

少 50% 的胶原酶。有文献报道,采用间断夹闭法也能取得很好的分离效果,但我们觉得间断快速输注法更易于操作,也更稳定些^[8,9]。在此基础上,我们又摸索了不同小鼠体重的最佳消化时间,进一步确保了高活力肝细胞的获得。

为了更进一步提高肝细胞活力,我们采用单密度 Percoll 离心法纯化活的肝细胞^[6]。由于死的肝细胞和一些非肝细胞比重较轻,经离心后就被留在上层,而比重较重的活肝细胞则沉在最下层,使细胞活力提高至 87% 左右。该纯化方法采用低速离心(50g),时间只需 10min,非常简便有效。

总之,本实验通过对传统的胶原酶两步灌流法进行一系列优化和改进,大大提高了小鼠肝细胞分离的稳定性,持续获得了高活力的原代小鼠肝细胞,为后续的实验研究打下了基础。

参考文献

1 Casciano D A, Development and utilization of primary hepatocyte culture systems to evaluate metabolism, DNA binding, and DNA repair of xenobiotics. *Drug Metab Rev*, 2000. 32(1):1-13

- 2 Lucifora J. Hepatitis B virus replication in primary macaque hepatocytes: crossing the species barrier toward a new small primate model. *Hepatology*, 2010. 51(6):1954-1960
- 3 Neufeld D S. Isolation of rat liver hepatocytes. *Methods Mol Biol*, 1997. 75:145-151
- 4 Papeleu, P. Isolation of rat hepatocytes. *Methods Mol Biol*, 2006. 320:229-337
- 5 Li W C, Ralphs K L, Tosh D. Isolation and culture of adult mouse hepatocytes. *Methods Mol Biol*, 2010. 633:185-196
- 6 Bill L, Kreamer, J L S, Norimasa S, *et al*. Use of a low-speed, iso-density percoll centrifugation method to increase the viability of isolated rat hepatocyte preparations. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1986, 22(4):201-211
- 7 Yin Z, Ellis E C, Nowak G. Isolation of mouse hepatocytes for transplantation: a comparison between antegrade and retrograde liver perfusion. *Cell Transplant*, 2007, 16(8):859-865
- 8 Klaunig J E. Mouse liver cell culture. I. Hepatocyte isolation. *In Vitro*, 1981, 17(10):913-925
- 9 余莹, 张日华, 朱自强, 等. 改良的小鼠原代肝细胞分离纯化方法. *南京医科大学学报*, 2008. 28(11):1437-1440

(收稿:2010-11-13)

DNA 修复基因 Rad51 和 ERCC1 蛋白在人肺鳞癌中的表达意义

许 俊 高 俊 陈洪雷

摘 要 目的 探讨 DNA 修复基因 Rad51 和 ERCC1 蛋白表达与肺鳞癌临床病理特征的关系。**方法** 采用二步法(非生物素)检测系统结合组织芯片技术检测 60 例肺鳞癌和 15 例癌旁肺组织中 Rad51 和 ERCC1 的蛋白表达。**结果** 在肺鳞癌组织中 Rad51 和 ERCC1 蛋白阳性表达率分别为 33.33% (20/60)、41.67% (25/60),均显著高于癌旁肺组织($P < 0.05$)。但 Rad51 和 ERCC1 蛋白阳性表达率与肺鳞癌的临床病理参数均无关($P > 0.05$)。60 例肺鳞癌组织中, Rad51 和 ERCC1 蛋白共同阳性表达 14 例,共同阴性表达 29 例,二者呈显著正相关($r = 0.406$, $P = 0.001$)。**结论** 肺鳞癌中存在 Rad51 和 ERCC1 蛋白表达,二者协同作用可能与肺鳞癌的发生发展有关。

关键词 肺肿瘤 Rad51 ERCC1 组织芯片

Significance of Rad51 and ERCC1 Protein Expression in the Human Lung Squamous Cell Cancers. Xu Jun, Gao jun, Chen Honglei. *Department of Surgery, The Centre of Medical Treatment, Hubei 430023, China*

Abstract Objective This study was designed to investigate the expression of DNA repair gene Rad51 protein and its relationship with clinicopathologic features of lung squamous cell carcinoma. **Methods** Rad51 protein was detected by a two-step (non-biotin) detection system combined with tissue microarray technique in 60 cases of lung squamous cell carcinomas and 15 cases of para-cancerous lung tissues. **Results** In lung squamous cell carcinoma tissues, the positive rates of Rad51 and ERCC1 protein were 33.33% (20/60)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30900652)

作者单位:430023 武汉市医疗救治中心外科(许俊);武汉大学基础医学院病理学教研室(高俊、陈洪雷)

and 41.67% (25/60), respectively, which were significantly higher than those of para - cancerous lung tissues ($P < 0.05$). However, no relation was observed between Rad51, ERCC1 protein and the clinicopathologic features of lung squamous cell carcinoma ($P > 0.05$). But positive correlation was found between Rad51 and ERCC1 protein ($r = 0.406$, $P = 0.001$). **Conclusion** Expression of Rad51 and ERCC1 protein could be detected in the lung squamous cell carcinoma tissues. The synergistic action of Rad51 and ERCC1 protein may correlate with the development and progress of lung squamous cell carcinoma.

Key words Lung cancer; Rad51; ERCC1; Tissue microarray

研究发现肺癌的易感性与 DNA 修复能力缺陷有关。DNA 的修复方式至少有核苷酸切除修复系统 (nucleotide excision repair, NER), 它在肺癌的发病和铂类制剂耐药中发挥重要作用^[1]; 还有 DNA 双链断裂修复 (DNA double strand break repair, DDSBR) 系统, 主要由同源性重组和非同源性 DNA 末端连接完成修复。切除修复交叉互补基因 1 (excision repair cross complementing1, ERCC1) 是核苷酸切除修复系统中的一个重要成员。而人 Rad51 基因是机体通过同源重组机制参与 DNA 修复的关键因子, 其与肿瘤的进展以及肿瘤细胞对放疗和化疗药物的耐受均密切相关^[2]。Rad51 和 ERCC1 蛋白在肺癌中的联合研究国内外报道鲜见。而鳞癌是肺癌的常见类型, 为了解 Rad51 和 ERCC1 蛋白在肺鳞癌中的作用, 本研究采用免疫组织化学二步法结合组织芯片技术检测 Rad51 和 ERCC1 蛋白表达及与肺鳞癌临床病理特征的关系。

材料与方法

1. 标本来源: 收集武汉大学中南医院 1997 ~ 2003 年手术切除后的肺鳞癌标本 60 例和癌旁肺组织 15 例作为对照。由桂林泛谱生物技术有限公司协助构建组织芯片, 10×15 点阵, 每点直径 1.1mm, $4 \mu\text{m}$ 厚, 每例组织均有 2 点。60 例肺鳞癌均得到确切的病理诊断其中男性 43 例, 女性 17 例; 年龄 32 ~ 80 岁, 平均年龄 57 岁。按 WHO《肺肿瘤组织学分型》(2000) 标准进行病理学分级为: 高、中分化 39 例, 低分化 21 例。TNM 分期显示: I + II 期 41 例, III 期 19 例。伴有淋巴结转移的肺鳞癌组织 21 例, 不伴有淋巴结转移的肺癌组织 39 例。

2. 主要试剂和仪器: Rad51、ERCC1 均为鼠抗人浓缩型单克隆抗体 (工作浓度分别为 1:100, 1:150, 美国 Abcam 公司), 即用型二步法 (非生物素) 检测试剂盒 (PV-6002) 均购自武汉珈源量子点技术有限公司。奥林巴斯 (Olympus BX51) 显微镜配 CCD DP-72 显微成像系统。

3. 免疫组织化学染色及结果判断: 采用二步法, 基本步骤如下: 组织芯片脱蜡至水; 10mmol/L 的柠檬酸缓冲液 ($\text{pH} 6.0$), 微波修复抗原; $3\% \text{H}_2\text{O}_2$ 去离子水孵育 5min, 以阻断内源性过氧化物酶, 0.01mol/L PBS 冲洗; 滴加 Rad51 和 ERCC1 一抗, 37°C 孵育 90min, 0.01mol/L PBS ($\text{pH} 7.2$) 冲洗, $2 \text{min} \times 3$; 滴加抗小鼠 IgG 抗体 (Fab 段) - HRP 多聚体, 37°C 孵育

20min, 0.01mol/L PBS 冲洗, $2 \text{min} \times 3$; DAB 显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 中性树胶封固并镜检分析结果。空白对照用 PBS 取代一抗, 其余步骤不变, 已知的阳性切片作为阳性对照。Rad51 和 ERCC1 蛋白均以癌细胞胞核内出现棕黄色颗粒为阳性, 在高倍视野 ($\times 400$) 下观察, 根据阳性肿瘤细胞在整个肿瘤中所占的比例, $> 10\%$ 判断为阳性, $\leq 10\%$ 则判断为阴性。

4. 统计学方法: 所有数据均用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 计数资料采用卡方检验和 Fisher 精确概率法。Rad51 和 ERCC1 蛋白表达之间的关系采用 Spearman 相关进行分析。 $P < 0.05$ 时被认为有统计学意义。

结 果

1. Rad51 蛋白表达与肺鳞癌病理特征的关系: 免疫组化二步法结果显示 Rad51 蛋白阳性表达以肿瘤细胞的胞核内出现明显棕黄色或棕褐色颗粒为标准 (图 1A、B)。Rad51 蛋白在 60 例肺鳞癌中阳性表达率为 33.33%, 而在 15 例癌旁肺组织中仅有 1 例有表达, 阳性率为 6.67%, 两者相比差异有显著性 ($\chi^2 = 4.233$, $P = 0.040$)。如表 1 所示, Rad51 蛋白阳性表达与肺鳞癌患者的年龄、性别和病理分级均无关 ($P > 0.05$)。Rad51 蛋白在 TNM 分期 III 期患者的阳性表达率为 42.11%, 高于 TNM 分期 I + II 期患者 (29.27%), 但差异无显著性 ($P = 0.326$)。伴有淋巴结转移组中 Rad51 蛋白阳性表达率为 47.62%, 显著高于无淋巴结转移组 (25.64%), 但差异也无显著性 ($P = 0.085$)。

2. ERCC1 蛋白表达与肺鳞癌病理特征的关系: 免疫组化二步法结果显示 ERCC1 蛋白阳性表达以肿瘤细胞核内出现明显棕黄色或棕褐色颗粒为标准 (图 1C)。ERCC1 蛋白在 60 例肺鳞癌中阳性表达率为 41.67%, 而在 15 例癌旁肺组织中仅有 2 例有表达, 阳性率为 13.33%, 两者相比差异有显著性 ($\chi^2 = 4.181$, $P = 0.041$)。如表 1 所示, ERCC1 蛋白阳性表达与肺鳞癌的临床病理参数均无关 ($P > 0.05$)。

3. Rad51 和 ERCC1 蛋白表达之间的关系: 60 例肺鳞癌组织中, Rad51 和 ERCC1 蛋白共同阳性表达 14 例, 共同阴性表达 29 例, 二者呈显著正相关 ($r = 0.406$, $P = 0.001$)。

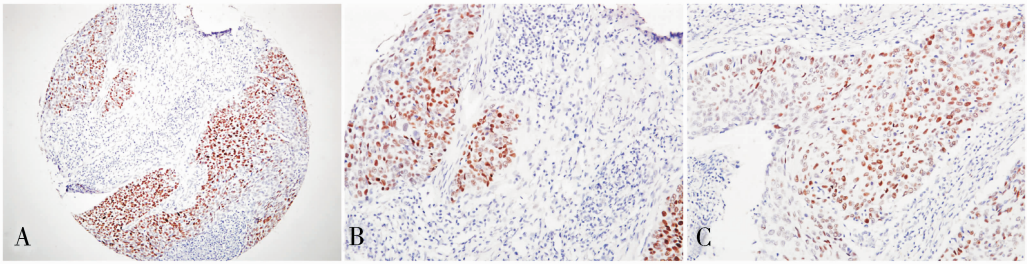


图 1 Rad51 和 ERCC1 蛋白在肺鳞癌细胞核中呈阳性表达 (DAB 显色)
A. 几乎所有的肿瘤细胞表达阳性 (×100); B. 为 A 图的放大 (×200); C. 大部分肿瘤细胞表达阳性 (×200)

表 1 Rad51 和 ERCC1 蛋白表达与肺鳞癌临床病理特征的关系

组别	n	Rad51 蛋白			χ^2	P	ERCC1 蛋白			χ^2	P
		-	+	阳性率 (%)			-	+	阳性率 (%)		
性别					0.657	0.418				0.396	0.529
男性	43	30	13	30.23			24	19	44.18		
女性	17	10	7	41.17			11	6	35.29		
年龄					2.297	0.130				1.386	0.239
<57 岁	22	12	10	45.45			15	7	31.81		
≥57 岁	38	28	10	26.31			20	18	47.37		
病理分级					1.319	0.251				1.131	0.279
高、中分化	39	24	15	38.46			20	19	48.72		
低分化	21	16	5	23.81			15	6	28.57		
TNM 分期					0.963	0.326				0.266	0.606
I + II	41	29	12	29.27			23	18	43.90		
III	19	11	8	42.11			12	7	36.84		
淋巴结转移					2.967	0.085				0.170	0.681
无	39	29	10	25.64			22	17	43.59		
有	21	11	10	47.62			13	8	38.09		

讨 论

DNA 损伤修复系统在维持基因组功能完整性、修复致癌因素所致的损伤以及抗癌过程中起到极为重要的作用,与肿瘤治疗和预后都有密切的关系。研究发现肺癌的易感性与 DNA 修复能力缺陷有关。ERCC1 基因是 NER 系统的关键基因,不仅是 NER 活性的标志性基因,也是细胞存活必须的 DNA 修复基因,其正常表达是维持该修复酶功能的分子基础,在肺癌的发病和铂类制剂耐药中发挥重要作用^[1]。Rad51 是体内参与同源重组 DNA 修复的关键酶,特别是对于双链断裂引起的 DNA 损伤,还在维持 DNA 的遗传稳定和多样性中具有重要作用,并且在肿瘤细胞中还有抗凋亡作用。近年的研究表明 Rad51 表达异常与乳腺癌、胰腺癌和膀胱癌等肿瘤的发生、发展密切相关,而且 Rad51 蛋白高表达与一些肿瘤的化疗耐药和不良预后密切相关^[3]。

本研究通过免疫组化二步法结合高通量的组织

芯片技术检测 Rad51 蛋白表达与肺鳞癌的关系,结果发现 Rad51 蛋白表达位于癌细胞胞核内。Rad51 蛋白在 60 例肺鳞癌中阳性表达率为 33.33%,而在 15 例癌旁肺组织中仅有 1 例有表达,阳性率为 6.67%,两者相比差异有显著性,表明 Rad51 蛋白表达异常在肺鳞癌的发生发展中起重要作用。本研究还发现 Rad51 蛋白阳性表达与肺鳞癌患者的年龄、性别和病理分级均无关,与 Qiao 等^[4]的报道一致。在本研究中 Rad51 蛋白在 TNM 分期 III 期患者的阳性表达率为 42.11%,高于 TNM 分期 I + II 期患者 (29.27%);伴有淋巴结转移组中 Rad51 蛋白阳性表达率为 47.62%,也高于无淋巴结转移组 (25.64%),但差异均无显著性,可能与病例数较少有关,但至少表明 Rad51 蛋白高表达与肺鳞癌的恶性进展有关。而在 NSCLC 中,Rad51 蛋白高表达与不良预后和对铂类药物耐受有关,可能机制为 Rad51 蛋白高表达的非小细胞肺癌患者生存率降低与提高了肿瘤细胞生

存、抗凋亡和化疗、放疗耐受相关^[3]。

目前 ERCC1 与肿瘤的关系正成为研究的热点,它可能与肿瘤的发生密切相关。但由于标本来源及样本量的不同,关于 ERCC1 表达水平尚存在争议。本研究通过免疫组化二步法发现 60 例肺鳞癌组织中 ERCC1 阳性率为 41.67%,显著高于癌旁肺组织,提示 ERCC1 可能与肺鳞癌的发生发展相关,此结果与 Takenaka 等^[5]的报道类似。针对 ERCC1 与临床病理特征的关系,Olaussen^[6]发现 ERCC1 表达与患者的年龄、性别、病理类型、胸膜受侵和脉管受侵等明确相关。Simon 等^[1]在 51 例早期 NSCLC 术后组织标本检测 ERCC1 蛋白的表达,发现其表达水平与肺癌患者的年龄、性别、病理分期、吸烟情况无关,而与病理类型显著相关。本研究并未发现 ERCC1 与肺鳞癌临床病理参数的关系。从上述结果可以看出不同的实验得出了不同的结果,这些差异可能与样本量、标本来源以及不同的检测方法有关,故 ERCC1 与临床病理特征的确切关系尚待大规模的临床实验进一步证实。

ERCC1 能够识别、切除和修复损伤 DNA 片段,缺乏 ERCC1 的细胞会产生 DNA 修复缺陷,诱发细胞的凋亡反应;Rad51 是参与同源重组 DNA 修复的关键酶特别是对于双链断裂引起的 DNA 损伤,在肿瘤细胞中还有抗凋亡作用。目前国内鲜有这两种 DNA 修复系统不同指标联合检测的报道,考虑到这

两种指标可能具有一定联系,本研究初步探索了两者之间的关系,发现 ERCC1 与 Rad51 之间存在显著正相关,分析可能在肿瘤细胞 DNA 损伤修复过程中 NER 和 DDSBR 系统均参与其中,从而产生协同或相加效应,对该相关性的进一步深入研究,可能会给肺鳞癌的治疗提供一条新的途径。

参考文献

- 1 Simon GR, Sharma S, Cantor A, *et al.* ERCC1 expression is a predictor of survival in resected patients with non - small cell lung cancer [J]. Chest, 2005, 127(3): 978 - 983
- 2 Raderschall E, Stout K, Freier S, *et al.* Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells [J]. Cancer Res, 2002, 62:219 - 225
- 3 Connell PP, Jayathilaka K, Haraf DJ, *et al.* Pilot study examining tumor expression of RAD51 and clinical outcomes in human head cancers [J]. Int J Oncol, 2006, 28:1113 - 1119
- 4 Qiao GB, Wu YL, Yang XN, *et al.* High - level expression of Rad51 is an independent prognostic marker of survival in non - small - cell lung cancer patients [J]. Br J Cancer 2005, 93:137 - 143
- 5 Takenaka T, Yoshino I, Kouso H, *et al.* Combined evaluation of Rad51 and ERCC1 expressions for sensitivity to platinum agents in non - small cell lung cancer [J]. Int J Cancer, 2007, 121(4): 895 - 900
- 6 Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, *et al.* DNA repair by ERCC1 in nonsmall lung cancer and cisplatin - based adjuvant chemotherapy [J]. N Engl J Med, 2006, 355(10): 983 - 991

(收稿:2010-11-19)

四嗪二甲酰胺对慢性 B 淋巴细胞白血病 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞体外作用的研究

邱莲女 周永列 黄 强 胡惟孝

摘 要 目的 研究四嗪二甲酰胺(ZGDHu-1)对慢性 B 淋巴细胞白血病(chronic B cell lymphocytic leukemia, B-CLL) CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)的影响,初步探讨其对 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 的作用机制。**方法** B-CLL 外周血淋巴细胞分离培养,流式细胞术检测 ZGDHu-1 作用前后 CD4⁺ CD25^{+/high} CD127^{low}、CD19⁺ CD5⁺ 以及 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 细胞活力、细胞凋亡、Fas、FasL、APO2.7 及 Bcl-2、Bax。**结果** B-CLL 的 CD4⁺ CD25^{+/high} CD127^{low}、CD19⁺ CD5⁺ 明显高于正常对照组,且 CD4⁺ CD25^{+/high} CD127^{low} 与 CD19⁺ CD5⁺ 明显正相关。ZGDHu-1 作用后,B-CLL 的 CD4⁺ CD25^{+/high} CD127^{low}、CD19⁺ CD5⁺ 明显降低,CD4⁺ CD25⁺ Tregs 活力明显下降和凋亡明显升高;CD4⁺ CD25⁺ T 细胞活力也有一定程度的下降,凋亡升高,但其凋亡

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30973568);浙江省医药卫生科学研究基金项目计划(2010KYA015);浙江省医学重点学科建设基金(07-010)

作者单位:310014 杭州,浙江省人民医院检验中心(邱莲女、周永列);血液科(黄强);杭州,浙江工业大学药学院(胡惟孝)

通讯作者:周永列,电子信箱:lab_zyl@126.com