5]。

总之,来福美对生物体的免疫、抗氧化、抗疲劳



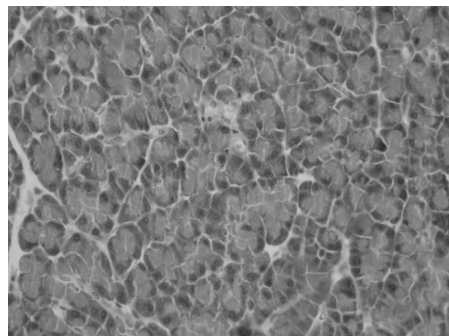
肾小球及肾小管分布规则,肾小管细胞及肾小球细胞无异常



肝小叶结构正常,肝细胞索环绕中心静脉,肝细胞大小均匀



脾结构正常,淋巴细胞分布正常,脾窦规则



胰腺小叶结构正常,腺上皮细胞大小均匀



有一定影响,产生不同的调理作用,但其详细的作用机制尚待研究。

参考文献

- [1] 田仁村. 谷类油脂. 第1版. 北京: 科学出版社, 1983: 25-28.
- [2] 赵长峰, 徐贵发, 韩玉荣, 等. 麦胚营养成分测定与分析[J]. 实用营养杂志, 1996, 3(1): 21-22.

[3] 张培彤, 张莹. SOD 与恶性肿瘤的治疗与预防[J]. 肿瘤防治研究, 1994, 21(1): 58-59.

[4] Okada S. Iron-induced tissue damage and cancer the role of reactive oxygen species-free radicals [J]. Pathol Int, 1996, 46: 311-312.

[5] 吴自豪. 肿瘤恶病质机制与防治对策 [J]. 肠外与肠内营养, 2000, 7(3): 182-187.

新疆维吾尔族妇女子宫颈鳞癌 C/EBP α 基因突变分析

潘泽民, 郑威楠, 张鑫芝, 李冬妹, 高蕊, 刘引引, 李星,
康华丽, 蒋旭鹏, 张东辉

(石河子大学医学院生物化学教研室, 新疆地方与民族高发病教育部重点实验室, 新疆石河子 832002)

摘要:目的:本研究探讨新疆维吾尔族妇女子宫颈鳞癌组织C/EBP α 基因启动子500bp和外显子区域基因突变和多态性。方法:收集12例维吾尔族子宫颈鳞癌组织和2例子宫颈正常组织。提取基因组DNA, C/EBP α 基因启动子500bp和外显子区域共设计6对引物,扩增6个片段。结果:通过PCR扩增和基因测序,在维吾尔族子宫颈鳞癌组织发现C/EBP α 基因6个已知SNP位点,2个新发现多态位点和1个突变位点;而在维吾尔族正常子宫颈组织未发现突变位点。结论:新疆维吾尔族子宫颈鳞癌的发生可能与C/EBP α 基因突变有关。

关键词:子宫颈鳞癌; C/EBP α 基因; 突变分析; 维吾尔族妇女

ANALYSIS OF MUTATION OF C/EBPA GENE IN CERVICAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF UIGUR WOMEN IN XINJIANG

PAN Zemin, ZHENG Weinan, ZHANG Xinzhi, LI Dongmei, GAO Rui, LIU Yinyin, LI Xing, KANG Huali, JIANG Xupeng, ZHANG Donghui
(Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Shihezi University, Xinjiang Endemic and Ethnic Disease and Education Ministry Key Laboratory, Shihezi 832002, China)



Abstract: Objective: To explore C/EBP α gene mutation and polymorphism in the promoter of 500bp region and exon region in cervical squamous cell carcinoma of Uigur women in Xinjiang. **Methods:** Twelve cervical squamous cell carcinoma tissues from Uigur women and 2 normal cervical tissues were collected. Genome DNA was extracted, 6 pairs of primers in the promoter of 500bp region and exon region of C/EBP α gene were designed, and 6 fragments were amplified. **Results:** Six known SNPs, 2 new SNPs and 1 mutation site were detected on C/EBP α gene in cervical squamous cell carcinoma of Uigur women by gene sequencing, however, no mutation site was detected in normal cervical tissues of Uigur women. **Conclusion:** C/EBP α gene mutation maybe related to cervical carcinogenesis of Uigur women in Xinjiang.

Keywords: cervical squamous cell carcinoma; C/EBP α gene; mutation analysis; Uigur women

子宫颈癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤,在世界范围内,子宫颈癌严重危害广大妇女的生命健康^[1]。我国子宫颈癌患病率和病死率都很高,约占世界的三分之一^[2]。维吾尔族妇女患病率为 459/10 万~590/10 万,病死率为 15.78/10 万,明显高于汉族和其他民族^[3]。在研究维吾尔族子宫颈癌差异表达基因时,用消减抑制杂交实验发现 CCAAT 增强子结合蛋白 α (CCAAT/enhancer binding proteins α , C/EBP α) 基因在子宫颈癌组织中 mRNA 表达水平降低,利用半定量逆转录聚合酶链反应实验 (RT-PCR) 发现 C/EBP α 基因在维吾尔族子宫颈癌组织中 mRNA 表达水平降低。本研究分析新疆维吾尔族妇女子宫颈癌组织 C/EBP α 基因突变情况。

1 材料与方法

1.1 收集标本和引物设计

收集 12 例新疆维吾尔族妇女子宫颈鳞癌组织标本(标本号为:31、38、43、44、45、47、48、49、50、54、55 和 56 号)及 2 例维吾尔族正常子宫颈组织标本(标本号为:15 和 20 号)。提取子宫颈组织 DNA。在 C/EBP α 基因启动子 500bp 和外显子区域(长度为 3276bp)设计引物,共设计 6 对引物,扩增 6 个片段。引物用在线 Primer3 软件设计(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)。

1.2 PCR 反应

PCR 反应体系总体积为 20 μ L: 双蒸水 6.4 μ L, 2x GC buffer I (TAKARA) 10 μ L, dNTP 0.4 μ L, 正向和反向引物各 1 μ L, 1 U HotStarTaq 聚合酶 (Qiagen Inc.) 0.2 μ L, 模板 DNA 1 μ L。

PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C, 15 min; 94 $^{\circ}$ C, 15 s, 68 $^{\circ}$ C, 60 s, 35 个循环。

1.3 PCR 产物使用 SAP 和 Exo I 纯化

将 1U SAP 和 6U Exo I 加入 8 μ L PCR 产物。混合物放入 37 $^{\circ}$ C, 60min, 接着放在 70 $^{\circ}$ C, 10min。

1.4 DNA 测序

反应混合物包括: 2 μ L BigDye3.1 mix, 2 μ L 测序引物(0.4 μ M) 和 1~2 μ L 纯化后的 PCR 产物。反应条件为: 96 $^{\circ}$ C, 1 min; 96 $^{\circ}$ C, 10 s; 50 $^{\circ}$ C, 5 s; 60 $^{\circ}$ C, 4 min, 进行 28 个循环。测序产物上 ABI3130XL 测序仪, 测序文件用 Polyphred 软件分析, 并结合人工校对记录后整理出结果。

2 结果

2.1 C/EBP α 基因启动子 500bp 和外显子区域分六段 PCR 扩增电泳结果

将 C/EBP α 基因启动子 500bp 和外显子区域分为 6 段, 设计引物, PCR 扩增后, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见 PCR 扩增片段大小正确, 可以进行

DNA 测序分析(图 1)。

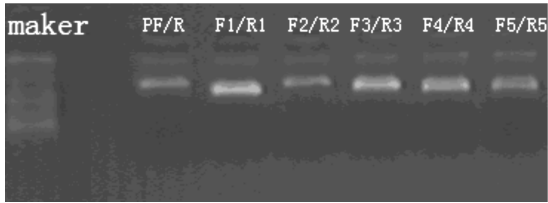


图 1 第 31 号样本 C/EBP α 基因 6 个片段电泳图

2.2 C/EBP α 基因启动子 500bp 和外显子测序结果

对 14 个标本 C/EBP α 基因启动子 500bp 和外显子进行了测序, 在新疆维吾尔族妇女子宫颈鳞癌组织中 C/EBP α 基因上检测出 6 个已知 SNP 位点和 2 个新发现的或低频的多态位点, 以及一个突变位点; 而在维吾尔族正常子宫颈组织中, 未发现突变位点(表 1)。

从表 1 可知, C/EBP α 基因位于 2 683 碱基位置, 44 号标本发现新的多态位点 C/T; 在 3 896 碱基位置, 31 号标本发现新的多态位点 G/A; 位在 2 699~2 700 碱基位置; 31、47 和 55 号标本发现新的突变位点, 3 例子宫颈鳞癌标本在 C/EBP α 基因第一外显子插入 ACCCGC 6 个碱基, 造成 195 号组氨酸和 196 号脯氨酸重复出现的插入突变(p.His195_Pro196dup 突变)。

2.3 C/EBP α 基因第一外显子基因突变结果

通过基因测序发现, 子宫颈鳞癌 31、47、55 号 3 例标本在 C/EBP α 基因第一外显子插入 ACCCGC 6 个碱基, 造成 p.His195_Pro196dup 突变(图 2)。

3 讨论

CCAAT/增强子结合蛋白属于基本的亮氨酸拉链转录因子家族成员。蛋白质结构中包含一个基本的 DNA 结合域和亮氨酸拉链域。C/EBP α 蛋白质在

表 1 子宫颈鳞癌 C/EBP α 基因突变位点及 SNP 位点分布表

碱基位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
标本号	1645	2683	2699-2700	2800	3489	3624	3896	3902	4304
15	G/G	C/C	-/-	G/G	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C
20	G/G	C/C	-/-	G/G	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C
31	G/G	C/C	-/N	G/G	C/C	A/A	G/A	C/C	C/C
38	G/G	C/C	-/-	G/G	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C
43	G/G	C/C	-/-	G/G	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C
44	G/G	C/T	-/-	G/G	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C
45	G/G	C/C	-/-	G/G	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C
47	G/G	C/C	-/N	G/G	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C
48	G/G	C/C	-/-	G/G	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C
49	G/G	C/C	-/-	G/G	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C
50	G/G	C/C	-/-	G/T	C/C	A/G	G/G	C/G	C/T
54	G/G	C/C	-/-	G/T	C/C	A/G	G/G	C/G	C/T
55	G/G	C/C	-/N	G/G	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C
56	G/A	C/C	-/-	G/G	C/T	A/A	G/G	C/C	C/C

N=accgac

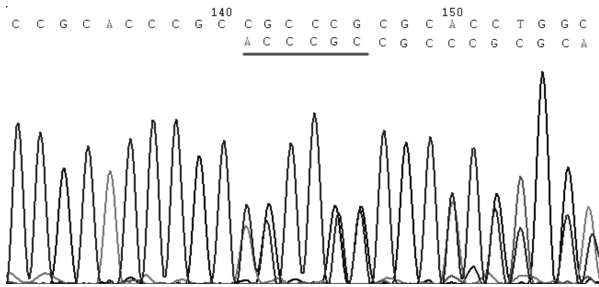


图2 子宫颈鳞癌 C/EBP α 基因第一外显子突变测序图

多种细胞中,调节细胞代谢和细胞增殖、分化^[4]。目前研究发现 C/EBP α 基因在急性髓样白血病有突变存在,并影响 C/EBP α 基因的功能^[5]。研究表明在急性髓样白血病中 C/EBP α 基因存在相对低的频率^[6]。核型异常的 C/EBP α 基因突变的急性髓样白血病患者表现出较短的存活时间^[7]。C/EBP α 基因在急性髓样白血病患者可以出现基因编码的蛋白质 N 末端和 C 末端氨基酸变化,可以通过 C/EBP α 基因突变来判断疾病的预后^[8]。另外,研究表明,细胞核型正常的急性髓样白血病的 C/EBP α 基因突变的基因型与患者治疗的疗效有关^[9]。

C/EBP α 基因突变在新疆维吾尔族子宫颈鳞癌人群中的分布,是否与新疆维吾尔族子宫颈鳞癌的发生有关,国内外均未见文献报道。为此,我们选择维吾尔族子宫颈鳞癌作为研究对象,检测 C/EBP α 基因的突变情况,为进一步深入研究维吾尔族患者子宫颈鳞癌的分子发生机制奠定基础。

C/EBP α 基因多态性变化是否与新疆维吾尔族患者子宫颈鳞癌的发生相关,还有待于扩大样本研究这些多态性位点在正常人群中的发生频率。因此,通过大样本和选择不同人群进行 C/EBP α 基因多态性研究十分必要。通过基因测序发现的 C/EBP α 基因多态性位点是否是新疆维吾尔族患者子宫颈鳞癌的

遗传易感性位点,尚需扩大样本进一步研究。

3 例维吾尔族妇女子宫颈鳞癌组织中,均检测出 C/EBP α 基因第一外显子插入 ACCCGC 6 个碱基,造成 p.His195_Pro196dup 突变,提示新疆维吾尔族子宫颈鳞癌的发生可能与 C/EBP α 基因突变相关,但尚需扩大样本进一步研究。

参考文献

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5):277-300
- [2] 高琼,韦创建,刘筱娟.宫颈癌的筛查及早期诊断[J].医学与社会,2007,20(1):41-42
- [3] 古扎丽努尔·阿不力孜,程静新,米克热木,古兰丹,李华,米合日尼沙,米日古丽,米日古丽·艾乃土,路玲.新疆维吾尔族妇女宫颈癌的 HPV 谱研究[J]. 肿瘤,2007,27(5):379-382
- [4] Rishi V, Bhattacharya P, Chatterjee R, Rozenberg J, Zhao J, Glass K, Fitzgerald P, Vinson C. CpG methylation of half-CRE sequences creates C/EBP α binding sites that activate some tissue-specific genes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107 (47):20311-20316
- [5] Szankasi P, Ho AK, Bahler DW, Efimova O, Kelley TW. Combined testing for CCAAT/enhancer-binding protein alpha (CEBPA) mutations and promoter methylation in acute myeloid leukemia demonstrates shared phenotypic features [J]. Leuk Res, 2011, 35(2): 200-207
- [6] Lu Y, Chen W, Chen W, Stein A, Weiss LM, Huang Q. C/EBPA gene mutation and C/EBPA promoter hypermethylation in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics [J]. Am J Hematol, 2010, 85(6):426-430
- [7] Renneville A, Boissel N, Gachard N, Naguib D, Bastard C, de Botton S, Nibourel O, Pautas C, Reman O, Thomas X, Gardin C, Terré C, Castaigne S, Preudhomme C, Dombret H. The favorable impact of CEBPA mutations in patients with acute myeloid leukemia is only observed in the absence of associated cytogenetic abnormalities and FLT3 internal duplication[J]. Blood, 2009, 113(21):5090-5093
- [8] Pabst T, Eyholzer M, Fos J, Mueller BU. Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favourable prognosis[J]. Br J Cancer, 2009, 100(8):1343-1346
- [9] Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H; German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia [J]. N Engl J Med, 2008, 358(18):1909-1918

卵巢肿瘤组织中端粒酶活性的表达

李红霞

(首都医科大学附属北京世纪坛医院妇产科,北京 100038)

摘要:目的:分析端粒酶活性在卵巢肿瘤中的表达,探讨端粒酶活性作为卵巢肿瘤诊断肿瘤标记物的意义。资料和方法:取冰冻肿瘤组织,采用端粒重复序列扩增法(Telomeric Repeat Amplification Protocol),结合银染,共测定了 27 例卵巢癌、5 例良性卵巢肿瘤、22 例卵巢癌旁组织以及 12 例正常卵巢组织中端粒酶活性,并分析其与组织分级、FIGO 分期、病理类型以及有无转移的关系。PCR 产物以采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,以出现特征性的 6-bp 间隔的特征性阶梯状条带为阳性。出现>100bp 的条带为强阳性,出现<99bp 的条带为中低阳性。结果:本实验共对 66 份标本进行了检测,12 例正常卵巢组织中,仅有 2 例表达端粒酶活性;5 例卵巢良性肿瘤中,1 例表达端粒酶弱阳性。27 例卵巢恶性肿瘤标本中,有 23 例表达端粒酶活性(其中强阳性 16 例);在检测的 22 例卵巢上皮癌的癌旁组织中,有 12 例表达端粒酶弱阳性。卵巢恶性肿瘤的端粒酶活性表达阳性率显著高于卵巢良性肿瘤($P=0.0090$)和正常卵巢($P=0.0000$)。I-II 期患者端粒酶活性阳性率 71%,III-IV 期患者端粒酶活性阳性率 90%($P=0.269$)。而强阳性率 III-IV 期明显高于 I-II 期($P=0.009$)。在肿瘤类型和组织学分级中,端粒酶阳性表达率均没有显著差异。结论:在卵巢恶性肿瘤组织中端粒酶活性有较高的表达率;早期和晚期卵巢肿瘤组织中端粒酶活性阳性率没有明显差异,但晚期卵巢肿瘤组织中的端粒酶活性程度较高;端粒酶活性有可能作为早期诊断卵巢肿瘤的标记物之一,并可以作为卵巢肿瘤判断预后的指标。

关键词:卵巢肿瘤 端粒 端粒酶



脑胶质瘤的免疫治疗

李文斌, 陈慧媛, 康 勋

(首都医科大学附属北京世纪坛医院, 北京 100038)

摘要: 脑胶质瘤的免疫治疗, 尤其是以树突状细胞为基础的主动免疫治疗在基础研究和临床试验中已经显示出良好的疗效。免疫治疗可能成为除手术、化疗、和放疗以外的, 治疗胶质瘤和防止肿瘤复发的手段。

关键词: 胶质瘤; 免疫治疗; 树突状细胞

IMMUNOTHERAPY FOR GLIOMAS

LI Wenbin, CHEN Huiyuan, KANG Xun

Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University

(10 Tieyi Rd, Yangfangdian, Haidian district, Beijing 100038)

Abstract: High grade gliomas are the most common and devastating primary brain tumours. Despite important progresses in gliomas treatment includes surgery combined to radio- and chemotherapy, high grade gliomas patients' prognosis remains very poor. Adoptive and active immunotherapies using lymphokine-activated killer cells, cytotoxic T cells, tumour-infiltrating lymphocytes, autologous tumour cells, and dendritic cells have been tested in clinical trials with glioma patients, which may become a important adjunctive therapy for gliomas patients.

Keywords: glioma; immunotherapy; dendritic cells

目前治疗胶质瘤的主要手段是手术治疗辅以放、化疗。近几十年来手术技术和辅助治疗已经有了很大的发展, 但由于脑胶质瘤富有高度的侵袭性, 浸润到毗邻的脑组织的肿瘤细胞极易导致复发, 胶质瘤患者的预后仍不乐观。尤其是胶质母细胞瘤, 目前其术后患者的两年生存率只有 27.2%^[1], 中位生存期仅为 14 个月左右^[2]。如何杀死残留的瘤细胞, 是留给神经肿瘤学者的一个难题。而由于这些瘤细胞具有

高度的选择性和长效的记忆性, 使得免疫治疗可能成为一个防止肿瘤复发的非常好的治疗手段。

1 胶质瘤的免疫学特征

血脑屏障的存在, 典型的树突细胞(Dendritic Cells, DCs)和淋巴引流系统的缺乏, 以及有研究显示中枢神经系统(central nervous system, CNS)在接受同种异体移植时缺乏排斥反应, 这些现象使得人们之前认为 CNS 是“免疫特惠器官”(Immunologically

Privileged Organ)。但是越来越多的研究表明实际情况并非如此。小胶质细胞已被发现可以表达一些巨噬细胞相关的表面标志物,其中包括 MHC 抗原,因此人们认为它在脑中可以作为提呈细胞(Antigen Presenting Cell, APC)来发挥作用^[3]。此外,尽管有血脑屏障的存在,活化的 T 细胞实际上是可以透过 BBB 进入中枢神经系统的^[4]。大多数的胶质瘤组织中可以发现有淋巴细胞的浸润(Tumor-Infiltration Lymphocyte, TILS),而且这种现象往往预示着好的预后^[5]。体外培养 TILS 的研究发现有肿瘤特异性抗原淋巴细胞的存在,这表示在胶质瘤中已经发生了比较成熟的获得性免疫反应。

尽管如此,胶质瘤患者显示了一定的免疫反应性的缺陷,胶质瘤细胞能够逃避宿主免疫系统的杀伤作用。表现在以下几个方面:(1)研究显示胶质瘤患者全身整体的免疫系统功能缺陷,表现在 T 细胞反应性降低、循环中调节 T 细胞(regulatory T cells, T reg)的增加及单核细胞和 DCs 功能缺陷。(2)胶质瘤细胞本身分泌免疫抑制因子,包括可溶性免疫抑制因子和胶质瘤细胞表面免疫抑制因子。前者如 TGF- β 、PGE2、IL10、GANGs 等,后者如 Fas-FasL、B7-H1(PDL-1)、RCAS1、HLA-G、CD70 等。这些因子或通过抑制免疫细胞的活化和成熟,或通过诱导免疫细胞的凋亡,起到了帮助胶质瘤细胞免疫逃逸的作用^[6]。(3)肿瘤微环境中存在的免疫抑制细胞如 T reg、胶质瘤中浸润的巨噬细胞/小胶质细胞(Glioma-infiltrating macrophages/microglia, GIM)、髓系抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MSDC)也均参与了胶质瘤免疫抑制的过程。

这些免疫缺陷的共同作用下,肿瘤患者本身很难对肿瘤发起有效的免疫反应,在这种免疫抑制的微环境下,肿瘤不断生长。而通过各种手段来增强免疫系统对胶质瘤细胞的靶向作用,就成为了我们对抗肿瘤的重要手段。

2 主动免疫治疗(active immunotherapy)

主动免疫治疗实际上就是人工导入肿瘤细胞的特异性抗原,用来激活体内的主动免疫功能的一种治疗。抗原的来源包括完整的肿瘤细胞、肿瘤蛋白提取物或肿瘤洗脱多肽以及人工合成的多肽。这些抗原或直接注射使用,或致敏树突细胞(树突细胞疫苗)后注射使用,以启动抗肿瘤的 T 细胞免疫反应。这种治疗手段特异性强,疗效高,是当今肿瘤免疫治疗的发展方向,而树突细胞疫苗是目前胶质瘤免疫治疗中研究最多的方法。

2.1 树突状细胞疫苗

免疫反应中专职抗原提呈细胞(APC)的发现和其作用的阐明为肿瘤疫苗发展带上了一个新台阶。在 CNS 中,小胶质细胞有 APC 的作用,但是提取这种细胞技术上还有困难。因此,人们转而从外周循环中提取树突状细胞。树突状细胞是体内最重要的 APC,表达高水平的 MHC1、2 类分子,共刺激分子如 B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、CD40,黏附分子如 LFA-1 α 等,是体内免疫反应的启动者,具有摄取各类抗原的能力,并分泌 IL-2,激活初始 T 细胞,产生免疫应答。

2.1.1 树突状细胞疫苗的理论基础

在胶质瘤中只有很少的 APC,即使有小胶质细胞的存在,其抗原提呈的能力也是很弱的。然而 CD4+Th 细胞的活化和 CD8+细胞毒性 T 细胞的活化都需要抗原提呈过程。因此,在这样的肿瘤微环境中,这两种 T 细胞活化就受到影响,从而影响下一步的免疫反应。为了解决这个问题,人们将各种类型的肿瘤抗原在体外冲击致敏 DCs,然后回输体内,来诱导肿瘤抗原特异性免疫应答。

2.1.2 树突状细胞疫苗的临床试验

2.1.2.1 肿瘤洗脱多肽冲击致敏的树突状细胞

Liau^[4]等用肿瘤洗脱多肽冲击致敏的树突状细胞治疗 12 名胶质瘤患者,结果 1 名患者出现了非常明



显的临床好转。6名患者出现了抗肿瘤细胞毒性反应。这种治疗对进展较慢的和TGF- β 2低表达的肿瘤细胞,治疗的效果较好。

2.1.2.2 肿瘤细胞与DCs融合

肿瘤细胞与DCs的融合细胞荷载了整个肿瘤细胞的抗原肽,它既能表达MHC-I和MHC-II类抗原、共刺激分子、粘附分子和肿瘤表面标记物,又具有处理和呈递肿瘤特异性抗原的能力。Kikuchi等^[7]运用融合瘤苗联合重组人白细胞介素12(rhIL-12)治疗15例胶质瘤患者,磁共振检查显示4例患者的肿瘤体积缩小超过50%。虽然该方法在部分病人身上出现明显的抗癌反应,且无明显不良反应的报道,但缺乏对rhIL-12在抗癌作用方面的对照研究。

2.1.2.3 肿瘤细胞溶解产物致敏的DCs

肿瘤洗脱多肽致敏的DCs和肿瘤细胞-DCs融合的治疗需要数量很多的自体肿瘤细胞,也需要很多时间。为了克服这个缺点,一些学者直接用肿瘤细胞溶解产物来致敏树突细胞,他们发现^[8],60%的肿瘤细胞溶解产物来致敏树突细胞免疫接种后的患者出现了T细胞介导的细胞毒性反应,比洗脱多肽致敏树突细胞组的40%高。

Yamanaka等^[9]选择24例复发恶性胶质瘤患者,接受了肿瘤细胞溶解产物来致敏树突细胞免疫皮下和瘤内接种。一些同时接受瘤内注射,一些皮下注射者,其树突细胞还使用OK-432促进成熟,结果1例有部分临床反应,3例有微弱的反应。和对照组相比,实验组的生存期延长,特别是那些接受成熟DCs接种的和同时接受皮下和瘤内接种者。而最近,Wheeler等^[10]也报道了GBM患者接受肿瘤溶解产物致敏的树突细胞疫苗接种后其介导的免疫反应与肿瘤进展和生存期之间存在着有统计学意义的相关性。目前参与例数最多的DC疫苗的临床试验^[9],报道了56例复发GBM接受了至少三次的自体肿瘤溶解产物致敏的DC免疫接种。试验表明,疫苗接种间

隔越短的患者其无进展生存期越长。

2.1.2.4 人工合成的肿瘤抗原致敏的DCs

人工合成的肿瘤抗原也可用于致敏DCs,最近报道的有EGFRV III^[11],其他合成多肽致敏的DC也在研究当中。此外,由于肿瘤干细胞在肿瘤复发中的重要作用,使用肿瘤干细胞所表达的抗原致敏DC可能是非常有意义的应用前景^[12,13]。

这种肿瘤洗脱多肽和肿瘤细胞提取物冲击致敏的树突状细胞接种的方法,不需要鉴别特异性的肿瘤抗原,在理论上可以减少肿瘤免疫逃逸的发生,但是可能增加了自身免疫病的风险。在一组黑色素瘤患者接受肿瘤溶解物所致敏的树突细胞后,有两例患者患上了白斑病^[14]。目前为止胶质瘤患者中应用DC疫苗尚未报道严重副作用,这个问题还需要人们继续关注。

2.1.2.5 肿瘤细胞RNA或cDNA致敏DC

Yamanka等^[15]研究发现,这种方法不但可延长荷瘤小鼠生存期,而且还可抑制肿瘤的种植转移。但是,这种技术要求较高,非特异性影响因素较多,操作复杂,其发展受到了一定程度的限制。

综上所述,目前对于DC作为脑胶质瘤免疫治疗尚处于起步阶段,已经显示出了广阔的应用前景。但是DC疫苗真正广泛应用于临床尚有一段距离,仍存在许多的问题:如何诱导出数量大、纯度高的DC;特异性肿瘤抗原的选择及合适的DC疫苗回输时间、方式、次数和剂量的选择;脑胶质瘤缺乏特异性的抗原,而用肿瘤全抗原制备的疫苗又有引发自身免疫疾病的危险等,所有这些都需我们去进一步的研究。

2.2 肿瘤细胞疫苗

DCs疫苗的制备都是在体外进行的。但是DCs的分离和体外培养有很高的技术要求、需要严格的培养条件和昂贵的费用。而肿瘤细胞的体外培养则要容易的多,如果能通过肿瘤细胞疫苗在体内高效

的向 DC 递送肿瘤抗原则可大大降低治疗费用。

人们通过对自体肿瘤细胞进行遗传修饰,赋予其更多的免疫原性。如 B7-1、GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)^[16] 和新城病毒 (Newcastle disease virus NDV) 转染胶质瘤细胞。

Steiner 等^[17]对 28 例胶质母瘤患者在接受放射治疗后,皮下免疫接种转染 NDV 的肿瘤细胞,结果,一例术后有肿瘤残留的患者看到了完全的影像学上的改变。总的中位生存期是 23 个月,比常规治疗结果要好。此外,8 例复发胶质瘤手术患者中有 5 位出现显著的 CD8+ 淋巴细胞浸润。这个结果是非常令人鼓舞的。

全胶质瘤相关抗原疫苗的优点是它具有胶质瘤自然表达的肿瘤抗原成分,对肿瘤治疗有较全的免疫原性,但因其制作工艺的繁琐和引起自身免疫性疾病的可能性而限制了其在临床方面的应用。

2.3 多肽类疫苗。

在 50% 的胶质瘤患者中,存在着 EGFR 的变异以及过表达其中 EGFRvIII 是最常见的变异型,可导致酪氨酸激酶的持续的活性,进一步导致肿瘤生长。一组临床试验将针对肿瘤变异的 EGFRvIII 的肽类疫苗与 GM-CSF 一同注入 19 例原发胶质母细胞瘤患者颅内,结果患者无进展生存期为 12 个月,中位生存期超过 18 个月。而且当这些病人复发胶质瘤时,体内就不再有 EGFRvIII 的表达了^[18,19]。虽然结果令人鼓舞,但是这个试验选择病人的标准十分严格,要求肿瘤全部切除,KPS 评分 (Karnofsky performance score) 大于 70。而最新的另一组临床 1 期和 2 期研究也表明,新诊断的 GBM 患者接种针对 EGFRvIII 变异区域多肽的疫苗后,介导产生了有效的 EGFRvIII 特异性免疫反应,而且患者的生存期明显好于历史对照^[20]。

还有一种疫苗是从患者切除的肿瘤组织中提取热休克蛋白 gp96 及其相关多肽 (heat-shock protein-peptide complex, HSPPC-96)。这种疫苗已在肾细胞

癌和黑色素瘤中有了比较成熟的研究。在胶质瘤中的研究刚刚起步。这种疫苗的安全性已经得到证实,也已发现肿瘤特异性免疫反应的证据^[21]。

主动免疫治疗可以导致体内的抗肿瘤的细胞毒性反应,使得一部分患者从中获益。但是还有很多待解决的问题,如细胞体外培养的成功率、回输的频率、注射细胞的数量和注射途径以及鉴定合适的肿瘤抗原仍需进一步研究。

3 过继免疫治疗 (adoptive immunotherapy)

过继免疫治疗是指将已激活的免疫效应细胞输注给肿瘤患者,使其直接在患者体内发挥抗肿瘤的作用,以达到治疗肿瘤的目的。目前研究较多的是运用 T 细胞的过继免疫治疗。

应用较为广泛的过继免疫治疗手段之一是采用淋巴因子激活的杀伤细胞 (lymphokine-activated killer cell, LAK) 治疗。LAK 细胞就是自体的淋巴细胞在 IL2 的条件下体外培养的细胞。在手术切除后的空腔内注入 LAK,由于其杀伤作用并非特异性,往往只有有限的疗效,并有很大的神经毒性。一组临床试验在 40 例复发胶质瘤患者的术中的空腔内,注入 LAK,结果显示患者的中位生存期仅为 9 个月,1 年生存率为 34%^[22]。

相比之下,抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (Cytotoxic T lymphocytes, CTL) 可以选择性的杀死肿瘤细胞。CTL 来源有两种,分别由体外肿瘤特异性抗原反复的刺激外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 和肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 得来。随着各种胶质瘤相关抗原 (glioma-associated antigens, GAA) 的陆续发现,使得即使在没有肿瘤细胞的情况下也能在体外培养针对这些 GAA 的 CD8+ T 细胞。这些抗原包括 IL-13R α 2, TRP-2, AIM-2, HER-2, gp100, MAGE-1, EGFRvIII, EphA2, EphB6^[6] 和 MRP3^[23]。

最近的进展是使用基因工程修饰的淋巴细胞^[24],



特异性的表达针对胶质瘤细胞特异抗原的 T 细胞受体, 这种方法为从外周血淋巴细胞中培育大量的肿瘤特异性淋巴细胞提供了可能, 并显示了很好的治疗前景。

其他的过继免疫治疗还用到了自然杀伤细胞、同种异体 T 淋巴细胞等。尽管 T 细胞治疗前景广阔, 但还是有很多问题含待解决, 例如: T 抑制性细胞对 T 细胞的调节, 以及中枢神经系统的血脑屏障和免疫抑制因子对 T 细胞作用的影响等。但与主动免疫相比, T 细胞治疗又有着自己独特的优势, 即通过对 T 细胞进行体内操作可赋予 T 细胞一定的功能来克服脑组织微环境的一些限制。值得一提的是 CD4+T 细胞和 NK 细胞也可以作为 T 细胞治疗的主体, 使得 T 细胞治疗不局限于 CD8+T 细胞^[25]。

4 其他类型的免疫治疗

4.1 抗体

由于分子量大而难以穿越血脑屏障等原因, 抗体在胶质瘤免疫治疗中的应用还存在挑战, 尽管如此, 目前针对这方面的研究仍取得了一定进展。针对 EGFR 和 EGFRvIII 的单克隆抗体—西妥昔单抗可增强放化疗的抗肿瘤效应。更有研究显示, 复发的 EGFR 阳性的胶质瘤患者对单纯应用西妥昔单抗有效^[26]。

4.2 放射免疫治疗(radioimmunotherapy, RIT)。

RIT 是将放射性同位素与抗体结合, 以肿瘤相关抗原为靶点的治疗方法, 从而将辐射量集中于肿瘤, 而对正常组织影响较小。此种治疗的给药途径一般是在切除肿瘤后注入术后空腔。胶质瘤中研究较多的肿瘤相关抗原靶点是 Tenascin。研究已显示抗 Tenascin 的抗体 81C6 与 I131 结合可以提高胶质瘤患者的生存期^[27]。

研究中的其他抗原靶点还有 DNA/histone HI complex, fibronectin, IL-2 受体, EGFR 等。

4.3 配对导向毒素

研究发现包括 IL-4R 和 IL-13R α 2 在内的多种细胞因子受体在胶质瘤细胞中上调。因此人们通过将细胞因子与毒素融合以达到特异性的杀死肿瘤细胞的目的, 称为配对导向毒素(Coupled Targeted Toxins)。现在研究当中的有以下几种: IL4-假单胞菌外毒素(IL4- Pseudomonas exotoxin, PE), IL13-PE, TG-F α -PE, 运铁蛋白-白喉毒素 (Transferrin-Diphtheria Toxin)。

4.4 其他免疫调节疗法

T 细胞表面表达的细胞毒性 T 细胞相关抗原 4 (cytotoxic T-lymphocyte A-4, CTL-A4)对 T 细胞可起到了抑制性的作用, 它与 APC 表面的共刺激分子 B7 结合而导致其不能发挥正常作用, T 细胞就会呈现“无能”状态。因此, 阻断 CTL-A4 可以促进 T 细胞反应性和抗肿瘤免疫性。关于这种治疗的临床试验, 对其他肿瘤治疗中有报道, 但还没用于胶质瘤的治疗; TGF- β 是一种胶质瘤细胞分泌的免疫抑制因子, 因此抑制 TGF- β 也可能是一种有效的治疗方法, 现在已有几种方法如反义寡核苷酸技术、TGF- β 受体 I 激酶抑制剂及抗 TGF- β 抗体等; T_{reg} 可以抑制 T 细胞的激活和增殖, 因此通过抑制这种 T 细胞的活性也可以增加机体抗肿瘤免疫反应。

5 小结

综上所述, 胶质瘤特别是恶性胶质瘤一直是围绕临床的难题, 免疫治疗是除手术治疗和放、化疗之外的又一种治疗方法, 经过大量的基础和临床研究也证明了其有效性和可行性。随着人们对免疫学、胶质瘤免疫生物学、分子生物学的研究不断深入, 研究者们也提出了一些新的治疗策略, 部分动物实验也显示了令人鼓舞的结果。虽然目前还是一种有待成熟的治疗方法, 但其广阔的应用前景值得我们继续研究和实践。

参考文献

[1] Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy

with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*, 2009, 10: 459-466.

[2] STUPP R, MASON WP, VAN DEN BENT MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 2005, 352: 1036-1038.

[3] GRIFFIN DE. Immune responses to RNA-virus infection of the CNS. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3: 493-502.

[4] LIAU LM, PRINS RM, KIERTSCHER SM, et al. Dendritic cell vaccination in glioblastoma patients induces systemic and intracranial T cell responses modulated by the local CNS tumor microenvironment. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 5515-5525.

[5] DUNN GP, DUNN IF, CURRY WT. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma. *Cancer Immun*, 2007, 7: 12-29.

[6] Hideho Okada, Gary Kohanbash, Xinmei Zhu, et al. Immunotherapeutic approaches for glioma. *Crit Rev Immunol*, 2009, 29 (1): 1-42.

[7] Kikuchi T, Akasaki Y, Abe T, et al. Vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells and recombinant human interleukin 12. *J Immunother*, 2004, 27(6): 452-459.

[8] YU JS, WHEELER CJ, ZELTZER PM, et al. Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. *Cancer Res*, 2001, 61: 842-847.

[9] YAMANAKA R, HOMMA J, YAJIMA N, et al. Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: results of a clinical phase I/II trial. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 4160-4167.

[10] WHEELER CJ, BLACK KL, LIU G, et al. Vaccination elicits correlated immune and clinical responses in glioblastoma multiforme patients. *Cancer Res*, 2008, 68: 5955-5964.

[11] Sampson JH, Archer GE, Mitchell DA, et al. An epidermal growth factor receptor variant III-targeted vaccine is safe and immunogenic in patients with glioblastoma multiforme. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2009, 8(10): 2773-2779.

[12] Stupp R, Hegi ME. Targeting brain-tumor stem cells. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(2): 193-194.

[13] Ahmed N, Salsman VS, Kew Y, et al. HER2-specific T cells target primary glioblastoma stem cells and induce regression of autologous experimental tumors. *Clinical Cancer Research*, 2010, 16 (2): 474-485.

[14] NESTLE FO, ALLJAGIC S, GILLIET M, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*, 1998, 4: 328-332.

[15] Yamanka R, Zullo SA, Tanaka R, et al. Enhancement of anti-

tumor immune response in glioma models in mice by genetically modified dendritic cells pulsed with Seemliki Forest Virus-mediated complementary DNA. *J Neurosurg*, 2001, 94(3): 474-481.

[16] PARNEY IF, CHANG LJ, FARR-JONES MA, et al. Technical hurdles in a pilot clinical trial of combined B7-2 and GM-CSF immunogene therapy for glioblastomas and melanomas. *J Neurooncol*, 2006, 78: 71-80.

[17] STEINER HH, BONSANTO MM, Beckhove P, et al. Anti-tumor vaccination of patients with glioblastoma multiforme: a pilot study to assess feasibility, safety, and clinical benefit. *J Clin Oncol*, 2004, 22: 4272-4281.

[18] HEIMBERGER AB, CROTTY LE, ARCHER GE, et al. Epidermal growth factor receptor vIII peptide vaccination is efficacious against established intracerebral tumors. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 4247-4254.

[19] HEIMBERGER AB, HUSSAIN SF, ALDAPE K, et al. Tumorspecific peptide vaccination in newly-diagnosed patients with GBM. *J Clin Oncol*, 2006, 24: 1072.

[20] SAMPSON JH, ARCHER GE, MITCHELL DA, et al. Tumor-specific immunotherapy targeting the EGFRvIII mutation in patients with malignant glioma. *Semin Immunol* 2008, 20: 267-275.

[21] PARSA AT, CRANE C, WILSON S, et al. Autologous tumor derived gp96 evokes a tumor specific immune response in recurrent glioma patients that correlates with clinical response to therapy. *AACR-NCI-EORTC International Conference Molecular Targets and Cancer Therapeutics* 2007, abstract C274; 2007.

[22] DILLMAN RO, DUMA CM, SCHILTZ PM, et al. Intracavitary placement of autologous lymphokine-activated killer (LAK) cells after resection of recurrent glioblastoma. *J Immunother*, 2004, 27: 398-404.

[23] Kuan CT, Wakiya K, Herndon JE II et al. MRP3: a molecular target for human glioblastoma multiforme immunotherapy. *BMC Cancer*, 2010, 10: 468.

[24] YAGHOUBI SS, JENSEN MC, SATYAMURTHY N, et al. Noninvasive detection of therapeutic cytolytic T cells with 18F-FH-BG PET in a patient with glioma. *Nat Clin Pract Oncol*, 2009, 6: 53-58.

[25] Hunder NN, Wallen H, Cao J, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med*, 2008, 358(25): 2698-2703.

[26] Belda-Iniesta C, Carpeno JC, Saenz EC, et al. Long term responses with cetuximab therapy in glioblastoma multiforme. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(8): 912-14.

[27] Aarts F, Bleichrodt RP, Oyen WJ, et al. Intracavitary radioimmunotherapy to treat solid tumors. *Cancer Biother Radiopharm*, 2008, 23(1): 92-107.



P120 连环素及 Bmi-1 在乳腺癌中的表达及临床意义

张建兵¹, 黄 荣², 朱兴华¹, 何 松¹, 陶 玉¹, 陆晓云¹

(1.江苏省南通大学附属肿瘤医院病理科, 江苏南通市 226361; 2.江苏省海门市第四人民医院病理科)

摘要:目的:探讨 P120 及 Bmi-1 在乳腺浸润性导管癌中的表达及其与临床病理特征的关系。方法:采用免疫组化方法检测 135 例乳腺浸润性导管癌组织中 P120, Bmi-1 及 ER, PR, c-erbB-2 表达情况, 并检测了 20 例乳腺增生症中 P120, Bmi-1 表达情况。结果:P120 异常表达率及 Bmi-1 高表达率在 135 例乳腺浸润性导管癌中分别为 67.4% 和 48.1%, 在 20 例乳腺增生症中分别为 5% 和 10%, 以上两组之间有显著性差异($P < 0.01$)。P120 异常表达与高组织学分级、淋巴结转移、和临床较晚分期均有明显相关性($P < 0.05$)。Bmi-1 高表达与淋巴结转移、临床较晚分期均有明显相关性($P < 0.05$)。并且, P120 异常表达与 Bmi-1 高表达呈显著正相关($r = 0.259, P < 0.01$)。结论:P120 异常表达与 Bmi-1 高表达在乳腺癌的发生及发展过程中可能发挥了协同或相关的作用。P120 与 Bmi-1 有可能成为预测乳腺浸润性导管癌生物学行为及指导靶向治疗的新的分子标志物。

关键词:乳腺肿瘤; P120; Bmi-1; 免疫组织化学; 临床病理

EXPRESSION AND CLINICAL SIGNIFICANCE OF P120 CATININ AND BMI-1 IN INVASIVE MAMMARY DUCTAL CANCER

ZHANG Jianbing¹, HUANG Rong¹, ZHU Xinhua¹, HE Song¹, TAO Yu¹, LU Xiaoyun¹

(1. Department of Pathology, the Affiliated Cancer Hospital, Nantong University, Jiangsu Province, Nantong 226361, P. R. China; 2. Department of Pathology, The Fourth People's Hospital of Haimen City)

Abstract: Objective: To investigate the relationship between the expression of P120, Bmi-1 and clinicopathological characteristics in invasive mammary ductal cancer. **Methods:** The immunohistochemical staining was performed to detect the expression of P120, Bmi-1 and ER, PR, c-erbB-2 in 135 cases with invasive mammary ductal carcinoma and detect the expression of P120, Bmi-1 in 20 cases of mammary adenosis. **Results:** The rate of P120 aberrant expression and Bmi-1 overexpression were 67.4% and 48.1%, respectively in 135 cases with invasive mammary ductal carcinoma, and were 5% and 10%, respectively in 20 cases of mammary adenosis. Significant relationships were found among P120 aberrant expression and high histologic grades, lymph node metastasis and TNM staging ($P < 0.05$), among Bmi-1 overexpression and lymph node metastasis and TNM staging ($P < 0.05$). Furthermore, the aberrant expression of P120 was correlated with the overexpression of Bmi-1 ($r = 0.259$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The aberrant expression of P120 and overexpression of Bmi-1 are likely to have synergistic or related effect in the genesis and progression of invasive mammary ductal cancer. P120 and Bmi-1 may have the possibility to serve as new biomarkers for predicting the biological behavior and targeting treatment for the patients with invasive mammary ductal carcinoma.

Keywords: Breast; neoplasm; P120; Bmi-1; Immunohistochemistry; Clinicopathology

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤,近年来其发病率呈上升趋势,发病年龄呈年轻化趋势。侵袭和转移是恶性肿瘤最重要也是最本质的生物学特征,是恶性肿瘤患者死亡的主要原因。深入研究乳腺癌侵袭和转移的分子生物学机制可以加深对乳腺癌侵袭转移调控机制的认识,同时也为乳腺癌侵袭转移的早期诊断、预测预后及发现治疗靶标提供必要的理论基础。

连环素(Catenin)可与 E 钙粘素(E-Cadherin)形成连环素-钙粘素复合体(Catenin Cadherin Complex, CCC),CCC 中任何一种分子表达异常都可能反映其正常结构和(或)功能受到破坏并可能导致细胞恶性转化。P120 连环素(P120)是 Catenin 家族新成员,其与 E-Cadherin 的连接具有特殊性^[1]研究认为,在细胞粘附、发育和肿瘤发生过程中,p120^{ctn}可控制 E-Cadherin 的表达水平^[2-4]。已有许多研究证实,p120^{ctn}和 E-Cadherin 的异常表达与多种肿瘤的浸润和转移等恶性特征具有明显相关性^[2-7]。

Bmi-1 基因(B cell-specific MLV integration site-1)是多梳基因家族(polycomb group, PcG)中重要成员之一,参与干细胞的增殖、分化与衰老,并在多种肿瘤形成过程中起重要作用。近年来,在人类多种恶

性肿瘤中已发现有 Bmi-1 基因^[8],如胃癌、结肠癌、非小细胞肺癌、乳腺癌及部分淋巴造血系统肿瘤等。

本研究旨在通过检测 P120、Bmi-1、雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)及 c-erbB-2 基因蛋白在乳腺浸润性导管癌组织中的表达,分析 P120、Bmi-1 表达与乳腺癌 ER、PR、c-erbB-2 表达及临床病理特征的相关性,探讨能反映乳腺癌侵袭和转移能力的客观指标及治疗乳腺癌的潜在分子靶标。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集南通大学附属肿瘤医院 2008 年 1 月至 2010 年 12 月进行乳腺癌改良根治手术、且临床资料完整的女性乳腺浸润性导管癌患者病例 135 例,所有病例术前均未行放化疗。135 例乳腺癌中,患者年龄 32~79 岁,>50 岁者 71 例,≤50 岁者 64 例,中位年龄 54 岁。无淋巴结转移 81 例,发生淋巴结转移 54 例(1~3 枚淋巴结转移 36 例,≥4 枚淋巴结转移 18 例)。肿瘤直径:≤3cm 者 69 例,>3cm 者 66 例。组织学分级:I~II 级 87 例,III 级 48 例。TNM 分期:I~II 期 108 例,III~IV 期 27 例。对 135 例乳腺癌均用免疫组化方法检测了 P120、Bmi-1、ER、PR 及 c-erbB-2



的表达。收集本院 20 例乳腺增生症住院手术病例均检测了 P120、Bmi-1 表达作为对照,患者年龄 27~72 岁,中位年龄 46 岁。所有组织标本均经 10%中性甲醛固定,石蜡包埋。

1.2 试剂与方法

1.2.1 免疫组织化学方法

所有组织块均为常规固定包埋,进行 4 μm 厚切片,经脱蜡、水化后,Bmi-1 标记采用免疫组化 SP 法染色,EDTA 高压锅热修复;P120 及其余标记采用免疫组化 Envision 二步法染色,枸橼酸盐高压锅热修复。DAB 显色,苏木素复染胞核。用 PBS 代替一抗作阴性对照,用已知阳性标本切片作阳性对照。鼠抗人单克隆抗体 Bmi-1(1:50)购自美国 Abcam 公司;鼠抗人单克隆抗体 P120(1:60)、兔抗人单克隆抗体 ER(1:170)、兔抗人单克隆抗体 PR(1:150)、兔抗人单克隆抗体 c-erbB-2(1:150)及 SP 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司;Envision 试剂盒购自 DaKo 公司。

1.2.2 结果判断标准

P120 棕黄色颗粒定位于细胞膜为正常表达,细胞膜表达缺失、显著减弱或/和细胞质明显表达为异常表达。Bmi-1 棕黄色颗粒定位于细胞核和细胞质,采用半定量方法判断结果,即根据阳性细胞百分比以及阳性细胞染色强弱判断免疫组化结果。A:按阳性细胞百分比记分,阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为 0 分,阳性细胞数 11%~25%为 1 分,阳性细胞数 26%~50%为 2 分,阳性细胞数 51%~75%为 3 分,阳性细胞数 76%~100%为 4 分。B:按细胞染色强弱记分,无阳性反应细胞为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。根据 A、B 两项之乘积判断其结果,如在同一病变中存在多个不同评分的视野,则取最大值和最小值的平均值作为免疫组化评分, ≤ 4 分判断为低表达(-), >4 分判断为高表达(+).

ER、PR 阳性物质定位于细胞核,c-erbB-2 阳性

物质定位于细胞膜,每例切片至少观察 10 个高倍视野,将肿瘤细胞超过或等于 30%阳性染色的病例定为阳性表达(+),小于 30%阳性染色的病例定为阴性表达(-),

1.3 统计学方法

采用 STATA10.0 统计软件包进行统计学分析,率的比较采用 χ^2 检验,当样本含量较小,且有理论数小于 5 时,采用 Fisher 确切概率检验。应用 Spearman 等级相关分析处理不同指标间的相关性。以 P 值 <0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 P120 蛋白在乳腺浸润性导管癌及乳腺增生症中的表达

135 例乳腺浸润性导管癌中,P120 免疫标记 44 例(32.6%)为细胞膜正常表达(图 1-1a),91 例(67.4%)为细胞异常表达(细胞膜表达缺失、显著减弱或/和细胞质明显表达,图 1-1b)。20 例乳腺增生症中 P120 在细胞膜正常表达 19 例(占 95.0%),在细胞膜表达缺失 1 例(占 5%),两组之间有显著性差异($P<0.01$)。P120 表达与肿瘤组织学分级、淋巴结转移、临床分期均有明显相关性($P<0.05$),即在组织学分级为低级别组、无淋巴结转移组、临床 TNM 分期为 I~II 期的肿瘤组织中可见 P120 蛋白高表达,反之亦然(表 1)。而 P120 蛋白表达与患者年龄、肿瘤大小、及 ER、PR、c-erbB-2 表达间均未见明显相关性($P>0.05$)。

2.2 Bmi-1 蛋白在乳腺浸润性导管癌及乳腺增生症中的表达

135 例乳腺浸润性导管癌中,Bmi-1 蛋白高表达 65 例(占 48.1%,图 1-1c-1d),20 例乳腺增生症中 Bmi-1 蛋白高表达 2 例(占 10.0%),两组之间有显著性差异($P<0.01$)。Bmi-1 蛋白表达与淋巴结转移、临床分期均有明显相关性($P<0.05$),即在无淋巴结转移组、临床 TNM 分期为 I~II 期的肿瘤组织中可见

Bmi-1 蛋白低表达,反之亦然(表 1)。而 Bmi-1 蛋白表达与患者年龄、肿瘤大小、肿瘤组织学分级及 ER、PR、c-erbB-2 表达间均未见明显相关性($P>0.05$)。

表 1 P120、Bmi-1 蛋白表达与乳腺浸润性导管癌临床病理特征的关系

组别	n	P120		Bmi-1	
		异常表达(%)	P 值	高表达(%)	P 值
年龄					
>50 岁	71	47(66.2)	>0.05	34(47.9)	>0.05
≤50 岁	64	44(68.7)		31(48.4)	
肿瘤大小					
≤3cm	69	43(62.3)	>0.05	29(42.0)	>0.05
>3cm	66	48(72.7)		36(54.6)	
组织学分级					
低级别组	87	51(58.6)	0.002	38(43.7)	>0.05
高级别组	48	40(83.3)		27(56.3)	
淋巴结转移					
无转移	81	47(58.0)	0.005	25(30.9)	0.000
有转移	54	44(81.5)		40(74.1)	
TNM 分期					
I、II 期	108	67(62.0)	0.010	46(42.6)	0.017
III、IV 期	27	24(88.9)		19(70.4)	
ER					
阳性	70	44(62.9)	>0.05	28(40.0)	>0.05
阴性	65	47(72.3)		37(56.9)	
PR					
阳性	58	37(63.8)	>0.05	24(41.4)	>0.05
阴性	77	54(70.1)		41(53.3)	
cerbB-2					
阳性	55	42(76.4)	>0.05	24(43.6)	>0.05
阴性	80	49(61.2)		41(51.3)	

2.3 乳腺浸润性导管癌中 P120 蛋白异常表达与 Bmi-1 蛋白表达的关系

本组 135 例乳腺浸润性导管癌组织同时进行了 P120 及 Bmi-1 免疫组化标记,在 44 例 P120 免疫标

记为细胞膜正常表达病例中,13 例(29.6%)为 Bmi-1 高表达;在 91 例 P120 免疫标记为异常表达病例中,52 例(57.1%)为 Bmi-1 高表达。经统计学分析显示,乳腺浸润性导管癌组织中 P120 异常表达与 Bmi-1 高表达呈显著正相关($r=0.259, P<0.01$),见表 2。

表 2 乳腺浸润性导管癌组织中 P120 异常表达与 Bmi-1 高表达的相关性

P120	n	Bmi-1		χ^2	P 值	r 值
		高表达(%)	低表达(%)			
异常表达	91	52(57.1)	39(42.9)	9.048	0.003	0.259
正常表达	44	13(29.6)	31(70.5)	44		

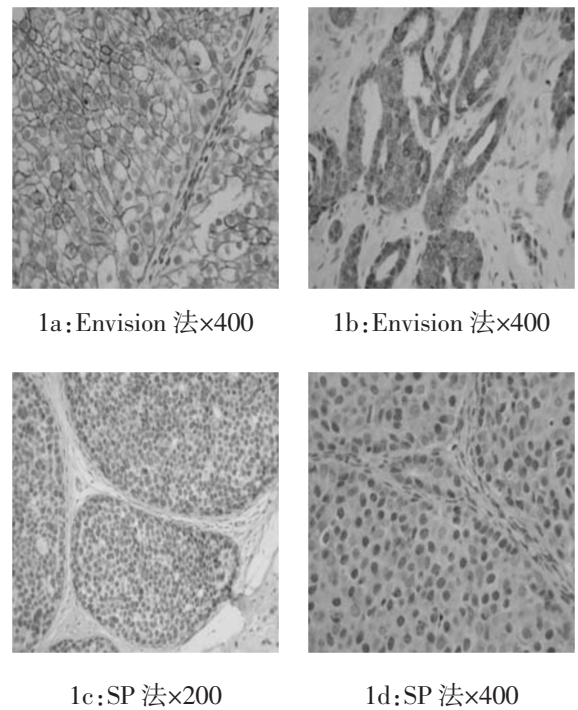


图 1 P120 及 Bmi-1 在乳腺浸润性导管癌组织中的表达

1a: positive expression of P120 of cell membrane in invasive mammary ductal cancer; 1b: aberrant expression of P120 of cytoplasm in invasive mammary ductal cancer; 1c and 1d: overexpression of Bmi-1 of nucleus and cytoplasm in invasive mammary ductal cancer.



3 讨论

已有研究显示,多种基因相互激活与失活、各种信号转导通路的相互作用在乳腺癌的发生、发展过程中构成了一个复杂的基因调控网络结构。

连环素(Catenin)是一组具有相似结构的链蛋白家族,P120属于连环素家族的成员,在正常成熟细胞中能与E钙粘素(E-Cadherin)形成连环素-钙粘素复合体(Catenin Cadherin Complex,CCC),在维持上皮细胞的结构完整性和抑制肿瘤的侵袭转移过程中发挥重要作用。研究表明在乳腺癌细胞中E-Cadherin表达的减少或缺失,主要是通过激活Wnt信号传导通路引起的^[9]。而P120与E-Cadherin胞质近膜端(juxtamembrane domain, JMD)结合^[10],并且能调控E-Cadherin的表达水平^[2-4]。研究显示P120的异常表达与结肠癌、肺癌的较强侵袭性和不良预后有关^[11-12]。

本研究发现,在20例乳腺增生症中19例(95.0%)P120免疫组化标记呈细胞膜正常表达,而在135例乳腺浸润性导管癌中,44例(32.6%)P120免疫标记为细胞膜正常表达,91例(67.4%)为细胞异常表达,两组之间具有显著性差异($P<0.01$)。提示在乳腺上皮恶性转化过程中,P120蛋白在乳腺上皮细胞膜表达显著减低、失表达或异常表达。P120表达与肿瘤组织学分级、淋巴结转移、临床分期均有明显相关性($P<0.05$),即在组织学分级为高级别组、有淋巴结转移组及临床分期为较晚期患者的肿瘤组织中P120异常表达率显著增高。由于CCC复合体是细胞间粘附的主要调节因子,因此CCC中任何一种分子表达异常(包括了P120表达异常)都可能导致细胞失分化,并有利于恶性肿瘤细胞脱离原有部位,浸润周围组织,转移到淋巴结和远处器官,使得患者预后较差。

Kim等^[13]研究发现,Bmi-1高表达与乳腺癌腋下淋巴结转移和ER阳性呈正相关。Silva等^[14]首次报道

了乳腺癌病例血浆中Bmi-1检测分析,研究显示,血浆中Bmi-1高表达与乳腺癌P53阳性及PR阴性呈正相关,并与晚期乳腺癌患者的不良预后有关。

本研究显示,在20例乳腺增生症中2例(10.0%)Bmi-1蛋白免疫标记呈高表达,而在135例乳腺浸润性导管癌中65例(48.1%)Bmi-1蛋白高表达,两组之间有显著性差异($P<0.01$)。提示在乳腺上皮恶性转化过程中,Bmi-1蛋白呈显著高表达。Bmi-1蛋白表达与淋巴结转移、临床分期均有明显相关性($P<0.05$),即Bmi-1蛋白高表达的患者更容易发生淋巴结转移及处于临床较晚期。

Bmi-1是多梳基因家族中重要成员之一,参与干细胞的增殖、分化与衰老,在多种肿瘤发生发展过程中发挥重要作用。Suling等^[15]研究显示,Hedgehog信号通路调节人体乳腺干细胞的自我更新可能是通过Bmi-1介导的。因此乳腺癌细胞中Bmi-1高表达可能反映肿瘤细胞具备了肿瘤干细胞(Cancer Stem Cells)样的特征,从而获得了更强的自我更新能力和侵袭转移能力。

本研究表明,乳腺浸润性导管癌组织中P120异常表达与Bmi-1高表达呈显著正相关($r=0.259, P<0.01$),并且P120异常表达与Bmi-1高表达均与乳腺癌患者淋巴结转移及临床较晚分期有关($P<0.05$),提示在乳腺癌的发生发展过程中,P120与Bmi-1可能发挥了协同或相关的作用,P120与Bmi-1有可能成为预测乳腺浸润性导管癌生物学行为及指导靶向治疗的新的分子标志物,但其具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Reynolds AB. P120-Catenin: Past and present[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773(1): 2-7.
- [2] Talvinen K, Tuikkala J, Nykanen M, et al. Altered expression of P120 catenin predicts poor outcome in invasive breast cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136: 1377-1387.
- [3] Chetty R and Serra S. Nuclear E-cadherin immunorepression from biology to potential applications in diagnostic pathology[J]. *Adv Anat Pathol*, 2008,15(4): 234-240.

- [4] Chetty R, Jain D and Serra S . P120 catenin reduction and cytoplasmic relocation leads to dysregulation of E-cadherin in solid pseudopapillary tumors of the pancreas[J]. Am J Clin Pathol, 2008, 130: 71-76.
- [5] Rakha EA, Patel A, Powe DG, et al. Clinical and biological significance of E-cadherin protein expression in invasive lobular carcinoma of the breast[J]. Am J Surg Pathol, 2010, 34(10):1472-1478.
- [6] Zhai B, Yan HX, Liu SQ, et al. Reduced expression of P120 catenin in Cholangiocarcinoma correlated with clinicopathologic parameters[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(23): 3739-3744.
- [7] Neto BS, Smith GL, Mandeville JA, et al. prognostic significance of altered P120ctn expression in bladder cancer[J]. BJU Int, 2008, 101(6): 746-752.
- [8] Glinsky W, Gennadi V, Berezovska J, et al. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer[J]. J Clin Invest, 2005, 115(6):1503-1519.
- [9] Nong CZ, Pan LL, He WS, et al. P120ctn overexpression enhances beta-catenin-E-cadherin binding and down regulates expression of survivin and cyclin D1 in BEL-7404 hepatoma cells [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(8): 1187-1191.
- [10] Hengel JV and Roy FV. Diverse functions of P120ctn in tumors[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1773(1): 78-88.
- [11] Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, et al. Altered localization of P120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease[J]. Cancer Res, 2005, 65: 10938-10945.
- [12] Wang EH, Liu Y, Xu HT, et al. Abnormal expression and clinicopathologic significance of P120-catenin in lung cancer [J]. Histol Histopathol, 2006, 21: 841-847.
- [13] Kim JH, Yoon SY, Jeong SH, et al. Overexpression of Bmi-1 oncoprotein correlates with axillary lymph node metastases in invasive ductal breast cancer[J]. Breast, 2004, 13(5): 383-388.
- [14] Silva J, Garcia V, Garcia JM, et al. Circulating Bmi-1 mRNA as a possible prognostic factor for advanced breast cancer patients[J]. Breast Cancer Res, 2007, 9(4): R55.
- [15] Liu S, Dontu G, Mantle ID, et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate Self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(12): 6063-6071.



PROTEOMIC ANALYSIS OF HUMAN EPITHELIAL OVARIAN CANCER XENOGRAFTS IN IMMUNODEFICIENT MICE EXPOSED TO CHRONIC PSYCHOLOGICAL STRESS

GAO Jun, GAO GuoLan*, XIONG Lijuan, ZHANG Yanyu, WANG Fen
(Department of Gynecology, General Hospital of CAAC, Beijing 100012, China)

Abstract: This study aims to compare alterations in the proteomes of human epithelial ovarian cancer xenografts between the stressed and non-stressed immunodeficient mice. Also, to explore the molecular mechanisms linking chronic psychological stress to ovarian cancer oncogenesis and progression. **Methods:** SK-OV-3 cells were injected subcutaneously into nude mice. The stress group was subjected to a chronic physical restraint protocol for 6 h on 35 consecutive days, while the control group was unrestrained. All mice were sacrificed on Day 36 after SK-OV-3 cell injection, and tumors were excised. Tumor tissues were processed for 2D gel electrophoresis, mass spectrometry (nanoUPLC-ESI-MS/MS) and western blotting. **Results:** The expression of twenty proteins was found to be significantly altered between the stress and control groups, of which fourteen were up-regulated, five were down-regulated, and one protein was found only in the stress group. All proteins were identified by UPLC-ESI-MS/MS, and western blotting results were consistent with those of proteomic methods. **Conclusions:** The present results provide new evidence relating to the molecular mechanism underlying the relationship between psychological stress and tumor progression.

Keywords: proteomic; psychological stress; ovarian cancer; 2-D electrophoresis; UPLC-ESI-MS/MS

肝癌转移分子机制与分子预测的研究进展和趋势

周海军 综述, 钦伦秀 审校

(复旦大学附属中山医院, 上海 200032)

转移是恶性肿瘤最重要的生物学表型, 是影响恶性肿瘤预后的首要因素。癌转移的过程是一个多因素参与、多阶段发展极其复杂的动态过程, 涉及癌细胞本身(肿瘤细胞异质性等)、癌与微环境及机体(包括免疫、内分泌、神经、代谢等)之间相互作用等多方面因素。肿瘤转移可以简单地概括为以下的连续过程: 1) 原发灶的肿瘤细胞获得侵袭转移潜能。2) 侵袭转移能力的癌细胞离开原发瘤进入血循环。3) 癌细胞到达转移靶器官后定居并生长。近年来围绕肿瘤转移的机制各国学者已进行了大量的研究, 取得了许多进展。在研究转移复发分子机制的同时大量的潜在分子预测标志物也应运而生。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上常见的癌症之一, 其发病率仍在上升。本文以肝细胞癌为例, 围绕肿瘤转移的主要过程, 简要介绍肿瘤转移复发分子机制和分子预测的发展现状与趋势。同时鉴于炎症免疫在肿瘤转移中的重要作用以及它贯穿于肿瘤转移的各阶段, 故将癌相关炎症免疫单独讨论。

1 癌细胞侵袭转移潜能的获得

1.1 肿瘤细胞自身遗传学特性与肿瘤转移潜能的关系

癌细胞获得侵袭转移能力是完成转移过程的前提, 但并非所有癌细胞都有这种能力并完成整个过程。经典理论认为转移是癌细胞高度克隆选择的过

程, 在原发瘤中仅少数细胞具有转移潜能, 癌进展中部分细胞获得更多的遗传学改变, 从而获得转移能力, 因此转移发生在晚期^[1,2]。一方面笔者曾利用全基因组分子遗传学技术比较 10 对原发瘤与转移灶基因组变化, 发现染色体 8p 缺失与肝癌转移关系最为明显, 可预测转移复发^[3]。新近我们证实 8p 上的肿瘤抑制基因 HTPAP 的特殊基因型与肝癌的转移和临床预后密切相关^[4]。另一方面, 临床上常见肿瘤很小、很早已出现远处转移, 甚至原发瘤隐匿不现而全身转移, 且许多病理诊断相同、临床特征相似的患者预后完全不同。近年笔者及其团队利用 cDNA 微阵列技术研究发现肝癌转移基因改变在原发瘤阶段即已存在^[5], 并成功建立了由 153 个基因组成的肝癌转移分子预测模型。此后其它的肝癌基因表达谱研究也有相似结论^[6-8]。这些发现提示转移潜能的获得是癌的早期事件^[9]。如何理解这两种不同的结论? 笔者及其团队通过对肝癌转移复发分子机制研究的系统解析, 提出“肿瘤转移潜能在原发瘤阶段即已获得, 在进展进程中, 受内外因素等影响而调变”的新观点, 进一步完善和充实经典的肿瘤转移理论。

1.2 干细胞与肿瘤转移潜能的关系

肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC)是肿瘤群体中具有自我更新、分化和稳态控制能力的细胞亚群, 尽管它们占全部肿瘤细胞的微小一部分, 然而正是



这些 CSCs 亚群是肿瘤恶性进程的关键起始者^[10]。目前我们已从乳腺癌、肝癌、大肠癌、前列腺癌、胃癌、肺腺癌、胰腺癌等实体瘤中根据各自不同的表面标记分离出具有干细胞特征的细胞亚群^[11]，但问题是：这些 CSCs 是癌固有的还是进展中诱生的？CSC 与肿瘤侵袭转移的关系？Brabletz 等^[12]提出转移癌干细胞的概念(Migrating cancer stem, MCSC)，认为并非每个 CSC 都有转移能力，仅小部分 CSC 具有转移能力。近年研究表明，肿瘤干细胞及其微环境之间相互作用不容忽视。肿瘤细胞的微环境或 CSC 的微环境是由多种间质细胞以及其分泌的细胞因子构成的，对 CSC 的存活及干性的维持起到了重要的调控作用，其机制有待于深入研究^[9]。最近发展的将终末分化细胞诱导为干细胞样细胞的“重编程”技术为 CSC 研究提供了独特的研究思路 and 平台^[13-14]。人工诱导具有多向分化潜能的癌细胞(induced pluripotent cancer, iPC)具有 CSC 特性，目前已成功诱导直肠癌等多种癌症患者的 iPC^[15-16]。

随着对肿瘤干细胞的研究，人们也发现肿瘤干细胞相关分子也有预测肝癌预后的潜能。通过免疫组化的分析发现肿瘤干细胞相关标志物 CD133 对肝癌预后具有预测价值^[17]。Villanueva 等^[18]发现肿瘤抑制基因 TP53 基因的突变会使肝癌细胞具有了干细胞样基因表达特征，这些能预示肝癌患者的预后。Yamashita 等^[19]研究发现用肝癌组织表达的肝癌干细胞相关标志物 EpCAM 结合 AFP 可以对肝癌患者进行预后的分层，并可能指导术后治疗。另有研究报道肝癌干细胞中 GEP 和 ABCB5 的表达明显与肝癌患者对化疗的抵抗和总生存时间^[20]。

1.3 癌细胞上皮-间质转化(EMT)与肿瘤细胞转移潜能的关系

在癌进展过程中，进展的癌细胞常表现出内皮标志物的明显下调以及细胞间连接的缺失，导致细胞极性的缺失、细胞间黏附降低和运动能力的增强。

这一过程称为上皮细胞间质转化(Epithelial-mesenchymal transitions, EMT)。研究发现细胞可通过多种途径启动并进行 EMT。肿瘤细胞发生 EMT 即可以是瞬时的，也可以是永久的，而且是不同程度的，有时还可以出现逆转化(mesenchymal-Epithelial transitions, MET)^[21]。已发现的调控 EMT 的转录因子有 Snail, Slug, Twist, Goosecoid, ZEB1, SIP1, FoxC2, HOXB7, TCF3, CBF-A 和 E12/E47 等十种以上，其中研究较多的是 Snail, Twist 和 ZEB1。其下游激酶，如 Ras、Src、PI3K、MAPK 等均被认为可促进恶性表型。Src 激活可增加侵袭性并促进 E-cadherin 的降解^[22]。而且越来越多的证据表明肿瘤细胞与邻近的肿瘤相关基质细胞之间的相互作用诱导肿瘤细胞 EMT 也是通过上述转录因子。最近研究证实 EMT 能诱导非癌 SCs 进入 CSCs 状态，肿瘤 EMT 进程的激活通常需要癌细胞和邻近基质细胞间的信号互换，进展的原发癌细胞可募集各型细胞：成纤维细胞，肌纤维细胞，粒细胞，巨噬细胞间叶细胞和淋巴细胞，进入周围基质，这些募集的细胞形成了一种“反应性”基质，诱导 EMT 信号释放，通过激活 EMT 转录因子(EMT-TFs)而起始肿瘤细胞 EMT 进程^[9, 23]。因为捕获肿瘤进展的某一瞬间，在技术上有很大难度所以目前 EMT 在肿瘤侵袭转移中的作用仍未证实。

在研究 EMT 在肝癌转移复发中作用的过程中，人们也发现了一些可预测肝癌转移的重要分子。信号转导分子 STAT5b 可通过诱导 EMT 过程增加肝癌细胞的运动和侵袭能力，并且与患者的预后相关^[24]。Niu 等报道 EMT 过程的转录因子 Twist 在肝癌组织中高表达预示着肝癌患者更容易肝内或肝外转移，而 Snail 的表达也与患者的坏预后相关^[25-26]。另有报道 P28 蛋白可促进肝癌细胞的 EMT，是肝癌转移复发的有力预测分子^[27]。

2 循环肿瘤细胞

肿瘤细胞脱离原发瘤部位到达远处转移靶器官

之前要先进入血液循环,许多进展期肿瘤患者血液中能够监测到循环肿瘤细胞(Circulating tumor cells, CTCs),CTCs 和播散肿瘤细胞(Disseminated tumor cells, DTCs)与肿瘤的进展程度以及临床复发密切相关,而且对于临床诊断和预后评估有着重要价值^[28]。目前对 CTCs 以及它们在转移中作用的理解还很不清楚,主要因为 CTCs 和 DTCs 的检测技术敏感性低等技术问题。另外肿瘤细胞表面的组织蛋白可吸引血小板集聚,聚集的血小板掩盖了 CTCs 的表面抗原,增加了检测 CTCs 的难度^[29]。尽管很复杂,从血循环中分离 CTCs 是一个相对无损伤的诊断措施,而且 CTCs 主要来源于原发瘤,通过监测肿瘤病人的 CTCs 会帮助我们对治疗效果进行评估。目前分离循环肿瘤细胞(CTC)的标准方法是基于肿瘤细胞表面上皮性抗原的磁性激活细胞分选技术(magnetic-activated cell separation, MACS)。由于缺乏针对肝癌细胞表面特异性抗原的单克隆抗体,迄今鲜见 MACS 用于分离循环肝癌细胞的报道。基于上皮细胞粘附分子(EpCAM)抗体磁珠的 CellSearch 系统已被美国 FDA 批准用于检测乳腺癌、结肠癌和前列腺癌循环肿瘤细胞^[30]。尽管肝癌细胞属于上皮性细胞,但 EpCAM 仅在约 35% 的 HCC 中表达。因此,CellSearch 系统并不适合用于分离、检测循环肝癌细胞。最近,Yin 等基于去唾液酸糖蛋白受体及其配体相互作用的原理创建了一种较为特异和敏感的循环肝癌细胞磁性分离方法。并证实其对肝癌的诊断和转移复发预测具潜在临床应用价值^[31]。

3 转移癌细胞在靶器官定居与生长

循环肿瘤细胞会特异地归巢到远处靶器官,一旦到达新组织的毛细血管床,CTCs 不久就从血管侵入到新组织。癌细胞和组织的特殊生物学特性在靶向性转移中起了一定的作用,转移癌细胞所表达的蛋白(如 integrin)在这个过程中起了一个关键的作用^[32-33]。但目前癌细胞靶向性归巢的机理仍不清楚。

笔者所在复旦大学肝癌研究所近期已优化建立了基于人肝癌高转移潜能细胞株 HCCLM9 的肝癌肺转移裸鼠模型和纵膈淋巴结定向转移的裸鼠模型,为靶向转移的机理研究和靶向转移的分子预测提供了有利的研究工具。

癌细胞在靶器官定居与拓殖性生长必须先主动适应并改造微环境,形成利于其定居与生长的环境(即转移小生境,metastatic niche)。而微环境对癌细胞进入也发生反相适应并可能调变癌细胞特性^[34]。癌细胞与微环境间的互动对话(cross-talk)被广为关注。我们在建立人肝癌转移模型过程中发现“土壤反过来可改变种子的特性”。目前人们正尝试破解癌细胞与其微环境间相互作用的“语言密码”,最终阻断其“对话”^[35]。

在这一时期肿瘤已发生转移,故基于此期的分子预测意义不大,但研究这一时期有助于探索抗癌转移疗法。

4 炎症免疫反应与肿瘤的侵袭转移

癌相关炎症免疫反应是一新热点。越来越多的证据表明炎症可促进癌的发生、生长与转移。炎症免疫在肿瘤的免疫逃逸中起重要作用,当炎症细胞被募集到进行性生长的肿瘤位置时,受到肿瘤产生的产物(如 VEGF)的激活,可以抑制保护性的抗肿瘤免疫^[36]。肿瘤微环境存在大量炎性细胞,它们分泌细胞因子、趋化因子及生长因子等在对损伤免疫应答的同时,更为癌的发生发展、特别是侵袭转移提供了必要的炎性微环境^[37]。我们与美国合作研究发现微环境炎症免疫失衡是影响转移的重要方面、炎症免疫因子标签可预测转移^[38-40];巨噬细胞分泌的 CSF-1 促癌转移^[41]。但炎症免疫反应的作用复杂多变,促癌与抗癌作用并存,例如,IL-1 和 MyD88 在鼠模型实验中有明显的促肿瘤形成作用,但在肿瘤形成的后期它们却起相反作用。最新提出“癌的免疫编辑”(cancer immunoeediting)概念,其相互转化机制并不清楚,对其



深入研究有望找到调变炎症免疫微环境防治癌转移的新策略^[23]。

综上所述,尽管肿瘤转移的研究进行了多年,在肿瘤转移的理念上发生了很大的变化。但转移过程具有相当复杂性,仍有许多问题不清,如:肿瘤细胞转移能力是先天固有的,还是后天经克隆筛选或受环境作用影响获得的? 诱生或重编程肿瘤干细胞样细胞的来源,EMT 和 MET 的转换? 播散癌细胞(DTC)如何逃避机体免疫攻击以及如何抗凋亡? 癌细胞靶向性归巢的机理? 器官组织微环境包括炎症微环境对肿瘤细胞的识别,及其相互诱导和对话机制? 肿瘤血管及代谢的适应性变化等病理过程的触发、维持和进展的机制? 等,仍然是肿瘤转移的研究重点和热点。尽管迄今为止已经发现了许多与肿瘤患者预后和转移复发相关的分子指标,但这些发现重叠性小,特别是通过基因和蛋白表达谱筛选的结果,实验方法、病例的选择标准以及结果的统计分析方法等的不同都可能造成结果的偏差。今后在肝癌分子预测的研究上,以下几个方向值得探索:①对已有分子指标继续扩大样本验证优化;②开展“由因及果”的前瞻性临床研究,才能明确真正可用于临床预测的分子标志物;③血清学标志物因其创伤小、可重复,仍然是目前生物标志物发展的主要方向;④目前肝癌的临床分期主要是基于肿瘤的临床和组织病理特征来划分的,将大样本验证优化后的分子标志物与这些临床病理特征相结合,可能会提高现有临床分期的预测准确率;⑤肝癌的复发可分为早期复发和晚期复发,其术后辅助治疗方案有所不同^[42],因此针对两种复发的精确预测,也将会有有效的指导术后治疗,使肝癌患者更为受益。

参考文献

[1] Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 2006 Nov 17;127(4):679–95.
[2] McCarthy N. Metastasis: Influencing bad behaviour. *Nat Rev Cancer*. 2009 Sep;9(9):609.

[3] Qin LX, Tang ZY, Sham JS, Ma ZC, Ye SL, Zhou XD, Wu ZQ, Trent JM, Guan XY. The association of chromosome 8p deletion and tumor metastasis in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 1999 Nov 15;59(22):5662–5.

[4] Ren N, Wu JC, Dong QZ, Sun HJ, Jia HL, Li GC, Sun BS, Dai C, Shi J, Wei JW, Sheng YY, Zhou HJ, Ye QH, Qin LX. Association of Specific Genotypes in Metastatic Suppressor HTPAP with Tumor Metastasis and Clinical Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res*. 2011 May 1;71(9):3278–86.

[5] Ye QH, Qin LX, Forgues M, He P, Kim JW, Peng AC, Simon R, Li Y, Robles AI, Chen Y, Ma ZC, Wu ZQ, Ye SL, Liu YK, Tang ZY, Wang XW. Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med*. 2003 Apr;9(4):416–23.

[6] Budhu A, Jia HL, Forgues M, et al. Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47:897–907.

[7] Lee JS, Chu IS, Heo J, et al. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology* 2004; 40:667–676.

[8] Villanueva A, Minguez B, Forner A, Reig M, Llovet JM. Hepatocellular carcinoma: novel molecular approaches for diagnosis, prognosis, and therapy. *Annu Rev Med*. 2010;61:317–28.

[9] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.

[10] Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*. 2009 Sep 4;138(5):822–9.

[11] Dirks P. Cancer stem cells: Invitation to a second round. *Nature*. 2010 Jul 1;466(7302):40–1.

[12] Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells – an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2005 Sep;5(9):744–9.

[13] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663–76.

[14] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1917–20.

[15] Miyoshi N, Ishii H, Nagai K, Hoshino H, Mimori K, Tanaka F, Nagano H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 5;107(1):40–5.

[16] Utikal J, Polo JM, Stadtfeld M, Maherali N, Kulalert W, Walsh RM, Khalil A, Rheinwald JG, Hochedlinger K. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature*. 2009 Aug 27;460(7259):1145–8.

[17] Song W, Li H, Tao K, Li R, Song Z, Zhao Q, Zhang F, Dou K. Expression and clinical significance of the stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Pract*. 2008 Aug;62(8):

1212-8.

[18] Villanueva A, Hoshida Y. Depicting the role of TP53 in hepatocellular carcinoma progression. *J Hepatol*. 2011 May 14. [Epub ahead of print]

[19] Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, Budhu A, Zanetti KA, Chen Y, Qin LX, Tang ZY, Wang XW. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2008 Mar 1;68(5):1451-61.

[20] Cheung ST, Cheung PF, Cheng CK, Wong NC, Fan ST. Granulin-epithelin precursor and ATP-dependent binding cassette (ABC)B5 regulate liver cancer cell chemoresistance. *Gastroenterology*. 2011 Jan;140(1):344-55.

[21] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009 Nov 25;139(5):871-90.

[22] Thompson EW, Williams ED. EMT and MET in carcinoma—clinical observations, regulatory pathways and new models. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(6):591-2.

[23] Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1559-64.

[24] Lee TK, Man K, Poon RT, Lo CM, Yuen AP, Ng IO, Ng KT, Leonard W, Fan ST. Signal transducers and activators of transcription 5b activation enhances hepatocellular carcinoma aggressiveness through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2006 Oct 15;66(20):9948-56.

[25] Niu RF, Zhang L, Xi GM, Wei XY, Yang Y, Shi YR, Hao XS. Up-regulation of Twist induces angiogenesis and correlates with metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2007 Sep;26(3):385-94.

[26] Yang MH, Chen CL, Chau GY, Chiou SH, Su CW, Chou TY, Peng WL, Wu JC. Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009 Nov;50(5):1464-74.

[27] Fu J, Chen Y, Cao J, Luo T, Qian YW, Yang W, Ren YB, Su B, Cao GW, Yang Y, Yan YQ, Shen F, Wu MC, Feng GS, Wang HY. p28GANK overexpression accelerates hepatocellular carcinoma invasiveness and metastasis via phosphoinositol 3-kinase/AKT/hypoxia-inducible factor-1 α pathways. *Hepatology*. 2011 Jan;53(1):181-92.

[28] Diamandis EP, Pantel K, Scher HI, Terstappen L, Lianidou E. Circulating Cancer Cells and Their Clinical Applications. *Clin Chem*. 2011 May 17. [Epub ahead of print]

[29] Camerer E, Qazi AA, Duong DN, Cornelissen I, Advincula R, Coughlin SR. Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood*. 2004 Jul 15;104(2):397-401.

[30] Mikolajczyk SD, Millar LS, Tsinberg P, Coutts SM, Zomorodi M, Pham T, Bischoff FZ, Pircher TJ. Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood. *J Oncol*. 2011;2011:252361. Epub 2011 Apr 19.

[31] Xu W, Cao L, Chen L, Li J, Zhang XF, Qian HH, Kang XY, Zhang Y, Liao J, Shi LH, Yang YF, Wu MC, Yin ZF. Isolation of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma using a novel cell separation strategy. *Clin Cancer Res*. 2011 Jun 1;17(11):3783-93.

[32] Sahai E. Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer*. 2007 Oct;7(10):737-49.

[33] Hoon DS, Ferris R, Tanaka R, Chong KK, Alix-Panabières C, Pantel K. Molecular mechanisms of metastasis. *J Surg Oncol*. 2011 May 1;103(6):508-17.

[34] Carlini MJ, De Lorenzo MS, Puricelli L. Cross-talk between Tumor Cells and the Microenvironment at the Metastatic Niche. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011 Apr 6. [Epub ahead of print]

[35] Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr;9(4):285-93.

[36] Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2101-2114.

[37] Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*. 2008 Jun 13;133(6):1019-31.

[38] Budhu A, Forgues M, Ye QH, Jia HL, He P, Zanetti KA, Kammula US, Chen Y, Qin LX, Tang ZY, Wang XW. Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer Cell*. 2006 Aug;10(2):99-111.

[39] Seike M, Yanaihara N, Bowman ED, Zanetti KA, Budhu A, Kumamoto K, Mechanic LE, Matsumoto S, Yokota J, Shibata T, Sugimura H, Gemma A, Kudoh S, Wang XW, Harris CC. Use of a cytokine gene expression signature in lung adenocarcinoma and the surrounding tissue as a prognostic classifier. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Aug 15;99(16):1257-69.

[40] Zhou H, Huang H, Shi J, Zhao Y, Dong Q, Jia H, Liu Y, Ye Q, Sun H, Zhu X, Fu L, Guo K, Gao D, Sun J, Yan Z, Ren N, Tang Z, Qin L. Prognostic value of interleukin 2 and interleukin 15 in peritumoral hepatic tissues for patients with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma after curative resection. *Gut*. 2010 Dec;59(12):1699-708.

[41] Zhu XD, Zhang JB, Zhuang PY, Zhu HG, Zhang W, Xiong YQ, Wu WZ, Wang L, Tang ZY, Sun HC. High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*. 2008 Jun 1;26(16):2707-16.

[42] Hoshida Y, Toffanin S, Lachenmayer A, Villanueva A, Minguez B, Llovet JM. Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Semin Liver Dis*. 2010 Feb;30(1):35-51.



抑制 LOX 下调荷胃癌 裸鼠肿瘤 MMP-2、9

韩梅, 马百箐¹

(1. 宁夏医科大学, 免疫学系, 宁夏银川 750004)

摘要:目的: 研究用 β -氨基丙腈(BAPN)抑制赖氨酰氧化酶(Lysyl Oxidase, LOX)后, 对荷胃癌裸鼠肿瘤组织基质金属蛋白酶-2 和 9(Matrix Metalloproteinase-2 and 9, MMP-2 and 9)的表达及酶活性的影响, 以探讨在肿瘤发生发展过程中 LOX 与 MMP-2、9 的关系。方法: 6 周龄的裸鼠随机分为对照组和 BAPN 预处理组(实验组), 每组 10 只。其中实验组每天用 LOX 的抑制剂 BAPN 腹腔注射, 对照组每天用相同体积的无菌 PBS 腹腔注射。两周后, 两组小鼠均以胃癌细胞 SGC-7901 细胞接种于背部皮下。接种 4 周后取肿瘤组织。分别检测肿瘤 MMP-2、9 的蛋白含量和酶活性。结果: 当 LOX 活性被抑制后, 对照组的 MMP-2 酶原及活性形式表达高于实验组。明胶酶谱检测 MMP-2 的酶活性, 对照组明显高于实验组。对于 MMP-9, 对照组的表达和酶活性明显高于实验组。结论: BAPN 抑制 LOX 活性后, 荷胃癌裸鼠肿瘤中的 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达和酶活性均下降。提示抑制 LOX 可下调 MMP-2 和 9, LOX 与 MMP-2 和 9 可能同步表达, 在胃癌的发生发展中协同作用。

关键词: 赖氨酰氧化酶; 基质金属蛋白酶 2; 基质金属蛋白酶 9; 胃癌

江西省美沙酮维持治疗 海洛因依赖者的生活质量及 各维度影响因素研究

颜兴伟¹, 杨玉金², 龚俊平³, 闵建华¹, 李国恩⁴

(1. 南昌市东湖区疾病预防控制中心, 江西南昌 33008; 2. 南昌大学第二附属医院;

3. 江西省疾病预防控制中心中心; 4. 南昌市药物维持治疗西湖门诊部)

摘要:目的: 分析江西省南昌市和九江市接受美沙酮维持治疗(MMT)前后的海洛因依赖者生活质量各维度的变化及其影响因素, 为 MMT 综合治疗提供理论依据。方法: 选择江西省南昌市东湖区、西湖区及九江市三个美沙酮门诊 2008 年 1-6 月新入组的海洛因依赖者为调查对象, 使用阿片类药物成瘾者生活质量量表对调查对象进行问卷调查, 用 Excel 软件建立数据库, SPSS 软件进行数据资料的统计分析。结果: MMT 治疗前后海洛因依赖者身体健康状况、家庭关系与社会支持、毒品依赖 3 个维度生活质量得分有统计学意义($P < 0.01$), 其它 3 个维度及总体生活质量得分无统计学意义($P > 0.05$)。身体健康状况改变的单因素分析影响因素有地区、经济来源和治疗期间家庭精神支持。多元逐步回归分析显示影响因素有地区、治疗前经济来源是否为临时工、治疗期间家人那里得到精神支持、年龄和维持治疗累计服药天数。家庭关系与社会支持改变的单因素分析影响因素有地区、治疗期间家庭精神支持、治疗期间家庭经济支持和治疗期间朋友精神支持。多因素分析结果为治疗期间家人精神支持、地区和治疗期间朋友经济支持是家庭关系与社会支持改善的影响因素。毒品依赖改变的单因素分析影响因素有地区和美沙酮首日剂量。多因素分析结果为首日剂量、既往强制戒毒次数和吸毒时间长短是毒品依赖改善的影响因素。结论: 长期坚持 MMT 可以改善海洛因依赖者的生活质量。家人的精神支持对患者身体健康状况、心理健康状况及家庭关系和社会支持改善程度影响显著, 家人用于治疗费和生活费等经济支持对患者满意度改善影响显著, 吸毒时间较长患者经过 1 年 MMT 后毒品依赖改善程度更高。

关键词: 美沙酮维持治疗(MMT); 海洛因依赖者; 生活质量; 影响因素



THE INFLUENCING FACTOR OF DIFFERENT DIMENSIONS OF THE METHADONE MAINTENANCE TREATMENT FOR HEROIN ADDICTS'S LIFE QUALITY AFTER TREATMENT

YAN Xingwei, YANG Yujin, GONG Junping, et al

(Donghu District of Nan Chang City Provincial CDC, Nanchang Jiangxi 330008, China)

Abstract: Objective: To analyze the Methadone Maintenance treatment (MMT) for heroin addicts's life quality dimensions before and after the treatment in Nanchang and Jiujiang City in Jiangxi province, and also about the influencing factor of it. to provide a theoretical basis for comprehensive treatment of MMT. **Methods:** Choose Three methadone clinics in Jiujiang City and Donghu District and Xihu District of Nanchang city, Jiangxi Province in 2008, in the first 6 months of patient as the new group survey, Opioid addicts using the quality of life questionnaire for the survey questionnaires, Excel software with a database, SPSS software for statistical analysis of data. **Results:** MMT treatment of heroin addicts before and after the physical health status, family relationships and social support, drug dependence 3 dimensions of quality of life scores was statistically significant ($P < 0.01$), the other three dimensions and the overall quality of life scores was not significant ($P > 0.05$). Changes in physical health impact of single factor analysis of regional factors, economic resources and family emotional support during treatment. Multiple stepwise regression analysis showed that there are regional factors, economic resources before treatment whether temporary, treatment received moral support during the family, age, and medication maintenance treatment of cumulative number of days. Changes in family relationships and social support of single-factor analysis of regional factors, treatment, emotional support during the family, family economic support during treatment and psychological support during treatment friends. Multivariate analysis showed the spirit of support for the family during treatment, regional and economic support during treatment is the family friends and social support factors of improvement. Drug-dependent changes in factors of univariate analysis of the first region and the daily dose of methadone. Multivariate analysis led daily dose, previous number of compulsory treatment and drug abuse is the length of time to improve the impact of factors of drug dependence. **Conclusion:** Insisted for a long time after MMT may improve heroin used patient's quality of life. Family member's spirit supports to the patient overall quality of life improvement, the health condition, the psychologically healthy condition and the diplomatic relation and the society supports the improvement degree influence to be remarkable, the family member uses in economies and so on cost of treatment and living expenses supports to the patient degree of satisfaction improvement influence is remarkable, after the taking drugs time long patient passes through 1 year MMT, the narcotic dependence improvement degree is higher.

Keywords: methadone maintains the treatment (MMT) ; heroin addicts ;quality of life; influencing factor

已有研究表明,海洛因依赖者血液微量元素及肝肾功能等生化指标发生改变^[1-2],生活质量明显降低^[3]。美沙酮维持治疗(MMT)是针对阿片类药物依赖的一种替代治疗方法。我们从江西省已开展的 13 个 MMT 门诊点中选择较早开展美沙酮维持治疗服务的东湖区、西湖区和九江市门诊作为研究现场,从 2008 年 1~6 月所有新入组接受治疗的海洛因依赖者为研究对象,研究其治疗 1 年前后生活质量改变及各维度影响因素,为提高 MMT 患者的生活质量提供理论依据。现报告如下:

1 对象和方法

1.1 研究对象 确定南昌市东湖区、西湖区和九江市社区维持治疗门诊为研究现场,选择从 2008 年 1~6 月所用新入组接受 MMT 的海洛因依赖者为跟踪研究对象,跟踪期限为 1 年,即到 2009 年 6 月底止仍保持在门诊接受 MMT 的研究对象为最终研究对象,共 182 人,其中男 132 人(72.53%),女 50 人(27.47%),男女性别比为 2.64:1。年龄为 37.66±6.427 岁,最大为 53 岁,最小为 22 岁,吸毒年龄主要集中在 30~50 年龄段最多,有 161 人。全部病例均符合美国精神病学协会制定的精神障碍诊断和统计手册第三版修订版(DSM-III-R)海洛因依赖者和药物滥用诊断标准^[4]。

1.2 研究方法 采用自填式问卷调查方法。填写问卷前统一的培训,说明本次调查目的和意义,受试者在指定的时间里以自评的方式集中填写问卷,答题后回收问卷,筛除无效问卷。调查工具包括:(1)自编问卷:内容包括海洛因依赖者的基本情况和药物滥用情况等;(2)生活质量测定量表(QOLDA-61)^[5]:共 61 个条目,包括身体健康状况、心理健康状况、家庭关系与社会支持、日常生活活动与经济状况、毒品依赖、生活满意度 6 个维度构成,该量表克郎巴赫系数为 0.958,重测信度为 0.917。

1.3 统计分析 用 Excel 软件进行数据的录入,

将数据 SPSS13.0 软件,对数据进行描述性统计,计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,进行 t 检验、单因素方差分析,计数资料用构成比表示,生活质量总分与各自变量的关系采用逐步筛选法进行多元线性回归分析,检验水准 $\alpha=0.05$,双侧检验。

2 结果

2.1 研究对象一般情况

本次研究 182 名接受 MMT 的人员,其中男 132 人(72.53%),女 50 人(27.47%),男女性别比为 2.64:1。年龄平均为 37.66±6.427 岁,主要集中在 30~50 岁,东湖区、西湖区、九江市三地接受 MMT 的人群年龄无统计学差异($P>0.05$)。民族全部为汉族。文化程度小学及以下 18 人(9.89%),初中 104 人(57.14%),高中/中专 57 人(31.32%),大专及以上 3 人(1.65%)。居住情况:与家人同住的有 138 人(75.82%),与朋友同住的有 8 人(4.40%),独自居住 36 人(19.78%)。经济状况:治疗前一个月自己有工作或做生意的工作生意的 43 人(23.63%),其中主要经济来源是固定工作的 22 人(12.09%),临时工的 21 人(11.54%),没有的 139 人(76.37%)。

2.2 MMT 治疗前后生活质量比较

MMT 治疗前后海洛因依赖者身体健康状况、家庭关系与社会支持、毒品依赖 3 个维度生活质量得分有统计学意义($P<0.01$),其它 3 个维度及总体生活质量得分无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 MMT 治疗前后海洛因依赖折生活质量得分比较

	治疗前	治疗后	t	P
身体健康状况	71.23±13.71	75.35±15.34	-2.739	0.007
心理健康状况	72.46±15.64	74.54±14.58	-1.400	0.164
家庭关系与社会支持	72.11±17.31	76.23±16.76	3.340	0.001
日常生活活动与经济状况	62.20±14.09	61.07±13.60	0.783	0.435
毒品依赖	68.20±21.79	86.43±13.38	-8.936	0.000
满意度	60.70±15.51	61.42±16.44	-0.437	0.663
总体生活质量	67.82±12.25	70.84±10.86	-2.647	0.009



2.3 MMT 治疗前后生活质量改变各维度的单因素分析

MMT 治疗前后海洛因依赖者单因素分析发现身体健康状况改变的影响因素有地区、经济来源和治疗期间家庭精神支持有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 < 0.05)。心理健康状况改变影响因素有地区及治疗期间家庭精神支持有统计学意义 ($P < 0.05$)。家庭关系与社会支持改变的影响因素有地区、治疗期间家庭

精神支持、治疗期间家庭经济支持及治疗期间朋友精神支持有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 < 0.05)。日常生活活动与经济状况改变的影响因素有地区、治疗期间朋友精神支持及治疗期间门诊支持和帮助有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 < 0.05)。毒品依赖改变的影响因素仅有地区及美沙酮首日剂量有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 < 0.05)。未见满意度改变的影响因素。见表 2。

表 2 MMT 门诊治疗者生命质量改善($\bar{x} \pm S$)影响因素的单因素分析结果

变量	身体健康状况改变	心理健康状况改变	家庭关系与社会支持改变	日常生活活动与经济状况改变	毒品依赖改变	满意度改变
地区						
东湖门诊	-4.80±17.36	-2.79±17.85	-10.52±19.32	-4.62±15.43	20.20±27.15	-1.42±15.14
西湖门诊	8.71±15.73	5.87±16.42	-0.81±20.34	3.27±15.84	25.30±18.99	2.72±18.98
九江门诊	7.42±15.40	0.71±14.95	-10.68±18.77	-6.15±17.64	-2.08±13.01	-0.65±23.55
F	9.418	3.529	4.020	4.618	15.820	0.695
P	0.000	0.032	0.020	0.012	0.000	0.501
性别						
男	4.63±17.42	1.56±16.84	-6.40±19.35	-6.7±16.42	19.27±22.45	1.17±19.33
女	2.77±16.85	3.41±17.36	-4.50±22.41	-2.33±	15.47±25.71	-0.47±17.64
t	0.548	-0.556	-0.481	0.512	0.831	0.446
P	0.584	0.579	0.632	0.610	0.408	0.656
年龄						
<30	5.32±16.50	2.85±14.55	-4.84±20.48	-1.81±14.87	14.54±29.64	5.19±27.45
30-40	3.88±18.42	2.09±17.16	-5.54±21.18	-0.96±16.48	16.68±22.46	.11±19.40
>40	4.22±15.59	1.84±17.44	-6.71±18.73	-1.24±17.27	21.71±23.29	.63±15.40
F	0.034	0.016	0.063	0.014	0.799	0.346
P	0.966	0.984	0.939	0.986	0.452	0.708
文化程度						
小学及以下	-1.31±24.67	-1.75±16.95	-3.41±22.25	3.53±12.78	22.19±17.42	1.75±19.98
初中	6.19±16.58	3.61±16.93	-5.36±20.38	-2.13±16.65	18.85±24.37	0.41±19.74
高中/中专	2.36±15.66	0.94±17.31	-8.07±19.79	-0.53±17.14	16.86±23.46	1.81±17.10
大专及以上	-2.14±13.13	-7.85±5.05	3.33±7.85	-6.00±28.28	-2.85±8.08	-17.14±8.08
F	1.023	0.715	0.376	0.508	0.729	0.660
P	0.385	0.545	0.770	0.677	0.537	0.578

婚姻状况						
未婚	3.63±16.70	1.49±16.02	-8.88±21.05	-4.04±15.89	16.53±24.20	1.15±20.22
已婚	5.43±18.69	1.81±17.80	-3.65±20.87	1.35±17.05	17.50±22.51	2.34±17.05
离异或丧偶	2.51±15.53	3.24±17.03	-5.85±17.75	-1.63±16.20	21.64±24.02	-2.59±20.01
F	0.320	0.109	0.807	1.312	0.488	0.729
P	0.727	0.897	0.449	0.273	0.615	0.484
居住状况						
与家人	3.83±17.30	2.02±17.12	-5.88±21.31	-0.08±17.12	17.05±23.98	0.46±17.76
与朋友	7.61±28.62	4.04±18.91	-0.37±9.87	-3.33±7.55	15.71±18.67	17.61±18.90
独自居住	4.39±14.21	1.81±16.43	-7.17±-7.17	-4.61±15.49	23.29±21.82	-2.19±21.40
F	0.139	0.044	0.275	0.830	0.769	2.813
P	0.871	0.957	0.760	0.439	0.466	0.064
工作						
有	0.78±18.17	0.50±16.30	-4.01±21.84	-2.32±16.99	17.60±24.33	-1.19±22.65
无	5.31±16.89	2.68±17.22	-6.48±19.80	-0.86±16.48	18.96±22.65	1.47±17.59
t	-1.279	-0.622	0.592	-0.425	-0.286	-0.686
P	0.203	0.535	0.555	0.671	0.775	0.494
经济来源						
固定工作	7.58±18.57	1.87±17.43	2.08±20.48	-4.50±19.02	18.03±25.03	5.53±19.39
临时工	-9.04±16.26	-5.14±19.20	-6.37±17.79	0.80±14.88	15.80±23.63	-6.85±28.21
家庭或朋友供给	5.99±16.12	2.78±16.06	-6.88±20.12	-1.08±16.91	17.49±23.12	2.25±15.88
其他	3.60±17.93	4.88±18.23	-7.95±21.84	0.00±14.52	23.45±23.87	-3.90±20.16
F	3.679	1.134	0.967	0.315	0.393	1.750
P	0.014	0.338	0.410	0.815	0.758	0.160
治疗期间家人的精神支持						
根本没有	-8.00±21.24	-8.57±19.31	-23.77±21.84	-5.40±15.11	22.00±19.52	0.85±24.24
偶尔	-2.58±14.73	-3.12±16.91	-8.47±16.23	-2.50±12.68	23.92±30.91	-7.67±15.74
有时有	2.52±16.09	-0.21±15.80	-10.98±18.01	-5.23±14.22	15.04±25.87	-0.16±15.21
经常	8.87±17.45	5.83±17.65	-1.94±21.06	1.33±18.47	18.84±21.16	3.30±18.11
总是	5.00±12.56	5.81±9.68	6.19±12.30	3.42±17.06	14.28±19.05	1.83±27.07
F	3.218	2.503	4.896	1.316	0.564	1.099
P	0.015	0.046	0.001	0.268	0.689	0.360
治疗期间家人的经济支持						
根本没有	-1.87±17.81	2.94±16.91	-16.38±21.23	-4.37±18.21	29.82±26.08	-6.78±25.05
偶尔	1.63±16.08	-3.06±16.70	-17.93±21.25	-5.57±11.92	15.71±26.34	-6.32±17.65
有时有	5.62±16.33	2.46±17.96	-10.90±18.09	-1.75±15.41	15.93±23.78	-0.43±15.56
经常	5.26±20.06	1.90±18.59	-0.37±18.56	-0.79±17.54	14.94±21.30	3.57±19.19
总是	5.42±10.61	4.71±10.98	6.00±15.69	4.80±16.87	22.42±21.70	6.71±15.92
F	0.696	0.451	6.386	1.071	1.530	1.997
P	0.596	0.771	0.000	0.374	0.197	0.099



治疗期间朋友的精神支持

根本没有	0.23±15.03	-2.46±17.22	-15.18±20.12	-7.33±14.09	22.06±26.88	0.95±17.55
偶尔	0.38±19.78	-3.37±18.78	-12.72±19.30	-7.21±13.80	17.40±21.88	-2.94±16.09
有时有	4.76±15.75	4.25±15.78	-6.46±19.24	0.570±16.63	17.07±26.23	-1.58±17.83
经常	9.65±18.40	7.08±19.54	7.91±18.13	8.32±16.81	20.80±18.58	9.25±16.37
总是	6.71±13.19	5.85±11.23	1.55±12.74	-1.20±17.51	12.85±20.87	1.42±32.72
F	1.348	2.103	5.971	4.319	0.360	1.814
P	0.256	0.084	0.000	0.003	0.837	0.130

治疗期间朋友的精神支持

根本没有	7.46±15.35	5.86±15.26	-5.06±16.81	-1.47±12.30	21.55±23.71	3.10±19.73
偶尔	-0.25±17.50	0.12±17.66	-12.18±23.83	-1.45±18.50	18.00±23.10	-3.20±18.01
有时有	1.72±15.38	-4.34±15.84	-3.14±21.50	-1.00±21.99	13.45±26.15	-2.61±16.20
经常	3.40±25.29	1.09±22.92	-3.07±20.45	1.38±14.45	13.84±18.69	5.05±19.34
总是	9.28±17.55	5.71±8.49	8.88±15.50	-2.50±27.73	15.71±17.68	5.00±25.59
F	1.295	1.782	1.566	0.089	0.660	0.999
P	0.276	0.137	0.188	0.986	0.621	0.411

治疗期间社区的支持和帮助

根本没有	4.26±15.68	1.95±16.42	-4.80±19.01	0.35±14.98	22.35±21.31	-0.04±16.51
偶尔	3.36±18.72	-0.35±16.68	-11.42±20.85	-4.21±14.76	19.18±25.67	-0.30±18.70
有时有	8.00±19.72	5.21±19.24	-5.88±22.31	-4.10±18.05	11.57±23.55	4.28±18.24
经常	-1.02±19.86	2.24±20.36	-6.50±21.90	1.71±20.78	8.36±27.73	1.83±18.70
总是	5.10±12.11	3.46±9.43	7.93±13.62	0.85±23.66	16.73±15.85	-0.81±38.28
F	0.578	0.322	1.416	0.653	1.558	0.244
P	0.679	0.863	0.232	0.626	0.189	0.913

治疗期间门诊的支持和帮助

根本没有	2.85±15.81	2.66±19.02	-3.55±22.18	-4.93±15.02	30.85±22.18	7.61±16.78
偶尔	2.65±14.18	2.75±14.95	-3.65±16.13	0.71±16.03	33.06±26.74	0.20±14.50
有时有	3.33±18.56	0.29±14.09	-6.20±16.77	-3.16±17.28	10.00±21.64	-6.07±17.67
经常	3.93±18.15	1.72±17.41	-5.70±22.08	2.75±16.34	13.31±21.20	1.77±17.79
总是	6.85±17.22	3.77±19.20	-8.62±20.86	-6.16±16.33	20.68±22.38	1.14±24.06
F	0.212	0.141	0.205	1.680	4.307	1.345
P	0.931	0.967	0.935	0.159	0.003	0.257

治疗期间公安的支持和帮助

根本没有	3.26±17.11	4.36±17.22	-4.05±17.30	1.50±14.42	22.91±23.97	-0.10±19.41
偶尔	7.03±13.34	2.30±13.91	-8.88±17.49	-5.69±16.91	14.50±20.03	2.08±15.59
有时有	1.51±19.48	-2.10±14.54	-12.67±29.60	-3.52±14.58	17.14±24.34	-5.04±22.86
经常	2.75±19.59	-1.53±19.77	-5.31±22.28	0.50±20.83	14.79±25.13	3.36±18.27
总是	10.53±16.79	7.85±17.74	4.44±8.31	-4.00±14.38	14.28±20.77	4.64±18.70
F	0.629	1.049	1.273	1.045	0.903	0.676
P	0.643	0.385	0.284	0.387	0.465	0.610

2.4 MMT 治疗前后生活质量改变各维度的多因素分析

2.4.1 身体健康状况的改善 多元逐步回归分析显示有地区、经济来源是否为临时工、治疗期间家庭精神支持、年龄和维持治疗累计服药天数是身体健康状况的改善的影响因素($P < 0.01$ 或 < 0.05), 方程 R^2 为 33.3%。见表 3。

表 3 身体健康状况改善的多因素分析结果

	β	标准误差	t	P	R^2
常量	-27.302	11.277	-2.421	0.017	0.333
地区	6.262	2.178	2.875	0.005	
治疗前经济来源是否为临时工	-27.798	8.542	-3.254	0.002	
治疗期间家人精神支持	3.778	1.314	2.875	0.005	
年龄	0.560	0.245	2.282	0.025	
维持治疗累计服药天数	-0.025	0.012	-2.025	0.046	

2.4.2 心理健康状况 多元逐步回归分析显示有从家人那里得到精神支持($\beta = 6.085, P < 0.01$)作为保护因素进入方程, 尿检阳性率($\beta = -43.122, P < 0.01$)作为危险因素进入方程, 方程的 R^2 为 33.4%。符合退出 MMT 治疗标准($P < 0.05$)的人员心理健康状况改善程度相对更高。见表 4。

表 4 心理健康状况改善的多因素分析结果

	β	标准误差	t	P	R^2
常量	-3.675	6.276	-0.586	0.561	0.334
家人精神支持	6.085	1.676	3.631	0.001	
尿检阳性率	-43.122	12.524	-3.443	0.001	
是否符合退出 MMT 标准	18.309	6.798	2.693	0.010	

2.4.3 家庭关系与社会支持 多元逐步回归分析显示有治疗期间家人精神支持、地区、治疗期间朋友经济支持是家庭关系与社会支持改善的影响因素($P < 0.01$ 或 < 0.05), 方程的 R^2 为 38.3%。见表 5。

2.4.4 日常生活活动与经济状况 多元逐步回归分析显示有治疗期间朋友精神支持和尿检阳性率是日常生活活动与经济状况改善的影响因素 ($P < 0.01$

或 < 0.05), 方程的 R^2 为 10.5%。见表 6。

表 5 家庭关系与社会支持改善的多因素分析结果

	β	标准误差	t	P	R^2
常量	14.113	22.643	0.623	0.536	0.383
治疗期间家人精神支持	9.087	2.150	4.227	0.000	
地区	-27.706	11.927	-2.323	0.025	
治疗期间朋友经济支持	4.307	2.082	2.069	0.044	

表 6 日常生活活动与经济状况改善的多因素分析结果

	β	标准误差	t	P	R^2
常量	-6.450	4.429	-1.456	0.149	0.105
治疗期间朋友精神支持	3.696	1.391	2.657	0.009	
尿检阳性率	-15.243	6.759	-2.255	0.026	

2.4.5 毒品依赖 多元逐步回归分析显示有首日剂量、既往强制戒毒次数和吸毒时间长短是毒品依赖改善的影响因素 ($P < 0.01$ 或 < 0.05), 方程的 R^2 为 18.1%, 见表 7。

表 7 毒品依赖改善的多因素分析结果

	β	标准误差	t	P	R^2
常量	-2.873	8.872	-0.324	0.747	0.181
首日剂量	0.478	0.212	2.258	0.026	
既往强制戒毒次数	-5.014	1.643	-3.052	0.003	
吸毒时间长短	1.277	0.595	2.145	0.035	

2.4.6 满意度 多元逐步回归分析显示有是否与朋友居住、尿检阳性率和家人的经济支持是 MMT 治疗满意度的影响因素($P < 0.01$ 或 < 0.05), 方程的 R^2 为 16.4%。见表 8。

表 8 满意度改善的多因素分析结果

	β	标准误差	t	P	R^2
常量	-5.439	4.926	-1.104	0.272	0.164
是否与朋友居住	18.960	7.102	2.670	0.009	
尿检阳性率	-19.615	7.200	-2.724	0.008	
治疗期间家人经济支持	3.498	1.365	2.563	0.012	



3 讨论

3.1 加强家人的支持 家人的精神支持是改善身体健康状况、心理健康状况及家庭关系和社会支持的因素，而满意度的提高与获得家人的用于治疗费和生活费等经济支持频率有关。心理干预是提高戒毒者的心理稳定性、依从性的重要措施，且可减少复吸^[6]。来自家人的精神支持和必要的物质支持是患者坚持治疗，配合治疗的重要动力^[7]。因此，提高家人的参与度，在 MMT 治疗中做好家属的工作，可能是 MMT 成败与否的重要因素。

3.2 控制朋友间的经济支持 吸毒人员的朋友非常少^[8-9]，且多为毒友，这决定了朋友间的经济支持有正反两方面的意义：如果过于频繁的经济支持，虽然可以获得一定程度的归属感，但可能带来对海洛因欣快感的渴求，从而加剧偷吸风险或中途间断 MMT 天数，降低了生活质量改善的程度，另一方面，正如本次研究结果所示：朋友间的经济支持越多，家庭关系和社会支持改善程度越高。

3.3 美沙酮用量适度，控制尿检阳性率 尿检阳性率越高，日常生活活动与经济状况的改善、心理健康状况和满意度改善程度均越差。要控制好尿检阳性率，也就是要减少患者偷吸海洛因的现象，需要有适度的美沙酮用量，使之对海洛因的渴求感得到充分控制。广西研究发现服用美沙酮剂量与维持治疗时间呈高度正相关 ($P < 0.01$)^[10-11]，甘肃研究结果显示：当美沙酮的维持剂量达到 77.60mg 水平时，能够有效降低 MMT 患者吗啡尿检阳性率，从而提高患者的依从性。本研究发现首日剂量越高，患者毒品依赖的改善程度更高，所以不能一味的追求低剂量，应该结合患者的婚姻状况、进入 MMT 之前海洛因每日实际用量、吸毒频率、家人精神支持的频率综合确定。

3.4 增强吸毒时间较长患者的信心 通过本课题

研究发现，吸毒时间较长患者经过 1 年 MMT 后毒品依赖改善程度更高。所以，对长期吸毒患者应该说明 MMT 也能对其产生明显作用。对毒品依赖的显著降低是恢复其正常生活工作极其有利因素，使之对以后恢复家庭功能和社会功能持乐观态度，从而坚持 MMT。

总之，本文研究显示 MMT 治疗前后生活质量改变各维度生活质量改善的影响因素有治疗期间朋友精神支持、治疗期间朋友经济支持、治疗期间家人经济支持、治疗期间家人精神支持、地区、尿检阳性率、第一天服用剂量、既往强制戒毒次数、吸毒时间长短等多个方面，但是，影响吸毒者生活质量改善的因素较多，MMT 治疗开始，就应针对可能存在的问题，综合考虑多个因素，MMT 治疗才会确有成效。

参考文献

- [1] 颜兴伟,杨玉金,龚俊平,等.海洛因依赖者血液中 5 种微量元素检测分析[J].中国公共卫生,2010,26(1):42.
- [2] 颜兴伟,杨玉金,龚俊平,等.海洛因依赖者肝肾功能生化指标检测分析[J].现代预防医学,2011,38(14):2829-2830
- [3] 谢炜麟.海洛因依赖自愿戒毒者生活质量的对照研究[J].中国临床心理学杂志,2004,12(1):86-87.
- [4] American Psychiatric Association. Quick reference to the diagnostic Criteria from DSM-III R. Washington Dc:American Psychiatric Association.1987,107-108.
- [5] 肖琳,吴尊友,李建华,等.阿片类药物成瘾者生活质量量表的初步编制[J].中国心理卫生杂志,2007,21(6):386-388.
- [6] 阚瑞云,韩永会.对美沙酮解毒治疗者进行心理行为干预的研究[J].中国社区医师.2009,1:246.
- [7] 率银良,吕秋霖,金俊,等.美沙酮维持合并心理、家庭干预治疗效果研究[J].中国药物依赖性杂志,2005,14(5):346.350.
- [8] 高倩,成浩,丁蕾,等.美沙酮维持治疗者的社会网络特征与维持状况的研究[J].南京医科大学学报.2008,9:230-232.
- [9] 高倩,丁蕾,成浩.美沙酮维持治疗者社会网络的现状分析及对策[J].医学与哲学.2008,29:39-40.
- [10] 石珊,黄映善,李欣,等.影响美沙酮维持治疗效果的相关因素分析[J].中国药物依赖性杂志.2008,17(1):56-60.
- [11] 朱秀花,魏秀玲,高莉,等.美沙酮维持治疗剂量与尿吗啡检测阳性的关系研究[J].中国药物滥用防治杂志.2009,15(6):341-342.