论著

文章编号:1000-5404(2009)05-0420-03

大肠癌中聚(腺苷二磷酸核糖)水解酶对聚(腺苷二磷酸核糖)聚合酶的调节作用及意义

李 佳,林 玲,王娅兰 (重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 初步探讨大肠癌中聚(腺苷二磷酸核糖)水解酶[Poly(ADP-ribose) glycohydrolase, PARG]与聚(腺苷二磷酸核糖)聚合酶[Poly(ADP-ribose) polymerase, PARP]的关系。**方法** 应用S-P免疫组化检测人大肠癌组织中PARG、PARP的表达;以PARG抑制剂丹宁酸(Gallotannin,GLTN)为处理因素,采用流式细胞计数检测小鼠结肠腺癌CT26细胞中PARG、PARP表达变化。**结果** PARG和PARP在人大肠癌组织中的表达呈正相关($r=0.300\ 01$, $P<0.05$);流式细胞计数显示,用GLTN处理后,小鼠结肠腺癌CT26细胞中PARG、PARP的阳性细胞率分别较对照组降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 大肠癌中PARG和PARP的表达有相关性,PARG抑制剂可以抑制PARG及PARP表达,PARG可能对PARP具有调节作用。

关键词:聚(腺苷二磷酸核糖)水解酶;聚(腺苷二磷酸核糖)聚合酶;大肠癌
中图法分类号:R345; R730.23; R735.34 **文献标识码**:A

Regulatory effects of PARG on PARP in colorectal carcinoma

LI Jia, LIN Ling, WANG Ya-lan (Department of Pathology, Chongqing Medical University, College of Basic Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the relationship between Poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) and Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in colorectal carcinoma. Methods Immunohistochemical S-P staining was used to examine the expressions of PARG and PARP in 44 specimens human colorectal carcinoma. The positive rate of PARG and PARP in murine colon carcinoma CT26 cells was detected by flow cytometry before and after the treatment of PARG inhibitor Gallotannin. Results PARG and PARP expressed in colorectal carcinoma specimens was of positive correlation ($r=0.300\ 01$, $P<0.05$). The expressions of PARG and PARP were weaker in Gallotannin-treated CT26 cells than those in the control cells ($P<0.05$). Conclusion The expressions of PARG and PARP are correlated positively in colorectal carcinoma. PARG inhibitor suppresses the expressions of both PARG and PARP, indicating that PARG may regulate PARP.

Key words: Poly(ADP-ribose) glycohydrolase; Poly(ADP-ribose) polymerase; colorectal carcinoma

在细胞内众多蛋白质的聚ADP糖基化过程中,聚(腺苷二磷酸核糖)聚合酶[Poly(ADP-ribose) polymerase, PARP]和聚(腺苷二磷酸核糖)水解酶[Poly(ADP-ribose) glycohydrolase, PARG]发挥着重要的作用[1]。研究表明,PARP与多种疾病的发生、发展有关[2-4]。而在炎症性疾病的聚ADP糖基化过程中,PARG对PARP的活性则起着重要的调节作用,抑制PARP和PARG能在同等程度上降低缺血再灌注引起的肠组织损伤,抑制PARG能有效的抑制PARP活性[5,6]。但在肿瘤中,两者关系如何,尚少见文献报道。本研究采用免疫组化S-P法,观察大肠癌组织中PARG和PARP的表达及关系;同时,应用PARG抑制剂丹宁酸(Gallotannin,GLTN)处理小鼠结肠癌CT26细胞,观察其PARG、PARP表达变化,初步探讨大肠癌中PARG与PARP的关系。

基金项目:重庆市自然科学基金(2006BB52881)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2006BB52881)
作者简介:李 佳,女,四川省南充市人,硕士研究生,主要从事肿瘤病理方面的研究。E-mail: jarjarlee@163.com
通信作者:王娅兰,电话:(023)68485789, E-mail: wangyalan074@gmail.com
收稿日期:2008-06-06;**修回日期**:2008-07-16

1 材料与方法

1.1 实验材料

大肠癌标本($n=44$)均取自重庆医科大学病理学教研室,病理学分级参照WHO大肠癌分级标准。所有标本经40 g/L甲醛液固定,石蜡包埋,5 μm连续切片。CT26为小鼠结肠腺癌细胞系,由四川大学魏于全教授惠赠。抗PARG、PARP抗体均购自Santa Cruz公司,S-P免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒、FITC标记兔抗羊IgG和FITC标记羊抗兔IgG均购自北京中杉生物技术公司,GLTN购自Sigma公司。

1.2 实验方法

1.2.1 S-P免疫组化染色 操作按试剂盒说明书进行。染

色结果的判断参照文献[7]的方法。染色强度:无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;阳性范围:观察 5 个不重叠的中倍视野(10 × 20),每个视野计数 100 个肿瘤细胞,将各个视野中阳性细胞数的平均百分率作为该切片的阳性细胞率;<5% 为 0 分,5% ~25% 为 1 分,26% ~50% 为 2 分,>50% 为 3 分。上述两项结果相加,0 分为阴性(-),1 ~3 分为弱阳性(+),4 ~5 分为中等度阳性(++),6 分为强阳性(+++)。以 PBS 代替一抗为阴性对照。

1.2.2　细胞培养　　将小鼠结肠腺癌细胞 CT26 置入含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中,37 ℃、5% CO_2 培养箱培养。

1.2.3　流式细胞计数　　将处于对数生长期 CT26 细胞悬液按 3×10^5 ml^{-1} 接种于 100 ml 培养瓶,培养 24 h 后,GLTN 处理组加入最终浓度为 100 μmol/L 的 PARG 抑制剂 GLTN,对照组加入不含 GLTN 的等体积生理盐水。培养 12 h 后分别收集对照组和 GLTN 处理组细胞。按试剂说明书分别进行 PARG 和 PARP 染色标记,流式细胞仪计数 10 000 个细胞中抗体标记阳性的细胞。

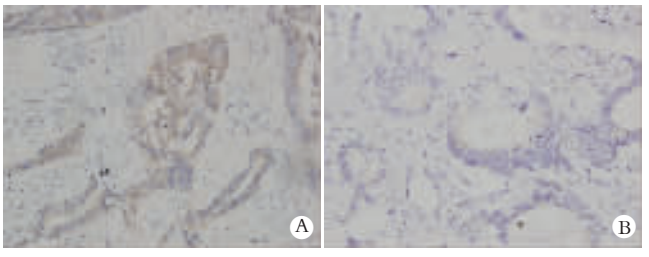
1.3　统计学处理

采用 SAS 8.0 统计软件,对大肠癌中 PARG 和 PARP 的免疫组化结果进行 pearson 相关分析、对流式细胞计数结果进行 u 检验。

2　结果

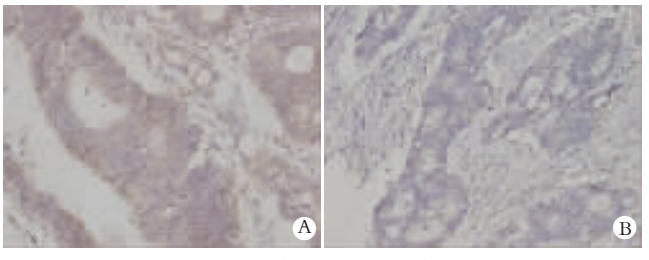
2.1　人大肠癌 PARG 和 PARP 的表达

S-P 免疫组化结果显示,PARG 阳性着色主要位于肿瘤细胞质,44 例标本中,阳性表达 25 例,其中强阳性 8 例,中度阳性 5 例,弱阳性 12 例(图 1);PARP 阳性着色部分位于肿瘤细胞质,部分位于细胞核,44 例标本中,阳性表达 43 例,其中强阳性 23 例,中度阳性 3 例,弱阳性 17 例(图 2)。经 Pearson 相关分析,两者的表达呈正相关趋势($r = 0.300\ 01$,$P < 0.05$)。



A:强阳性表达;B:弱阳性表达

图 1　PARG 在人大肠癌组织中的表达　(S-P × 400)

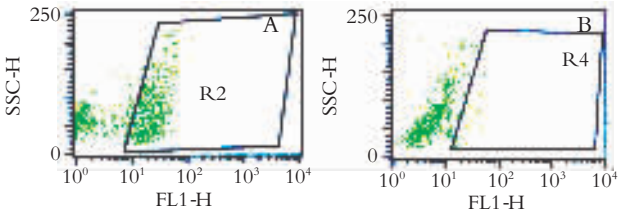


A:强阳性表达;B:弱阳性表达

图 2　PARP 在人大肠癌组织中的表达　(S-P × 400)

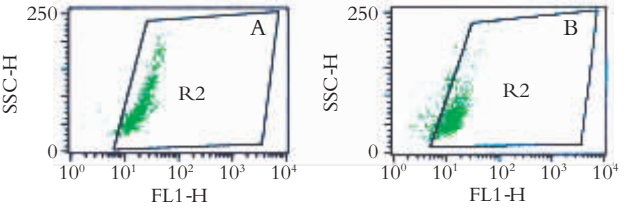
2.2　GLTN 对小鼠 CT26 细胞 PARG 和 PARP 表达的影响

流式细胞计数结果显示,对照组中,PARG 和 PARP 的阳性细胞率分别为 55.41%、96.02%;用浓度为 100 μmol/L 的 GLTN 处理后,两者阳性细胞率分别为 7.3%、84.21%。GLTN 处理组 PARG、PARP 阳性细胞率均较对照组降低(图 3、4)。对 GLTN 处理前后 PARG 的阳性细胞率进行 u 检验分析,差异具有统计学意义($P < 0.05$);同样,对处理前后 PARP 的阳性细胞率进行 u 检验分析,差异亦具有统计学意义($P < 0.05$)。



A:对照组;B:GLTN 处理组

图 3　流式细胞计数小鼠结肠腺癌 CT26 细胞中 PARG 阳性细胞



A:对照组;B:GLTN 处理组

图 4　流式细胞计数小鼠结肠腺癌 CT26 细胞中 PARP 阳性细胞

3　讨论

PARG 是细胞 PAR 化过程中极其重要的一种水解酶,由一个 N 端调节域和一个 C 端催化域构成,主要分布在细胞质。在动态的 PAR 化过程中,PARP 以 NAD^+ 为底物,生成尼克酰胺和 ADP-核糖,并使后者聚合成有分子结构的 PAR,共价结合到相关的核受体蛋白和其自身。但 PAR 由 PARP 合成后,几乎立即被具有活性的 PARG 降解。PARG 能沿着 1→2 糖苷健,通过其外切酶活性,水解聚合物末端与分支的 ADP-核糖;也能通过其内切酶活性,切割大片段的寡 ADP-核糖片段,从而发挥调节作用。尤其值得注意的是,PARP 本身可作为受体蛋白与 PAR 结合,与 PAR 结合后的 PARP 失活,但通过 PARG 的水解作用,PARP 能恢复活性,重新投入 PAR 化的循环当中[1]。可见,PARG 对 PARP 的活性起着重要的调节作用。

文献[8]报道,抑制 PARP 或 PARG 活性,均可减轻缺血对大脑造成的损伤。Cuzzocrea 等[6]的研究也表明,抑制 PARP 和 PARG 能在同等程度上降低缺血再灌注引起的肠组织损伤,PARG 抑制能作为一种有效的 PARP 活性抑制方法。但在肿瘤性疾病中,PARG 与 PARP 的相互关系则不清楚。本研究中我们对人大肠癌中 PARG 和 PARP 的关系进行了观察。结果显示,PARG 和 PARP 的表达具正相关趋势($r = 0.300$

01, $P<0.05$)。同时,我们观察了 PARG 抑制剂 GLTN 对小鼠结肠腺癌 CT26 细胞 PARG 和 PARP 表达的影响。结果显示,GLTN 处理后,CT26 细胞 PARG 表达降低,同时,PARP 表达也降低。从而我们推测,在肿瘤中 PARG 对 PARP 的调节可能与炎症过程中类似,即 PARP 表达与 PARG 调节有关。

有研究表明,在敲除 $PARG_{110}$基因的小鼠肠炎模型中,或运用 PARG 抑制剂之后,缺血再灌注损伤的大肠组织中 ICAM-1、P-selectin、VCAM-1 的表达降低,并可能与 PARP 活性减弱、下调 NF-κB 转录活性有关[5,6]。我们先前的实验[4]亦表明,在人大肠癌中,PARP 活性增强与大肠癌转移具有相关性;而抑制小鼠结肠腺癌 CT26 细胞 PARP,可减少其 PARP ~ NF-κB p65 复合物的形成,进而使 NF-κB 的活性降低,最终抑制小鼠结肠腺癌 CT26 细胞的黏附、运动和增殖[9,10]。因此我们进一步推测,在大肠癌中,PARG 对 PARP 的调节作用也可能与 PARP 介导的 NF-κB 途径影响肿瘤增殖、侵袭转移等有关。详尽机制尚有待进一步研究。

参考文献:

[1] Woon E C, Threadgill M D. Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition - where now? [J]. Curr Med Chem, 2005,12(20): 2373 - 2392.

[2] Tentori L, Leonetti C, Scarsella M, *et al*. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase prevents irinotecan-induced intestinal damage and enhances irinotecan/temozolomide efficacy against colon carcinoma [J]. FASEB J, 2006, 20(10):1709 - 1711.

[3] Rajesh M, Mukhopadhyay P, Godlewski G, *et al*. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition decreases angiogenesis [J]. Biochem Biophys Res Commun,2006,350(4): 1056 1062.

[4] 郝兰香,王娅兰,李圆圆. 大肠癌 PARP 表达与 P-selectin 和 ICAM-1 表达的相关性[J]. 基础医学与临床, 2006, 26(8):882 - 887.

[5] Cuzzocrea S, Di-Paola R, Mazzon E, *et al*. PARG activity mediates intestinal injury induced by splanchnic artery occlusion and reperfusion [J]. FASEB J, 2005,19(6): 558 - 566.

[6] Cuzzocrea S, Mazzon E, Genovese T, *et al*. Role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the development of inflammatory bowel disease in mice[J]. Free Radic Biol Med, 2007,42(1): 90 - 105.

[7] Brown R S, Wahl R L. Overexpression of Glut-1 glucose transporter in human breast cancer. An immunohistochemical study [J]. Cancer, 1993, 72(10): 2979 - 2985.

[8] Lu X C, Massuda E, Lin Q, *et al*. Post-treatment with a novel PARG inhibitor reduces infarct in cerebral ischemia in the rat[J]. Brain Res, 2003,978(1 - 2): 99 - 103.

[9] 蔡 莉,王娅兰,林 晓. PARP 抑制与小鼠结肠癌 CT26 细胞生长活性的关系[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(2):136 - 139.

[10] 黎 明,蔡 莉,王娅兰. PARP 抑制剂 5-AIQ 对 CT26 细胞侵袭及转移的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(3):237 - 240.

(编辑 张 维)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)05-0422-01

宫腔镜治疗宫颈妊娠 4 例临床分析

王 丹,梁志清,徐惠成,陈 勇,袁吉钊 (第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

宫颈妊娠发病率虽然仅占异位妊娠总发病率的 1%[1],但误诊率高。治疗上多采取氨甲蝶呤化疗或刮宫等治疗方法,近年来开展了介入治疗和妊娠部位局部药物治疗,各种治疗方法各有利弊。我院 2001 年以来对 4 例临床确诊的宫颈妊娠患者实行 MTX 肌肉注射联合腔镜治疗,取得了良好治疗效果,现总结如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2005 年 1 月至 2008 年 2 月,我院经彩色超声(经腹或经阴道)、血 β-HCG 定量检测及病理确诊的宫颈妊娠 4 例,平均年龄 28.5 岁,经产妇 3 例,初产妇 1 例,均有人工流产病史,1 例患者有剖宫产史。患者均有停经史(35 ~ 54 d),3 例有无痛性阴道流血,1 例无任何症状,4 例均无腹痛。

1.2 辅助检查

入院后均经腹或经阴道超声确诊宫内未见孕囊,宫颈管内见孕囊样回声或减弱不均质回声,见图 1。血 β-HCG 定量 136 ~ 1 128 U/L,平均 736 U/L。



图 1 经阴道超声探查见孕囊

作者简介:王 丹,女,黑龙江省哈尔滨市人,硕士,主治医师,主要从事卵巢肿瘤方面的研究。电话:(023)68754411, E-mail: wangd717@yahoo.com.cn

收稿日期:2008-11-01;修回日期:2009-02-11

(下转 429 页)