

参考文献

- 1 Hu YY, Dong XQ, Yu WH, *et al.* Change in plasma S100B level after acute spontaneous basal ganglia hemorrhage[J]. Shock, 2010, 33(2):134 – 140
- 2 Wang WH, Yu WH, Dong XQ, *et al.* Plasma adiponectin as an independent predictor of early death after acute intracerebral hemorrhage[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(17 – 18): 1626 – 1631
- 3 Huang M, Hu YY, Dong XQ. High concentrations of procoagulant microparticles in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with acute basal ganglia hemorrhage are associated with poor outcome[J]. Surg Neurol, 2009, 72(5): 481 – 489
- 4 黄曼, 胡悦育, 徐秋萍. 急性脑出血患者血液中微粒促凝活性的变化[J]. 中华急诊医学杂志, 2009, 18(6): 645 – 650
- 5 Silswal N, Singh AK, Aruna B, *et al.* Human resistin stimulates the pro – inflammatory cytokines TNF – alpha and IL – 12 in macrophages by NF – kappa B – dependent pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334(4):1092 – 1101
- 6 Schaeffler A, Gross P, Buettner R, *et al.* Fatty acid – induced induction of Toll – like receptor – 4/nuclear factor – kappa B pathway in adipocytes links nutritional signaling with innate immunity[J]. Immunology, 2009, 126(2):233 – 245
- 7 Wiesner G, Brown RE, Robertson GS, *et al.* Increased expression of the adipokine genes resistin and fasting – induced adipose factor in hypoxic/ischaemic mouse brain[J]. Neuroreport, 2006, 17(11):1195 – 1198

- 8 Brown R, Thompson HJ, Imran SA, *et al.* Traumatic brain injury induces adipokine gene expression in rat brain[J]. Neurosci Lett, 2008, 432(1):73 – 78
- 9 Dong XQ, Hu YY, Yu WH, *et al.* High concentrations of resistin in the peripheral blood of patients with acute basal ganglia hemorrhage are associated with poor outcome[J]. J Crit Care, 2010, 25(2):243 – 247
- 10 Lau CH, Muniandy S. Adiponectin and resistin gene polymorphisms in association with their respective adipokine levels[J]. Ann Hum Genet, 2011, 75(3):370 – 382
- 11 Suriyaprom K, Phonrat B, Namjuntra P, *et al.* The +299(G > A) resistin gene polymorphism and susceptibility to type 2 diabetes in Thais[J]. J Clin Biochem Nutr, 2009, 44(1):104 – 110
- 12 陈思娇, 都镇先, 张海燕, 等. 2 型糖尿病患者血清抵抗素水平与血糖和炎症因子的关系[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2006, 22(2):151 – 153
- 13 徐克群, 沈云志. 抵抗素与急性胰腺炎[J]. 中华胰腺病杂志, 2008, 8(5):350 – 352
- 14 王新锋, 徐永庆. 抵抗素和血栓调节蛋白与急性脑梗死的关系研究[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(8):929 – 931
- 15 Dong XQ, Yang SB, Zhu FL, *et al.* Resistin is associated with mortality in patients with traumatic brain injury[J]. Crit Care, 2010, 14(5):R190

(收稿:2011 – 08 – 22)

(修回:2011 – 12 – 12)

Per2 和 cyclin D1 在非小细胞肺癌中的表达

池 闯 刘 瑜 林晓铭 孙成超

摘 要 **目的** 研究生物钟基因 Per2 和细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)在非小细胞肺癌中的表达,探讨其临床意义。**方法** 采用免疫组织化学染色法检测 60 例非小细胞肺癌组织和 20 例正常肺组织中 Per2 和 cyclin D1 的表达并分析其表达与临床病理特征的关系。**结果** 在非小细胞肺癌和正常肺组织中 Per2 的阳性表达率分别为 71.7% 和 95.0% ($P < 0.05$),而 cyclin D1 的阳性表达率分别为 63.3% 和 15.0% ($P < 0.01$)。非小细胞肺癌中 Per2 的表达缺失与分化程度及 TMN 分期相关($P < 0.05$),而 cyclin D1 的阳性表达和 TNM 分期及淋巴结转移相关($P < 0.05$)。**结论** Per2 在非小细胞肺癌中表达降低,而 cyclin D1 则呈高表达,两者可以作为判断非小细胞肺癌发生、发展和预后的指标。

关键词 非小细胞肺癌 生物钟基因 Per2 细胞周期蛋白 D1 免疫组织化学

Expression of Circadian Gene Per2 and Cyclin D1 in NSCLC. Chi Chuang, Liu Yu, Lin Xiaoming, Sun Chengchao. Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To detect the expression of Per2 and cyclin D1 in non – small – cell lung cancer (NSCLC), and analyze their relation to clinical pathological data. **Methods** The expression of Per2 and cyclin D1 was measured in 60 NSCLC and 20 normal lung tissue by immunohistochemistry assay, then we analyzed the relation with clinical pathological parameters. **Results** The positive expression rates of Per2 in NSCLC and in normal lung tissue were 71.7% and 95.0% ($P < 0.05$), while the positive expression rates of cy-

clin D1 were 63.3% and 15.0% ($P < 0.01$). The negative expression of Per2 in NSCLC was correlated with pathological differentiation or TNM stage ($P < 0.05$), while the positive expression of cyclin D1 in NSCLC was correlated with TNM stage or lymphatic metastasis ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of Per2 in NSCLC was decreased, while the expression of cyclin D1 was increased. The detection of them could be an important marker to evaluate the malignancy degree and the prognosis of NSCLC.

Key words Non-small-cell lung cancer(NSCLC); Circadian gene Per2; Cyclin D1; Immunohistochemistry

Per2 是生物钟中一个必不可少的基因,在中枢、外周组织及肿瘤细胞中均可表达,不仅调节生物周期节律和器官功能,而且在恶性肿瘤的发生、发展中起重要作用。现已发现在乳腺癌、神经胶质瘤、结直肠癌中均存在 Per2 的表达异常,但在非小细胞肺癌中尚未见报道^[1-4]。细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)是细胞周期蛋白家族中的重要成员之一,是参与细胞周期 G₁/S 转化的最关键的阳性调节因子,作为蛋白激酶复合体的调节亚基,调节着细胞周期的进程。cyclin D1 的过度表达可引起细胞增殖失控,使细胞持续性异常增殖,引起癌变。我们采用免疫组化法检测非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)组织和正常肺组织中 Per2 和 cyclin D1 的表达水平,探讨两者在 NSCLC 发生、发展和转移过程中的作用及其临床意义。

材料与方法

1. 材料:选取 2005 年 1 月~2006 年 12 月在温州医学院附属第一医院胸心外科手术的 NSCLC 病例 60 例,其中男性 38 例,女性 22 例;年龄 38~77 岁,≤60 岁的 27 例, >60 岁的 33 例;有吸烟史的 37 例,无吸烟史的 23 例;中央型 24 例,周围型 36 例;鳞癌 28 例,腺癌 32 例;高、中分化 34 例,低分化 26 例;Ⅰ期 14 例,Ⅱ期 28 例,Ⅲ期 18 例;有淋巴结转移的 26 例,无淋巴结转移的 34 例。另选取同期大泡性肺气肿及肺囊肿手术中切除的正常肺组织共 20 例作为对照。

2. 方法:鼠抗人 Per2 (M01)单克隆抗体购自 ABNOVA 公司;兔抗人 cyclin D1 单克隆抗体(SP4)、免疫组化 SP 试剂盒及其他试剂均购自北京中杉金桥公司。组织蜡块 4 μm 连续切片,二甲苯脱蜡,无水乙醇逐步水化,抗原修复,SP 法免疫组化染色,严格按试剂说明书进行。以 PBS 缓冲液替代一抗作为阴性对照。Per2 染色以细胞核或细胞质出现黄色或棕褐色颗粒为阳性。高倍镜下随机选 10 个视野,各计数 100 个细胞,无阳性细胞为 0 分,阳性细胞 1%~25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, >75% 为 4 分。细胞无色为 0 分,浅黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。上述两分值相乘 ≥2 分为阳性。cyclin D1 染色以细胞核出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性,每张切片高倍镜下选定 10 个视野,每个视野计数 100 个细胞,阳性细胞 <5% 为阴性, >5% 为阳性。

3. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 统计学软件。计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Per2、cyclin D1 在非小细胞肺癌和正常肺组织中的表达情况:正常肺组织中 Per2 的阳性表达率为 19/20(95.0%),而 NSCLC 中 Per2 的阳性表达率为 43/60(71.7%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。Cyclin D1 在正常肺组织中的阳性表达率为 3/20(15.0%),而在 NSCLC 中的阳性表达率为 38/60(63.3%),差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2. Per2、cyclin D1 的表达与非小细胞肺癌临床病理特征的关系:Per2 的表达缺失与 NSCLC 的分化程度及 TMN 分期相关($P < 0.05$),而与性别、年龄、是否吸烟、病理类型、大体分型及淋巴结转移等因素无相关性($P > 0.05$)。cyclin D1 的阳性表达与 NSCLC 的 TNM 分期及淋巴结转移相关($P < 0.05$),而与性别、年龄、是否吸烟、病理类型、大体分型及分化程度等因素无相关性($P > 0.05$,表 1)。

讨 论

生物钟基因(circadian clock genes)是生命活动的时序控制器,他们的活动使得器官组织和细胞水平的生命活动高度有序、协同,并呈现明显的昼夜节律。尤其重要的是,它们影响着细胞增殖周期和凋亡、神经内分泌和免疫功能等与恶性肿瘤的发生、发展、治疗和预后等关系密切的各个方面,昼夜节律紊乱促使肿瘤发生,加速肿瘤进展。到目前为止,在哺乳动物体内至少发现有 10 种调节昼夜节律的基因,包括 CK1 ϵ , Clock, Per1、2、3, Bmal 1, dbp, Rev-Erb α 和 Cry1、2。这些高度保守的生物钟基因驱动的转录-翻译反馈环路控制着哺乳动物的生物节律^[5]。Per2 在生物钟基因中扮演着重要的角色,在中枢、外周组织及肿瘤细胞均可表达,不仅调节生物周期节律和器官功能,而且在恶性肿瘤的发生、发展中起重要作用^[6,7]。本组实验结果表明,正常肺组织中 Per2 的阳性表达率为 19/20(95.0%),而 NSCLC 中 Per2 的阳性表达率为 43/60(71.7%),提示在非小细胞肺癌的发生中存在 Per2 的表达降低。同时,我们还发现 Per2 在非小细胞肺癌中的表达和肿瘤分化程度及 TMN 分期相关($P < 0.05$),即肿瘤的分化程度越低,

表1 Per2、cyclin D1 在 NSCLC 中的表达及其与临床病理特征的关系

临床病理特征	n	PER2		χ^2	P	cyclin D1		χ^2	P
		(+)	(-)			(+)	(-)		
正常肺组织	20	19	1			3	17		
肺癌组织	60	43	17	4.683	0.030	38	22	14.025	0.000
性别									
男性	38	25	13			25	13		
女性	22	18	4	1.763	0.184	13	9	0.269	0.604
年龄(岁)									
≤60	27	20	7			18	9		
>60	33	23	10	0.140	0.708	20	13	0.235	0.628
是否吸烟									
是	37	27	10			22	15		
否	23	16	7	0.081	0.776	16	7	0.624	0.430
病理类型									
鳞癌	28	18	10			18	10		
腺癌	32	25	7	1.409	0.235	20	12	0.021	0.886
大体分型									
中央型	24	17	7			17	7		
周围型	36	26	10	0.014	0.907	21	15	0.969	0.325
分化程度									
高中分化	34	28	6			20	14		
低分化	26	15	11	4.413	0.036	18	8	0.687	0.407
TMN 分期									
I 期	14	12	2			5	9		
II 期	28	22	6			18	10		
III 期	18	9	9	6.179	0.046	15	3	7.710	0.021
淋巴结转移									
有	26	16	10			22	4		
无	34	27	7	2.318	0.128	16	18	8.949	0.003

TMN 分期越晚,Per2 基因蛋白阳性表达率也愈低,提示 Per2 参与了 NSCLC 的侵袭和转移等生物学行为,非小细胞肺癌的转移可能与生物节律的紊乱有关。王雅平等^[2]在结直肠癌中亦有相似的发现。总之,生物钟基因 Per2 的异常表达与肿瘤的发生、发展相关,对评价恶性肿瘤的侵袭性和预后也有意义。

Per2 可以通过调控细胞的增殖和凋亡在肿瘤发生和抑制方面具有重要作用,研究发现在 Per2 基因缺失的小鼠中,胸腺细胞受到辐射损伤后仍能存活,同时伴有 cyclin D1 等细胞周期蛋白表达失去调控。cyclin D1 是细胞周期蛋白家族中的重要成员之一,位于染色体 11q13,由 295 个氨基酸构成,分子质量为 34kDa,含量随细胞周期呈周期性变化。cyclin D1 于 1991 年被提出作为一种原癌基因,是参与细胞周期 G₁/S 转化的最关键的正性调节因子,作为蛋白激酶复合体的调节亚基,调节着细胞周期的进程,其表达蛋白通过启动下游的 CDKs(细胞周期素依赖激酶)而促进 G₁/S 期转移,从而促使细胞的分裂与增殖^[8]。cyclin D1 的过度表达可引起细胞增殖失控,

使细胞持续性异常增殖,引起癌变。我们研究发现,相对于正常肺组织,非小细胞肺癌中 cyclin D1 的表达明显升高($P<0.01$);同时,cyclin D1 在非小细胞肺癌中的表达和肿瘤 TMN 分期及淋巴结转移相关($P<0.05$),这与文献[9,10]等报道一致。可见,cyclin D1 不仅与 NSCLC 的发生有关,也影响其转移、预后。

综上所述,Per2 和 cyclin D1 的联合检测可以作为判断非小细胞肺癌发生、发展和预后的指标,有助于从分子生物学水平进一步研究其在肿瘤发生、发展中的机制,可以为肺癌的预防、治疗提供新的思路。

参考文献

- 1 Chen ST, Choo KB, Hou MF, *et al.* Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers[J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(7):1241-1246
- 2 Xia HC, Niu ZF, Ma H, *et al.* Deregulated expression of the Per1 and Per2 in human gliomas[J]. *Can J Neurol Sci*, 2010, 37(3):365-370
- 3 Oshima T, Takenoshita S, Akaike M, *et al.* Expression of circadian genes correlates with liver metastasis and outcomes in colorectal cancer

- [J]. *Oncol Rep*, 2011 25(5):1439-1446
- 4 王雅平, 华鲁纯, 蒿汉坤, 等. 生物钟基因 hPer2 在人结直肠癌中的表达及其临床意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2009, 26(8):1034-1036
 - 5 Badiu C. Genetic clock of biologic rhythms[J]. *J Cell Mol Med*, 2003, 71(4):408-416
 - 6 Fu L, Pelicano H, Liu J, *et al*. The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response *in vivo* [J]. *Cell*, 2002, 111(1):41-50
 - 7 Yang X, Wood PA, Oh EY, *et al*. Down regulation of circadian clock gene Period2 accelerates breast cancer growth by altering its daily growth rhythm[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 117(2):423-431
 - 8 Zhou P, Jiang W, Weghorst CM, *et al*. Overexpression of cyclin D1 enhances gene amplification[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(1):36-39
 - 9 Jin M, Inoue S, Umemura T, *et al*. Cyclin D1, p16 and retinoblastoma gene product expression as a predictor for prognosis in non-small cell lung cancer at stage I and II [J]. *Lung Cancer*, 2001, 34(2):207-218
 - 10 宋鑫, 冀文茹, 夏养志, 等. p15、细胞周期蛋白 D1 和转移生长因子 $\beta 1$ 在非小细胞肺癌中的表达及其意义[J]. *中华病理学杂志*, 2001, 30(3):218-219

(收稿:2011-11-26)

(修回:2011-12-11)

JAK-STAT 通路参与 CTGF 诱导人胚肺成纤维细胞转分化的研究

黄晓燕 廉姜芳 金丽华 徐炜烽 杨 曦 张 珠

摘 要 **目的** 研究 JAK-STAT 信号通路在重组人结缔组织生长因子(recombinant human, CTGF)诱导人胚肺成纤维细胞(HFL-I)转分化过程中的作用。**方法** 将体外培养的 HFL-I 分为正常对照组、CTGF 组及 CTGF + JAK-STAT 特异性抑制剂通路抑制剂 AG490 组,选取不同时相点,Western blotting 测定平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、磷酸化蛋白(p-STAT3)和总蛋白 STAT3 的蛋白表达,RT-PCR 检测 STAT3 mRNA 表达。**结果** 正常体外培养的 HFL-I 有微量的 p-STAT3、 α -SMA 表达,加入 20ng/ml CTGF 诱导 15min 后 p-STAT3 水平明显升高($P < 0.05$),30min 时升至顶峰后逐渐减弱;诱导 24h 后 α -SMA 表达显著升高($P < 0.05$)。AG490 50 μ mol/L 预处理 60min, p-STAT3 和 α -SMA 表达明显抑制($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** CTGF 诱导 HFL-I 转分化为肌成纤维细胞, JAK-STAT 通路参与上述过程,其特异性抑制剂 AG490 可有效抑制该效应。

关键词 JAK-STAT 肺纤维化 人胚肺成纤维细胞 CTGF α -SMA

Involvement of JAK-STAT Signaling in CTGF Promoted Lung Fibroblast-myofibroblast Transdifferentiation. Huang Xiaoyan, Lian Jiangfang, Jin Lihua, *et al*. Key Laboratory of Organ Transplantation, Li Huili Hospital, Zhejiang 315041, China

Abstract Objective To investigate the effect of JAK-STAT signal transduction pathway in the transdifferentiation process of recombinant human CTGF-stimulated human embryonic lung fibroblasts(HFL-I). **Methods** The HFL-I were cultured *in vitro* and were divided into three equal groups: control group, CTGF group, CTGF and JAK-STAT inhibitor AG490 group. The expression levels of total-STAT3, phosphor-STAT3 and α -SMA in each group were detected by western blot, while RT-PCR was used to test the expression of STAT3 mRNA in each group. **Results** The levels of p-STAT3 and α -SMA were significantly increased in CTGF group compared with control group($P < 0.05$). And JAK-STAT inhibitor AG490 (50 μ mol/L) largely down-regulated α -SMA and p-STAT3 expression in response to CTGF($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** JAK-STAT is a upstream mediator in the lung fibroblast-myofibroblast process stimulated by CTGF, and JAK-STAT inhibitor AG490 can significantly abrogated the effect of CTGF.

Key words JAK-STAT; Pulmonary fibrosis; Human fetal lung fibroblasts; CTGF; α -SMA

基金项目:宁波市自然科学基金资助项目(2008A610081);宁波市医学科技项目(2008002)

作者单位:315041 宁波市医疗中心李惠利医院器官移植重点实验室(黄晓燕、杨曦);心内科(廉姜芳、张珠);科教科(金丽华);检验科(徐炜烽)

通讯作者:廉姜芳,电子信箱:hjmpin@163.com

酪氨酸蛋白激酶/信号转导子和转录激活子(janus protein tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK-STAT)通路是细胞因子信号转导的重要通路之一,不仅参与炎症反应,同时也