文章编号:1000-5404(2005)20-2045-03

论著

原代人胎胰岛细胞凋亡相关因子的检测及其意义

陈 兵[1],王海惠[1],郭海涛[2],王宇明[2] (第三军医大学西南医院:[1]内分泌科,[2]全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨TGF-β、P21ras、c-fos与原代人胎胰岛细胞凋亡的关系。**方法** 半定量RT-PCR和免疫组化染色(SABC法)检测不同生长时期原代人胎胰岛细胞TGF-β、P21ras、c-fos的表达,设原代人成纤维细胞为对照。**结果** P21ras在原代人胎胰岛细胞各期均弱表达,其中潜伏期、指数生长期显著弱于原代人成纤维细胞($P<0.01$);c-fos仅在原代人成纤维细胞、原代人胎胰岛细胞停滞期可检出;TGF-β1在原代人胎胰岛细胞停滞期表达最强,潜伏期其次,指数生长期最弱,但均强于原代人成纤维细胞。**结论** 原代人胎胰岛细胞的增殖和凋亡可能是非P21ras依赖的;c-fos蛋白的表达对原代人胎胰岛细胞凋亡启动可能是必须的;TGF-β1在原代人胎胰岛细胞增殖中可能发挥负性调节作用。

关键词: 糖尿病;胰岛细胞;细胞凋亡
中图法分类号: R322.57;R329.24;R392.11 **文献标识码:** A

Detection and significance of apoptosis related factors in the primary human embryonic pancreatic islet cells

CHEN Bing[1], WANG Hai-hui[1], GUO Hai-tao[2], WANG Yu-ming[2] ([1]Department of Endocrinology, [2]Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the relationship between TGF-β, P21ras, c-fos and the apoptosis of human embryonic pancreatic islet cells. **Methods** Semi-quantitative RT-PCR and immunohistochemistry (SABC method) were used to detect TGF-β, P21ras, c-fos expression at different growth periods of the primary human embryonic pancreatic islet cells and human fibroblast cells. **Results** P21ras expression was weak in every period of the pancreatic islet cells and significantly weaker than the fibroblast cells at exponential growth period and was stronger than in incubation period and retention period ($P<0.01$). The expression of c-fos in retention period of the pancreatic islet cells and the fibroblast cells could be detected, while not in incubation period and exponential growth period. There were high, mild and weak levels of TGF-β1 expression in retention period, incubation period and exponential growth period of the pancreatic islet cells, respectively. TGF-β1 expression of the fibroblast cells in different periods was weaker than that of the pancreatic islet cells. **Conclusion** The proliferation and apoptosis of human embryonic pancreatic islet cells are not likely to dependent on P21ras. The expression of c-fos protein may be indispensable to the apoptosis start-up in human embryonic pancreatic islet cells. There is a negative effect of TGF-β1 on the proliferation regulation of human embryonic pancreatic islet cells.

Key words: diabetes; pancreatic islet cells; apoptosis

胰岛细胞移植作为一种极具潜力的糖尿病治疗手段而成为目前研究的热点,但供体细胞来源仍为胰岛细胞移植中亟待解决的难题[1]。其原因之一是胰岛细胞在体外增殖能力非常有限,推测可能与细胞凋亡机制有关[2]。为此,我们检测了体外培养的原代胰岛细胞不同时期凋亡相关因子的表达情况,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 细胞

原代人胎胰岛细胞和对照原代人成纤维细胞分别按文献[3]方法分离、培养及鉴定,分别取潜伏期、指数生长期及停滞期细胞作为检测标本。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271442),第三军医大学西南医院科技创新基金资助项目(2002)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30271442) and the Research Foundation for Sci & Tech Innovation by Southwest Hospital of Third Military Medical University (2002)

作者简介: 陈 兵(1960-),男,江苏省南京市人,博士,主任医师,教授,主要从事内分泌代谢疾病方面的研究,发表论文52篇。电话:(023)68754138

收稿日期: 2005-04-14;**修回日期:** 2005-09-09

1.2 引物

购自上海生工生物工程技术公司，序列如下：

P21ras：F5′-TTAGGGCTTCCTCTTGGAAAGAT-3′；R5′-ATGTCAGAACCGGCTGGGGATGTC-3′；共496 bp。

β-actin：F5′-GTGGGCCGGTCTAGGCACCAA-3′；R5′-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3′；共540 bp。

1.3 P21ras 半定量 RT-PCR 检测

取上述细胞 2×10^7 加入 Tripure 试剂（Roche 公司）提取RNA，利用上述引物和 RT-PCR 一步法试剂盒（Promga 公司）扩增，产物电泳后上 UVP 紫外线凝胶图像分析系统（Bio-Rad 公司）测定光密度比值（样本光密度值/内参照光密度值）。

1.4 c-fos、TGF-β1 免疫细胞化学检测

爬片法将上述细胞接种于多聚-L-赖氨酸包被的载玻片上，SABC 试剂盒（博士德公司）检测，设 PBS 替代一抗为对照。c-fos 表达于细胞核，按染色强度分五级：无着色（－）、淡黄色（±）、棕黄色（＋）、深棕黄色（＋＋）棕褐色（＋＋＋）。TGF-β1 表达于细胞浆，采用德国 LEICA 图像分析系统计算平均光密度植。

1.5 统计学处理

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 统计程序包进行 t 检验。

2 结果

2.1 不同生长期细胞 P21ras mRNA 的表达

原代人成纤维细胞指数生长期表达最强，潜伏期其次，停滞期最弱；原代人胎胰岛细胞各期均弱表达，其中潜伏期、指数生长期显著弱于原代人成纤维细胞（表1）。

表1 细胞 P21ras mRNA 表达（光密度比值，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 P21ras mRNA expression level in fibroblast cells and pancreatic islet cells (D, $\bar{x}\pm s$)

Groups	Incubation period	Exponential growth period	Retention period
Fibroblast cells	0.27±0.14	0.49±0.21	0.15±0.09
Pancreatic islet cells	0.12±0.06*	0.13±0.07*	0.11±0.06

*：$P<0.01$，*vs* fibroblast cells

2.2 不同生长期细胞 c-fos、TGF-β1 蛋白的表达

c-fos 仅在原代人成纤维细胞、原代人胎胰岛细胞停滞期可检出，其它生长期不表达。TGF-β1 在原代人成纤维细胞停滞期表达最强，潜伏期其次，指数生长期最弱；原代人胎胰岛细胞各期的 TGF-β1 表达强度顺序与原代人成纤维细胞相似，但均强于原代人成纤维细胞（表2）。

表2 不同生长时期细胞 TGF-β1 免疫组化结果（平均光密度值，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Immunohistochemical results of TGF-β1 in fibroblast cells and pancreatic islet cells (Average optical value, $\bar{x}\pm s$)

Groups	Incubation period	Exponential growth period	Retention period
Fibroblast cells	0.18±0.02	0.15±0.02	0.26±0.02
Pancreatic islet cells	0.22±0.02*	0.20±0.02*	0.28±0.02

*：$P<0.05$，*vs* fibroblast cells

3 讨论

文献[2]报道认为β细胞凋亡不但在1型糖尿病的发病中起着主导的作用，而且还参与了部分2型糖尿病的发病机制。无论是阻止体内胰岛细胞的凋亡，还是减少体外培养胰岛细胞的凋亡率，抑或利用细胞工程技术获得足够数量的胰岛细胞用于移植，均需对胰岛细胞凋亡的机制进行研究。

P21ras 参与大多数细胞有丝分裂信号的传递[4]。文献[5]报道成纤维细胞中 Ras 信号系统的主要作用是刺激细胞生长。本研究的结果中 P21ras mRNA 在原代人成纤维细胞指数生长期表达最强，为上述论点提供了佐证。但作为细胞增殖反馈平衡调控网络中的一员，P21ras 的过度表达可激活诸如 Ras-MAPK 这样的细胞凋亡通路。此种作用在正常细胞虽然表现相对短暂或微弱，但却是防止细胞无限制增殖而发生转化的重要保护机制之一[5]。本研究中原代人胎胰岛细胞各个时期 P21ras mRNA 均呈弱表达，且无明显时相的变化，提示至少原代人胎胰岛细胞的增殖和凋亡可能是非 P21ras 依赖的。

c-fos 是一即刻早期基因（immediate early gene），有丝分裂原刺激时能快速瞬间表达，并可与 c-jun 结合形成 AP-1 复合物。而 AP-1 已为证明能进一步激活与细胞凋亡有关的下游基因，进而导致细胞凋亡[6]。本研究的结果显示 c-fos 蛋白在成纤维细胞、胰岛细胞停滞期均一过性表达，提示 c-fos 蛋白的表达对这两种细胞的凋亡启动可能是必须的。

已经证实 TGF-β 可诱导细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子（cyclin-dependent kinasese inhebitoors，CKIs）表达，如 p15Ink4B 和 p27Kip1 等。CKIs 与细胞周期蛋白（cyclins）竞争结合细胞周期蛋白依赖性激酶（cyclin-dependent kinases，CDKs），使 cyclin-CDK 全酶的装配和活性受抑，进而发挥其在细胞增殖周期中的负性调节作用[7]。本研究的结果显示 TGF-β1 在原代人成纤维细胞停滞期表达最强，潜伏期其次，指数生长期最弱，进一步证明了 TGF-β 在细胞增殖中的负性调节作用。此外，在原代人胎胰岛细胞各期的 TGF-β1 表达强度顺序与原代人成纤维细胞相似，但均强于原代人成纤维细胞与实验中检测结果一致，提示 TGF-β 的这种作用在象胰岛细胞这样的高度分化的细胞可能更为重要。

参考文献：

[1] 崔　岱，刘　超. 糖尿病胰岛移植及细胞治疗的细胞来源[J]. 国外医学内分泌学分册，2004，24(1)：36－38.

[2] Mathis D, Vence L, Benoist C. β-Cell death during progression to diabetes[J]. Nature, 2001, 414(6865): 792－798.

[3] 胡远峰，王煜飞，丁一明，等. 人胎胰胰岛细胞单层培养的研究[J]. 中华器官移植杂志，1990，11(4)：158－160.

[4] Bokoch G M. Biology of the p21-activated kinases[J]. Annu Rev Biochem, 2003, 72: 743－781.

[5] Bloom J, Pagano M. To be or not to be ubiquitinated[J]? Cell Cycle, 2004, 3(2): 138－140.

[6] Kovacs K J. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re) view from a functional map[J]. Neurochem Int, 1998, 33(4): 287－297.

[7] Chin D, Boyle G M, Parsons P G, *et al*. What is transforming growth factor-beta (TGF-beta) [J]? Br J Plast Surg, 2004, 57(3): 215－221.

（编辑　张大春）

文章编号：1000-5404(2005)20-2047-01

个案与短篇

腹膜后原始神经外胚层肿瘤 1 例

A case report of retroperitoneal primitive neuroectodermal tumor

高　天，马秀清　（解放军第 203 医院妇产科，齐齐哈尔 161000）

患者，女，42 岁。发现盆腔包块 2 周，于 2005 年 7 月 18 日入院。患者 11 年前因"子宫肌瘤"行子宫全切除术，双附件保留。患者入院前 2 周无明显诱因出现少量阴道出血，量少，持续约 1 d 后血止，无其它不适，行妇科检查发现盆腔内包块，进一步行 B 超、CT 检查均提示盆腔内肿物。妇科检查：盆腔可扪及约 6 cm×8 cm 大小包块，质偏硬，表面尚光滑，形态不太规则，活动度差，有压痛。CT 示：右侧盆腔内见一约 7 cm×3 cm 大小边界清楚的等密度病灶，其密度均匀，CT 值为 40 Hu，肠腔向左侧推挤。其病灶与阴道残端相连。腹部彩超检查：右侧髂窝、髂总动脉分支的内侧见 4.2 cm×4.5 cm 的较低回声区，形态不规则，边界清，呈"分叶状"改变，内部可见较丰富的血流信号，包块与右侧膀胱壁关系较密切。临床初步诊断为卵巢恶性肿瘤。行剖腹探查术，术中见腹直肌内多量大小不等灰白色结节，以右侧腹直肌明显增厚、变硬。清除肉眼可见结节，送冰冻病检，进腹探查见：子宫缺如，双侧附件区与周围组织严重粘连，分解粘连后见双侧卵巢正常，双输卵管表面不光滑，但未见肿瘤转移结节；后腹膜偏右侧约 10 cm×7 cm 大小包块，灰白，不规则，位于右侧髂内血管与右侧输尿管之间。术中冰冻回报：腹膜后恶性肿瘤。遂决定行腹膜后肿瘤切除＋双侧附件切除＋大网膜、阑尾切除＋盆腔淋巴结清扫术。病理诊断：（右侧腹膜后）原始神经外胚层肿瘤（PNET）。免疫组化检查：Vimentin(+++)、NSE(++)、S-100(+/－)、CgA(－)、Syn(－)、HMB45(－)、CK(－)、EMA(－)、CD117(－)。

讨论

原始神经外胚层肿瘤（primitive neuroectodermal tumor, PNET）首先由 Hart 等[1]于 1973 年提出。其特点是：①为中枢神经系统肿瘤；②主要发生于早龄期；③临床表现高度恶性；④多发生于大脑半球深部；⑤肉眼界限明显，多伴出血、坏死与囊性变；⑥光镜下由致密深染的小细胞构成，故又称蓝瘤（blue tumor）。核分裂象较多，无特殊排列，至少 90% 的细胞缺少分化特征，但可见到局灶性向神经元和/或神经胶质分化的证据；⑦间叶成分明显。PNET 是一种罕见的由神经嵴衍生的恶性肿瘤，分为中枢型和外周型两类。外周性 PNET 可发生于软组织、骨、腹膜后、盆腔、胸膜和肺，它包括了骨内和骨外的 PNET、Askin 瘤，以及伴多向分化的色素性神经外胚层瘤等。患者以男性为主，发生部位较多，可发生在直肠、腹膜后、腹股沟、淋巴结、胸壁、睾丸、鼻腔及骨组织等。

近年来，随着免疫组化、电子显微镜技术的发展，对本病的认识逐渐深入，报道逐渐增加。文献[2]报道，免疫组化显示肿瘤细胞胞膜 NSE 和 NF 多数阳性，CK 阴性，此结果与本例病理学检查结果一致。总结国内外文献可知，外周型原始神经外胚层瘤多发生于青少年男性，年龄 6～65 岁，其中，发生在腹膜后的 PNET，尤其是女性患者国内尚少见报道。本病例为女性患者，且发生于腹膜后，术后 10 d 进行了全身 PET 代谢显像，盆腔及全身其余部位均未见明显葡萄糖异常代谢灶。出院后坚持规范化疗，定期随访。

关键词：原始神经外胚层肿瘤；腹膜后

中图法分类号：R730.264　文献标识码：B

参考文献：

[1] Hart M N, Earle K M. Primitive neuroectodermal tumors of the brain in children[J]. Cancer, 1973, 32(4): 890－897.

[2] 姜　虹，冯瑞娥. 皮肤原始神经外胚层肿瘤 1 例报告并文献复习[J]. 诊断病理学杂志，2003，10(5)：291－292.

（编辑　张大春）

作者简介：高　天（1978－），女，黑龙江省齐齐哈尔市人，硕士研究生，医师，主要从事肿瘤病理学方面的研究。电话：13637915827，E-mail：cecilia7@sohu.com

收稿日期：2005-09-02；修回日期：2005-10-05