

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2008)02-0167-04

大肠癌 PARP 与微血管形成的关系

李 佳 黎 明 郝兰香 王娅兰 (重庆医科大学病理学教研室 重庆 400016)

Relationship between poly(ADP-ribose) polymerase and microangiogenesis in colorectal carcinoma

Li Jia, Li Ming, Hao Lan-Xiang, Wang Ya-Lan

Department of Pathology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China

【Abstract】 AIM: To study the relationship between poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and microangiogenesis in colorectal carcinoma and its underlying mechanism. **METHODS:** Immunohistochemical SP staining was used to examine the expression of poly(ADP-ribose) (PAR) and the change of microvessel density (MVD) under light microscope in 30 cases of colorectal carcinoma. The positive rate and activation of MMP-9 were detected by Flow Cytometry (FCM) and gel zymography after the inhibition of CT26 cells by 5-aminoisoquinolinone (5-AIQ). **RESULTS:** MVD of the group with positive PAR was higher than that of negative PAR, and the difference was significant ($P=0.0001$, $P<0.01$). The positive rate of MMP-9 decreased after the treatment of 500 $\mu\text{mol/L}$ 5-AIQ. The activation of MMP-9 in 5-AIQ-treated CT26 was significantly weaker than that in 5-AIQ-untreated cells ($P=0.0013$, $P<0.01$). **CONCLUSION:** The expression of PARP is correlated with microangiogenesis, and it probably promotes the angiogenesis in colorectal carcinoma.

【Keywords】 poly(ADP-ribose) polymerase; microvessel density; gelatinase B; colorectal neoplasms

【摘要】 目的: 探讨大肠癌 PARP 与微血管形成的关系及其可能机制。方法: 应用 SP 免疫组化染色观察 30 例大肠癌中 PAR 的表达和微血管密度的变化, 流式细胞计数和明胶酶谱观察 5-AIQ 抑制 CT26 细胞后 MMP-9 阳性细胞数和活性的变化。结果: 在 PAR 强表达的大肠癌中, 微血管密度高, 弱表达则密度低, 其差异具有统计学意义 ($P=0.0001$, $P<0.01$)。流式细胞计数中, 与未处理组相比, 用 500 $\mu\text{mol/L}$ 5-AIQ 处理后, MMP-9 阳性细胞的百分比降低, 明胶酶谱显示, MMP-9 的活性在 500 $\mu\text{mol/L}$ 5-AIQ 处理组和未处理组中差异有统计学意义 ($P=0.0013$, $P<0.01$)。结论: 大肠癌 PARP 的表达可能和微血管形成相关, PARP 活性增强可能促进了肿瘤血管的形成。

【关键词】 聚(腺苷二磷酸核糖)聚合酶; 微血管密度; 明胶酶

收稿日期 2007-08-29; 接受日期 2007-11-20

基金项目 重庆市自然科学基金(2006BB52881)

通讯作者: 王娅兰, Tel: (023) 68485789 Email: wangyalar074@gmail.com

作者简介: 李 佳, 硕士生(导师王娅兰), Tel: (023) 68485789

Email: jarjarlee@163.com

B 结肠肿瘤

【中图分类号】Q783 【文献标识码】A

0 引言

聚(腺苷二磷酸核糖)聚合酶 [Poly(ADP-ribose) polymerase, PARP], 参与聚 ADP 糖基化过程, 对核内众多的蛋白质和酶类进行翻译后修饰, 从而调节细胞内一系列的分子事件。聚(腺苷二磷酸核糖) [Poly(ADP-ribose), PAR] 是 PARP 的活化形式, 对其抑制, 可反映 PARP 的活性。有文献^[1-2]报道, 在炎症反应、以及白血病、前列腺癌等多种恶性肿瘤中 PARP 的表达增强。而我们先前的研究结果也提示, 大肠癌 PAR 表达较正常组织明显增强, PARP 与大肠癌转移具有相关性^[3]。亦有研究表明, 通过抑制 PARP 能抑制人脐静脉血管内皮增殖^[2]。但 PARP 与肿瘤血管形成的关系, 尚未见文献报道。在炎症反应中, 5-氨基异喹啉酮 (5-Aminoisoquinolinone, 5-AIQ) 可通过抑制 PARP 活性, 抑制细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 和 P 选择素 (P-selectin) 等黏附分子表达。我们的前期研究也表明, 5-AIQ 可抑制大肠癌 HT-29 细胞 PARP 活性^[3]。本研究观察了 PAR (PARP 的活化形式, 其表达强弱可反映 PARP 活性的高低) 与大肠癌微血管密度 (MVD) 的关系, 大肠癌 CT26 细胞处理前后基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 表达和活性的变化, 初步探讨了 PARP 与肿瘤血管生成的关系及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠癌标本 ($n=30$) 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 甲醛固定, 石蜡包埋, 5 μm 连续切片。小鼠大肠癌 CT26 细胞由四川大学魏于全教授惠赠。5-AIQ 由英国 Bath 大学 Threadgill 教授惠赠。抗 PAR 抗体购自博士德生物工程有限公司, 抗 CD31 抗体购自 Gene Tech 公司, 抗 MMP-9 抗体购自 Santa Cruz 公司, SP 免疫组化试剂盒、山羊抗兔 IgG-FITC 均购自北京中杉生物技术公司, 核及胞质蛋白裂解液 (NE-PERTM Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents) 购自 Pierce 公司, 明胶购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将小鼠结肠腺癌细胞 CT26 置入含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养液 37℃, 50 mL/L CO₂ 培养箱常规培养。

1.2.2 SP 免疫组化染色 操作按试剂盒说明书进行。PAR 染色结果的判断参照文献 [3] 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: 随机观察 5 个中倍视野 (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比作为该切片的阳性细胞百分比; <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, 已知阳性心肌切片为阳性对照。CD31 染色结果判断: 细胞呈黄色或棕黄色为阳性 (+), 无着色为阴性 (-)。以 PBS 代替一抗为阴性对照, 自身大血管内皮细胞为阳性对照。

1.2.3 肿瘤微血管密度计数 按照 Weidner 等^[4]的评判标准, 计算肿瘤内着色的毛细血管和微小血管。凡呈现棕色单个内皮细胞或内皮细胞团均作为一个血管计数。肿瘤内硬化区以及与肿瘤交界处软组织内的微血管不计数, 有厚的平滑肌壁以及管腔直径 > 8 个红细胞直径的血管也排除在外。计数方法: 每张染色切片选择 3 个血管最多的癌间质区, 在 400 倍视野下进行血管计数, 每例标本分别计数 3 个视野, 取其平均值。

1.2.4 流式细胞计数 将处于对数生长期的 CT26 细胞 3×10^7 /L 细胞悬液接种于 100 mL 培养瓶, 培养 24 h 后实验组加入最终浓度为 500 μ mol/L 的 5-AIQ, 对照组加入不含 5-AIQ 的等体积生理盐水。培养 20 h 后分别收集对照组和 5-AIQ 处理组细胞, 按试剂说明书进行 MMP-9 染色标记, 流式细胞仪计数 10000 个细胞中 MMP-9 抗体标记阳性的细胞。重复实验 5 次。

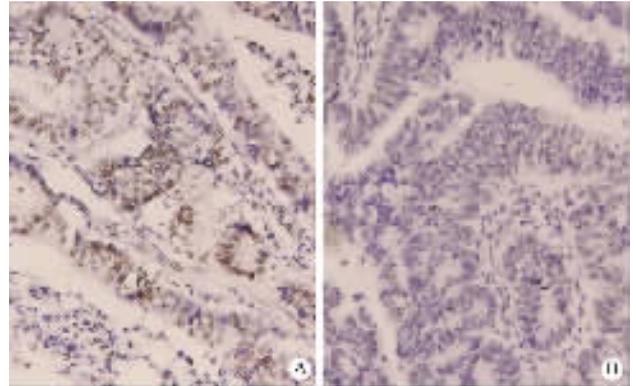
1.2.5 明胶酶谱 取对数生长期 CT26 细胞以 1×10^6 /瓶接种于培养瓶中, 培养过夜。次日, 无血清 RPMI1640 培养液培养 1 h。5-AIQ 终浓度为 500 μ mol/L 的无血清 RPMI1640 培养液继续培养 24 h。收集各组培养上清液, 低速离心 (200 g) 去除细胞碎片, 同时将各瓶细胞消化, 计数。按照活细胞数取相应体积的培养上清液与样品缓冲液混合上样。配制 75 g/L 分离胶及 50 g/L 浓缩胶, 分离胶中加入终浓度为 1 g/L 的明胶, 4℃ 恒温电泳 30 min。电泳完毕后移入 TritonX-100 溶液中, 低速摇动, 漂洗, 加明胶酶缓冲

液 (50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L CaCl₂, 200 mmol/L NaCl, 1 μ mol/L ZnCl₂, pH 7.5) 37℃ 温育 24 h。考马斯兰 R-250 染色液中染色后脱色, 至对照出现清晰负染酶带。在凝胶成像仪下分析照相。重复实验 5 次。

统计学处理: 采用 SAS 8.0 统计软件进行 spearman 秩相关分析和 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

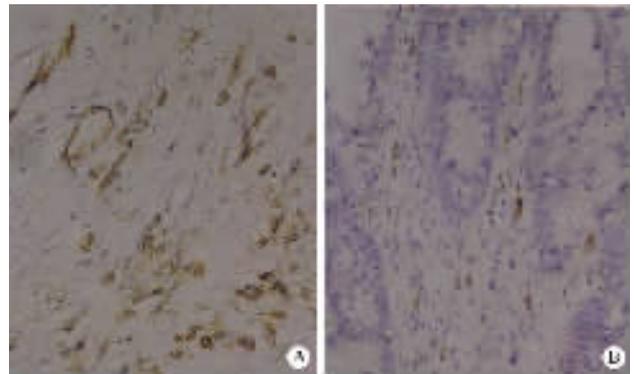
2 结果

2.1 大肠癌 PAR 的表达与 MVD 的关系 PAR 阳性着色主要位于肿瘤细胞胞核, 多靠近核膜, 部分间质内皮细胞、炎症细胞弱阳性。30 例大肠癌组织中, 阳性表达 23 例 (图 1)。用 CD31 标记大肠癌血管, 可见肿瘤间质内微血管的大小、形态均存在差异, 部分呈单个内皮细胞或内皮细胞团, 部分管腔不规则或无明显管腔 (图 2)。MVD 在不同程度表达 PAR 的大肠癌中存在差异。在 PAR 强表达的大肠癌中, 微血管密度高 (28.86 ± 13.49); 弱表达则密度低 (7.52 ± 4.75)。差异具有统计学意义, $P = 0.0001$ 。



A 强阳性 B 弱阳性。

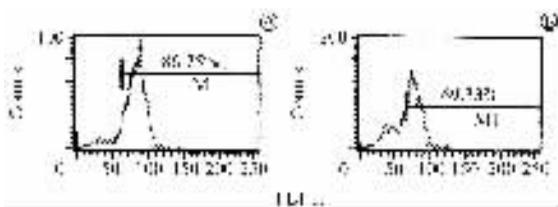
图 1 PAR 在大肠癌组织中的表达 SP × 400



A 高密度; B 低密度。

图 2 不同 PAR 表达强度大肠癌组织中微血管密度 (棕黄色着色为 CD31 标记) SP × 400

2.2 流式细胞计数 对照组中 MMP-9 阳性细胞的百分比为 86.75% ,用浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-AIQ 处理后,阳性细胞的百分比为 69.33%。5-AIQ 处理组阳性细胞百分比比较对照组降低(图 3)。



A 未处理 B 处理。

图3 流式细胞计数 MMP-9 阳性细胞

2.3 明胶酶谱 CT26 细胞加入 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-AIQ 孵育后,其 MMP-9 的活性明显弱于未加药的 CT26 [(0.4001 \pm 0.0518) vs (0.6148 \pm 0.0847)],差异具有统计学意义 $P=0.0013$ 。

3 讨论

PARP 广泛存在于真核细胞核内,能通过 PAR 化,参与细胞内一系列的分子生物事件。PAR 作为 PARP 的产物,其合成的多少能反应 PARP 活性的强弱,通过检测 PAR 的表达可了解 PARP 的活性状态。PARP 与多种疾病的发生发展有关。PARP 与肿瘤的关系也逐渐被重视,文献[5]报道,PARP 与肿瘤细胞的增殖分化有关;还有研究显示,结肠癌组织中 PARP 的活性明显高于正常肠黏膜[6]。我们先前的研究结果提示,在人大肠癌组织中,PARP 与大肠癌的侵袭转移有关,PARP 活性增强有利于大肠癌侵袭转移,且 P-Selectin 和 ICAM-1 的表达增高也与大肠癌的侵袭转移有关。而在肿瘤的转移过程中,血管生成是关键的一步。那么 PARP 是否会影响肿瘤侵袭转移过程中血管的生成呢?目前尚未见文献报道。5-AIQ 作为一种强大的 PARP 抑制剂,在炎症反应中,可通过抑制 PARP 活性,抑制细胞 ICAM-1 和 P-selectin 等黏附分子表达,进而抑制由粘附分子介导的白细胞与血管内皮细胞间黏附。Rajesh 等[2]研究发现,5-AIQ 能通过对 PARP 的抑制,进而抑制血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)诱导的人脐静脉内皮细胞的增殖、迁移及血管形成等。本实验首次对人大肠癌组织 PAR 表达与肿瘤 MVD 的关系进行了观察,结果显示 MVD 在不同程度表达 PAR 的大肠癌中存在差异,PAR 高表达的组织中, MVD 大;低表达的组织中, MVD 小。有研究表明, PARP 与 NF- κ B 存在协同激活作用[7],且这种协同作

用是通过 PARP-1 蛋白与 NF- κ B 蛋白直接的相互作用而实现的。PARP 的自动修饰可促进 NF- κ B · DNA 复合物的形成,增强 NF- κ B 转录活性[8]。还有研究表明, NF- κ B 可上调 ICAM-1, VEGF, MMP-2 等的表达,从而促进大肠癌的转移[9-10]。Lu 等[11]的研究表明,在单核细胞激活的情况下, MMP-9 的生成与 NF- κ B 途径有关。Pandey 等[12]的研究结果指出, NF- κ B 抑制剂能抑制 NF- κ B 调节的基因产物如 MMP-9 的表达,而这种抑制可能是通过对 IKK 的抑制实现的。我们先前的实验已观察到[13] 大肠癌 MVD 与其转移有关,有淋巴结转移的大肠癌组织中 MVD 较无转移者高。在对肿瘤血管生成的研究中,有实验显示,皮肤鳞癌组织中 MMP-9 的表达与肿瘤血管形成密切相关, MMP-9 可能是皮肤鳞癌中重要的促血管因子之一[14]。而本实验也观察到,用 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-AIQ 处理后,小鼠结肠腺癌 CT26 细胞中 MMP-9 的表达降低。提示 PAR 高表达可能与 NF- κ B 依赖性的 MMP-9 表达增强引起的促肿瘤血管形成有关。由此我们推测, PARP 与肿瘤血管生成相关。在大肠癌中, PARP 活性增强,使 NF- κ B 的活性增强,而受 NF- κ B 调节的 MMP-9 表达也增高,从而促进了肿瘤血管的形成。

【参考文献】

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 1991 324: 1.
- [5] Shiobara M, Miyazaki M, Ito H, et al. Enhanced polyadenosine diphosphate-ribosylation in cirrhotic liver and carcinoma tissues in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2001 16: 338-344.
- [6] Hirai K, Ueda K, Hayaishi O. Aberration of poly(Adenosine diphosphate-ribose) metabolism in human colon adenomatous polyps and cancers [J]. *Cancer Res* 1983 43: 3441-3446.
- [7] Martin-Oliva D, O'Valle F, Munoz-Gamez JA, et al. Crosstalk between PARP-1 and NF-kappaB modulates the promotion of skin neoplasia [J]. *Oncogene*, 2004, 23(31): 5275-5283.
- [8] Nakajima H, Nagaso H, Kakui N, et al. Critical role of the auto-modification of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 in nuclear factor-

- κ B-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells[J]. J Biol Chem ,2004 279(41) #2774 -42786.
- [9] Williams AC ,Smartt H ,H-Zadeh AM ,et al. Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) potentiates TRAIL-induced apoptosis of human colorectal carcinoma cells through inhibition of NF- κ pA[J]. Cell Death Differ ,2007 14(1) 137 -145.
- [10] Bar-Yehuda S ,Madi L ,Silberman D ,et al. CF101 , An agonist to the A3 adenosine receptor , enhances the chemotherapeutic effect of 5-Fluorouracil in a colon carcinoma murine model[J]. Neoplasia , 2005 7(1) 85 -90.
- [11] Lu Y ,Wahl LM. Production of matrix metalloproteinase-9 by activated human monocytes involves a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/IKK α /NF- κ B pathway [J]. J Leukoc Biol , 2005 ,78 (1) :

259 -265.

- [12] Pandey MK ,Sandur SK ,Sung B ,et al. Butein , a Tetrahydroxychalcone , inhibits nuclear factor (NF)-B and NF-B-regulated gene expression through direct inhibition of IKK on Cysteine 179 Residue[J]. J Biol Chem ,2007 282(24) 17340 -17350.
- [13] Wang YL ,Lin X. Cathepsin B expression and its relationship with microvessel density and biological behaviour of colorectal carcinoma[J]. Chin J Cancer Res ,2002 14(4) 293 -296.
- [14] 阎平玲 ,贾静 ,刘蕊. 皮肤鳞癌组织中 MMP-9 的表达与血管生成的关系[J]. 第四军医大学学报 ,2007 ,27(24) : 2248 -2250.

编辑 井晓梅

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2008)02-0170-01

食管癌、肺癌术后并发肺动脉栓塞 12 例的诊治

金哲 (南阳市中心医院胸外科 河南 南阳 473009)

【关键词】食管肿瘤 肺肿瘤 肺动脉栓塞 诊断 治疗
【中图分类号】R563.5 【文献标识码】B

1 临床资料 我院 1997-06/2007-02 收治食管癌、肺癌术后并发肺动脉栓塞患者 12(男 8 ,女 4)例。年龄 46 ~ 78(平均 64)岁。食管癌术后 9 例 肺癌术后 3 例。术前合并高血压、冠心病心房纤颤 4 例 ,慢性阻塞性肺病 2 例 ,下肢深静脉炎 2 例。肺动脉栓塞发生于术后 2 ~ 13 d ,突发呼吸困难、胸痛、咯血、晕厥、甚至休克。体检肺部闻及湿罗音 5 例 肺动脉第二心音亢进和右心室奔马律 3 例。动脉血气分析 PaO₂ < 80 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 10 例 PaO₂ < 40 mmHg 3 例。胸片示肺实质斑片状密度增强影、肺不张 6 例。心电图检查 S₁Q₃T₃ 3 例。超声心动图检查见肺动脉异常回声 2 例。1 例肺动脉造影显示左肺动脉突然截断。螺旋 CT 或 MRI 检查 3 例 ,均显示肺动脉管腔及分枝的部分充盈缺损。积极抗休克治疗或心肺复苏同时 8 例患者抗凝治疗 :应用低分子肝素钙首剂 5000 U 静推 ,然后输入 1500 U/h ,保证凝血酶原时间在对照的 1.5 ~ 2.0 倍。4 例患者溶栓治疗 :应用尿激酶 4000 U/kg 10 min 静注 ,然后 12 h 内输入 2000 U/kg。1 例食管癌术后患者急诊开胸探查 ,术中证实左肺梗死 ,行左全肺切除术。结果 12 例患者中死亡 5 例 ,存活 7 例。存活 7 例中均接受抗凝治疗 ,其中 2 例接受溶栓治疗 1 例急诊手术。死亡 5 例中 1 例猝死 3 例因大面积栓塞 ,严重呼衰而死亡 ;1 例溶栓治疗后伴胃肠道出血、吻合口瘘而死亡。

2 讨论 食管癌、肺癌术后并发的肺动脉栓塞一般为血栓栓塞 ,引起急性缺氧和右心衰竭 ,误诊或漏诊率高 ,死亡率高 ,因此对该病的迅速诊断和治疗以及预防尤为重要。

肺动脉栓塞临床表现多样化、不典型 ,缺乏特异性^[1]。食管癌、肺癌术后并发肺动脉栓塞极易被心肺原发病或术后支

气管痉挛、呼吸衰竭等常见并发症所掩盖而导致误诊。我们认为食管癌、肺癌术后突发严重呼吸困难和严重的低氧血症、低碳酸血症或血氧饱和度急剧下降时 ,要高度警惕肺栓塞发生的可能。对存在肺栓塞病因的患者特别是并存有多个危险因素病例应有较强的诊断意识。本组有 7 例患者通过临床表现、心电图、胸片、超声心动图、血气分析等间接诊断方法确诊 ,占 63.6%。最简便易行的方法是动脉血气分析 ,多出现程度不等的低氧低碳酸血症及呼吸性碱中毒。心电图典型的 S₁Q₃T₃ 有助于肺栓塞的诊断。血 D-二聚体测定降低时具有排除肺栓塞的诊断价值^[2]。本组 4 例患者通过肺动脉造影、螺旋 CT ,MRI 直接诊断方法确诊 ,占 36.4%。由于病情危重 ,仅适用于心肺功能稍稳定的病例。增强螺旋 CT 和 MRI 具有方便、无创的特点 ,对急性肺栓塞可作为一线筛选方法^[3]。

急性肺动脉栓塞致休克或心脏骤停的患者积极施行抗休克治疗或心肺复苏。肺栓塞早期肝素抗凝是最主要的治疗方法 ,对有出血倾向的病例 ,经过停用肝素、少量输血和调整肝素的用量后 ,可得以控制。一般主张早期不宜溶栓治疗 ,本组 3 例尿激酶溶栓治疗在术后一周开始应用 ,1 例术后第 4 日应用 ,溶栓治疗除了有延迟性出血倾向外 ,临床改善明显。溶栓治疗对一些大的肺动脉栓塞和持续低血压休克患者是一种有效的治疗方法 ,近期手术是溶栓的相对而非绝对禁忌症。急诊手术取栓子或肺切除术是巨大肺动脉栓子药物保守或溶栓治疗无效时的治疗方法 ,此时患者往往因进行性缺氧而需呼吸机辅助通气 ,对术后早期并发的急性大面积肺栓塞并伴有咯血的患者 ,应积极手术探查 ,术中切除梗死的肺组织 ,减少毒素的吸收 ,改善通气功能。但二次开胸手术创伤较大 ,需慎重选择。食管癌、肺癌术后肺动脉栓塞的围手术期预防策略为鉴定高危患者和采取措施防止静脉血栓形成 ,包括限制术前卧床时间 ,术中间断肺通气 ,术后早期离床活动 ,避免下肢静脉输液 ,避免便秘 ,以及术后停用任何止、凝血药物和术后预防性应用肝素抗凝治疗等。

【参考文献】

- [1] Torbiki A ,Van Beek EJR ,Charbonnier B ,et al. Guidelines on diagnosis and management of a acute pulmonary embolism[J]. Eur Heart J , 2000 21(16) 1301 -1336.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会. 肺血栓栓塞症诊断与治疗指南(草案) [J]. 中华结核和呼吸杂志 2001 24(5) 259 -264.
- [3] 王辰. 老年肺栓塞的诊治 [J]. 中国实用内科杂志 ,1998 , 18(10) 586 -587.

编辑 袁天峰

收稿日期 2007-12-04 ; 接受日期 2007-12-19

作者简介 金哲 , 本科 , 副主任医师 , 主任。Tel : (0377) 63200265

Email jin_skysnow@sohu.com