

### 3 讨论

长久以来,CO<sub>3</sub>与生物磷灰石的关系一直存在争论。最初认为CO<sub>3</sub>是以独立的CaCO<sub>3</sub>形式存在于牙体组织中,随后结构和化学研究证据显示,CO<sub>3</sub>可能以两种方式即A型取代(CO<sub>3</sub>取代PO<sub>4</sub>)和B型取代(CO<sub>3</sub>取代OH)的方式结合到生物磷灰石晶体结构之中,目前,对于CO<sub>3</sub>在牙磷灰石中的存在方式认识不一<sup>[1~5]</sup>。LeGeros<sup>[1,2]</sup>通过将A型取代、B型取代的合成磷灰石与人牙釉质磷灰石的红外光谱进行对比分析,显示牙釉质磷灰石中CO<sub>3</sub>的存在方式更接近于B型取代,故认为CO<sub>3</sub>主要以取代PO<sub>4</sub>的方式(B型取代)结合到牙磷灰石中。Aoba<sup>[3]</sup>等通过对初期形成的猪牙釉质磷灰石进行分析,推测在牙釉质矿化初期,CO<sub>3</sub>主要为B型取代;随着牙釉质矿化的进展,A型取代逐步增多。本研究分别对乳、恒牙牙釉质和牙本质磷灰石进行了红外光谱分析,显示各标本中CO<sub>3</sub>的红外吸收峰均更接近于B型取代,提示不同组织牙磷灰石中CO<sub>3</sub>主要是以取代PO<sub>4</sub>的方式存在,从而为支持LeGeros的观点提供了系统有力证据。

生物磷灰石结构中,当CO<sub>3</sub>取代PO<sub>4</sub>时可使晶胞参数的a轴收缩、c轴膨胀,结晶性降低,溶解度增高<sup>[1,2]</sup>。人牙釉质的研究显示,从釉质表层至釉牙本质界区CO<sub>3</sub>的含量逐步降低,且伴随着结晶性的增加<sup>[6]</sup>。而CO<sub>3</sub>含量较低的猪釉质结晶性明显高于CO<sub>3</sub>含量较高的人牙釉质<sup>[1]</sup>。X射线衍射及红外光谱图谱分析已经证实乳、恒牙牙釉质的结晶性明显高于其自身牙本质<sup>[7]</sup>。本研究中,红外光谱的定量分析测得牙体组织内CO<sub>3</sub>的含量依次为恒牙牙釉质<乳牙牙釉质<恒牙牙本质<乳牙牙本质,故推测乳、恒牙牙釉质和牙本质结晶性的不同可部分归因于其CO<sub>3</sub>的含量存在差异。

龋病是一种细菌性感染性疾病,始于变形链球菌酸性代

谢产物引起的牙磷灰石脱矿<sup>[8]</sup>。CO<sub>3</sub>是龋病变牙磷灰石组织中优先丢失的成分之一,有观点认为龋病变微晶的中心溶解与CO<sub>3</sub>的取代有关,并推测龋病变中牙磷灰石脱矿和再矿化的平衡过程是由低氟、高Mg和高CO<sub>3</sub>牙磷灰石的溶解和高氟、低Mg和低CO<sub>3</sub>磷灰石的再沉积组成<sup>[9]</sup>。体外研究亦表明,CO<sub>3</sub>结合到生物磷灰石结构中可使其结晶性降低、溶解性增强,且与Mg具有协同作用,而与F相拮抗<sup>[1,2,6]</sup>。因而,本研究通过对不同牙磷灰石中CO<sub>3</sub>的定性和定量分析,可为进一步探讨CO<sub>3</sub>在牙磷灰石中的作用及其与龋病变的关系提供客观的依据。

#### 参考文献:

- [1] LeGeros R Z. Calcium phosphates in oral biology and medicine[M]. Basel(Switzerland): Karger, 1991.108.
- [2] LeGeros R Z. Chemical and crystallographic events in the caries process[J]. J Dent Res, 1990, 69(Spec Iss): 567.
- [3] Aoba T. Recent observations on enamel crystal formation during mammalian amelogenesis[J]. Anat Rec, 1996, 245(2): 208.
- [4] Tsuda H, Ruben J, Arends J. Raman of human dentin mineral[J]. Eur J Oral Sci, 1996, 104(2): 123.
- [5] Penel G, Leroy G, Rey C, et al. MicroRaman spectral study of the PO<sub>4</sub> and CO<sub>3</sub> vibrational modes in synthetic and biological apatites [J]. Calcif Tissue Int, 1998, 63(6): 475.
- [6] LeGeros R Z, Sakae T, Bautista C, et al. Magnesium and carbonate in enamel and synthetic apatites [J]. Adv Dent Res, 1996, 10(2): 225.
- [7] 赵 玮,汪说之,洪汉烈,等. 人牙釉质、牙本质矿化成分的晶体特性[J]. 中华口腔医学杂志, 2002, 37(3): 219.
- [8] 凌均纮,汪喻忠,蒋少云. 基因重组乳链球菌防龋疫苗免疫性的实验研究[J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(4): 245.
- [9] LeGeros R Z. Calcium phosphates in demineralization / remineralization processes[J]. J Clin Dent, 1999, 10(1): 65.

(编辑 刘清海)

## 肝癌组织中 P73 蛋白表达的意义

张昌卿<sup>1</sup>, 肖锡宾<sup>1</sup>, 冯凯涛<sup>1</sup>, 黄必军<sup>3</sup>, 李经略<sup>1</sup>, 孙 韵<sup>1</sup>, 叶永照<sup>1</sup>, 李锦清<sup>2</sup>  
(中山大学肿瘤防治中心肿瘤医院 1. 中心实验室, 2. 肝胆科, 3. 肿瘤研究所, 广东广州 510060)

**摘要:**【目的】检测肝癌组织中P73蛋白表达,了解P73在肝癌中的意义。【方法】采用LSAB免疫组织化学方法检测58例原发性肝癌组织中P73 $\alpha$ 、 $\beta$ 蛋白表达,并与相应的癌旁肝组织、远癌正常肝组织进行比较。同时用LSAB法检测P53和PCNA,探讨P73蛋白与这两者间的关系。【结果】①P73蛋白在正常肝组织、癌旁肝组织和肝癌组织中的表达比例分别为97%、88%和26%;②缺失P73蛋白的肝癌细胞PCNA高增殖指数的比例高于P73蛋白表达阳性组,前者79%,后者27%;③缺失P73蛋白的肝癌病例在P53蛋白阳性组和阴性组中的比例分别为79%和68%,二者间无统计学差异。但是在P53阳性的病例中,伴有P73蛋白缺失时PCNA高增殖指数的比例高于P73蛋白无缺失组,前者80%,后者29%。【结论】P73蛋白在正常肝细胞、癌旁肝细胞和肝癌细胞中的表达呈递减趋势,缺失P73蛋白的肝癌细胞生长快,P73在肝癌中可能起着抑癌基因的作用。P73的缺失与P53的异常表达无关系,但是在P53异常表达的情况下,如果存在P73蛋白时可能对细胞有一定的调控作用,抑制细胞增殖,起补偿作用。

**关键词:** 肝细胞癌; P73基因; P73蛋白; 蛋白表达

**中图分类号:** R735.7, 730.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-257X(2002)5S-0008-03

收稿日期: 2002-06-21

基金项目: 国家科委九五攻关课题(96-907-03-02)

作者简介: 张昌卿(1946-),女,福建福清人,副研究员

P73 基因是 Kaghad 等在 1997 年克隆得到的一个基因,它在结构和功能上均与抑癌基因 P53 相类似,被认为是 P53 家族的一个成员及候选的抑癌基因<sup>[1]</sup>。P53 基因在肝细胞性肝癌(简称肝癌)中的突变率较高,它在肝癌的发生和发展中起着十分重要的作用<sup>[2]</sup>。本文的目的是探讨 P73 基因在肝癌中的表达,通过与肝癌的生物学行为,与 P53 的相关性研究,了解 P73 在肝癌中的作用

## 1 材料与方 法

### 1.1 临床资料

从 1999 年 1 月至 2000 年 3 月收集未经治疗的原发性肝癌手术标本共 58 例,其中男性 53 例,女性 5 例,年龄 21~68 岁,平均为 51.5 岁。28 例为直径小于 5 cm 的小肝癌。全部病例均病理诊断为肝细胞性肝癌,根据 Edmondson 和 Steiner 标准分级,其中 I~II 级 35 例,III~IV 23 例,在显微镜下见有癌旁肝组织增生(见明显结节性增生,异型增生和纤维化等)29 例,有门静脉分枝癌栓的 21 例。组织经 100 mL/L 中性福马林固定 12 h,石蜡包埋,切片。58 例肝癌标本均为配对的癌,癌旁和离切缘最远的(>2 cm)的肝组织。

### 1.2 试剂

P73 抗体购自 Santa Cruz 公司,为羊多克隆抗体(编号 C-20),抗人源性 P73<sup>β</sup> COOH-末端肽链,能与人性 P73<sup>α</sup> 和 P73<sup>β</sup> 蛋白反应而与其它 P73 亚类无交叉反应。P53 抗体(克隆号:DO-7,检测突变型 P53 蛋白),增殖细胞核抗原抗体(proliferating cell nuclear antigen, PCNA,克隆号:PC-10,检测处于增殖期的细胞)和 LSAB 检测试剂盒(K0690)均购自丹麦 DAKO 公司。

### 1.3 方 法

P73、P53 蛋白和 PCNA 检测用 LSAB 免疫组织化学方法,P73、P53 和 PCNA 的工作浓度均为 1:100;检测 P53 需进行抗原修复,即将切片浸入 0.1 mol/L PH6.0 的柠檬酸缓冲液中置微波炉以高,中功率档各加热 5 min,保持缓冲液为沸腾状态,室温静置 20 min,加入第一抗体后 4℃ 过夜,其余步骤均照说明书进行。

结果判断标准:染色阳性信号呈黄棕色(DAB 色源)。每张组织切片随机选择 10 个高倍视野(×400),为了使阳性表达更为明确,将 P73 染色阳性细胞数>10%为阳性表达,阳性细胞数<10%为阴性表达或称为 P73 的缺失;P53 染色阳性细胞数>20%为阳性;PCNA 阳性细胞数>50%为高增殖指数。

### 1.4 统计方法

采用 SPSS 软件作卡方检验

## 2 结 果

### 2.1 P73 在肝癌组织中的表达

P73 蛋白在肝癌细胞中阳性表达以细胞浆为主,极个别见于细胞核。它在正常肝细胞,癌旁肝细胞和肝癌细胞中表达呈递减趋势,阳性表达率分别为 97%(56/58),88%(51/58)和 26(15/58)%。正常肝细胞中 P73 的表达无论从染色强度或阳性细胞数均明显强于肝癌细胞中 P73 的表达。肝内胆管上皮,血管内皮细胞和纤维细胞等均未见 P73 蛋白的

阳性表达。见图 1,2,3。

### 2.2 P73 蛋白表达与肝癌生物学特征的关系

P73 蛋白在肝癌中的缺失与肿瘤的大小,肝癌细胞的分化程度无关( $P > 0.05$ ),与癌旁肝组织增生有关系( $P < 0.05$ ),癌栓的形成多见于 P73 缺失组,见表 1。

表 1 P73 蛋白的表达与肝癌的生物学特征

P73 表达	病理分级		肿瘤大小		癌旁肝组织增生		癌 栓	
	I- II	III- IV	≤5cm	>5cm	有	无	有	无
阳性	8	7	8	7	3	12 <sup>1)</sup>	3	12 <sup>2)</sup>
阴性	27	16	20	23	26	17	18	25

1)  $\chi^2 = 7.7658, P = 0.0053$ ; 2)  $\chi^2 = 2.4816, P = 0.1152$

### 2.3 在肝癌组织中 P73 与 P53 蛋白表达的关系

在 P53 蛋白阳性表达组和阴性表达组中,P73 蛋白的缺失率分别为 79%(26/33)和 68%(17/25),二者间无统计学差异, $\chi^2 = 1.2788, P = 0.258$ 。

### 2.4 P73 的表达与肝癌细胞增殖状况

在 43 例缺失 P73 蛋白的肝癌组中,PCNA 高增殖指数的比例(79%)高于 15 例 P73 表达阳性组(11%), $\chi^2 = 13.806, P = 0.0002$ ,见图 4。

### 2.5 P53 表达阳性组中 P73 的缺失与细胞增殖的关系

在 33 例 P53 蛋白表达阳性组中,26 例伴有 P73 蛋白缺失,其 PCNA 高指数的比例(81%)高于 P73 表达阳性组(29%), $\chi^2 = 5.612, P = 0.0161$ 。

## 3 讨 论

P73 基因定位于人类染色体 1p36.33,它在结构和功能上与 P53 相类似,可能是抑癌基因。P73 的表达有组织特异性,在神经母细胞瘤、膀胱癌、前列腺癌等恶性肿瘤中此基因频繁地丢失、突变,它的正常存在至关重要,对控制肿瘤的发生和发展有重要的影响<sup>[3,4]</sup>;而在肺癌中 P73 基因的突变率很低,它的正常存在没能阻止癌症的发生及恶化<sup>[5]</sup>。在肝癌中,P73 对肿瘤的发生,发展的作用也有争议。Mihara 等<sup>[6]</sup>发现 P73 mRNA 在肝癌中的表达呈低水平,与癌旁肝组织无差异,P73 杂合性丢失频率为 20%,未发现 P73 基因的突变,认为 P73 可能不是抑癌基因。Tennapel 等<sup>[7]</sup>应用兔多克隆抗体检测 193 例肝癌标本,发现 32% P73 表达阳性,认为 P73 的表达与肝癌的预后有关,P73 表达阳性的病人预后差。而 Herath 等<sup>[8]</sup>报道 P73 mRNA 的表达与染色体 1p36 杂合性丢失无关,在 P53 失活的情况下,P73 mRNA 可能上调,起补偿的作用,但未测到 P73 蛋白的表达。从本研究的结果可见 P73<sup>α</sup> 和 P73<sup>β</sup> 蛋白在肝癌组织中的表达从正常肝组织到癌旁肝组织到癌呈递减的趋势。肝癌中 P73 的缺失率为 74%,而 P53 异常表达为 56%,P73 的改变在肝癌中也是常见的现象。

本结果中 P73 蛋白的表达与肝癌细胞的分化程度,肿瘤的大小无关,但与癌旁肝组织增生有关,在癌旁肝组织异常的情况下,P73 在癌组织中的缺失率高;P73 的缺失有更容易出现门静脉分枝癌栓的趋势(40%),无缺失 P73 组癌栓出现

率为 20%；缺失 P73 蛋白的肝癌细胞生长快，在 43 例 P73 缺失的肝癌中 PCNA 高增殖指数达 79%，而 P73 表达阳性组中 PCNA 高增殖指数的仅为 25%。P73 与以上这些肝癌的生物学特征的关系与 P53 异常相类似<sup>[9,10]</sup>，P73 在肝癌中可能起着抑癌基因的作用。

从本组的实验结果看，P53 蛋白表达阳性组中 P73 的缺失率为 79%，P53 表达阴性组中 P73 的缺失率为 68%，统计学上两者间无明显差异，但是在 33 例 P53 蛋白表达异常的病例中，伴有 P73 蛋白缺失时 PCNA 高增殖指数的病例高于 P73 蛋白无缺失组，前者 81%，后者 29%。可能 P53 与 P73 在调控肝癌细胞增殖方面起协同作用。尽管 P73 和 P53 都通过诱导 P21 蛋白来行使功能，但由于受不同的信号调控，各自的诱导方式不同，它们在维持细胞内平衡方面可能扮演根本不同的角色，所以在 P53 异常的情况下，P73 蛋白可能对细胞还有一定的调控作用，从另一途径抑制细胞的增殖。

(本文图 1, 2, 3 见封 4)

#### 参考文献:

- [1] Kaghad M, Bonnet H, Yang A, et al. Monoallelically expressed gene related to P53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers[J]. Cell, 1997, 90(4):809.
- [2] 顾健人, 连 争. 肝癌的分子生物学[A]. 见: 汤钊猷, 余业勤. 原发性肝癌[M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.

19~29.

- [3] Iakada N, Ozaki T, Ichimiya S, et al. Identification of a transactivation activity in the COOH-terminal region of p73 which is impaired in the naturally occurring mutants found in human neuroblastomas[J]. Cancer Res, 1999, 59(12):2810.
- [4] Chi S G, Chang S G, Lee S J, et al. Elevated and biallelic expression of p73 is associated with progression of human bladder cancer[J]. Cancer Res, 1999, 59(12):2791.
- [5] Mai M, Yokomizo A, Qian C, et al. Activation of p73 silent allele in lung cancer[J]. Cancer Res, 1998, 58(11):2347.
- [6] Mihara M, Nimura Y, Ichimiya S, et al. Absence of mutation of the p73 gene localized at chromosome 1p36.3 in hepatocellular carcinoma[J]. Br J Cancer, 1999, 79(1):164.
- [7] Tannapet A, Wasner M, Krause K, et al. Expression of p73 and its relation to histopathology and prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 1999, 91(13):1154.
- [8] Herath N I, Kew M C, Whitehall V L, et al. p73 is up-regulated in a subset of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2000, 31(3):601.
- [9] 李锦清, 张昌卿, 张亚奇, 等. PCNA, P53 蛋白在肝癌临床中的意义[J]. 癌症, 1996, 15(1):45.
- [10] 林小军, 张昌卿, 李锦清, 等. P53 功能在肝癌临床中的意义[J]. 癌症, 2000, 19(7):687.

(编辑 黄小廷)

## 应用噬菌体随机肽库筛选 2 型登革病毒 E 蛋白的抗原表位

魏惠永, 江丽芳, 郭辉玉

(中山大学中山医学院微生物学教研室, 广东 广州 510089)

**摘要:**【目的】通过型特异性单抗与噬菌体随机 12 肽库的生物淘洗, 确定 2 型登革病毒 E 蛋白分子的抗原表位。【方法】以 DEN2 型特异的 E 单克隆抗体作为筛选分子, 生物淘洗噬菌体随机 12 肽库, 将筛选的噬菌体阳性克隆进行 ELISA 检测、DNA 序列测定及展示肽的氨基酸序列推导, 通过展示肽序列与 DEN2 E 蛋白的氨基酸一级结构的对比, 确定 E 蛋白的抗原优势表位并用相应的合成肽验证。【结果】常规生物淘洗获得富含芳香族氨基酸并有 aHWbW 核心结构的克隆, 确定为非特异的塑料结合噬菌体。改进淘洗方法后, 肽库筛选的噬菌体阳性克隆有共同的结构模体 WFKKGS, 与 DEN2 E 蛋白分子的 390~397 有 3~5 个氨基酸相同。其对应的合成 10 肽能与淘洗单抗特异反应, 并可抑制噬菌体阳性克隆与该单抗结合。【结论】本实验通过噬菌体随机肽库的生物淘洗确定 DEN2 E 蛋白 390~397 氨基酸残基(WFKKSSI)存在一线性的 B 细胞抗原表位。

**关键词:** 登革病毒; E 蛋白; 噬菌体随机肽库; 抗原表位

**中图分类号:** R37.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2002)5S-0010-04

近年登革病毒(DEN)导致的登革热(DF)、登革出血热(DHF)及登革休克综合征(DSS)在热带与亚热带地区流行加剧, 加强其致病机制和疫苗的研究具有重要意义。E 蛋白是 DEN 病毒体上主要的包膜糖蛋白, 有人认为 E 分子上可能存在着与二次感染时 DSS/DHF 发生密切相关的免疫增强(ADE)表位<sup>[1]</sup>。E 蛋白分子的表位图谱分析已经成为当今 DEN 的研究热点。本实验以型特异的 DEN2 E 单抗为靶分子, 用噬菌体随机肽库(RPL)进行生物淘洗, 旨在筛选确定抗原表位。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要材料

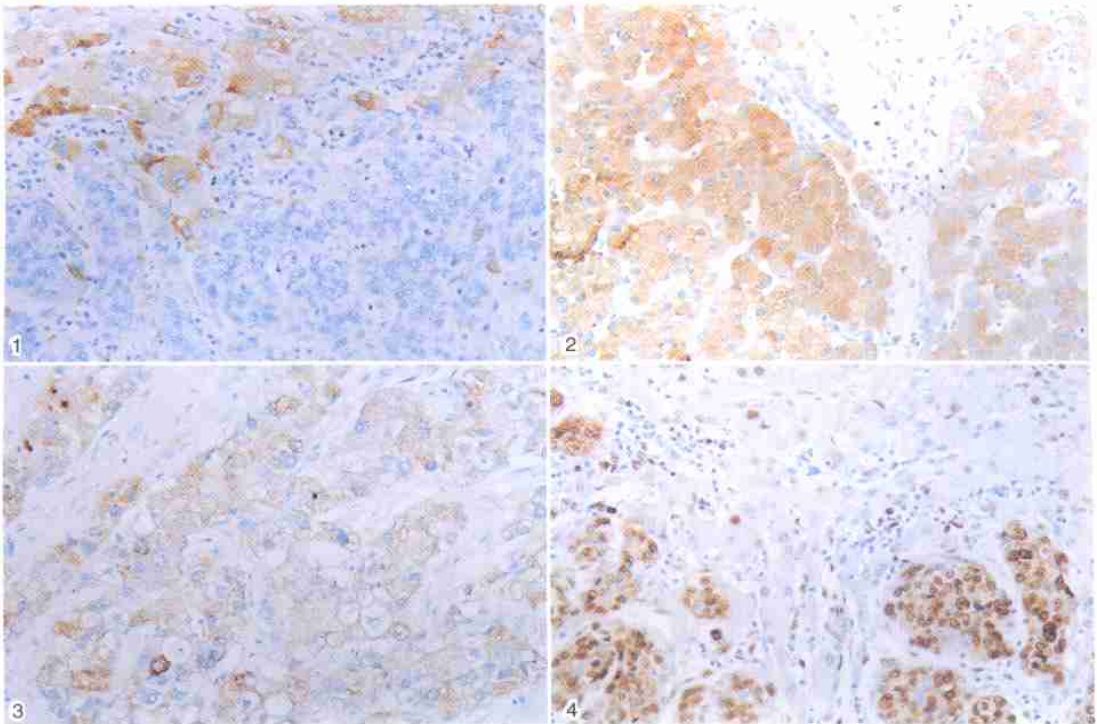
Ph.D.-12 Phage Display Peptide Library Kit 为 NEB 公司产品, 批号 E8110S。内含 12 随机肽库、宿主菌 *E. coli* ER2738、28g III 与 96g III 测序引物。肽库的滴度为  $2 \times 10^{13}$  PFU/mL, 随机多样性为  $2.7 \times 10^9$ 。DEN1 Hawaii 株 E 单抗 D2-1F1-3/TCF、DEN2 NGC 株 E 单抗 3H5-1-21/TCF、DEN3 H-87 株 E 单抗 D6-8A1-12/TCF、DEN4 H-241 株 E 单抗

收稿日期: 2002-07-25

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(201036)

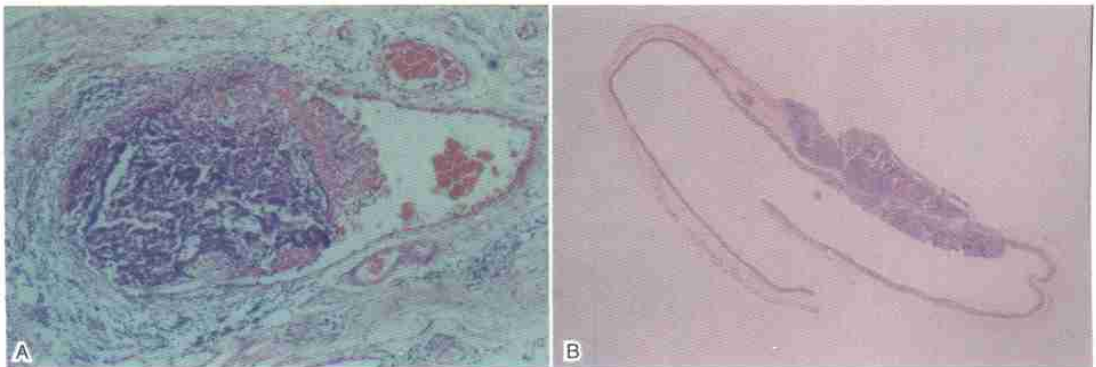
作者简介: 魏惠永(1964-), 男, 江西安远人, 助理研究员, 现在广东省人民医院中心实验室

## 肝癌组织中 P73 蛋白表达的意义 (正文见第 8 页)



- 图 1 肝细胞癌  
肝癌细胞 P73 蛋白阴性, 癌旁肝细胞 P73 蛋白阳性(×200)
- 图 2 远癌正常肝细胞癌  
肝细胞 P73 蛋白阳性(×200)
- 图 3 肝细胞癌  
肝癌细胞 P73 蛋白阳性(×200)
- 图 4 肝细胞癌  
肝癌细胞 PCNA 阳性(++++)(×200)

## 胃癌病理大切片制片及作用 (正文见第 28 页)



- 图 1 胃癌标本病理大切片
- A. 在同一切片上显示胃近切端一肿瘤一远切端, HE 染色 ×40
- B. 癌细胞侵袭胃壁深肌层血管并且形成癌栓, HE 染色 ×40