

# 功能基因组学与肝脏疾病研究

成 军

成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
成军, 男, 1963-08-17生, 山东省淄博市人, 汉族. 1986年毕业于第一军医大学军医系, 获医学学士学位, 1989年毕业于军医进修学院, 获传染病学硕士学位, 1994年毕业于北京医科大学, 获传染病学博士学位, 1994-11-17/1997-12-01在美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病学完成博士后研究, 主任医师. 主要从事传染病特别是病毒性肝炎的临床工作和基础研究, 主要学术研究方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制. 国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689  
军队“九·五”科技攻关项目, No. 98D063  
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038  
军队“十·五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138  
军队“十·五”科技攻关面上项目, No. 01MB135  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2003-06-24 接受日期: 2003-08-16

## 摘要

功能基因组学是指应用整体的研究技术阐明基因和蛋白的生物学功能. 因此, 需要发展一些强大的分析技术, 对基因和蛋白质的功能进行研究. 这必将为肝病学的研究提供了一个前所未有的发展机遇. 本文主要论述功能基因组学的先进技术在肝病领域的应用.

成军. 功能基因组学与肝脏疾病研究. 世界华人消化杂志 2004;12(1):1-5  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1.asp>

## 0 引言

人和模式生物的基因组序列测定完成之后, 今后基因组学(genomics)主要的工作就转移到基因组的结构与功能、表达调控、生物学意义和医学意义等研究领域, 即从结构基因组学(structural genomics)研究转向功能基因组学(functional genomics)研究<sup>[1]</sup>. 面对庞大的核苷酸序列数据库, 强烈感到应用传统的理论和技术来解决这么庞大的数据库资料, 显得力不从心. 因此, 要开拓功能基因组的研究, 从理论和技术上必须进行革命性的变革. 功能基因组学的建立和发展, 同时也为肝病学的研究提供了一个前所未有的发展机遇. 随着功能基因组学研究理论和技术的不断进步, 必将进一步推动肝病学的研究进展<sup>[2]</sup>.

## 1 功能基因组学的定义和内涵

随着人和各种模式生物基因和基因组测序的完成, 生物学和医学正处在一个深刻变革的时代. 1986年美国科学家 Thomas Roderick 提出了基因组学, 又称为后基因组学(postgenomics), 是指对所有基因进行基因组作图(包括遗传图谱、物理图谱、转录图谱), 核苷酸序列

分析, 基因定位和基因功能分析的一门科学. 基因组学可以分为结构基因组学和功能基因组学, 功能基因组学是指应用整体的研究技术阐明这些基因和蛋白的生物学功能. 各种生物系统是一个复杂的系统, 基因组中基因的序列是一个庞大的数据库, 因此, 需要发展一些强大的分析技术, 代替传统的分析技术, 对这些基因和蛋白质的功能进行研究.

基因是 DNA 中的一些具有功能的单位, 在遗传信息的流向中, 首先由 DNA 转录生成中间产物 RNA, 然后再翻译成具有生物学功能的蛋白质. 蛋白质是执行生命活动的基本成分. 作为基因的一段 DNA, 一般包括调节基因序列和编码基因序列. 功能基因组学的主要任务就是阐明这些基因及其编码产物的结构与功能、表达与调控. 主要包括: 第一, 人类不同个体之间基因序列的区别; 第二, 决定疾病状态和疾病的易感性的人和人之间的基因差别; 第三, 引起疾病的各种病原体, 还包括大肠杆菌、酵母、果蝇、线虫等所有生物合成的每一种蛋白的功能; 第四, 不同蛋白协同完成生命活动的机制; 第五, 在特定细胞类型和特定时间段内, 并不是所有基因都具有表达活性, 决定基因选择性表达和活动的机制; 第六, 在多细胞生物中, 不同的基因表达在形成不同细胞和组织中的作用. 对于一种特定的基因或蛋白来说, 功能基因组学的任务就是阐明调节他复制与表达的因素、与之结合蛋白的类型及功能、对于其他基因类型表达的调节作用, 还要阐明这一基因或蛋白的生物学和医学意义. 这些都是功能基因组学研究的重要内容.

## 2 启动子 DNA 结合蛋白的研究

cDNA文库的构建及其应用这一功能基因组的研究技术在启动子DNA结合蛋白的研究中具有十分重要的地位. 表达型cDNA文库的构建及其合适的筛选技术是功能基因组学的重要研究途径之一. 因为一个质量较高的表达型 cDNA 文库, 代表了一种生物的各种各样的基因表达类型. 表达型 cDNA 文库的筛选, 不是针对个别的, 或者是少数基因的分析技术, 而是针对全基因组表达的基因范围的分析技术.

例如, 乙型肝炎病毒(HBV)是一种典型的嗜肝 DNA 病毒, 但是目前关于决定其嗜肝特性的分子生物学机制还不十分清楚<sup>[3-5]</sup>. 一般认为, 肝细胞膜上的特异性受体以及肝细胞中存在的 HBV 基因启动子特异性的转录调节因子是决定 HBV 嗜肝特点的决定因素. HBV 表

面抗原基因启动子 I (SP I) 是典型的肝细胞特异性的启动子, 因此考虑肝细胞中应该存在特有的 HBV SP I 的结合蛋白, 而且对于 SP I 的转录活性具有调节作用. 国内洪源 et al 首先应用酵母单杂交(yeast-one hybrid)技术对于 SP I 的结合蛋白进行筛选. 从肝细胞的 cDNA 文库中筛选得到数种 SP I 结合蛋白, 其中之一是未知功能蛋白, 命名为 SP I 结合蛋白 1(SBP1), 这一与 C/EBP  $\beta$  同源的转录因子蛋白的表达对于 SP I 的转录活性具有显著的负调节作用, 共转染试验结果表明, SBP1 蛋白的表达对于 SP I 的转录活性的抑制率达到 65-73 %, 从而为 HBV SP I 的分子生物学调节机制开辟了新的研究方向. 酵母单杂交技术是应用表达型文库的筛选技术, 发现、鉴定启动子 DNA 结合蛋白的重要技术类型之一.

噬菌体展示(phage display)技术与表达型 cDNA 文库技术相结合, 也为启动子 DNA 结合蛋白的筛选提供了很有前途的功能基因组学研究技术<sup>[6-13]</sup>. 应用噬菌体展示技术筛选启动子 DNA 结合蛋白, 首先如何使启动子 DNA 固相化, 曾经是一个难以解决的问题. 经过认真设计, 我们率先利用一端引物的生物素化修饰以及链亲和素的酶联免疫板包被技术, 巧妙地解决了多聚酶链反应(PCR)技术扩增的启动子 DNA 片段固相化的难题, 然后结合噬菌体展示、表达型 cDNA 文库的筛选, 建立了启动子 DNA 结合蛋白的筛选技术途径. 张忠东 et al 设计合成了 HBV 核心启动子(CP)DNA 序列特异性引物, 其中一条引物进行生物素化修饰, 以含有 HBV 全基因组的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 链亲和素包被, 并使 CP DNA 片段固相化, 然后进行 3-5 轮的肝细胞 T7 噬菌体表达型 cDNA 文库的“黏附-洗脱-扩增”的淘洗, 获得了特异性噬斑. 提取噬斑中的表达载体, 对于插入片段进行序列分析, 意外地发现羧肽酶 N(CPN)可以结合 CP DNA, 报告基因表达载体以及细胞的共转染实验研究结果表明, CPN 的表达可以显著提高 CP 的转录表达活性. 因此, 经过改进的噬菌体展示技术, 结合表达型 cDNA 文库的筛选技术, 为启动子 DNA 结合蛋白的筛选增添了又一个功能基因组研究策略和技术途径.

### 3 蛋白与蛋白分子之间的结合

研究蛋白-蛋白分子之间的相互结合作用, 是目前功能基因组学研究的重要内容, 同时也是蛋白质组学(proteinomics)的重要研究内容. 高通量筛选一种已知蛋白的结合蛋白, 较为常用的技术是酵母双杂交(yeast-two hybrid)技术、双向电泳(two-dimensional electrophoresis)技术、质谱分析技术(mass spectrometry)等. 利用酵母细胞的转录调节机制设计的蛋白-蛋白之间相互作用的研究技术, 结合表达型 cDNA 文库的筛选, 成为目前研究蛋白-蛋白之间结合的重要的功能基因组学研究技术. 特别是近年来增加了报告基因多重缺陷性培养基的筛选, 提高了真阳性率; 通过可以配合的  $\alpha$  和 a 型单倍体酵母宿主细胞的引入, 提高了工作效率, 促进了酵

母双杂交技术的应用和发展<sup>[14-23]</sup>. 李克 et al 构建了以丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白为诱饵的酵母表达载体, 对于肝细胞表达型 cDNA 文库进行筛选, 获得了一系列的与 HCV 核心蛋白的结合蛋白类型, 从而为阐明 HCV 核心蛋白这种具有多种生物学功能的蛋白的作用机制研究, 奠定了坚实的基础<sup>[15]</sup>. 陆荫英 et al 对于 HBV 的各种蛋白的结合蛋白进行了系统的筛选, 王琳 et al 对于肝细胞表达的蛋白类型, 如肝再生增强因子(augmenter of liver regeneration, ALR)等的结合蛋白进行了文库级的筛选, 为阐明这些肝炎病毒蛋白以及人的蛋白的结合蛋白, 奠定了坚实的基础. 对于未知功能基因来说, 阐明其生物学功能具有很大的挑战性, 往往觉得无从下手. 利用功能基因组学的研究技术, 如利用酵母双杂交技术首先对其在细胞内结合的蛋白类型进行筛选, 则对于其细胞内定位和功能的预测具有很大的帮助. 例如, 我们曾经利用酵母双杂交技术对于丙型肝炎病毒核心蛋白的结合蛋白进行筛选, 获得了一种从未报道过的新基因, 命名为 HCBP6, 对于这一新基因的功能进行研究, 首先我们应用同样的酵母双杂交技术, 对 HCBP6 蛋白在细胞内结合的蛋白类型进行筛选研究. 筛选结果显示 HCBP6 蛋白与 Ran 结合蛋白 2(RanBP2)以及 RanBP2 样蛋白能够结合. 对 RanBP2 蛋白的亚细胞定位以及生物学功能进行分析, 发现 RanBP2 蛋白是负责细胞质、细胞核之间的大分子运输有关的核孔蛋白成分, 因而推测 HCBP6 蛋白的亚细胞定位在细胞核膜的胞质侧, 这一推测已经被免疫组织化学染色以及 HCBP6 与绿色荧光蛋白(GFP)的融合蛋白表达策略所证实. 从其结合蛋白的性质来看, HCBP6 可能与生物大分子在细胞质和细胞核之间的运输过程有关. 因此, 研究蛋白与蛋白之间的相互作用, 也是功能基因组学的重要内容和策略<sup>[24-32]</sup>.

### 4 差异显示研究技术

细胞甚至完整的生物表现出很大的差别. 这种差别肯定也是由基因及其表达的不同来决定的. 因此对于不同表型的 2 个系统的基因表达类型进行比较, 是发现和阐明表型相关基因的重要的研究策略. 目前研究中这种差异显示新的高通量表达分析方法包括微点阵(microarray)、基因表达序列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)、DNA 芯片(DNA chip)、抑制性消减杂交技术(SSH)、代表性差异显示技术(RDA)、随意引物差异显示逆转录多聚酶链反应技术(AP-DD-RT-PCR)等. 目前较为常用的技术是基因芯片技术. 基因芯片技术由于具有高通量筛选的优势, 因此受到人们的广泛关注. 但是, 目前商业化途径的基因芯片的容量毕竟有限, 只是人体基因组中很少的一部分基因序列, 因而具有很大的局限性. 另外, 基因芯片中绝大多数是已知基因, 因此不能据此发现很多新的、未知功能的基因. 相对之下, SSH 是目前较为成熟的克隆与发现反式激活新基

因的不可替代的技术途径. 利用 SSH, 可以筛选得到肝炎病毒蛋白反式激活的靶基因, 不仅可以筛选得到功能已知的基因, 而且还能筛选到功能未知的基因类型. 因此, 抑制性消减杂交技术在相当一段时间内具有广泛的应用前景.

肝炎病毒蛋白具有反式激活作用早已被人们广泛认识到. 肝炎病毒蛋白对于肝细胞基因组表达的反式调节作用, 是肝炎病毒感染与肝细胞癌发生发展密切相关的重要的分子生物学机制<sup>[33-35]</sup>. 分子生物学技术的发展, 为研究和克隆肝炎病毒蛋白反式激活基因的克隆化提供了前所未有的机遇. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒都编码一些具有反式激活作用的肝炎病毒蛋白<sup>[36-44]</sup>. HBxAg 的反式激活作用早已为人熟知, 近年来关于乙型肝炎病毒表面抗原截短型中蛋白(MHBs<sup>t</sup>)的反式激活作用也逐渐受到重视. MHBs<sup>t</sup> 的编码基因首先是在肝细胞癌(HCC)组织中发现的, 由于基因整合的缘故, HBsAg 基因片段不完整地整合到肝细胞基因组中, 从而产生了这种 MHBs<sup>t</sup>. 最近, 我们在慢性乙型肝炎患者外周血中也发现了 MHBs<sup>t</sup> 的存在, 因此, 关于 MHBs<sup>t</sup> 的作用有了更为细致的认识<sup>[45-49]</sup>. 如果这种 MHBs<sup>t</sup> 在 HCC 的发生发展过程中起作用, 那么不仅仅是整合的 HBV DNA 编码这种反式激活肝炎病毒蛋白, 而且非整合型 HBV DNA 也具有编码这种反式激活剂的功能. 从而认为 MHBs<sup>t</sup> 在 HCC 的发生发展过程中具有更为广泛的作用. HCV 病毒的核心蛋白、非结构蛋白 NS3 和 NS5A 都是明确的反式激活蛋白, 在 HCV 相关性的 HCC 发展过程中具有十分重要的作用. HBV 是一种 DNA 病毒, 在复制周期中通过前基因组 RNA 的逆转录机制, 而 HCV 是一种 RNA 病毒, 是 RNA-RNA 的复制过程. 因此, 这两种肝炎病毒的致病机制不完全相同. 但是, 共同的一点是这两种肝炎病毒的基因组都编码一些具有反式激活功能的蛋白质, 与 HCC 的形成机制有关.

我们利用基因芯片技术和 SSH 对于肝炎病毒蛋白的反式激活作用的靶基因进行了研究<sup>[50-59]</sup>. 研究的结果既有已知功能的基因, 也发现了一些功能未知的基因类型. 例如, 我们在 MHBs<sup>t</sup> 的反式激活研究中, 首先构建了 MHBs<sup>t</sup> 的表达载体, 利用细胞的共转染技术, 证实这种 MHBs<sup>t</sup> 具有反式激活 SV40 早期即刻启动子的作用. 然后, 利用 SSH, 对于转染表达 MHBs<sup>t</sup> 表达载体的 Hep G2 细胞以及转染 pcDNA3 空白载体的 Hep G2 细胞的基因表达谱进行分析. 结果发现了一些 MHBs<sup>t</sup> 反式激活的靶基因. 已知功能基因包括原癌基因 c-myc 这种具有复杂功能的肿瘤相关基因. 我们不但利用 SSH 筛选得到这种反式激活的现象, 而且利用 Western blot 杂交技术证实了 MHBs<sup>t</sup> 的表达对于 c-myc 基因表达的反式激活效应. 利用 SSH, 我们不但得到一些功能已知基因, 而且还发现了一些肝炎病毒反式激活的未知功能基因, 为进一步研究和阐明肝炎病毒感染引起 HCC 的分子生物学机制, 开创了新的可能的研究方向. 与此同

时, 我们利用基因表达谱基因芯片技术, 对于 HCV 核心蛋白转染的 Hep G2 细胞系与转染空白载体的相同细胞系的基因表达谱进行了分析, 证实了 HCV 核心蛋白对于一部分功能已知基因的反式激活作用, 同时也发现了一些 HCV 核心蛋白反式激活的未知功能的新基因. 因此, 基因芯片技术和 SSH 是目前进行差异表达分析的有效工具<sup>[60]</sup>.

## 5 功能缺失表型分析策略

功能缺失表型(loss of function phenotype)的研究策略又称为反向功能基因组学(reverse functional genomics)策略, 是功能基因组的重要的研究策略之一. 功能缺失表型技术包括细胞系或动物的基因敲除(gene knock-out)技术、反义(antisense)技术、RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术等.

细胞系或整体动物的基因敲除技术, 目前虽然在操作上有一定的差别, 但都是利用了细胞内的同源基因重组的技术原理. 为了提高细胞内同源重组, 或者说基因打靶(gene targetting)的效率, 近年来逐步建立了一系列的正性、负性选择系统和技术, 进一步提高了基因打靶的效率. 从目前的发展来看, 细胞系的基因敲除和细胞核移植技术的结合逐步成熟, 将是基因敲除研究的主流发展方向.

反义分子包括反义寡聚脱氧核苷酸(ODN, oligodeoxynucleotide)、反义 RNA、核酶(ribozyme)以及多靶位的核酶(multi-target ribozyme)技术等. 反义 ODN 和 RNA 分子主要是通过与其靶 RNA 分子的结合, 形成杂种复合物分子, 激活、诱导内源性的蛋白酶类, 对于这类杂种分子进行消化, 反义分子与靶 RNA 分子同归于尽, 抑制靶 RNA 分子的作用. 核酶和多靶位核酶技术作用的原理, 不仅包括反义技术的作用原理, 而且还利用核酶 RNA 分子的酶学催化作用, 即分子剪刀对于靶 RNA 分子的剪切, 一分子的核酶 RNA 可以剪切多个分子的靶 RNA, 因此更加有效率. 目前根据核酶作用的基本原理, 构建了核酶活性中心两侧的侧翼序列为随机序列的核酶文库, 在功能基因组学研究中具有十分重要的应用前景. 利用随机核酶文库的构建, 对于抗 - Fas 抗体诱导的细胞凋亡(apoptosis)的相关基因进行研究, 也取得了很好的效果.

RNA 干扰现象从低等生物到人都是广泛存在的. 实验研究证明, RNA 干扰策略是功能缺失表型研究的有力工具. Kamath et al<sup>[61]</sup> 构建了针对美丽隐杆线虫(*C. elegans*)16 757 个基因的特异性 RNAi 表达菌株, 占美丽隐杆线虫全部预测的 19 427 个基因的 86 %, 通过喂食含有 RNAi 表达载体的菌株, 在美丽隐杆线虫体内表达不同的 RNAi, 并对于 RNAi 表达导致的功能丧失表型进行分析. 其中最为常见的一种表型就是死胎, 共 929 种 RNAi, 占 5.5 %, 估计是占美丽隐杆线虫死胎相关基因的 75 %, 因此这一研究结果对于研究美丽隐

杆线虫的胚胎发育具有十分重要的意义, 是一个很好的研究起点. 第二位的功能缺失表型是运动失调, 这些基因的缺失导致神经肌肉系统的损害. 根据不同种属生物基因序列的保守性, 还鉴定出 33 个与人的疾病相似的功能缺失表型. 进一步表明了 RNAi 策略在人类疾病相关基因研究中的重要意义. RNAi 研究策略中, 可以根据基因的序列, 体外化学合成 21-23 nt 的双链 RNAi, 利用表达载体的构建以及体外转录制备 RNAi, 也可以构建 RNAi 的表达载体, 在体内进行表达. 由于 RNAi 是相互配对的双链 RNA 分子, 因此必须采用 2 种表达载体进行共转染, 配对的双链分别从不同的载体上表达, 然后以碱基配对方式结合成具有功能的 RNAi 分子. 为了简化 RNAi 表达载体的构建, Yu et al<sup>[62]</sup> 构建了“发夹” RNAi (hairpin RNAi), 利用引物的特殊设计, 在一个表达载体上表达一段 RNA, 可以反折形成发夹 RNAi. RNAi 的有效性对于其序列的长度有严格的要求. 为了避免体内转录产物恰好在需要处结束, 减少不必要的 RNA 序列, 干扰 RNAi 的生物学功能, Yu et al 采用了小鼠的 U6 基因启动子, 这种 III 型基因启动子, 在 III 型 RNA 聚合酶的催化作用下, 模板序列的 3' - 末端只要存在 2-4 个 U, 就可以停止转录, 利用这样的启动子选择和模板 DNA 的设计, 就可以保证有效的转录以及在特定位置的转录终止, 保证 RNAi 的转录水平和 RNAi 的长度.

## 6 生物信息学技术

生物信息学是以生物大分子为研究对象, 以计算机为工具, 运用数学和信息科学的观点、理论和方法去研究生命现象、组织和分析呈指数级增长的生物信息数据的一门科学. 研究重点体现在基因组学和蛋白质两个方面. 首先是研究遗传物质的载体 DNA 及其编码的大分子量物质, 以计算机为工具, 研究各种学科交叉的生物信息学的方法, 找出其规律性, 进而发展出适合他的各种软件, 对逐步增长的 DNA 和蛋白质的序列和结构进行收集、整理、发布、提取、加工、分析和发现. 由数据库、计算机网络和应用软件三大部分组成, 其关注的研究热点包括: 序列对比, 基因识别和 DNA 序列分析, 蛋白质结构预测, 分子进化, 数据库中知识发现<sup>[63, 64]</sup>. 这一领域的重大科学问题有: 继续进行数据库的建立和优化; 研究数据库的新理论、新技术、新软件; 进行若干重要算法的比较分析; 进行人类基因组的信息结构分析; 从生物信息数据出发开展遗传密码起源和生物进化研究; 培养生物信息专业人员, 建立国家生物医学数据库和服务系统. 1990 年代生物学数据的大量积累将导致新的理论发现或重大科学发现. 生物信息学是基于数据库与知识发现的研究, 对生命科学带来革命性的变化, 对肝脏疾病的研究将产生巨大的影响.

## 7 参考文献

- Escobar MA, Civerolo EL, Summerfelt KR, Dandekar AM. RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:13437-13442
- Kruger M, Beger C, Li QX, Welch PJ, Tritz R, Leavitt M, Barber JR, Wong-Staal F. Identification of eIF2 $\gamma$  and eIF2 $\gamma$  as cofactors of hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation using a functional genomics approach. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8566-8571
- 成军, 斯崇文, 王勤环, 于敏. 人白介素 -2 基因转移表达及抗乙型肝炎病毒和诱导 LAK 细胞活性的研究. *中华医学杂志* 1995; 75:388-391
- 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 夏小兵, 斯崇文. 外周血中乙型肝炎病毒截短型囊膜中蛋白基因的克隆化与分析. *中华肝脏病杂志* 2001;9:163-165
- 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶区基因序列准种与变异研究. *解放军医学杂志* 2001;26:823-825
- Cheng J, Zhong YW, Liu Y, Dong J, Yang JZ, Zhang LX. Screening and identification of a humanized single chain variable region antibody for hepatitis C virus non-structural 3 protein. *Chin J Immunol* 2000;16:246-249
- 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. *世界华人消化杂志* 2002;10:133-136
- 钟彦伟, 成军, 施双双, 王刚, 夏小兵, 田小军, 李莉, 张玲霞. 抗丙肝病毒包膜蛋白 E2 人源单链抗体的制备及免疫组织化学研究. *中华肝脏病杂志* 2002;10:109-112
- 钟彦伟, 成军, 蔡炯, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 抗独特型人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. *世界华人消化杂志* 2002;10:897-901
- Zhong YW, Cheng J, Wang G, Shi SS, Li L, Zhang LX, Chen JM. Preparation of human single chain Fv antibody against hepatitis C virus E2 protein and its identification in immunohistochemistry. *World J Gastroenterol* 2002;8:863-867
- 钟彦伟, 成军, 田小军, 陈新华, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 抗原模拟表位的筛选与鉴定. *中华传染病杂志* 2003;21:5-8
- 钟彦伟, 成军, 蔡炯, 张忠东, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒核心蛋白模拟表位. *解放军医学杂志* 2003;28:34-36
- 钟彦伟, 成军, 蔡炯, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 NS4A 蛋白抗独特型人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. *解放军医学杂志* 2003;28:37-39
- Cheng J, Zhong YW, Liu Y, Dong J, Yang JZ, Chen JM. Cloning and sequence analysis of human genomic DNA of augmenter of liver regeneration. *World J Gastroenterol* 2000;6:275-277
- 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. *世界华人消化杂志* 2001; 9:1379-1383
- 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体构建及表达. *世界华人消化杂志* 2002;10: 15-18
- 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒 NS2 基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. *世界华人消化杂志* 2002;10:129-132
- 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. *世界华人消化杂志* 2002;10:161-164
- 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 牟劲松, 洪源, 刘妍, 段惠娟, 王刚, 李莉, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白与染色体转位蛋白的相互作用. *中华医学杂志* 2002;82:673-677
- 王琳, 陆荫英, 成军, 于敏, 李克, 刘妍. 白介素 -18 逆转录病毒载体的构建及抗乙型肝炎病毒的研究. *解放军医学杂志* 2002;27: 699-701
- 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙肝病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:765-769
- 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 邵得志, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 洪源, 陈菊梅. 筛选与克隆丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因. *中华实验和临床病毒学杂志* 2002;16:351-354
- 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白 AI 结合的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:1018-1021

1 Escobar MA, Civerolo EL, Summerfelt KR, Dandekar AM. RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall

- 24 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 刘妍, 王刚, 洪源, 王贺, 芮莉莉. 筛选与克隆丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白结合蛋白基因. 解放军医学杂志 2003;28:50-52
- 25 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源. 酵母双杂交技术筛选克隆丙型肝炎病毒 NS3 蛋白结合蛋白. 解放军医学杂志 2003;28:31-33
- 26 陆荫英, 李克, 王琳, 刘妍, 王业东, 成军, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S2 蛋白结合蛋白的筛选. 中华肝脏病杂志 2003;11:8-10
- 27 陆荫英, 王琳, 刘妍, 李克, 成军, 张玲霞, 李莉. 乙型肝炎病毒核心抗原与金属硫蛋白相互作用的研究. 解放军医学杂志 2003;28:161-163
- 28 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L, Chen JM. Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein-a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:300-303
- 29 陆荫英, 王琳, 刘妍, 李克, 成军, 张玲霞, 李莉. 乙型肝炎病毒 e 抗原与金属硫蛋白相互作用的研究. 解放军医学杂志 2003;28:451-453
- 30 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选 Hcbp6 结合的肝细胞蛋白编码基因. 世界华人消化杂志 2003;11:385-388
- 31 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:426-429
- 32 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBcAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:422-425
- 33 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙肝病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 34 夏小兵, 成军, 王刚, 杨继珍, 刘妍, 董菁, 王琳, 李克. 人肝再生增强因子在毕赤酵母中的表达. 世界华人消化杂志 2001;9:743-746
- 35 Dong J, Cheng J, Wang QH, Liu Y, Wang G, Shi SS, Xia XB, Shao Q, Si CW. The preliminary study on hepatitis B virus (HBV) quasispecies in patients with chronic HBV infection. *Chin J Infect Dis* 2001;19:199-203
- 36 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 董菁, 洪源, 张跃新, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26:880-883
- 37 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及准种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325
- 38 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 DNA 序列异质性及准种特点的研究. 中华医学杂志 2002;82:81-85
- 39 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 皇甫竞坤, 王刚, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前 C/C 基因准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:122-123
- 40 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 杨守纯. 丙型肝炎病毒非结构区 NS3 基因在大肠杆菌中的可诱导性高表达. 中华实验和临床病毒学杂志 2002;16:85-87
- 41 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 X 基因准种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 42 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 王业东, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:116-118
- 43 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列个体化变异的初步观察. 解放军医学杂志 2002;27:119-121
- 44 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及对其反式激活功能的影响. 解放军医学杂志 2002;27:125-127
- 45 刘妍, 成军, 陆荫英, 王刚, 牟劲松, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式调节基因的克隆化研究. 中华肝脏病杂志 2003;11:5-7
- 46 刘妍, 成军, 邵得志, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 李克, 李莉. HCV 核心蛋白与 HBV X 蛋白协同反式激活作用的研究. 中华实验和临床病毒学杂志 2003;17:39-41
- 47 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. 世界华人消化杂志 2003;11:394-398
- 48 牟劲松, 刘妍, 王刚, 成军, 段惠娟, 李克, 陆荫英, 王琳, 王惠芬. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活的相关基因. 世界华人消化杂志 2003;11:399-403
- 49 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV 核心蛋白与截短型 HBV 表面抗原中蛋白协同反式激活功能的研究. 中华肝脏病杂志 2002;10:354-357
- 50 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 韩萍, 牟劲松, 李克, 钟彦伟. 乙型肝炎病毒核心启动子区基因异质性及对其转录活性的影响. 解放军医学杂志 2002;27:128-130
- 51 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调 c-myc 基因表达的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:141-144
- 52 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 53 洪源, 成军, 董菁, 李克, 王琳, 王刚, 刘妍. 乙型肝炎病毒 HBsAg 重组疫苗与表面抗原 DNA 疫苗诱导 H-2<sup>b</sup> 小鼠免疫应答的实验研究. 世界华人消化杂志 2002;10:137-140
- 54 王刚, 刘妍, 牟劲松, 洪源, 邵得志, 张耀新, 李莉, 成军. 大鼠肝再生相关基因 LRRP1 的克隆化. 世界华人消化杂志 2002;10:165-168
- 55 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒前 S2 基因序列异质性的研究. 中华内科杂志 2002;41:233-236
- 56 董菁, 施双双, 王业东, 皇甫竞坤, 洪源, 李莉, 张玲霞, 成军. cDNA 文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前 S1 蛋白结合蛋白筛选. 解放军医学杂志 2002;27:321-322
- 57 Dong J, Cheng J, Wang QH, Shi SS, Wang G, Si CW. Cloning and analysis of the genomic DNA sequence of augments of liver regeneration from rat. *Chin Med Sci J* 2002;17:63-67
- 58 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S1 基因酵母表达载体的构建及表达. 解放军医学杂志 2002;27:341-342
- 59 董菁, 成军, 王勤环, 刘妍, 王刚, 施双双, 夏小兵, 李克, 邵得志, 斯崇文. 乙型肝炎病毒囊膜中蛋白与白细胞介素-18 联合基因免疫的实验研究. 中华传染病杂志 2002;20:148-151
- 60 刘妍, 成军, 张跃新, 段惠娟, 牟劲松, 韩萍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 截短型 HBsAg 中蛋白反式激活基因的克隆. 中华传染病杂志 2002;20:218-221
- 61 Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, Kanapin A, Bot NL, Moreno S, Sohrmann M, Welchman DP, Zipperlen P, Ahringer J. Systemic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 2003;421:231-237
- 62 Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;99:6047-6052
- 63 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因和蛋白的生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2003;11:378-384
- 64 钟彦伟, 成军, 张忠东, 孙敏, 李强, 李克, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 噬菌体表面展示技术筛选 HCBP6 人源单链可变区抗体. 世界华人消化杂志 2003;11:389-393

# 胃癌同时性肝转移手术治疗 12 例

陈俊强, 詹文华, 何裕隆, 彭俊生, 黄奕华, 陈正煌, 蔡世荣

陈俊强, 詹文华, 何裕隆, 彭俊生, 黄奕华, 陈正煌, 蔡世荣, 中山大学附属第一医院胃肠胰脾外科 广东省广州市 510080  
陈俊强, 男, 1968-08-23 生, 广西北海市人, 汉族. 中山大学附属第一医院胃肠外科临床博士研究生, 副教授. 主要从事消化道肿瘤的侵袭转移等方面的研究.

项目负责人: 詹文华, 510080, 广东省广州市中山二路 80 号, 中山大学附属第一医院胃肠胰脾外科. wzwk@gzsums.edu.cn  
收稿日期: 2003-05-14 接受日期: 2003-06-04

## Surgical treatment for synchronous hepatic metastases from gastric cancer: A report of 12 cases

Jun-Qiang Chen, Wen-Hua Zhan, Yu-Long He, Jun-Sheng Peng, Yi-Hua Huang, Zhen-Xuan Chen, Shi-Rong Cai

Jun-Qiang Chen, Wen-Hua Zhan, Yu-Long He, Jun-Sheng Peng, Yi-Hua Huang, Zhen-Xuan Chen, Shi-Rong Cai, Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China  
Correspondence to: Dr. Wen-Hua Zhan, Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. wzwk@gzsums.edu.cn  
Received: 2003-05-14 Accepted: 2003-06-04

## Abstract

AIM: To determine the most effective means of treating liver metastases from gastric cancer.

METHODS: We retrospectively examined 26 patients with liver metastases, but without peritoneal dissemination, who had received synchronous hepatic resection and curative gastrectomy, and noncurative gastrectomy.

RESULTS: The median survival times of patients given curative gastrectomy and noncurative gastrectomy were 398 and 202 days, respectively. The patients given curative gastrectomy survived significantly longer than those noncurative gastrectomy ( $P=0.0072$ ). One patient survived for more than 8 years without any signs of recurrence. 1-year, 2-year and 3-year survival rates of patients who underwent curative gastrectomy were 51.2%, 44.9% and 18.2%, respectively. Those with noncurative gastrectomy were 14.6%, 0% and 0%, respectively.

CONCLUSION: Curative gastrectomy is best indicated for gastric cancer patients with solitary metastatic nodule or nodules limited in one lobe of the liver, which may improve the patients' prognosis and extend their survival.

Chen JQ, Zhan WH, He YL, Peng JS, Huang YH, Chen ZX, Cai SR. Surgical treatment for synchronous hepatic metastases from gastric cancer: A report of 12 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):6-8

## 摘要

目的: 确定胃癌肝转移有效的治疗方法.

方法: 我们回顾性研究了具有同时性肝脏转移而没有腹膜播散的接受根治性胃切除 + 肝转移灶切除(根治性胃切除)和非根治性胃切除治疗的 26 例患者.

结果: 根治性胃切除组和非根治性胃切除组患者的中数生存期分别是 398 d 和 202 d, 两组生存时间有显著性差异 ( $P=0.0072$ ). 根治性胃切除组 1 a, 2 a 和 3 a 生存率分别为 51.2%, 44.9% 和 18.2%, 而非根治性胃切除组 1 a, 2 a 和 3 a 生存率分别为 14.6%, 0% 和 0%.

结论: 单个或局限于一侧肝叶的孤立性肝转移灶的肝切除可改善患者的预后, 延长生存时间.

陈俊强, 詹文华, 何裕隆, 彭俊生, 黄奕华, 陈正煌, 蔡世荣. 胃癌同时性肝转移手术治疗 12 例. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):6-8

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/6.asp>

## 0 引言

肝转移是晚期胃癌患者死亡的最主要原因之一<sup>[1,2]</sup>. 胃癌肝转移的治疗尤其是肝切除的治疗的意义仍存在争议<sup>[3-13]</sup>. 1981-03/2002-12 中山大学附属第一医院经胃镜、钡餐、B 超、CT 等共诊断胃癌合并同时性肝转移 105 例, 其中对 12 例肝转移者行根治性胃切除术同时切除肝转移灶(根治性胃切除), 14 例仅行胃癌切除术而对肝转移灶未作特殊处理(非根治性胃切除), 如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 根治性胃切除组 12 例, 肝脏转移灶均为孤立性转移灶(H<sub>1</sub> 转移: 单个转移灶 8 例, 局限于一叶肝内的 2 个或 3 个转移灶分别为 3 例和 1 例; 右肝 3 例, 左肝 9 例), 转移癌直径为 1.5-5.5 cm, 男 8 例, 女 4 例, 年龄 30-73 岁(平均 59.8 岁), 肝转移灶均经病理学检查证实. 非根治性胃切除组 14 例, 肝脏转移灶为 H<sub>2</sub> 或 H<sub>3</sub>, 男 14 例, 女 0 例, 年龄 36-74 岁(平均 58.5 岁), 经手术探查活检病理证实肝转移. 这些患者术前均经胃镜检查诊断为胃癌, 均有活检组织病理诊断, 均经 B 超、CT 或 MRI 检查诊断为肝内转移病灶但无腹腔其他脏器转移, 术前无手术禁忌证, 术中探查无其他部位的转移.

1.2 方法 根治性胃切除组行远端胃癌根治术 8 例, 全胃根治性切除 4 例, 均为 D<sub>2</sub> 术式; 肝转移灶行不规则肝部分切除 7 例, 肝左外叶切除 4 例, 左半肝切除 1 例. 有 2 例术后应用 FAM 方案进行了 6 个疗程的全身性



化疗. 非根治性胃切除组仅对原发癌灶行根治性切除, 其中远端胃大部切除术 10 例, 全胃切除术 4 例, 术后无放疗化疗.

统计学处理 根据 Kaplan-Meier 方法计算累积生存率, 使用 Log rank test 比较各组间生存时间有无显著差异,  $P < 0.05$  有显著意义. 统计计算借助于 SPSS10.0 完成.

## 2 结果

根治性胃切除组 12 例获随访, 中数生存期是 398 d, 1 例生存时间达 8 a 以上, 目前仍存活. 非根治性胃切除组 14 例中 12 例获随访, 中数生存期是 202 d. 根治性胃切除组与非根治性胃切除组的生存时间有显著差异( $P = 0.0072$ ). 根治性胃切除组 1 a, 2 a 和 3 a 生存率分别为 51.2%, 44.9% 和 18.2%, 而非根治性胃切除组 1 a, 2 a 和 3 a 生存率分别为 14.6%, 0% 和 0%(图 1).

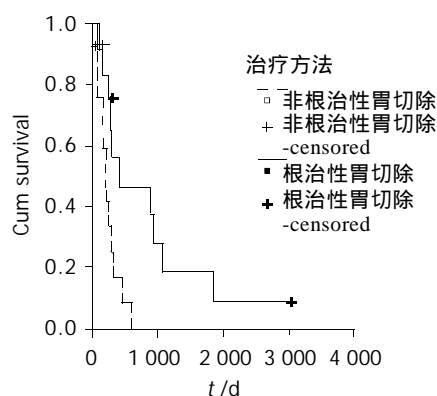


图 1 根治性胃切除、非根治性的胃切除患者的生存曲线.

## 3 讨论

胃癌肝转移约占 5-8%, 不包括癌灶直接浸润而累及肝脏者. 胃癌肝转移的特点是多发性转移者居多, 并且常常伴有腹膜转移等. 仅 10-20% 的胃癌肝转移患者适宜肝切除术<sup>[3-8]</sup>. 在我院收治的 105 例胃癌合并同时性肝转移的患者中, 除本研究中列出的病例外, 其余都是伴有腹膜转移、盆腔转移等的病例, 大多数都是多发转移. 关于胃癌肝转移的机制目前公认的理论是通过血源性途径转移. 陈峻青<sup>[9]</sup>的研究显示, 胃癌微静脉内癌栓与发生肝转移有密切关系, 有微静脉癌栓者术中、术后发生肝转移者达 56.3% (13/23), 无微静脉癌栓者仅为 5.2%. Maehara et al<sup>[10]</sup>注意到肝转移者常伴随淋巴结转移. Burn<sup>[14]</sup>发现, 当淋巴管受阻时可出现淋巴及静脉交通的现象, 作者因而假设当癌细胞转移到淋巴管或淋巴管并且妨碍淋巴管内淋巴液流动时就出现淋巴及静脉交通现象, 并因此提出胃癌肝转移是通过淋巴途径转移的可能性. Kumagai et al<sup>[15]</sup>的研究初步证实了这一设想.

由于胃癌肝转移往往是多发的并且常常伴有其他的肝外病变, 因此只有 10-20% 的胃癌肝转移患者适宜肝切除术. 相对于结直肠癌肝转移肝切除术而言, 胃癌

肝转移肝切除术仍然是一个有争议的临床问题<sup>[2-7, 14-20]</sup>. Morise et al<sup>[21]</sup>报道 1 例 63 岁晚期胃癌患者行全胃切除术后由于复发肝转移, 先后 3 次行肝转移灶的切除, 而在初次术后 6.5 a, 初次肝转移灶切除术后 5.8 a 未再发现转移灶, 说明肝转移灶的手术切除对于某些患者是可以获得满意疗效的. 然而, 也有研究认为肝转移灶切除并不能改善胃癌肝转移患者的预后. Kunieda et al<sup>[22]</sup>回顾了具有肝脏转移但是没有腹膜播散的接受各种治疗的 43 例患者, 结果显示经受胃切除术和完全的肝转移灶切除术(根治性胃切除术)的患者和非根治性的胃切除术和没有胃切除术患者的 5 a 存活率分别是 33.3%, 3.7% 和 0%. 根治性胃切除术组存活率最高, 但统计学上无显著性差异. Ambiru et al<sup>[23]</sup>利用单变量和多变量分析了 40 例胃癌肝转移行肝切除患者, 认为同时性肝转移的肝切除术没有价值. 大部分数据表明, 胃癌肝转移肝切除后中数生存期 5-24 mo<sup>[21]</sup>; 1 a, 5 a 存活率分别为 15-50% 和 5-19%<sup>[2-9]</sup>. 本研究中胃癌肝转移肝切除后中数生存期为 398 d, 1 a, 2 a 和 3 a 生存率分别为 51.2%, 44.9% 和 18.2%, 与大部分研究者的数据基本一致. 影响胃癌肝转移肝切除术预后的因素很多, 主要有单个的和异时的转移、肿瘤周围存在纤维假包膜和转移性结节分化良好的组织学类型、原发肿瘤部位位于胃远端、是否有淋巴结转移等<sup>[22-31]</sup>.

## 4 参考文献

- Maehara Y, Kakeji Y, Oda S, Takahashi I, Akazawa K, Sugimachi K. Time trends of surgical treatment and the prognosis for Japanese patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 2000;83:986-991
- Wang CS, Hsieh CC, Chao TC, Jan YY, Jeng LB, Hwang TL, Chen MF, Chen PC, Chen JS, Hsueh S. Resectable gastric cancer: operative mortality and survival analysis. *Chang Gung Med J* 2002;25:216-227
- Amemiya H, Kono K, Itakura J, Tang RF, Takahashi A, An FQ, Kamei S, Iizuka H, Fujii H, Matsumoto Y. c-Met expression in gastric cancer with liver metastasis. *Oncology* 2002;63:286-296
- Fujisaki S, Tomita R, Nezu T, Kimizuka K, Park E, Fukuzawa M. Prognostic studies on gastric cancer with concomitant liver metastases. *Hepatogastroenterology* 2001;48:892-894
- Moriya A, Hyodo I, Nishina T, Imaoka H, Imagawa A, Doi T, Endo H, Tanimizu M, Tajiri H. Extensive liver metastasis of gastric cancer effectively treated by hepatic arterial infusion of 5-fluorouracil/cisplatin. *Gastric Cancer* 2000;3:110-115
- Sakamoto Y, Ohyama S, Yamamoto J, Yamada K, Seki M, Ohta K, Kokudo N, Yamaguchi T, Muto T, Makuuchi M. Surgical resection of liver metastases of gastric cancer: an analysis of a 17-year experience with 22 patients. *Surgery* 2003;133:507-511
- Watanabe S, Tanaka T, Takeuchi T, Takabayashi H, Hirayama Y. Advanced gastric cancer with liver metastases successfully treated with S-1. *Int J Clin Oncol* 2002;7:326-329
- Yagi Y, Seshimo A, Kameoka S. Prognostic factors in stage IV gastric cancer: univariate and multivariate analyses. *Gastric Cancer* 2000;3:71-80
- 陈峻青. 胃癌肝转移的治疗原则. *中国实用外科杂志* 1995;15:267-268
- Maehara Y, Tomisaki S, Oda S, Sakaguchi Y, Ichiyoshi Y, Sugimachi K. Lymphatic advancement to peritoneal dissemination and liver metastasis in gastric cancer patients. *Anticancer Res* 1994;14:2755-2758

- 11 Kumada T, Arai Y, Itoh K, Takayasu Y, Nakamura K, Ariyoshi Y, Tajima K. Phase II study of combined administration of 5-fluorouracil, epirubicin and mitomycin-C by hepatic artery infusion in patients with liver metastases of gastric cancer. *Oncology* 1999;57:216-223
- 12 Iwahashi M, Tanimura H, Nakamori M, Nagai Y, Hirabayashi N, Ueda K, Matsuda K, Tsunoda T, Yamaue H. Clinical evaluation of hepatic arterial infusion of low dose-CDDP and 5-FU with hyperthermotherapy: a preliminary study for liver metastases from esophageal and gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 1999;46:2504-2510
- 13 Hanazaki K, Sodeyama H, Mochizuki Y, Igarashi J, Yokoyama S, Sode Y, Wakabayashi M, Kawamura N, Miyazaki T. Palliative gastrectomy for advanced gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2001;48:285-289
- 14 Burn JI. Obstructive lymphopathy. *Ann R Coll Surg Engl* 1968; 42:93-113
- 15 Kumagai K, Tanaka T, Yamagata K, Yokoyama N, Shimizu K. Liver metastasis in gastric cancer with particular reference to lymphatic advancement. *Gastric Cancer* 2001; 4:150-155
- 16 Benevento A, Boni L, Frediani L, Ferrari A, Dionigi R. Result of liver resection as treatment for metastases from noncolorectal cancer. *J Surg Oncol* 2000;74:24-29
- 17 Tarazov PG. Transcatheter therapy of gastric cancer metastatic to liver: preliminary result. *J Gastroenterol* 2000;35: 907-911
- 18 Takata N, Harada K, Yoshinaka I, Maeda M, Nasu J, Ikeda R. Multimodality therapy for synchronous liver metastases of gastric cancer-significance of aggressive hepatic resection of liver lesions. *Gan To Kagaku Ryoho* 2000;27:1916-1919
- 19 Okuno K, Shigeoka H, Tanaka A, Hirai N, Matsumura E, Yasutomi M. Clinicopathological evaluation of T2-gastric cancer among age groups. *Hepatogastroenterology* 2000;47: 1180-1182
- 20 Tsujitani S, Oka S, Suzuki K, Saito H, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Prognostic factors in patients with advanced gastric cancer treated by noncurative resection: a multivariate analysis. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1504-1508
- 21 Morise Z, Yamafuji K, Takahashi T, Asami A, Takeshima K, Hayashi N, Fukazawa A, Yoshida F, Yamamoto M, Tokura Y. Successful treatment of recurrent liver metastases from gastric cancer by repeated hepatic resections: report of a case. *Surg Today* 2000;30:1041-1045
- 22 Kunieda K, Saji S, Sugiyama Y, Osada S, Sano J, Nagao N, Takahashi T, Takagi Y, Arai Y. Evaluation of treatment for synchronous hepatic metastases from gastric cancer with special reference to long-term survivors. *Surg Today* 2002;32: 587-593
- 23 Ambiru S, Miyazaki M, Ito H, Nakagawa K, Shimizu H, Yoshidome H, Shimizu Y, Nakajima N. Benefits and limits of hepatic resection for gastric metastases. *Am J Surg* 2001;181: 279-283
- 24 Okano K, Maeba T, Ishimura K, Karasawa Y, Goda F, Wakabayashi H, Usuki H, Maeta H. Hepatic resection for metastatic tumors from gastric cancer. *Ann Surg* 2002;235: 86-91
- 25 Zacherl J, Zacherl M, Scheuba C, Steininger R, Wenzl E, Muhlbacher F, Jakesz R, Langle F. Analysis of hepatic resection of metastasis originating from gastric adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2002;6:682-689
- 26 Saiura A, Umekita N, Inoue S, Maeshiro T, Miyamoto S, Matsui Y, Asakage M, Kitamura M. Clinicopathological features and outcome of hepatic resection for liver metastasis from gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2002;49:1062-1065
- 27 Nashimoto A, Yabusaki H, Takii Y, Tsuchiya Y, Tanaka O. Evaluation of hepatic resection for metachronous liver metastases from gastric cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2002;29: 2096-2099
- 28 Yoshizumi Y, Matuyama T, Koike H, Aiko S, Sugiura Y, Maehara T. Long-term survival after gastric cancer and liver and paraaortic lymph node metastases: report of a case. *Surg Today* 2001;31:159-162
- 29 Aoyagi K, Koufuji K, Yano S, Murakami N, Miyagi M, Takeda J, Shirouzu K. Long-term survival after gastric cancer with liver metastasis: a report of two cases. *Kurume Med J* 2001; 48:335-338
- 30 Kawasaki H, Shibata S, Suzuki H, Sasaki M. Hepatic resection for synchronous liver metastases of gastric cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2001;28:1740-1742
- 31 Yano S, Koufuji K, Aoyagi K, Murakami N, Terasaki Y, Miyagi M, Takeda J, Shirouzu K. A patient with advanced gastric cancer, underwent curative gastrectomy and partial resection of metachronous hepatic metastases, is surviving for 13 years to date. *Kurume Med J* 2002;49:53-56



# 致敏树突细胞及其亚细胞成分对荷胃癌小鼠的免疫治疗作用研究

罗治彬, 徐采朴, 王 东, 王 阁, 肖世全, 朱高友, 房殿春

徐采朴, 房殿春, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化内科中心 重庆市 400038  
罗治彬, 王东, 王阁, 肖世全, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院肿瘤中心 重庆市 400042  
朱高友, 重庆市垫江高安中心医院 重庆市 408306  
罗治彬, 男, 1968-06-13 生, 重庆市垫江县人, 汉族. 2000 年第三军医大学博士研究生毕业, 讲师. 主要从事胃肠黏膜免疫和肿瘤免疫防治方面的研究, 已发表论文 26 篇.  
项目负责人: 罗治彬, 400042, 重庆市渝中区大坪长江支路 10 号, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院肿瘤中心. luzhibin@online.cq.cn  
电话: 023-68757346  
收稿日期: 2003-04-15 接受日期: 2003-06-02

## Immunotherapy of dendritic cells and its exosomes transfected with mRNA of gastric cancer cells in tumor-carried mice

Zhi-Bin Luo, Cai-Pu Xu, Dong Wang, Ge Wang, Shi-Quan Xiao, Gao-You Zhu, Dian-Chun Fang

Cai-Pu Xu, Dian-Chun Fang, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Chongqing 400038, China  
Zhi-Bin Luo, Dong Wang, Ge Wang, Shi-Quan Xiao, Department of Oncology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China  
Gao-You Zhu, Department of Gastroenterology, Gaoan Center Hospital, Dianjiang County, Chongqing 408306, China  
Correspondence to: Dr. Zhi-Bin Luo, Department of Oncology, The 3th Affiliated Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China. luzhibin@online.cq.cn  
Received: 2003-04-15 Accepted: 2003-06-02

## Abstract

**AIM:** To unravel the functional status of dendritic cells (DCs) in the tissue of gastric cancer (GC) and precancerous lesions, and to explore the possibility of treating and preventing gastric carcinoma with activated DCs and their exosomes.

**METHODS:** The tumor-bearing mice were treated with DCs sensitized by mRNA of gastric cancer cells and their exosomes, and efficacy of the immunotherapy was observed.

**RESULTS:** The indices such as the production rate of ascites of mice (75%), the metastasis rate of tumor (25%), the survival rate of animals (75%) and the average mass of tumor ( $2.04 \pm 0.33$  g) showed that the condition of the mice treated with DCs was better than that in the control group ( $P < 0.01$ ). The level of gene expression of IL-12, IFN $\gamma$  and IL-18 in local tumor tissue was significantly risen ( $P < 0.01$ ), the local CD $4^+$  and CD $8^+$  cells were increased ( $P < 0.05$ ) and the cytotoxicity of TIL was remarkably enhanced. After immunotherapy of the tumor-bearing mice by using exosomes from DCs transfected with mRNA isolated

from murine tumor cells, the indices were as good as those of sensitized DCs. However, DCs transfected with mRNA isolated from mouse tumor cells could effectively inhibit the growth of tumor and ameliorate the symptoms, showing a certain therapeutic efficiency for mice carrying tumor.

**CONCLUSION:** DCs-derived exosomes sensitized by RNA of gastric carcinoma cells can not only intensify the local immunologic function of GC but also make a better survival quality of the tumor-bearing host. Being a new type of therapeutic vaccine, exosomes is an important investigative value and a prospect of development.

Luo ZB, Xu CP, Wang D, Wang G, Xiao SQ, Zhu GY, Fang DC. Immunotherapy of dendritic cells and its exosomes transfected with mRNA of gastric cancer cells in tumor-carried mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):9-12

## 摘要

**目的:** 了解胃癌组织中 DC 的功能状态, 探讨 DC 及其所分泌的亚细胞成分 exosomes 用于防治胃癌的可能性, 旨在为胃癌的治疗探索一条新的途径.

**方法:** 利用致敏 DC 及其所分泌的亚细胞成分 exosomes 对荷胃癌小鼠进行治疗, 观察其免疫治疗效果.

**结果:** 荷胃癌小鼠经胃癌细胞 RNA 致敏的 DC 及其所分泌的亚细胞成分 exosomes 治疗后, 小鼠腹水产生率、肿瘤转移率、动物的存活率、瘤体平均质量等指标均明显优于对照组 ( $P < 0.01$ ), 局部组织中 IL-12、IFN $\gamma$  和 IL-18 的基因表达水平都明显升高 ( $P < 0.01$ ), 肿瘤局部 CD $4^+$ 、CD $8^+$  细胞数量增加 ( $P < 0.05$ ), TIL 细胞毒活性明显增强.

**结论:** 胃癌 RNA 致敏的 DC 及其所分泌的亚细胞成分 exosomes, 能促进胃癌抗原的提呈, 并启动和增强局部的抗癌免疫功能, 改善临床症状和宿主的生存质量, 对荷胃癌小鼠具有一定的免疫治疗效果.

罗治彬, 徐采朴, 王东, 王阁, 肖世全, 朱高友, 房殿春. 致敏树突细胞及其亚细胞成分对荷胃癌小鼠的免疫治疗作用研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):9-12

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/9.asp>

## 0 引言

树突状细胞(dendritic cells, DC)是体内最有效的抗原提呈细胞(antigen-presenting cells, APC), 是 T 细胞依赖性免疫应答的重要辅助细胞. 癌前状态胃黏膜中 DC 数

量显著增多,功能增强;而胃癌患者胃黏膜中肿瘤浸润DC(tumor infiltrating dendritic cells, TIDC)数量随分化程度的降低而减少, TIDC 提呈胃癌抗原引起宿主免疫抵抗的能力较弱,胃黏膜中DC细胞功能的抑制是导致胃黏膜免疫功能低下和癌前状态发生癌变的重要原因之一<sup>[1-5]</sup>. DC除了细胞间直接接触和通过分泌细胞因子参与机体免疫调节的作用方式之外,还可通过分泌或外排具有Ag提呈能力的亚细胞成分exosomes来诱导T细胞免疫反应<sup>[6]</sup>. Exosomes能表达MHC分子和CD<sub>86</sub>,能在体外刺激Ag特异性CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞增生;肿瘤来源的exosomes带有相关的肿瘤抗原信息,能够像DC一样向T细胞提呈肿瘤抗原<sup>[7]</sup>. 我们利用致敏DC及其所分泌的亚细胞成分exosomes对荷瘤小鼠的肿瘤进行治疗.

## 1 材料和方法

1.1 材料 -80℃低温冰箱 Nuair 公司;低温高速离心机 Biofuge 22R, Heraeus;低温超速离心机 Chimac CR-21E; <sup>60</sup>Co 射线放射源,本院放射科;PCR循环仪,2400型,Perkin-Eler;凝胶成像仪, Gel Doc 2000, Bio-Rad;图像分析仪, Tiger920型;MFC(mouse forestomach carcinoma):小鼠的前胃癌细胞系,从中国科学院上海细胞所引进;IFN $\gamma$ 、L-18 primer:上海生工生物工程公司合成;Cytotoxicity Detection Kit(LDH)及 Lipotectimin DOTAP:Boehringer Mannheim; Purified rat anti-mouse CD<sub>8</sub> $\alpha$ (Ly-2) mAb: cat#01041D, Phamingen; Access RT-PCR System: cat# A1250, Promega; Exosome 提取缓冲液(pH7.4). 615小鼠, SPF级, 6-8周龄,购自第三军医大学实验动物中心(川实动管使第015号,川实动管质第058号).

## 1.2 方法

1.2.1 MFC RNA 冲击 DC 对小鼠的免疫治疗作用 MFC RNA冲击DC对小鼠的免疫治疗作用研究分3组: RNA-DC1, PBS1, 灭活MFC, 各8只615小鼠;Exosomes对胃癌的治疗作用研究分3组: RNA-DC2, DC, PBS2, 各8只615小鼠. RNA提取选用生长期MFC细胞,加入 Tripure™ 分离试剂按其说明书进行分离操作,用紫外分光光度计定量后备用.从小鼠骨髓的CD<sub>34</sub><sup>+</sup>细胞中扩增、分离出大量纯化DC,在15 mL的聚丙烯试管中洗涤DC 2次、重悬,细胞浓度调为 $5.0 \times 10^9$ /L,移入另一支15 mL聚苯乙烯试管中;将25  $\mu$ g MFC RNA (250  $\mu$ L)与50  $\mu$ g DOTAP (250  $\mu$ L,培养基配制)混匀,20℃孵育10 min;将上述混合物加入 $5.0 \times 10^9$ /L DC中37℃培养40 min(间断晃动).洗涤后重悬于无菌磷酸盐缓冲液(PBS)中( $2.0 \times 10^8$ /L),30 Gy灭活备用.各组615小鼠腋窝皮下注射 $2 \times 10^8$ /L MFC 500  $\mu$ L/鼠;第7 d分别给各组615小鼠腹腔注射已制好的30 Gy灭活MFC RNA致敏DC(RNA-DC<sub>1</sub>组)、PBS(PBS<sub>1</sub>组)、30Gy灭活的 $2 \times 10^8$ /L MFC(灭活MFC组)各500  $\mu$ L/鼠;3 d后复种1次,以后每天观察小鼠肿瘤的生长情况及其存活率;

第21 d处死小鼠,取肿瘤组织分离TIL(tumor infiltrating lymphocyte)以检测其细胞毒活性;取肿瘤组织分别进行CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞的免疫组化染色、用RT-PCR和原位杂交染色检测细胞因子IL-12、IL-18、IFN $\gamma$ .

1.2.2 Exosomes对胃癌的治疗作用 参照文献[4, 8-10]改良提取exosomes. DC、MFC RNA致敏DC细胞500 g离心10 min, 2次;细胞上清37℃培养24 h;20 000 g离心20 min;上清150 000 g离心90 min;沉淀(即exosomes)重悬于缓冲液中;紫外分光光度计定量.各组615小鼠腋窝皮下注射 $1 \times 10^8$ /L MFC 500  $\mu$ L/鼠;第7 d分别给各组615小鼠皮下注射来自MFC RNA冲击DC(RNA-DC<sub>2</sub>组)和DC(DC组)的exosomes各10  $\mu$ g,对照组为PBS(PBS<sub>2</sub>组),隔4 d重复1次;每天观察小鼠肿瘤的生长、情况及其存活率;第21 d处死小鼠,取肿瘤组织分离TIL以检测其细胞毒活性;取肿瘤组织分别进行CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞的免疫组化染色、用RT-PCR和原位杂交染色检测细胞因子IL-12、IL-18、IFN $\gamma$ .

1.2.3 细胞毒活性检测 无菌条件下将新鲜肿瘤组织剪碎、匀浆、过滤、离心,不连续密度梯度离心,收集界面细胞用RPMI 1640培养液调浓度为 $1 \times 10^6$ /L,加入rIL-2 100  $\mu$ g/L在5% CO<sub>2</sub> 37℃培养,每天观察1次,每3 d换液1次(当密度大于 $2 \times 10^6$ /L时补充rIL-2并调整细胞浓度);用前500 g离心3 min,生理盐水洗涤1次,计数后备用.效-靶细胞混合物(effector-target cell mix, E-T)及效应细胞(effector cell, EC)各12孔,另设背景对照、自发(Low)对照、最大释放(High)对照,分别设3个复孔;按说明书进行操作,ELISA机测读A490 nm值.细胞介导的细胞毒活性计算公式如下:细胞毒活性(%)=[(效-靶细胞混合物-背景对照)-自发对照]÷(最大释放对照-自发对照)×100%.

1.2.4 RT-PCR, SP和原位杂交 根据GenBank中检索的小鼠IL-18、IFN $\gamma$ 的完整cDNA序列,利用PRIMER软件设计PCR成对引物. IL-18:上游引物5'-ACTGTACAACCGCAGTAA TA C-3',下游引物5'-AGTGAA CATTAC AG ATTTATCCC-3'(扩增产物片段长度434 bp、退火温度56℃); IFN $\gamma$ :上游引物5'-AAC GCTACACAC TGCATCTTGG-3',下游引物5'-GACTTCAA AGAGTCTGAGG-3'(扩增产物片段长度237 bp、退火温度56℃).在PCR管中加入:5×buffer 5.0  $\mu$ L、dNTP 2.0  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O (DEPC) 11  $\mu$ L、specific Primer 1.5  $\mu$ L、GAPDH Primer 1.5  $\mu$ L、MgCl<sub>2</sub> 1.0  $\mu$ L、Total RNA 2.0  $\mu$ L、AMV 0.5  $\mu$ L、Tf1 DNA 0.5  $\mu$ L (Total 25  $\mu$ L), 48℃ 45 min; 94℃ 2 min; 94℃ 40 s,退火40 s, 68℃ 120 s, 35个循环, 68℃ 10 min; 20 g/L琼脂糖电泳后凝胶照像记录.免疫组化染色(SP法)和原位杂交检测IL-12 P40 mRNA按文献[1]介绍方法进行.

统计学处理 采用第三军医大学数学教研室编制的数理统计程序包SPRm作单因素方差分析、二维列联表统计,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, P < 0.05为相差显著.

## 2 结果

2.1 小鼠肿瘤的生长情况及其存活率 RNA-DC<sub>1</sub>组、RNA-DC<sub>2</sub>组小鼠经治疗后肿瘤生长相对减慢, 未见大范围的转移, 腹水量少, 动物精神状况稍有好转. 而PBS<sub>1</sub>组、PBS<sub>2</sub>组小鼠肿瘤生长仍然快, 精神食欲差, 嗜睡, 明显衰竭; 全身皮下可见大小不等的多个转移灶和新旧不一的出血斑, 腹水明显、呈蛙腹状, 小鼠死亡率高. 灭活MFC组和DC组情况介于二者之间(表1).

表1 小鼠肿瘤的生长情况及其存活率 ( $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm s$ , %).

分组	瘤质量(g)	转移率	腹水率	生存率
RNA-DC <sub>1</sub>	2.04±0.33 <sup>a</sup>	25% <sup>b</sup>	75%	75% <sup>b</sup>
RNA-DC <sub>2</sub>	1.37±0.19 <sup>a</sup>	0	50% <sup>a</sup>	100% <sup>b</sup>
MFC	4.96±0.58	100%	100%	50% <sup>b</sup>
DC	5.24±0.72	100%	100%	38%
PBS <sub>1</sub>	4.71±0.77	100%	100%	38%
PBS <sub>2</sub>	5.18±0.83	100%	100%	38%

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs PBS.

2.2 肿瘤TIL细胞毒活性检测 RNA-DC<sub>1</sub>、RNA-DC<sub>2</sub>组的细胞毒活性明显高于相同效靶比的相应PBS组 ( $P < 0.05$ , 或  $P < 0.01$ , 图1). CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞散在分布, 阳性产物主要呈现在细胞膜上. RNA-DC<sub>1</sub>组CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞数量分别为  $0.71 \pm 0.25/\mu\text{m}^2$  和  $0.67 \pm 0.22/\mu\text{m}^2$ , RNA-DC<sub>2</sub>组CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞数量分别为  $1.15 \pm 0.33/\mu\text{m}^2$  和  $0.98 \pm 0.16/\mu\text{m}^2$ , 均明显高于相应的PBS组 ( $P < 0.05$ ); MFC组、DC组CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞数与PBS组无显著差异 ( $P > 0.05$ ).

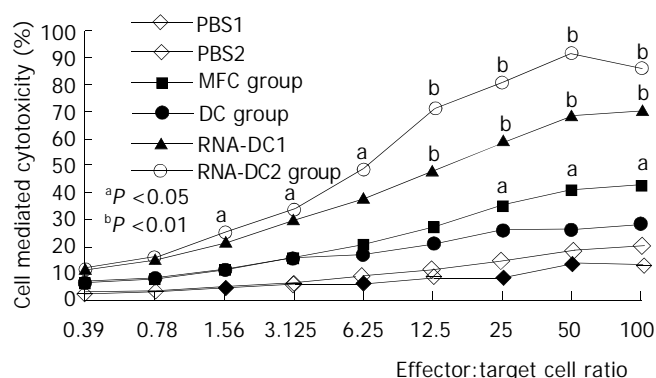


图1 各组肿瘤TIL的细胞毒活性(%)与细胞效靶比的关系.

2.3 原位杂交染色及RT-PCR检测 RNA-DC<sub>1</sub>组、RNA-DC<sub>2</sub>组IL-12 p40 mRNA阳性产物的面积比率显著高于相应PBS组 ( $P < 0.01$ ); 而其阳性产物的平均吸光度与PBS组均无差异 ( $P > 0.05$ ). 用四星图形分析软件半定量, 以各自GADPH条带设定本底值, 测定目的片段的PCR产物的积分吸光度. 结果显示: RNA-DC<sub>1</sub>组、RNA-DC<sub>2</sub>组IL-18 mRNA、IFN $\gamma$  mRNA阳性产物的平

均吸光度显著高于PBS组 ( $P < 0.05$ ); 而DC组、MFC组与PBS组相比则无差异 ( $P > 0.05$ ).

## 3 讨论

DC网络是体内能提呈抗原给未致敏或静息T细胞的特异系统, 除了DC细胞间直接接触和通过分泌细胞因子参与机体免疫调节的作用方式<sup>[11-17]</sup>之外, 还可通过分泌或外排具有Ag提呈能力的exosomes<sup>[7-9]</sup>来诱导T细胞免疫反应. 病毒、细菌和肿瘤抗原致敏DC诱导特异CTL, 可作为新型疫苗研制的基石. Bockowski et al<sup>[18]</sup>发现RNA抗原比肿瘤洗脱肽抗原能更高效地致敏DC, 用含OVA抗原的肿瘤细胞来源的RNA致敏的DC能更有效地激活OVA特异性CTL的产生, 并且完全能够保护宿主不再受表达OVA的肿瘤细胞的攻击. 研究表明: 若同时用CD<sub>4</sub><sup>+</sup> mAb和CD<sub>8</sub><sup>+</sup> mAb去除CD<sub>4</sub><sup>+</sup>和CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞, 可完全抑制DC接种后所诱导的免疫作用; 因此, DC接种后诱导免疫应答的发生同时需要CD<sub>4</sub><sup>+</sup>和CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞的存在. 我们发现: RNA-DC接种后, 肿瘤局部CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞的数量均有一定程度的增加, 局部肿瘤组织中TIL细胞的细胞毒活性也明显增强, 说明DC诱导的免疫应答与CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞密切相关. 我们还发现: 给RNA-DC<sub>2</sub>组荷瘤小鼠注射exosomes后, 肿瘤局部CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞的数量明显增加, TIL细胞的细胞毒活性也有了明显提高, 并且其细胞毒活性随着效靶细胞比值的增加而增加; 同时, 细胞因子IL-12、IL-18和IFN $\gamma$ 的基因表达较对照组明显增多. 这都表明, RNA致敏DC分泌的exosomes能和RNA致敏DC一样, 能通过有效提呈胃癌抗原, 诱导局部组织Th<sub>1</sub>型细胞因子表达增加, 进一步促进了CTL的成熟和抗体的合成和分泌, 加上局部TIL和NK细胞的细胞毒作用, 这都成了其杀灭肿瘤细胞、控制肿瘤生长和转移的分子免疫基础. 我们的结果与文献[11, 19-22]报道是一致的.

但是, 我们尚未发现一例小鼠的肿瘤有明显缩小或完全消退, 只是发现exosomes治疗后肿瘤生长明显减慢、治疗组小鼠的精神食欲等状况相对较好、没有明显的转移灶和大量腹水生成, 这与文献[23]报告的注射exosomes一次(5  $\mu\text{g}$ )即可治愈的结果尚有不小的差距. 我们认为, 这可能与致敏DC时所用RNA的含量、转导效率、以及exosomes的纯度等多种因素的影响有关; 也可能与他们治疗用的瘤体直径太小有关(0.1 cm). 从这个角度看, exosomes治疗实体瘤尤其是中晚期肿瘤仍然有一段很长的路要走, 他对治疗较早期的肿瘤效果较好, 可以很好地控制肿瘤的生长, 甚至可以完全治愈. 致敏exosomes的确起到了比DC更好的作用, 有更强的抗癌效果. 这种有抗原提呈功能的亚细胞成分, 一旦获得即可长时间保存、省却了长期培养肿瘤抗原致敏DC的困难, 而且实际使用中的可操作性 and 可控性更强. 因此我们有理由认为, 肿瘤抗原致敏DC分泌的亚细胞成分exosomes作

为一种新型的抗肿瘤药物,对肿瘤的预防和治疗都有很好的研究价值,具有广阔的开发前景。

#### 4 参考文献

- 1 罗治彬, 鲁荣, 罗元辉, 徐采朴. 树突状细胞对胃黏膜免疫的调节作用研究. 第三军医大学学报 2000;22:769-772
- 2 Luo ZB, Xu CP, Luo YH, Zhang PB. 11th Asian pacific congress of gastroenterology and 8th asian pacific congress of digestive endoscopy. Hong Kong, China, March 10-14, 2000. Abstracts. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):B1-132
- 3 罗治彬, 罗元辉, 鲁荣, 晋华源, 张朋彬, 徐采朴, 罗成基. 胃癌和癌前病变中树突状细胞的免疫组化研究. 世界华人消化杂志 2000;8:400-402
- 4 Takahashi A, Kono K, Itakura J, Amemiya H, Feng Tang R, Iizuka H, Fujii H, Matsumoto Y. Correlation of vascular endothelial growth factor-C expression with tumor-infiltrating dendritic cells in gastric cancer. *Oncology* 2002;62:121-127
- 5 Galetto A, Contarini M, Sapino A, Cassoni P, Consalvo E, Forno S, Pezzi C, Barnaba V, Mussa A, Matera L. Ex vivo host response to gastrointestinal cancer cells presented by autologous dendritic cells. *J Surg Res* 2001;100:32-38
- 6 Ludewig B, Ochsenbein AF, Odermatt B. Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease. *J Exp Med* 2000;191:795-803
- 7 Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Thery C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T, Angevin E, Amigorena S, Zitvogel L. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 2001;7:297-303
- 8 Barbulescu K, Becker C, Schlak JF. Cutting edge: IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human  $\text{INF}\gamma$  promoter in primary  $\text{CD4}^+$  T lymphocytes. *J Immunol* 1998;160:3642-3653
- 9 Osaki T, Hashimoto W, Gambotto A. Potent antitumor effects mediated by local expression of the mature form of the interferon-gamma inducing factor, interleukin-18(IL-18). *Gene Ther* 1999;6:808-812
- 10 Lamparski HG, Metha-Damani A, Yao JY, Patel S, Hsu DH, Ruegg C, Le Pecq JB. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J Immunol Methods* 2002;270:211-226
- 11 Buttiglieri S, Galetto A, Forno S, De Andrea M, Matera L. Influence of drug-induced apoptotic death on processing and presentation of tumor antigens by dendritic cells. *Int J Cancer* 2003;106:516-520
- 12 Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, Kuroda N, Naruse K, Kiyoku H, Toi M, Hiroi M. CD34 positive stromal cells in gastric adenocarcinomas. *J Clin Pathol* 2001;54:846-848
- 13 郭建巍, 秦力维, 蔡美英, 吕同德. 树突状细胞体内外对肝癌细胞的抑制作用. 世界华人消化杂志 2003;11:408-410
- 14 郭建巍, 秦力维, 蔡美英. 肝癌 DC 疫苗活化的 CTL 对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用. 世界华人消化杂志 2003;11:419-421
- 15 姜琳, 朱金水. 胃癌的免疫治疗研究新进展. 世界华人消化杂志 2002;10:1190-1193
- 16 杜建军, 窦科峰, 曹云新, 王中华, 王为忠, 高志清. 胃癌下调新基因为 CA11 的功能研究. 世界华人消化杂志 2002;10:525-529
- 17 刘剑勇, 张力图, 李挺, 赵荫农, 张春燕, 陈建思, 张丽生, 覃宇周, 吴飞翔, 唐凯, 唐朝晖. 树突状细胞诱导肿瘤浸润性淋巴细胞抗胃癌免疫的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:467-469
- 18 Boczkowski D, Nair SK, Nam JH. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer Res* 2000;60:1028-1042
- 19 Chaput N, Scharz NE, Andre F, Zitvogel L. Exosomes for immunotherapy of cancer. *Adv Exp Med Biol* 2003;532:215-221
- 20 Brouwer R, Pruijn GJ, van Venrooij WJ. The human exosome: an autoantigenic complex of exoribonucleases in myositis and scleroderma. *Arthritis Res* 2001;3:102-106
- 21 Kim CH, Todoroki T, Matsumura M, Ohno T. Eligibility of antigenic-peptide-pre-loaded and fixed adhesive peripheral blood cells for induction of cytotoxic T lymphocytes from cancer patients with elevated serum levels of carcinoembryonic antigen. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126:383-390
- 22 Ishigami S, Natsugoe S, Hokita S, Xiangming C, Aridome K, Iwashige H, Tokuda K, Nakajo A, Miyazono F, Aikou T. Intracodal antitumor immunocyte infiltration in node-negative gastric cancers. *Clin Cancer Res* 2000;6:2611-2617
- 23 Thery C, Regnault A, Garin J. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol* 1999;147:599-611

# mRNA致敏树突细胞对胃癌的免疫治疗作用研究

罗治彬, 徐采朴, 朱高友, 张朋斌, 郭朝华, 罗元辉, 房殿春, 罗成基

徐采朴, 罗元辉, 房殿春, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化内科中心 重庆市 400038  
罗治彬, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院肿瘤中心 重庆市 400042  
朱高友, 重庆市垫江高安中心医院 重庆市 408306  
张朋斌, 中国人民解放军第三军医大学新桥医院消化内科 重庆市 400037  
郭朝华, 罗成基, 中国人民解放军第三军医大学全军复合伤研究所 重庆市 400038  
罗治彬, 男, 1968-06-13 生, 重庆市垫江县人, 汉族. 2000 年第三军医大学博士研究生毕业, 讲师. 主要从事胃肠黏膜免疫和肿瘤免疫防治方面的研究, 已发表论文 26 篇.  
项目负责人: 罗治彬, 400042, 重庆市渝中区大坪长江支路 10 号, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院肿瘤中心. luozhibin@online.cq.cn  
电话: 023-68757346  
收稿日期: 2003-04-15 接受日期: 2003-06-02

## Immunotherapy of dendritic cells transfected with mRNA of gastric cancer cells in carried-tumor mice

Zhi-Bin Luo, Cai-Pu Xu, Gao-You Zhu, Peng-Bin Zhang, Chao-Hua Guo, Yuan-Hui Luo, Dian-Chun Fang, Cheng-Ji Luo

Cai-Pu Xu, Yuan-Hui Luo, Dian-Chun Fang, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Chongqing 400038, China  
Zhi-Bin Luo, Department of Oncology, The 3th Affiliated Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China  
Gao-You Zhu, Department of Gastroenterology, Gaoan Center Hospital, Dianjiang County, Chongqing 408306, China  
Peng-Bin Zhang, Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, China  
Chao-Hua Guo, Cheng-Ji Luo, Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Correspondence to: Dr. Zhi-Bin Luo, Department of Oncology, The 3th Affiliated Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China. luozhibin@online.cq.cn  
Received: 2003-04-15 Accepted: 2003-06-02

## Abstract

**AIM:** To probe into the possibility of dendritic cells (DC) in preventing solid carcinomas such as gastric cancer (GC).

**METHODS:** Immunotherapy was performed by DC sensitized by mRNA of gastric cancer cells.

**RESULTS:** The indices such as the production rate of ascites of mice (75%), the metastasis rate of tumor (25%), the survival rate of animals (75%) and the average weight of tumor ( $2.04 \pm 0.33$  g) showed that the condition of the mice treated by DC was better than that in the control group ( $P < 0.01$ ). And the level of gene expression of IL-12, IFN $\gamma$  and IL-18 in local tumor tissue was significantly raised ( $P < 0.01$ ) and the amount of local CD $_4^+$  ( $0.71 \pm 0.25/\mu\text{m}^2$ ) and CD $_8^+$  ( $0.67 \pm 0.22/\mu\text{m}^2$ ) cells was increased ( $P < 0.05$ ) and the cytotoxicity of TIL was remarkably enhanced.

**CONCLUSION:** DC transfected with mRNA isolated from mouse tumor cells may effectively control the growth of tumor and ameliorate the symptoms, suggesting that a certain therapeutic efficiency for mice carrying tumor can be realized.

Luo ZB, Xu CP, Zhu GY, Zhang PB, Guo CH, Luo YH, Fang DC, Luo CJ. Immunotherapy of dendritic cells transfected with mRNA of gastric cancer cells in carried-tumor mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):13-15

## 摘要

**目的:** 了解 DC 在胃癌胃黏膜中的功能状态, 探讨 DC 用于胃癌等实体瘤防治的可能性, 旨在为胃癌的治疗探索一条新的途径.

**方法:** 利用致敏 DC 治疗胃癌, 以观察其对荷胃癌小鼠的免疫治疗效果.

**结果:** 荷胃癌小鼠经胃癌细胞 RNA 致敏的 DC 治疗后, 小鼠腹水产生率、肿瘤转移率、动物的存活率、平均瘤体质量等指标分别为 75% (6/8)、25% (2/8)、75% (6/8)、( $2.04 \pm 0.33$  g), 均优于对照组 ( $P < 0.01$ ); 局部组织中 IL-12、IL-18 和 IFN $\gamma$  的基因表达水平都明显升高 ( $P < 0.01$ ); 肿瘤局部 CD $_4^+$ 、CD $_8^+$  细胞数量分别为  $0.71 \pm 0.25/\mu\text{m}^2$  和  $0.67 \pm 0.22/\mu\text{m}^2$ ,  $P < 0.05$ ), TIL 细胞毒活性明显增强.

**结论:** 胃癌 RNA 致敏的 DC, 能促进胃癌抗原的提呈并启动和增强局部的抗癌免疫功能, 改善临床症状和生存质量, 对荷胃癌小鼠具有一定的免疫治疗效果.

罗治彬, 徐采朴, 朱高友, 张朋斌, 郭朝华, 罗元辉, 房殿春, 罗成基. mRNA 致敏树突细胞对胃癌的免疫治疗作用研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):13-15  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/13.asp>

## 0 引言

树突状细胞(dendritic cell, DC)是体内最有效的抗原提呈细胞(antigen-presenting cell), 是 T 细胞依赖性免疫应答的重要辅助细胞<sup>[1-3]</sup>. 癌前状态胃黏膜中 DC 数量显著增多, 功能增强; 而胃癌患者胃黏膜中肿瘤浸润性树突状细胞(tumor infiltrating dendritic cell, TIDC)数量随分化程度的降低而减少, TIDC 提呈胃癌抗原引起宿主免疫抵抗的能力较弱, 胃黏膜中 DC 细胞功能的抑制是导致胃黏膜免疫功能低下和癌前状态发生癌变的重要原因之一<sup>[4-8]</sup>. 因此, 我们利用致敏 DC 对荷胃癌小鼠的免疫治疗效果如下.

## 1 材料和方法

**1.1 材料**  $^{60}\text{Co}$  射线放射源, 本院放射科提供; 台式低温冷冻离心机, MR1812, Jouar 公司生产, USA; PCR 循环仪, 2400 型, Perkin-Elmer 生产; 凝胶成像仪, Gel

Doc 2000 型, Bio-Rad 生产, USA; 图像分析仪, Tiger920 型, Germany 生产. 小鼠的前胃癌细胞 MFC (mouse forestomach carcinoma) 细胞系: 从中国科学院上海细胞所引进; IFN $\gamma$ 、IL-18 primer: 上海生工生物工程公司合成; Cytotoxicity Detection Kit (LDH) 和 Lipotectimin: 脂质体(DOTAP), 宝灵曼公司生产, Germany; Purified Rat anti-mouse CD $\alpha$  (Ly-2) mAb: cat#01041D, Phamingen 公司生产; Access RT-PCR System: cat# A1250, Promega 公司生产. 615 小鼠, SPF 级, 购自第三军医大学实验动物中心(川实动管使第 015 号, 川实动管质第 058 号), 6-8 周龄, 雌雄各半, 体重为  $23.2 \pm 1.5$  g, 随机分为 3 组: RNA-DC、PBS、灭活 MFC, 每组 8 只, 各组间质量无统计学差异.

1.2 方法 采用粒细胞巨噬细胞集落刺激因子从小鼠骨髓的 CD $34^+$  细胞中扩增、分离出大量纯化 DC. 选用生长期小鼠的前胃癌细胞系 MFC 细胞, 加入 Tripure<sup>TM</sup> 分离试剂按其说明书进行 RNA 提取分离操作, 取样品适当稀释, 用紫外分光光度计定量后备用. 从小鼠骨髓的 CD $34^+$  细胞中扩增、分离出大量纯化 DC, 在 15 mL 的聚丙烯试管中洗涤 DC 2 次、重悬, 细胞密度调为  $5.0 \times 10^9$ /mL, 移入另一支 15 mL 聚苯乙烯试管中; 将 25  $\mu$ g MFC RNA (250  $\mu$ L) 与 50  $\mu$ g 脂质体 (250  $\mu$ L, 培养基配制) 混匀, 20  $^{\circ}$ C 孵育 10 min; 将上述混合物加入  $5.0 \times 10^9$ /mL DC 中 37  $^{\circ}$ C 培养 40 min (间断晃动). 洗涤后重悬于无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中( $2.0 \times 10^8$ /mL), 3 000 cGy 灭活备用.

1.2.1 MFC RNA 冲击 DC 对小鼠的免疫治疗作用 各组 615 小鼠腋窝皮下注射  $2 \times 10^8$ /mL MFC 500  $\mu$ L/ 鼠; 第 7 d 分别给各组 615 小鼠腹腔注射已制好的 3 000 cGy 灭活 MFC RNA 致敏 DC (RNA-DC 组)、PBS(PBS 组)、3 000 cGy 灭活的  $2 \times 10^8$ /mL MFC (灭活 MFC 组)各 500  $\mu$ L/ 鼠; 第 3 d 后复种 1 次, 以后每天观察小鼠肿瘤的生长情况及其存活率; 第 21 d 处死小鼠, 取肿瘤组织分离肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)以检测其细胞毒活性; 取肿瘤组织分别进行 CD $4^+$ , CD $8^+$  细胞的免疫组化染色、用 RT-PCR(reverse transcriptase polymerase chain reaction)和原位杂交染色检测细胞因子 IL-12, IL-18, IFN $\gamma$ .

1.2.2 细胞毒活性检测 无菌条件下将新鲜肿瘤组织剪碎、匀浆、过滤、离心, 不连续密度梯度离心, 收集界面细胞用 RPMI1640 培养液调浓度为  $1 \times 10^9$ /mL, 加入 rIL-2 100 KU/mL 在 50 mL/L CO $_2$  37  $^{\circ}$ C 培养, 每天观察 1 次, 每 3 d 换液 1 次(当细胞密度大于  $2 \times 10^9$ /mL 时补充 rIL-2 并调整细胞浓度); 用前 500 g 离心 3 min, 生理盐水洗涤 1 次, TIL 计数后备用. 按说明书进行细胞毒活性检测操作, 设孔: 效-靶细胞混合物(effector-target cell mix, E-T)及效应细胞(effector cell, EC)各 12 孔, 另设背景对照、自发(Low)对照、最大释放(High)对

照, 分别设 3 个复孔; ELISA 机测读 A 490 nm 值. 细胞介导的细胞毒活性(%) = [(效-靶细胞混合物-背景对照)-自发对照]  $\div$  (最大释放对照-自发对照)  $\times$  100%. 1.2.3 RT-PCR、SP 法免疫组化染色和原位杂交 根据基因库 GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Entrez/nucleotide.html>) 中小鼠 IL-18, IFN $\gamma$  的完整 cDNA 序列, 利用 PRIMER 软件设计 PCR 成对引物. IL-18: 上游引物 5' -ACTGTA CAACCGCAGTAATAC-3', 下游引物 5' -AGTGAA CATTACAGA TTTATCCC-3' (扩增产物片段长度 434 bp、退火温度 56  $^{\circ}$ C); IFN $\gamma$ : 上游引物 5' -AACGCTACACAC TGCATCTTGG-3', 下游引物 5' -GACTTCAAAGA GTCTGAGG -3' (扩增产物片段长度 237 bp、退火温度 56  $^{\circ}$ C). 在 PCR 管中加入: 5  $\times$  buffer 5.0  $\mu$ L、dNTP 2.0  $\mu$ L、ddH $_2$ O(DEPC) 11  $\mu$ L、specific Primer 1.5  $\mu$ L、GAPDH Primer 1.5  $\mu$ L、MgCl $_2$  1.0  $\mu$ L、Total RNA 2.0  $\mu$ L、AMV 0.5  $\mu$ L、Tf1 DNA 0.5  $\mu$ L (Total 25  $\mu$ L), 48  $^{\circ}$ C 45 min; 94  $^{\circ}$ C 2 min; 94  $^{\circ}$ C 40 s, 退火 40 s, 68  $^{\circ}$ C 120 s, 35 个循环, 68  $^{\circ}$ C 10 min; 20 g/L 琼脂糖电泳后凝胶照像记录. 免疫组化和原位杂交染色按文献[7, 9]介绍方法进行.

统计学处理 采用第三军医大学数学教研室编制的数理统计程序包作单因素方差分析、二维列联表统计, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为相差显著.

## 2 结果

RNA-DC 组小鼠经治疗后肿瘤生长相对减慢, 未见大范围的转移, 腹水量少, 动物精神状况稍有好转. 而 PBS 组小鼠虽经治疗, 但肿瘤生长仍然很快, 精神食欲很差, 嗜睡, 不活动, 动物明显衰竭; 全身皮下可见大小不等的多个转移灶和新旧不一的出血斑, 腹水明显、呈蛙腹状. 灭活 MFC 组介于二者之间.(表 1).

表 1 小鼠肿瘤的生长情况及其存活率 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

项目	RNA-DC 组	PBS 组	灭活 MFC 组
瘤体质量(g)	$2.04 \pm 0.33^a$	$4.71 \pm 0.77$	$4.96 \pm 0.58$
转移率	25% (2/8) <sup>b</sup>	100% (8/8)	100% (8/8)
腹水率	75% (6/8)	100% (8/8)	100% (8/8)
生存率	75% (6/8) <sup>b</sup>	37.5% (3/8)	50% (4/8) <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs PBS group.

表 2 各组肿瘤 TIL 细胞毒活性的检测结果 ( $\bar{x} \pm s$ , %)

效-靶比	PBS 组	MFC 组	RNA-DC 组
0.39	$2.00 \pm 0.13$	$5.80 \pm 1.60$	$11.59 \pm 2.98$
0.78	$3.60 \pm 1.01$	$8.00 \pm 4.22$	$15.30 \pm 4.28^a$
1.56	$4.70 \pm 2.18$	$11.80 \pm 2.82$	$21.30 \pm 6.55^a$
3.125	$6.00 \pm 3.11$	$15.80 \pm 5.17$	$30.00 \pm 4.17^a$
6.25	$9.00 \pm 6.10$	$20.70 \pm 4.10$	$38.00 \pm 8.42^a$
12.5	$11.50 \pm 2.48$	$27.60 \pm 7.18$	$48.30 \pm 6.75^b$
25	$15.10 \pm 6.10$	$35.10 \pm 6.41^a$	$59.00 \pm 7.44^b$
50	$18.30 \pm 2.07$	$40.90 \pm 5.74^a$	$68.50 \pm 9.83^b$
100	$20.80 \pm 3.55$	$43.00 \pm 5.00^a$	$70.50 \pm 14.29^b$

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs PBS group.



2.1 肿瘤TIL细胞毒活性检测 RNA-DC组的细胞毒活性明显高于相同效靶比的PBS组(表2,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ).

2.2 免疫组化、原位杂交染色和RT-PCR PBS组CD<sub>4</sub><sup>+</sup>细胞数为  $0.18 \pm 0.01/\mu\text{m}^2$ 、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞数为  $0.21 \pm 0.06/\mu\text{m}^2$ , MFC组CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞数分别为  $0.37 \pm 0.18/\mu\text{m}^2$  和  $0.34 \pm 0.17/\mu\text{m}^2$ , 与PBS组无显著差异( $P > 0.05$ ). RNA-DC组CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞数量分别为  $0.71 \pm 0.25/\mu\text{m}^2$  和  $0.67 \pm 0.22/\mu\text{m}^2$ , 均明显高于PBS组( $P < 0.05$ );而各组平均吸光度则无显著差异( $P > 0.05$ ). RNA-DC组IL-12 p40 mRNA阳性产物的面积比率显著高于PBS组( $P < 0.01$ );而其阳性产物的平均吸光度与PBS组均无差异( $P > 0.05$ ). RNA-DC组IL-18 mRNA、IFN $\gamma$  mRNA阳性产物的平均吸光度显著高于PBS组( $P < 0.05$ );而灭活MFC组与PBS组相比则无差异( $P > 0.05$ ).

### 3 讨论

胃癌发病率高,其免疫治疗在国内外已经有不少研究<sup>[10-21]</sup>.我们发现,胃癌细胞RNA致敏的DC接种后,局部肿瘤组织中IL-12, IL-18和IFN $\gamma$ 等因子的基因表达水平都有明显的升高,TIL细胞在致敏DC的诱导下其细胞毒活性均有了明显增强(并且其细胞毒活性随着效靶细胞比值的增加而增加);小鼠的精神食欲状况、腹水的产生、肿瘤生长和转移的发生率、动物的存活率和瘤体的重量等指标均优于各自的对照组小鼠.表明RNA致敏DC接种后,由于促进了胃癌抗原的有效提呈,并在自身和周围组织分泌的细胞因子IL-12、IL-18和IFN $\gamma$ 作用下,CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞活化,使局部肿瘤组织中NK、TIL等效应细胞的细胞毒活性和抗体产生细胞功能增强.RNA-DC接种后,肿瘤局部CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞的数量有一定程度的增加,局部肿瘤组织中TIL细胞的细胞毒活性增强.说明DC诱导的免疫应答与CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞密切相关.Boczowski et al<sup>[22-23]</sup>研究也发现RNA抗原比肿瘤洗脱抗原能更高效地致敏DC,用含OVA抗原的肿瘤细胞来源的RNA致敏的DC能更有效地激活OVA特异性CTL的产生,并且完全能够保护宿主不再受表达OVA的肿瘤细胞的攻击.我们的结果与Boczowski et al<sup>[23]</sup>的结果是一致的.

用胃癌细胞RNA致敏的DC接种对小鼠的免疫保护和免疫治疗,这种方法从根本上讲至少可以部分地重建或强化胃癌局部的免疫功能,对改善荷瘤宿主的生存状况有一定的帮助.DC网络是体内能提呈抗原给未致敏或静息T细胞的特异系统,他在诱导T、B淋巴细胞免疫中起着关键性作用,在肿瘤的免疫调控中有着相当重要的地位.

### 4 参考文献

1 Lau AH, Thomson AW. Dendritic cells and immune regula-

- tion in the liver. *Gut* 2003;52:307-314
- 2 Waller EK, Ernstoff MS. Modulation of antitumor immune responses by hematopoietic cytokines. *Cancer* 2003;97:1797-1809
- 3 Buttiglieri S, Galetto A, Forno S, De Andrea M, Matera L. Influence of drug-induced apoptotic death on processing and presentation of tumor antigens by dendritic cells. *Int J Cancer* 2003;106:516-520
- 4 Galetto A, Contarini M, Sapino A, Cassoni P, Consalvo E, Forno S, Pezzi C, Barnaba V, Mussa A, Matera L. Ex vivo host response to gastrointestinal cancer cells presented by autologous dendritic cells. *J Surg Res* 2001;100:32-38
- 5 Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, Kuroda N, Naruse K, Kiyoku H, Toi M, Hiroi M. CD34 positive stromal cells in gastric adenocarcinomas. *J Clin Pathol* 2001;54:846-848
- 6 Takahashi A, Kono K, Itakura J, Amemiya H, Feng Tang R, Iizuka H, Fujii H, Matsumoto Y. Correlation of vascular endothelial growth factor-C expression with tumor-infiltrating dendritic cells in gastric cancer. *Oncology* 2002;62:121-127
- 7 罗治彬, 鲁荣, 罗元辉, 徐采朴. 树突状细胞对胃黏膜免疫的调节作用研究. 第三军医大学学报 2000;22:769-772
- 8 Luo ZB, Xu CP, Luo YH, Zhang PB. 11th Asian Pacific Congress of Gastroenterology and 8th Asian Pacific Congress of Digestive Endoscopy. Hong Kong, China, March 10-14, 2000. Abstracts. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):B1-132
- 9 罗治彬, 罗元辉, 鲁荣, 晋华源, 张朋彬, 徐采朴. 胃癌和癌前病变中树突状细胞的免疫组化研究. 世界华人消化杂志 2000;8:400-402
- 10 Belldgrun A, Bander NH, Lerner SP, Wood DP, Pantuck AJ. Society of urologic oncology biotechnology forum: new approaches and targets for advanced prostate cancer. *J Urol* 2001;166:1316-1321
- 11 Slovin SF. Vaccines as treatment strategies for relapsed prostate cancer: approaches for induction of immunity. *Hematol Oncol Clin North Am* 2001;15:477-496
- 12 Lotze MT, Shurin M, Esche C, Tahara H, Storkus W, Kirkwood JM, Whiteside TL, Elder EM, Okada H, Robbins P. Interleukin-2: developing additional cytokine gene therapies using fibroblasts or dendritic cells to enhance tumor immunity. *Cancer J Sci Am* 2000;6(Suppl 1):S61-S66
- 13 Morse MA, Lysterly HK. Clinical applications of dendritic cell vaccines. *Curr Opin Mol Ther* 2000;2:20-28
- 14 Gitlitz BJ, Belldgrun AS, Figlin RA. Vaccine and gene therapy of renal cell carcinoma. *Semin Urol Oncol* 2001;19:141-147
- 15 Meidenbauer N, Andreesen R, Mackensen A. Dendritic cells for specific cancer immunotherapy. *Biol Chem* 2001;382:507-520
- 16 Ishigami S, Natsugoe S, Hokita S, Xiangming C, Aridome K, Iwashige H, Tokuda K, Nakajo A, Miyazono F, Aikou T. Intranodal antitumor immunocyte infiltration in node-negative gastric cancers. *Clin Cancer Res* 2000;6:2611-2617
- 17 郭建巍, 秦力维, 蔡美英, 吕同德. 树突状细胞体内外对肝癌细胞的抑制作用. 世界华人消化杂志 2003;11:408-410
- 18 郭建巍, 秦力维, 蔡美英. 肝癌DC疫苗活化的CTL对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用. 世界华人消化杂志 2003;11:419-421
- 19 姜琳, 朱金水. 胃癌的免疫治疗研究新进展. 世界华人消化杂志 2002;10:1190-1193
- 20 杜建军, 龚科峰, 曹云新, 王中华, 王为忠, 高志清. 胃癌下调新基因CA11的功能研究. 世界华人消化杂志 2002;10:525-529
- 21 刘剑勇, 张力图, 李挺, 赵荫农, 张春燕, 陈建思, 张丽生, 覃宇周, 吴飞翔, 唐凯, 唐朝晖. 树突状细胞诱导肿瘤浸润性淋巴细胞抗胃癌免疫的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:467-469
- 22 Kochman S, Bernard J. Antitumour immune response and cancer vaccination: the critical role of dendritic cells. *Curr Med Res Opin* 1999;15:321-326
- 23 Boczowski D, Nair SK, Nam JH, Lysterly HK, Gilboa E. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer Res* 2000;60:1028-1034

# 肠型胃癌基因表达的cDNA微阵列分析

李新华, 张万岱, 王波涛, 肖冰, 张振书

李新华, 张万岱, 肖冰, 张振书, 中国人民解放军第一军医大学南方医院消化科 广东省广州市 510515  
李新华, 中国人民解放军第四军医大学西京医院消化科 陕西省西安市 710032  
王波涛, 中国人民解放军第四军医大学西京医院烧伤科 陕西省西安市 710032  
项目负责人: 李新华, 710032, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学西京医院消化科. doclixh@sina.com  
收稿日期: 2003-05-14 接受日期: 2003-06-02

## Gene expression profiling in intestinal-type gastric carcinoma by cDNA microarray

Xin-Hua Li, Wan-Dai Zhang, Bo-Tao Wang, Bin Xiao, Zhen-Shu Zhang

Xin-Hua Li, Wan-Dai Zhang, Bin Xiao, Zhen-Shu Zhang, Department of Gastroenterology, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China  
Xin-Hua Li, Department of Gastroenterology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shanxi Province, China  
Bo-Tao Wang, Department of Burn, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shanxi Province, China  
Correspondence to: Xin-Hua Li, Department of Gastroenterology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shanxi Province, China. doclixh@sina.com  
Received: 2003-05-14 Accepted: 2003-06-02

## Abstract

**AIM:** To identify a set of genes involved in the development of intestinal-type gastric carcinoma.

**METHODS:** Pure mRNAs from 6 cases of intestinal-type gastric carcinoma and corresponding noncancerous mucosae were reversely transcribed into cDNAs labeled with Cy5 and Cy3 dyes for probes, then mixed and hybridized with the cDNA microarray consisting of 4 096 genes, and the fluorescent signals were scanned.

**RESULTS:** Among total genes, 333 were up-regulated and 333 down-regulated in intestinal-type gastric cancer tissues. Within altered expression of those genes, cell-cycle regulators and growth factors were up-regulated, and the promoter genes of apoptosis were down-regulated; Oncogenes and cell-adhesion molecules were more up-regulated; The cancer progression genes were up-regulated, while the anti-cancer progression genes were down-regulated.

**CONCLUSION:** The quick and high-throughout method of gene expression profile by cDNA array provides us with an overview of gene changes that may involved in intestinal-type gastric cancer development, and will open up new possibilities to identify novel molecular targets for diagnosis and therapy. Several genes are altered in intestinal-type

gastric cancer, which need to be further investigated.

Li XH, Zhang WD, Wang BT, Xiao B, Zhang ZS. Gene expression profiling in intestinal-type gastric carcinoma by cDNA microarray. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):16-19

## 摘要

**目的:** 研究肠型胃癌发生发展的基因表达变化。

**方法:** 利用肠型胃癌和相应非癌组织的mRNA通过逆转录方法, 将Cy3和Cy5两种荧光分别标记到两种cDNA上制成探针, 然后与表达谱芯片(含4 096条基因)进行杂交后扫描, 通过计算机辅助判别基因的差异表达。

**结果:** 肠型胃癌和相应非癌组织组织中差异表达的基因有666条, 上调表达333条, 下调表达333条。参与细胞增殖、凋亡、分化和转移调控的多种基因的表达水平发生了明显改变。

**结论:** 高通量、高灵敏度的cDNA微阵列芯片技术提供了全面了解肠型胃癌基因表达谱的新思路, 一些与肿瘤发生相关的差异表达基因有可能发展成为生物标记物或肿瘤早期诊断和治疗的靶点。

李新华, 张万岱, 王波涛, 肖冰, 张振书. 肠型胃癌基因表达的cDNA微阵列分析. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):16-19

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/16.asp>

## 0 引言

胃癌是我国目前发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一<sup>[1-6]</sup>, 在胃癌的形成过程中, 常伴有多个抑癌基因的失活(p53, APC, DCC等)<sup>[7-12]</sup>及多个原癌基因的扩增(k-RAS, C-MET, K-SAM和C-ERBB2)<sup>[13-17]</sup>, 以及DNA修复基因异常等。但是以上基因的变化没有一种存在于所有的胃癌, 而且不同类型的胃癌其发病机制也不尽相同。因此从基因组整体水平系统地分析胃癌的基因表达谱<sup>[18]</sup>, 系统地揭示基因在疾病发展中表达上的时空差别信息, 为全面了解正常胃黏膜到癌前变再到胃癌过程基因表达谱的变化及最终揭示胃癌的发病机制并提供诊断和治疗的靶点前进一步。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 第四军医大学西京医院和第一军医大学南方医院普外科的肠型胃腺癌组织标本6例, 对照为其自身萎缩性胃炎或肠上皮化生的非癌黏膜组织。术前患者

均未接受过放疗或化疗. 全部标本均经病理切片及 AB/PAS 黏液组织化学染色证实. 胃癌切除手术中, 组织离体后立即在癌灶生长旺盛处取癌组织, 并剔除其他组织类型, 迅速切成多个  $1\text{ cm}^3$  小块; 非癌黏膜组织为刮取所得. 在 RNase-Free 生理盐水中漂洗, 以去除污渍或血渍, 用冷冻管迅速置入液氮中保存备用, 此过程在组织离体后 30 min 内完成. 用 Trizol (GIBCO 公司) 试剂一步法抽提胃癌和非癌黏膜组织的总 RNA, 样品经紫外分光光度计检测吸光度值, 并进行热稳定实验, 于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保温 1 h 后电泳检测 28 s, 18 s 条带无降解.

**1.2 方法** 以 Qiagen 公司 Oligotex mRNA Midi Kit 纯化得 mRNA. 按说明书操作与紫外分析其质量. 将 6 例胃癌患者的癌组织及非癌组织总 RNA 分别等量混合, 参照 Schena et al [Science 1995;270:467] 方法逆转录标记 cDNA, 用 Cy3-dUTP 标记非癌组织 mRNA, Cy5-dUTP 标记癌组织 mRNA. 用逆转录酶以 RNA 为模板反转录为单位 cDNA, 乙醇沉淀后将探针混合溶解在  $20\text{ }\mu\text{L}$  杂交液中. 所用含 4 096 个靶基因的 cDNA microarray 为复旦大学、上海博星基因芯片公司提供(型号为 H40s). 以通用引物进行 PCR 扩增, 以 Cartesian Pixsys 7 500 点样仪(Cartesian 公司)在硅化玻片(TeleChem 公司)上进行点样; 玻片经水合、室温干燥、UV 交联, 再分别用  $2\text{ g/L}$  SDS, 水及  $2\text{ g/L}$  硼氢化钠溶液处理 10 min, 凉干备用. 将芯片和标记 cDNA 探针分别在  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴变性 5 min, 将混合的标记探针加在芯片上, 用盖玻片封片, 置于  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  杂交 15-17 h. 解开盖玻片, 依次以  $2\times\text{SSC}+2\text{ g/L}$  SDS,  $1\text{ g/L}$  SSC+ $2\text{ g/L}$  SDS,  $1\text{ g/L}$  SSC 洗涤 10 min, 室温凉干. 用 ScanArray4000 扫描仪(General Scanning 公司)扫描芯片, 观察杂交结果, 用 GenePix3.0 软件分析 Cy3 和 Cy5 荧光信号强度, 用 40 个管家基因均衡后, 计算 Cy5/Cy3 值. 判定基因差异转录的标准: (1) Cy3 和 Cy5 信号值二者皆必须大于 200, 或 Cy3 和 Cy5 信号值之一必须大于 800; (2) Cy5/Cy3 大于 2 或小于 0.5. (3) PCR 结果良好.

## 2 结果

癌与非癌组织抽提的总 RNA 中 A260/A280 值为 1.972-2.06, 电泳显示 28 s, 18 s 条带无明显降解(图 1).

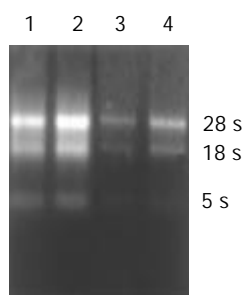


图 1 肠型胃癌和非癌组织总 RNA 电泳图. (Cy3). 1、2: 非癌组织 3、4: 肿瘤组织.

### 2.1 基因差异表达的芯片杂交 肠型胃癌组织表达谱(Cy5)

扫描结果与非癌组织表达谱(Cy3)扫描结果经计算机数据叠加后产生的图像(图 2), 为单个基因在 2 种组织中表达丰度的比值, 反应了两种组织基因表达的差异. 黄色点表示该基因在 2 种组织中接近; 绿色点表示 Cy3 信号较强, 代表该基因在非癌组织中高表达, 而癌组织低表达或不表达; 红色点代表 Cy5 信号强, 说明基因有上调表达趋势. 将上图经软件处理后制成杂交信号强度散点图(图 3). 每个点的 X 轴和 Y 轴分别表示 Cy3 和 Cy5 荧光信号的相对强度. 若数据点为红色, 则代表 Y 值与 X 值在 0.5-2.0 之间, 属非差异表达; 黄点代表 Y 值与 X 值在 0.5-2.0 之外, 可能属于差异表达. 由图可以看出芯片上绝大多数基因在 2 种组织中的表达丰度一致.

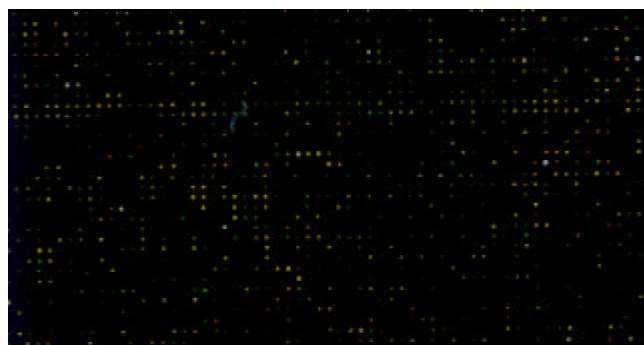


图 2 肠型胃癌组织(Cy5)与相应非癌组织(Cy3)的基因差异表达杂交扫描结果.

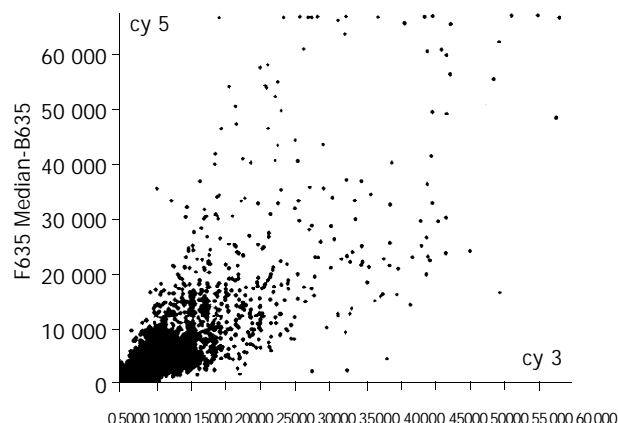


图 3 肠型胃癌组织与相应非癌组织基因表达杂交信号强度.

**2.2 芯片的生物信息分析** 按照阳性标准, 我们所用芯片上含有 4096 个人类基因, 在实验中一共检测到 3 840 个基因在胃癌和非癌组织中有表达, 其中 333 个在癌组织中高表达, 333 个在癌组织中低表达. 差异表达的基因被分为如下几类: 癌基因和抑癌基因、离子通道和运输蛋白类、细胞周期蛋白类、细胞骨架和运动类、细胞凋亡相关蛋白类、DNA 合成和修复蛋白类、DNA 合成和转录因子类、细胞受体类、免疫相关类、细胞信号和传递蛋白类、代谢类、蛋白翻译合成类、发育相关类等.

## 3 讨论

人类基因组测序草图的公布, 为疾病的诊断、新药物的研制和新疗法的探索带来一场革命<sup>[19]</sup>. cDNA 微阵列技

术提供了高通量(high throughput)或平行监测基因表达变化和功能的新方法,有可能成为未来生物学研究和临床诊断的通用手段.目前该技术已应用于包括人肝癌、食管癌、结肠癌等消化系统肿瘤在内的基因差异性研究中<sup>[20]</sup>,但尚罕见于正常胃黏膜到癌前变再到胃癌过程基因变化的研究,为此我们应用cDNA微阵列同时分析4 096种细胞基因的表达,筛选与肠型胃癌相关的已知基因,对其进行研究将有助于了解肠型胃癌发生机制的概貌,为诊断和治疗提供必要的理论基础.

由于遗传背景和环境因素的差别,患同一种肿瘤的不同患者的癌细胞基因表达模式可能不尽相同<sup>[21]</sup>.为寻找肠型胃癌患者基因表达的共同规律,我们将6例肠型胃癌组织和相应萎缩性胃炎或肠上皮化生组织总RNA分别等量混合,使每例样品对基因表达改变的贡献相同,使在多数样品中呈上/下调的基因在结果中显示明显的上/下调,结果反映了多数患者的共同趋势.我们一共检测到666个基因在癌及非癌组织有差异表达,其中在肠型胃癌组织中表达上调的基因333个,表达下调的基因333个,进一步分析显示,在胃癌组织中,多数对细胞增生起促进作用的基因表达上调,起抑制作用的基因表达下调,抗凋亡基因上调,而促凋亡基因表达下调,异常分化及侵袭相关基因上调,与上细胞发育分化相关的多种蛋白酶类表达明显改变,一些基因在胃癌中的表达变化明显不同于其他恶性肿瘤,这些改变既构成肠型胃癌细胞特异的基因表达谱,也是其增生失控、去分化、转移与侵袭等恶性表型的基础.我们的结果,胃癌组织中表达上调的有生长因子、生长因子受体信号转导通路组分及细胞周期调控因子等多种对细胞增生起正调控作用的基因(如CDC25 B, EGF, CDK, 多种泛素结合蛋白等),而表达下调的有抑癌基因、生长抑制因子等,(如P21, growth inhibitory factor MT3, TGF- $\beta$ ),显示了癌细胞明显的生长失控,而该生长调控的缺陷发生在多个层面上.其中表皮生长因子在癌组织中表达上调与Karameris et al<sup>[22]</sup>对63例胃癌组织的研究结果相似.

调节细胞程序性死亡或凋亡的基因明显与肿瘤的发展有关.本结果中介导 $\gamma$ -TNF诱导的细胞凋亡的基因DAPK1表达下调.而对凋亡起抑制作用的基因NM23-H6/IP1A-ALPHA和BAG5表达上调.DAPK1是新型的钙离子依赖的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员,他们的结构中含重复锚定序列和死亡结构域,与细胞骨架蛋白关联.DAP激酶的高度甲基化导致了癌细胞躲避凋亡而生长和侵袭<sup>[23]</sup>.DAPK1在胃癌细胞凋亡中的网络关系尚未见报道.基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)已有25个成员,他们可以降解多种细胞间质成分<sup>[24]</sup>.在胃癌组织中,MMP1, MMP2, MMP12呈明显高表达,其中MMP2在胃癌中高表达与Monig et al<sup>[25]</sup>的结果相似,且在淋巴结转移的肿瘤中呈显著高表达.目前,MMP的抑制剂用作抗侵袭药物已进入临床试

验<sup>[26]</sup>,了解胃癌细胞中MMP的种类为应用MMP抑制剂进行治疗提供了基础.CD44是作为一种细胞与细胞相互作用的重要的细胞黏附蛋白因子,所有的胃癌组织和他的转移瘤都含有CD44剪接重组子的过度表达<sup>[27, 28]</sup>.有趣的是MMP和CD44蛋白的过度表达在分化程度好的和低分化的胃癌之间不相同,提示肠型胃癌与扩散型胃癌的发生可能有不同的遗传学途径.由以上讨论可以看出,胃癌细胞中基因表达的改变是非常复杂的,决定了恶性表型的各个方面,是多种基因共同运作的结果.因此,利用基因芯片高通量多角度系统地进行基因特征分析,为我们从一个全新的视角认识胃癌的病因和发病机制提供了一个可用的方法.

#### 4 参考文献

- 1 Werner M, Becker KF, Keller G, Hofler H. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:207-216
- 2 Yin T, Ji XL, Shen MS. Relationship between lymph node sinuses with blood and lymphatic metastasis of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:40-43
- 3 Yang L, Kuang LG, Zheng HC, Li JY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. PTEN encoding product: a marker for tumorigenesis and progression of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9:35-39
- 4 Jiang YA, Zhang YY, Luo HS, Xing SF. Mast cell density and the context of clinicopathological parameters and expression of p185, estrogen receptor, and proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:1005-1008
- 5 Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:994-998
- 6 Niu WX, Qin XY, Liu H, Wang CP. Clinicopathological analysis of patients with gastric cancer in 1200 cases. *World J Gastroenterol* 2001;7:281-284
- 7 Fang DC, Luo YH, Yang SM, Li XA, Ling XL, Fang L. Mutation analysis of APC gene in gastric cancer with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2002;8:787-791
- 8 Fang DC, Jass JR, Wang DX, Zhou XD, Luo YH, Young J. Infrequent loss of heterozygosity of APC/MCC and DCC genes in gastric cancer showing DNA microsatellite instability. *J Chin Pathol* 1999;52:504-508
- 9 李晓清, 郝丽萍, 张小丽, 龚飞跃, 郭惠学, 伍尤星. 胃黏膜不典型增生P53基因表达及其癌变率的研究. *世界华人消化杂志* 2002; 10:1216-1217
- 10 费素娟, 陈玉林, 林志发, 陈淑敏, 刘广珍. 胃癌及癌前病变RasP21, P53的表达意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:465-466
- 11 李贵新, 李国庆, 赵常在, 徐功立. 胃癌组织端粒酶hTERT与抑癌基因P53和P16表达的关系. *世界华人消化杂志* 2002;10:591-593
- 12 王仰坤, 马乃绪, 姜海玲, 李涌, 王丽, 潘红, 张志波. 胃癌nm23和P53蛋白表达及癌浸润转移的关系. *世界华人消化杂志* 1999;7: 34-36
- 13 Sasano H, Date F, Imatania A, Asaki S, Nagura H. Double immunostaining for c-erbB-2 and P53 in human stomach cancer cells. *Hum Pathol* 1993;24:584-589
- 14 郭长青, 王玉萍, 刘国永, 马社旺, 丁贯一, 李继昌. 胃黏膜癌变过程中的幽门螺杆菌感染与p53, c-erbB-2基因表达的研究. *世界华人消化杂志* 1999;7:313-315
- 15 房殿春. 基因不稳在胃癌发生中的作用. *世界华人消化杂志* 2003; 11:1-5
- 16 蒋艳霞, 赵明彦, 耿明, 曹永成, 王兴友. p16, cerbB-2蛋白在胃肿瘤中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2002;10:1050-1051
- 17 Tsugawa K, Yonemura Y, Hirono Y, Fushida S, Kaji M, Miwa K, Miyazaki I, Yamamoto H. Amplification of the c-met, c-

- erbB-2 and epidermal growth factor receptor gene in human gastric cancers: correlation to clinical features. *Oncology* 1998; 55:475-481
- 18 Liotta L, Peticoin E. Molecular profiling of human cancer. *Nat Rev Genet* 2000;1:48-56
  - 19 Young RA. Biomedical discovery with DNA arrays. *Cell* 2000; 102:9-15
  - 20 Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Nakamura Y. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res* 2001; 61:2129-2137
  - 21 Yasui W, Oue N, Kuraoka K, Nakayama H. Molecular diagnosis of gastric cancer. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2002;103: 463-467
  - 22 Karameris A, Kanavaros P, Aninos D, Gorgoulis V, Mikou G, Rokas T, Niotis M, Kalogeropoulos N. Expression of epidermal growth factor(EGF)and epidermal growth factor receptor (EGFR)in gastric and colorectal carcinomas. An immunohistological study of 63cases. *Pathol Res Pract* 1993;189:133-137
  - 23 Simpson DJ, Clayton RN, Farrell WE. Preferential loss of Death Associated Protein kinase expression in invasive pituitary tumours is associated with either CpG island methylation or homozygous deletion. *Oncogene* 2002;21:1217-1224
  - 24 Cox G, O' Byrne KJ. Matrix metalloproteinases and cancer. *Anticancer Res* 2001;21:4207-4219
  - 25 Monig SP, Baldus SE, Hennecken JK, Spiecker DB, Grass G, Schneider PM, Thiele J, Dienes HP, Holscher AH. Expression of MMP-2 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Histopathology* 2001;39:597-602
  - 26 Bramhall SR, Hallissey MT, Whiting J, Scholefield J, Tierney G, Stuart RC, Hawkins RE, McCulloch P, Maughan T, Brown PD, Baillet M, Fielding JW. Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomised trial. *Br J Cancer* 2002;86:1864-1870
  - 27 Hsieh HF, Yu JC, Ho LI, Chiu SC, Harn HJ. Molecular studies into the role of CD44 variants in metastasis in gastric cancer. *Mol Pathol* 1999;52:25-28
  - 28 Chen GY, Wang DR. The expression and clinical significance of CD44v in human gastric cancers. *World J Gastroenterol* 2000; 6:125-127

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

## • 读者来信 •

尊敬的《世界华人消化杂志》编委会:

我连续阅读了 10 期《世界华人消化杂志》和《World Journal of Gastroenterology》，认为该杂志办的很有特色，有较高的学术水平和创新性，我从事消化专业工作 20 a，对该杂志好感颇深，故我自愿申请加入《世界华人消化杂志》编辑委员会工作。简历如下:

张铸，男，49 岁，1982 年毕业于新疆医科大学医疗系，现任新疆医科大学第一附属医院胸外科主任，教授，主任医师，兼任新疆医科大学第一临床学院外科教研室副主任。专业特长：能熟练掌握胸外科常见病、和疑难疾病的发病机制，及其诊断和外科治疗，尤其擅长食管癌和贲门癌的诊治工作，在提高其手术切除率，五年生存率和减少术后并发症，降低胸内吻合口瘘，以及术后并发症的处理方面，做出了积极探讨。近年来在国内和省内发表论文 20 篇，其代表作有《食管癌、贲门癌术后吻合口瘘诊断与治疗》，《胸壁肿瘤的外科治疗》，《漏斗胸的外科治疗》等。获奖或成果：参加研究的胸内食管、胃吻合口狭窄的纤维内窥镜扩张治疗荣获 1991 年自治区科学技术进步奖四等奖。参加研究的：新疆食管癌高发民族癌基因研究，荣获 1998 年自治区科技进步奖二等奖。(830054，新疆乌鲁木齐市鲤鱼山路 1 号 新疆医科大学第一附属医院胸外科. zhangzhu@cscs.org.cn) 2003-12-06

# 天津市 20 a 间胃恶性肿瘤发病分析

刘 婷, 王新允, 宋文静, 朱丛中, 李 艳

刘婷, 王新允, 宋文静, 朱丛中, 李艳, 天津医科大学病理教研室  
天津市 300070

刘婷, 女, 1972-11-12 生, 黑龙江省齐齐哈尔市人, 汉族. 1995 年齐齐哈尔医学院本科毕业, 现为天津医科大学硕士研究生, 讲师. 主要从事肺癌的分子病理研究.

项目负责人: 王新允, 300070, 天津市, 天津医科大学病理教研室.

tjykd2002@yahoo.cn.com

电话: 022-23517798

收稿日期: 2003-04-15 接受日期: 2003-06-04

## Incidence of gastric malignant tumors during the past 20 years in Tianjin

Ting Liu, Xin-Yun Wang, Wen-Jing Song, Cong-Zhong Zhu, Yan Li

Ting Liu, Xin-Yun Wang, Wen-Jing Song, Cong-Zhong Zhu, Yan Li, Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China  
Correspondence to: Xin-Yun Wang, Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China. tjykd2002@yahoo.cn.com  
Received: 2003-04-15 Accepted: 2003-06-02

## Abstract

**AIM:** To study the incidence and its tendency of gastric malignant tumors during the past 20 years in Tianjin and to provide information for clinicians and pathologists.

**METHODS:** The data of gastric malignant tumors were collected from the General Hospital and the Second Hospital of Tianjin Medical University. The data from 1981/2000 were stored in Excel. The tendency of gastric malignant tumors during the past 20 years was showed by statistical graph. The proportion and average ages of every type of malignant tumors were calculated and analyzed by *T-test* or *ANOVA*.

**RESULTS:** The incidence of gastric malignant tumors was increasing in both male and female during the past 20 years and reached the top in 2 000. The cases of male were 3121 and female, 1323. The relative ratio of male to female was 2.36 : 1. The cases in the previous 10 years were 1 923 and the latter 10 years were 2 542. The relative ratio was 0.76 : 1. Gastric cancer was 96.19%, its proportion was the highest and the average age was also oldest (58.3 years). Adenocarcinoma was the main histological type. The average ages of male and female patients were different.

**CONCLUSION:** The pathogenesis of gastric malignant tumors is associated with aged population and environmental pollution. Early diagnosis and treatment is critical to the patients' prognosis.

Liu T, Wang XY, Song WJ, Zhu CZ, Li Y. Incidence of gastric malignant tumors during the past 20 years in Tianjin. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):20-22

## 摘要

**目的:** 为探讨天津市近 20 a 胃恶性肿瘤的发病趋势及特点, 为临床和病理医生提供有价值的诊断思路.

**方法:** 材料来自天津医科大学总医院及第二医院病理科 1981/2000 年外科病理检查胃恶性肿瘤资料, 以 Microsoft excel 表格形式存储. 列统计图表显示胃恶性肿瘤 20 a 检出趋势. 并分别计算各型恶性肿瘤的构成比和平均确诊年龄, 对不同类型, 不同性别的胃恶性肿瘤患者年龄进行方差分析 (ANOVA) 和 *t* 检验 (或 *u* 检验).

**结果:** 20 a 来胃恶性肿瘤无论男、女检出数均呈逐年递增趋势, 2000 年达到顶峰; 检出男 3 121 例, 女 1 323 例, 男女之比为 2.36 : 1. 前 10 a 为 1 923 例, 后 10 a 为 2 542 例, 前后 10 a 之比为 0.76 : 1. 其中胃癌所占比例最大 96.19%, 确诊年龄也最大 (58.3 岁). 组织学类型中以腺癌最多; 男女两性确诊年龄不同, 男性 (59.8 岁) 高于女性 (54.5 岁).

**结论:** 胃恶性肿瘤尤其胃癌的发生与环境危险因素增多和人口老龄化等有关, 所以, 做好早期防治工作任重道远.

刘婷, 王新允, 宋文静, 朱丛中, 李艳. 天津市 20 a 间胃恶性肿瘤发病分析. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):20-22

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/20.asp>

## 0 引言

近 20 a 来, 肿瘤发病率不断上升, 尤其恶性肿瘤已成为威胁人类健康最大的敌人. 由于地理环境、经济发展、生活习惯及生活水平不一致, 肿瘤的好发部位差异很大. 但是胃的恶性肿瘤尤其是胃癌在很多国家和地区发病率都很高. 为探讨天津市近 20 a 胃恶性肿瘤的发病趋势及特点, 我们统计了天津医科大学总医院及第二医院病理科 20 a 的胃恶性肿瘤外科病理检查资料, 对其进行回顾性分析, 希望能为临床和病理医生提供有价值的诊断思路.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 来自天津医科大学总医院及第二医院病理科 1981/2000 年外科病理检查胃恶性肿瘤标本, 两所医院均为三级甲等医院, 故统计数据在天津地区具有一定的代表性. 全部标本经甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 并经认真复查, 根据 WHO 肿瘤国际组织学分类<sup>[1]</sup>重新进行审核, 分型. 以 Microsoft Excel 表格形式存储. 列统计图表显示胃恶性肿瘤 20 a 检出趋势. 并



分别计算各种恶性肿瘤的构成比和平均确诊年龄,对不同类型,不同性别的胃恶性肿瘤患者年龄进行方差分析(ANOVA)和t检验(或u检验).显著性检验水准为 $\alpha = 0.05$ ,双侧.

## 2 结果

**2.1 胃恶性肿瘤发病特点** 20 a间检出肿瘤47 626例,胃恶性肿瘤4 465例,占9.38%.表1显示胃恶性肿瘤20 a的检出情况:无论男、女检出数均呈逐年递增趋势,2000年达到顶峰.检出男3 121例,女1 323例,男女之比为2.36:1.前10 a为1 923例,后10 a为2 542例,前后10 a之比为0.76:1(表1).

表1 胃恶性肿瘤20 a的检出情况

年代	1981/1985	1986/1990	1991/1995	1996/2000	合计
男性	637	766	761	957	3 121
女性	243	265	322	493	1 323
性别不详	4	8	7	2	21
合计	884	1 039	1 090	1 452	4 465

表2 天津市胃恶性肿瘤的男女两性平均确诊年龄(岁)

年份	男性		女性		u	P
	n	年龄( $\bar{x} \pm s$ )	n	年龄( $\bar{x} \pm s$ )		
1981/1990	1 403	58.2 $\pm$ 11.1 (20-89)	508	52.4 $\pm$ 13.1 (14-83)	8.808	<0.0005
1991/2000	1 718	60.8 $\pm$ 12.5 (13-89)	815	55.8 $\pm$ 13.5 (20-88)	9.008	<0.0005
合计	3 121	59.7 $\pm$ 11.9 (14-88)	1 323	54.5 $\pm$ 13.5 (13-89)	21.81	<0.0005

**2.2 胃恶性肿瘤的类型及性别和年龄** 20 a来男性的平均确诊年龄(59.7岁)高于女性(54.5岁),相差约5岁,

表4 各型胃癌的性别、确诊年龄及构成比

病理类型	男	女	男:女	合计	构成比%	年龄范围( $\bar{x} \pm s$ ,岁)		两性年龄比较t
						男	女	
腺癌	2 739	1 081	2.53:1	3 820	88.94	60.1 $\pm$ 11.4 (20-85)	55.0 $\pm$ 13.4 (13-88)	11.004 <sup>b</sup>
印戒细胞癌	186	150	1.24:1	336	7.82	56.6 $\pm$ 13.5 (20-81)	51.6 $\pm$ 12.4 (24-78)	3.545 <sup>b</sup>
鳞癌	72	19	3.79:1	91	2.12	64.2 $\pm$ 10.2 (38-89)	58.9 $\pm$ 14.7 (13-78)	1.493
未分化癌	11	4	2.75:1	15	0.35	63.5 $\pm$ 9.0 (53-75)	56.5 $\pm$ 7.0 (50-66)	1.406
腺鳞癌	3	-	-	3	0.07	65.7 $\pm$ 11.2 (53-74)	-	-
性别、年龄不详	-	-	-	30	0.70	-	-	-
合计	3 011	1 254	2.40:1	4 295	100.00	59.8 $\pm$ 11.8 (20-89)	54.5 $\pm$ 13.4 (13-88)	12.091 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>P<0.01

经统计学检验有意义(P<0.0005);此外,前后10 a的确诊年龄不同,无论男女后10 a的确诊年龄均大于前10 a(P<0.01,表2).胃癌所占比例最大96.19%,肉瘤最小0.65%;其中肉瘤患者平均确诊年龄最低(50.4岁),淋巴瘤居中(55.3岁),胃癌患者平均确诊年龄最高(58.3岁),经方差分析(ANOVA)三者之间有统计学意义(F=9.117, P<0.01),经q检验,胃癌与淋巴瘤平均确诊年龄比较无统计学意义(q=2.232, P>0.05),而胃癌与肉瘤,淋巴瘤与肉瘤平均确诊年龄比较均有统计学意义(q=5.510, P<0.01; q=2.865, P<0.05).

**2.3 胃癌的性别、构成比和年龄** 胃恶性肿瘤中以胃癌检出最高.胃癌的主要组织学类型为腺癌,其次为印戒细胞癌,鳞癌、腺鳞癌及未分化癌较少.符合胃癌的特点.各型胃癌检出数均是男性多于女性.从年龄上看,男性确诊年龄高于女性,腺癌与印戒细胞癌两性年龄之比有统计学意义(P<0.01,表4).但鳞癌、腺鳞癌及未分化癌无统计学意义(P>0.05).

表3 天津市胃恶性肿瘤的类型构成比和平均确诊年龄

类型	n	构成比%	年龄( $\bar{x} \pm s$ 岁)
胃癌	4 295	96.19	58.3 $\pm$ 12.5 (13-89)
淋巴瘤	63	1.41	55.3 $\pm$ 16.4 (23-84)
肉瘤	29	0.65	50.4 $\pm$ 15.4 (16-74)
其他	78	1.75	54.9 $\pm$ 12.0 (29-87)
合计	4 465	100.00	58.1 $\pm$ 12.6 (13-89)

F: 9.117, P<0.01.

### 3 讨论

胃部是恶性肿瘤的好发部位,但在不同国家和地区相差悬殊.尤其胃癌,以美国、加拿大、新西兰和热带国家发病率较低<sup>[2-6]</sup>,而日本、中国、智利发病率较高,其中以日本胃癌死亡率最高.但近年来胃癌在大多数国家已出现发病水平普遍下降的趋势,美国最早出现胃癌下降趋势<sup>[7]</sup>,从1930-1960年间,下降了三分之二,日本、智利等发病率高的国家,至1950年代才开始下降,且下降速度较慢<sup>[8]</sup>.我国既无统一的癌症发病报告制度,且癌症又非法定报告的病种,因而得不到全国平均的胃癌发病率,仅能获得少数报告制度健全的城市或地区的有限资料<sup>[9-12]</sup>.总体上看,胃恶性肿瘤尤其是胃癌发病呈上升趋势,我们收集的天津市两所三级甲等医院的病理资料显示呈同样趋势.究其原因:一方面是人口老龄化加剧,城市化进程的加快,以及工业污染和食物农药残留的增多,另一方面,医疗诊断水平的提高,家庭经济状况的改善,使较多恶性肿瘤能及时发现和手术治疗,因此胃部恶性肿瘤尤其是胃癌的绝对人数有所增长<sup>[13,14]</sup>.

从总体上看,20 a来胃恶性肿瘤的确诊年龄无论男女,后10 a均高于前10 a,这可能与近10 a来的变化有关:一是随着人民生活水平的提高,机体抗癌机能有所增强<sup>[15-16]</sup>;二是医疗卫生条件有较大改善,使城乡居民的预期寿命有了较大增长<sup>[17]</sup>,所以发病时间有一定的延迟.从胃部恶性肿瘤的确诊年龄上看男性(59.7岁)高于女性(54.5岁).各型胃部恶性肿瘤的确诊年龄不同,癌症患者平均确诊年龄最高(58.3岁),肉瘤患者平均确诊年龄最低(50.4岁),淋巴瘤居中(55.3岁).

胃恶性肿瘤中以胃癌所占比例最大,从发病年龄上看,胃癌的发病年龄符合于癌肿的一般规律,即大多数发生在中年以后,多见于50-70岁,平均60岁<sup>[18-20]</sup>;以性别而论,胃癌在男性较女性常见,本资料与国内外报道的相同,国外男女胃癌的发病比例不到2:1,而我国胃癌男性患者远较女性患者为多,其比例约为3:1.从组织学类型上看,腺癌所占比例最大,印戒细胞癌次之,有报道鳞癌发病呈上升趋势,因本资料鳞癌例数较少,尚不能得出以上结论.

从以上分析可见胃恶性肿瘤的发生与环境恶化,人口老龄化有密切关系,要降低他的发病率,需要多方面的努力,这是一项任重而道远的工作.

### 4 参考文献

- 1 谭郁彬,张乃鑫.外科诊断病理学.第1版.天津:天津科学技术出版社,2000:473-478
- 2 Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol* 2003;56:1-9
- 3 Alberts SR, Cervantes A, van de Velde C. Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment. *Ann Oncol* 2003;14: (Suppl 2)31-36
- 4 Roder DM. The epidemiology of gastric cancer. *Gastric Cancer* 2002;5(Suppl 1):5-11
- 5 Hernandez BY. Highlights of recent cancer incidence data in Hawaii. *Hawaii Med J* 2003;62:17-18
- 6 Newnham A, Quinn MJ, Babb P, Kang JY, Majeed A. Trends in the subsite and morphology of oesophageal and gastric cancer in England and Wales 1971-1998. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:665-676
- 7 Terry MB, Gaudet MM, Gammon MD. The epidemiology of gastric cancer. *Semin Radiat Oncol* 2002;12:111-127
- 8 Blaser MJ, Saito D. Trends in reported adenocarcinomas of the oesophagus and gastric cardia in Japan. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:107-113
- 9 马利顺,王理伟,周琴,华召来,李茂生.扬中市胃癌流行及治疗情况调查分析. *中国肿瘤* 2001;10:718-720
- 10 孙秀娣,牧人,周有尚,戴旭东,乔友林,张思维,皇甫小梅,孙杰,李连弟,鲁凤珠.中国1990-1992年胃癌死亡调查分析. *中华肿瘤杂志* 2002;24:4-8
- 11 姚红玉,陈建国,朱建,张永辉.启东1973-2000年胃癌发病流行情况. *中国肿瘤* 2002;11:265-266
- 12 李秀凯,牛德富,何春红,王登周,赵朝选.阆中市1981-2000年消化系统恶性肿瘤死亡趋势. *中国肿瘤* 2002;11:270-272
- 13 刘光军,金成兰,陈红雨,孙玉芝.胃癌流行病学的内镜调查. *华人消化杂志* 1998;6:85-86
- 14 柏林,张亚历,周殿元.青年人胃癌的内镜病理与临床特征. *世界华人消化杂志* 2001;9:969-970
- 15 Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of *H pylori* infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. *World J Gastroenterol* 2001;7:801-804
- 16 Cai L, Yu SZ, Ye WM, Yi YN. Fish sauce and gastric cancer: an ecological study in Fujian Province, China. *World J Gastroenterol* 2000;6:671-675
- 17 孟建英,王新允.宁城与天津地区胃癌发病现状的临床病理分析. *河北医学* 2002;8:1063-1065
- 18 吴坚炯.老年人胃癌80例临床分析. *世界华人消化杂志* 2000;8: 949-950
- 19 Niu WX, Qin XY, Liu H, Wang CP. Clinicopathological analysis of patients with gastric cancer in 1 200 cases. *World J Gastroenterol* 2001;7:281-284
- 20 许国强,倪晓莹,顾秀珍.1 554例胃癌的临床分析. *中国肿瘤临床* 2002;29:481-484

# 反义 VEGF 寡核苷酸与碘油混合肝动脉注入转染鼠肝癌的可行性

吴汉平, 冯敢生, 田 元

吴汉平, 冯敢生, 华中科技大学同济医学院附属协和医院介入放射科  
湖北省武汉市 430022

田元, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外实验室  
湖北省武汉市 430022

吴汉平, 男, 1973-05-17 生, 湖北省麻城市人, 汉族. 2002 年华中科技大学  
同济医学院博士, 主治医师, 主要从事消化系统疾病的介入治疗及影像诊断,  
发表论文 6 篇.

国家自然科学基金资助项目, No. 39770839

项目负责人: 冯敢生, 430022, 湖北省武汉市解放大道 1277 号, 华中科技大学  
同济医学院附属协和医院介入放射科. shhwhp@public.wh.hb.cn

电话: 027-85726432

收稿日期: 2003-05-14 接受日期: 2003-06-04

## Feasibility of VEGF ASODN mixed with lipiodol transfecting liver cancer via hepatic artery infusion in rats

Han-Ping Wu, Gan-Sheng Feng, Yuan Tian

Han-Ping Wu, Gan-Sheng Feng, Department of Interventional  
Radiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University  
of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China  
Yuan Tian, Laboratory of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical  
College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan  
430022, Hubei Province, China

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No.  
39770839

Correspondence to: Gan-Sheng Feng, Department of Interventional  
Radiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University  
of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China.  
shhwhp@public.wh.hb.cn

Received: 2003-05-14 Accepted: 2003-06-04

## Abstract

**AIM:** To study the distribution and stability of VEGF ASODN in Walker-256 cells and to explore the distribution of VEGF ASODN in rat's liver, lung and kidney after mixed with lipiodol for hepatic artery infusion.

**METHODS:** The 5'-FITC labeled VEGF ASODN was given into Walker-256 cell culture media. The cellular distribution was observed by fluorescent microscope. Walker-256 carcinosarcoma was transplanted into Wistar rat liver to establish the liver cancer model. 5'-FITC labeled VEGF ASODN mixed with (mixed group,  $n=6$ ) or without (TAI group,  $n=6$ ) ultra-fluide lipiodol was administrated via hepatic artery. The frozen samples of rats' liver, lung and kidney tissues were collected at 1, 3, and 6d after ASODN administration. The distribution of ASODN was determined under fluorescent microscope.

**RESULTS:** ASODN could enter the cytoplasm within 2 h and enter the nuclei within 4 h. Accumulation of the ASODN reached the high point in the nuclei at 6h. After that, they began to disappear. No fluorescence could be seen in cells

at 48 h. At 1d and 3d, the fluorescence stained stronger in the liver in the mixed group than that in TAI group. More fluorescence could be detected in lung and kidney in TAI group than that in the mixed group. At 6 d, no fluorescence could be detected in TAI group tissues, but a little florescence could be seen in the mixed group tissues. ASODN could be seen in cancer cells and normal hepatic cells.

**CONCLUSION:** VEGF ASODN can transfect Walker-256 cells. VEGF ASODN stays longer in the liver, is transfected more into hepatic and cancerous cells and distributes less in other tissue when mixed with lipiodol. VEGF ASODN mixed with lipiodol *via* hepatic artery is an ideal way treating liver carcinoma.

Wu HP, Feng GS, Tian Y. Feasibility of VEGF ASODN mixed with lipiodol transfecting liver cancer via hepatic artery infusion in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):23-26

## 摘要

**目的:** 探讨反义 VEGF 寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotides, ASODN)转染 Walker-256 瘤细胞及其与碘油混合后肝动脉注入转染鼠肝癌及在鼠肝、肺、肾组织的分布情况。

**方法:** 将异硫氰酸荧光素(5'-FITC)标记的 VEGF ASODN 加入培养的 Walker-256 瘤细胞培养液中, 不同时间用荧光显微镜观察细胞内 ASODN 的分布. 12 只 Walker-256 移植性大鼠肝癌模型, 一组肝动脉内注入荧光标记的 VEGF ASODN(TAI 组,  $n=6$ ), 另一组肝动脉内注入荧光标记的 VEGF ASODN 与超液态碘油的混合液(混合组,  $n=6$ ), 两组分别于术后 1 d、3 d、6 d 取动物的肝、肺、肾组织行冰冻切片, 荧光显微镜观察各组织内 ASODN 的分布情况。

**结果:** 荧光标记的 ASODN 与 Walker-256 瘤细胞共同培养后 2 h 时可见瘤细胞胞质内有点状荧光染色, 6 h 胞核内有荧光染色, 12 h 荧光染色最强, 胞核及胞质中均可见荧光染色, 24 h 荧光物质减少, 48 h 完全消失. 1 d 和 3 d 时混合组肝癌组织及肝组织内荧光染色强于 TAI 组, 而肺、肾组织荧光染色弱于 TAI 组; 6 d 时 TAI 组肝、肺、肾组织内荧光染色基本消失, 而混合组肝、肺、肾组织仍有少许荧光染色. ASODN 可以进入肝癌细胞及瘤周肝细胞。

**结论:** VEGF ASODN 可以转染 Walker-256 细胞, 其与碘油混合后可以延长 ASODN 在肝内的停留时间, 增加对肝

癌组织的转染率,减少其在肝外组织的分布.与碘油混合后肝动脉注入是VEGF ASODN反义基因治疗肝癌的理想给药方法.

吴汉平,冯敬生,田元.反义VEGF寡核苷酸与碘油混合肝动脉注入转染鼠肝癌的可行性.世界华人消化杂志 2004;12(1):23-26

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/23.asp>

## 0 引言

抗血管生成是肿瘤治疗的热点,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前公认主要促进血管形成的因子之一<sup>[1-9]</sup>,针对VEGF的反义基因治疗可以抑制肿瘤血管生成<sup>[10-14]</sup>.反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotides, ASODN)由于合成简便,序列可依据不同的靶基因序列的要求进行变换,具有较大的适应性,是反义基因治疗中最为方便的一种方法<sup>[15-18]</sup>.实验表明VEGF ASODN可以抑制肿瘤细胞VEGF的表达<sup>[19-24]</sup>,但ASODN的临床应用大多是全身给药,靶向性差、转染率低、治疗效果差.器官的靶向性给药是介入治疗的优势之一,能否采用介入的方法来提高ASODN在活体反义治疗中的疗效,目前尚未见报道,特设计以下实验.

## 1 材料和方法

1.1 材料 Walker-256瘤细胞株购自武汉大学中国典型物保藏中心;荧光标记的VEGF ASODN(序列为:5'-GCAGTAGCTGCGCTGATAGCGC-3',全长硫代修饰,5'端FITC荧光素标记)由上海生工生物公司合成;♂Wistar大鼠由华中科技大学同济医学院实验动物部提供;荧光显微镜(日本Olympus公司);超液态碘油(法国Guerbet公司).

### 1.2 方法

1.2.1 体外实验 取接种Walker-256瘤细胞3-5 d后Wistar大鼠癌性腹水0.2 mL接种于含50 mL/L小牛血清RPMI 1640培养液培养瓶内,置37℃、饱和湿度、50 mL/L CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,每2 d传代1次.取第3代培养的Walker-256瘤细胞,接种在24孔板上,每孔100 μL,含细胞总数为1×10<sup>3</sup>个,加入荧光密度为10 kA/L ASODN 20 μL,置37℃、饱和湿度、50 mL/L CO<sub>2</sub>的培养箱中培养.分别在荧光ASODN加入后2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h和48 h收集细胞,用无血清的培养液冲洗3次,最后将洗涤后的细胞滴在玻片上,盖上盖玻片,置于荧光显微镜下观察.

1.2.2 体内实验 取接种Walker-256瘤细胞3-5 d后Wistar大鼠癌性腹水0.5-1 mL,无菌条件下注射至健康大鼠皮下,7-10 d可以长出直径约1-2 cm肿瘤,切取新鲜鱼肉样瘤组织剪成1 mm<sup>3</sup>组织块.预接种大鼠用1 g/L戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔麻醉后,剑突下正中切口切开腹腔,挑出肝左外叶,用眼科镊在肝实质内

刺一小隧道,将1 mm<sup>3</sup>瘤组织块种植到隧道内,并用明胶海绵小块堵塞隧道口部.将肝左外叶送回腹腔,关腹.饲养1 wk后即可长出直径为0.5-1 cm的肝左叶肿瘤.荷瘤大鼠随机分为2组,每组6只.TAI组:肝动脉内缓慢注入荧光ASODN 1A(生理盐水稀释至0.2 mL),注药同时阻断肝动脉20 min;混合组:荧光ASODN 1A与超液态碘油0.2 mL混合后肝动脉注入,VEGF ASODN分子质量为6 766 u,1A质量为165 μg.荷瘤大鼠于接种后10 d,腹腔麻醉后,仰卧固定于实验台上.上腹部消毒铺巾后,行正中切口打开腹腔,暴露肝门及肝十二指肠韧带.在手术显微镜下游离出肝总动脉、胃十二指肠动脉、肝右动脉,用丝线打活结法暂时阻断腹腔动脉,结扎胃十二指肠动脉远段,用显微剪在结扎处的近肝端剪一小口,将PE-50管逆行插入胃十二指肠动脉近端,并结扎固定导管,再暂时阻断肝右动脉,经PE-50管注入实验药物.实验完后拔出PE-50管,结扎胃十二指肠动脉近端,松开肝总动脉及肝右动脉,逐层缝合、消毒、分笼饲养.于术后1 d, 3 d, 6 d每组各处死2只动物,取肝左叶肿瘤组织及瘤周肝组织、肺、肾组织,-70℃保存.上述组织行5 μm厚冰冻切片,在荧光显微镜下观察荧光ASODN分布情况.

## 2 结果

2.1 体外实验 Walker-256瘤细胞呈悬浮方式生长,圆形.荧光标记的ASODN在荧光显微镜下显示为黄绿色.荧光ASODN与Walker-256瘤细胞作用后2 h胞体中即可见清晰的点状荧光聚集,胞核荧光聚集不明显;6 h时胞质荧光着色加浓,部分细胞胞核核膜周围及核内可见点状荧光;12 h时胞质荧光着色最浓,呈黄色颗粒状、小片状,大部分细胞胞核内可见点状荧光着色(图1);24 h时胞质荧光物质开始减少,36 h细胞内荧光着色进一步减退,呈散点状(图2),48 h细胞内荧光完全消失.

2.2 体内实验 混合组术后1 d时肝脏荧光染色主要见于肿瘤区,部分瘤周区域也可见到,荧光染色强,呈深黄色,大片状,细胞界限不清(图3);肺、肾组织有轻度染色,其中部分肺组织可见较强的片状荧光染色.3 d在肝脏肿瘤区及瘤周区域可见较多的荧光染色,染色强度减弱,呈星芒状分布,主要位于肿瘤区域,大多数的癌细胞内有点状黄色荧光;肺、肾组织仅有弱染色.6 d时肝组织内荧光染色减少,呈簇状分布,部分癌细胞及肝细胞内可见荧光物质(图4);肺、肾组织仍可见较弱的荧光染色.

TAI组术后1 d时肝脏肿瘤及瘤周区内肿瘤细胞及肝细胞见浅黄色的荧光染色,簇状分布(图5);肺、肾组织有较强的染色.3 d在肝细胞及癌细胞仅见散在的荧光染色(图6),肺、肾组织仅有弱染色.6 d时肝内几乎无荧光染色,肺、肾组织无染色.

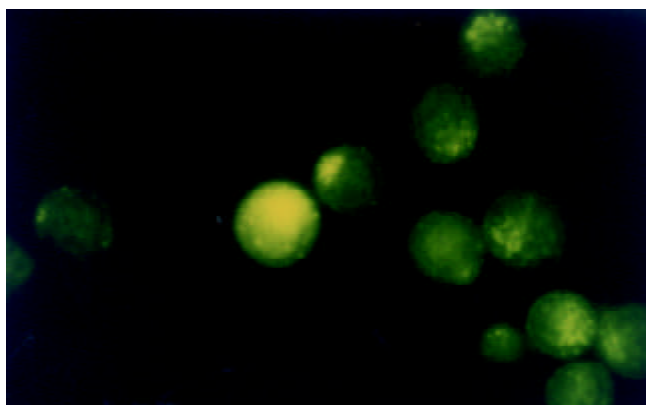


图1 12 h, 胞质荧光呈黄色小片状, 最浓, 胞核内见点状荧光着色×200.

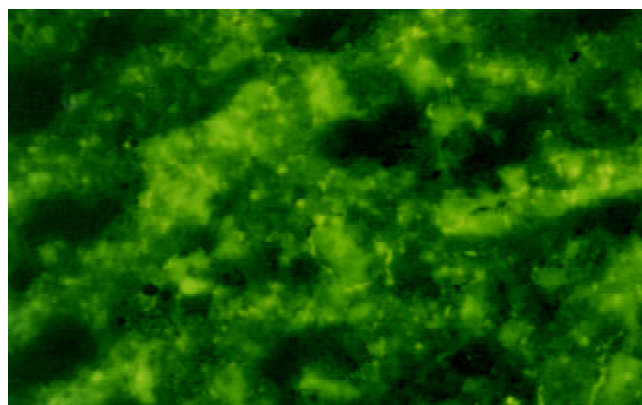


图5 TAI 组, 1 d 肝癌组织较强荧光染色×100.

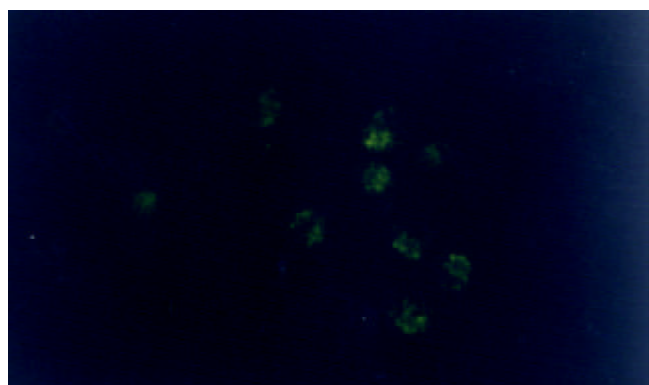


图2 36 h, 细胞内荧光着色进一步减退, 呈散点状×100.

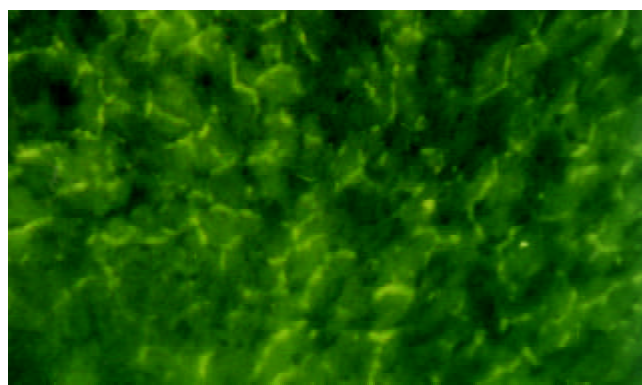


图6 TAI 组, 3 d 肝癌细胞见散在的荧光染色×100.

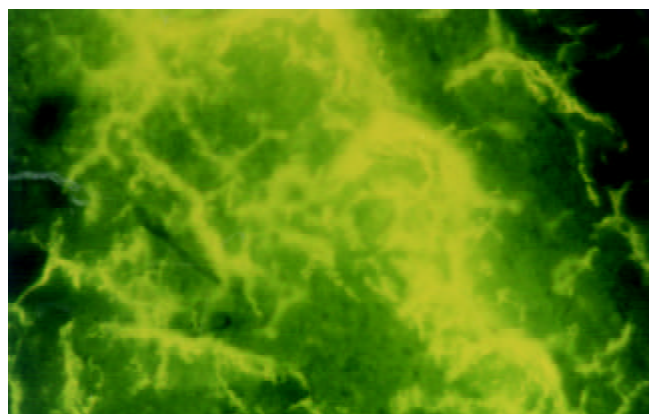


图3 混合组, 1 d 肝癌组织见大量的荧光染色, 成片状×100.

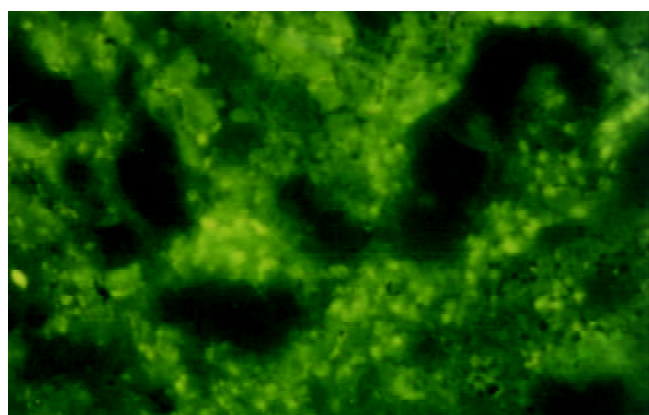


图4 混合组, 6 d 肝组织仍有较强的荧光染色×100.

### 3 讨论

ASODN 在基因治疗实验中有较好的疗效, 但价格昂贵, 有毒性作用, 对靶器官及组织的转染效率较低, 增加转染效率有多种方法, 如用阳离子脂质体包裹、肿瘤局部注射等. 经导管动脉内灌注(TAI)化疗和碘油与化疗药混合动脉栓塞已成为治疗中晚期实体肿瘤的重要方法. 与全身给药相比, TAI 可使药物直接进入靶器官而不受血流量的影响, 这样使局部药物浓度显著增加, 减少剂量及全身副作用. 采用 TAI 方法可以增加外源治疗基因在靶组织内的浓度及持续的时间, 提高基因转染率. 郝强<sup>et al</sup> 研究肝动脉注入重组腺病毒介导的标记基因(LacZ), 结果发现 LacZ 基因在肝脏表达有器官特异性, 并可以持续 21 d 以上. 碘油经肝动脉注入后可以选择性在肝癌组织中存积数月甚至 1 a 以上, 碘油与化疗药混合后行肝癌的栓塞可以使化疗药在肿瘤局部缓慢释放, 长期发挥作用. 鉴于碘油在肝癌介入栓塞治疗中的特殊作用, 将外源基因与碘油混合肝动脉注入能否进一步增加其对肝癌的转染效果, 目前国内外尚未见类似的报道.

我们采用的肝癌模型为富血管性肿瘤, 碘油肝动脉灌注后主要积聚在肿瘤组织. 肝动脉注入 ASODN 与碘油混合物后, ASODN 在肝脏中的分布以肿瘤区为主, 可以进入肝细胞及癌细胞内, 且可以维持达 5 d 以上; 而肝动脉单纯灌注时, ASODN 在肝脏的肿瘤区及非肿



瘤区分布差不多,分布的范围及感染的细胞数目明显少于混合组,且仅在肝脏维持3 d左右。就ASODN在肺、肾组织的分布而言,两组均在第1 d染色最强,但混合组弱于TAI组,第3 d肺、肾组织ASODN均较少,第5 d时TAI组几乎没有荧光染色,而混合组还有少量的荧光染色。这可以得出以下结论:(1)ASODN对肝细胞和肿瘤细胞的转染没有选择性;(2)碘油可以携带ASODN进入肿瘤区域内;(3)与单纯肝动脉注入相比,ASODN与碘油混合后肝动脉注入可以在肿瘤内缓慢释放,延长与肿瘤细胞作用时间,增加转染率,减少肝外组织的分布。我们发现荧光ASODN在肝细胞及瘤细胞中为点状黄色颗粒,但混合组第1 d荧光染色呈片状,细胞界限分辨不清,这可能是因为ASODN与碘油混合后致使ASODN大量停留在肿瘤局部,某些尚在血窦内,未从碘油中分离出来,加之冰冻切片较厚,荧光显微镜下主要显示荧光物质,细胞及组织结构显示相对较差,致使难以看清细胞结构。混合组第1 d部分肺组织中可见到较强的片状荧光染色,这可能和少量碘油与ASODN混合物进入肺组织沉积所致。一般而言,VEGF主要在肿瘤组织内高表达,在正常肝、肺、肾组织表达较少,由于设计的VEGF ASODN对VEGF具有高度的特异性,因此注入的ASODN对非肿瘤组织的作用较小。

ASODN与碘油混合后肝动脉注入ASODN进入肿瘤细胞的机制并不十分清楚,我们推测其可能的机制为:(1)ASODN分子量较小,渗透力强,细胞可以主动摄取;(2)肿瘤血管发育不成熟,缺乏弹力层和肌层,内皮细胞间隙较大等为ASODN进入肿瘤细胞外间隙提供了条件;(3)有研究表明碘油肝动脉栓塞后病理检查发现在肝癌细胞胞质及部分胞核内可以有碘油存在,推测肝癌细胞可以主动摄取碘油,ASODN可伴随碘油进入癌细胞内。

总之,我们认为碘油可以作为ASODN的一种载体,使其主要集中在肿瘤组织内,缓慢释放,同时可以减少在肝外组织中的分布,达到增加基因转染效率,减少全身副作用的目的,明显优于单纯肝动脉灌注。

#### 4 参考文献

- Du JR, Jiang Y, Zhang YM, Fu H. Vascular endothelial growth factor and microvascular density in esophageal and gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2003;9:1604-1606
- Zheng S, Han MY, Xiao ZX, Peng JP, Dong Q. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1227-1230
- Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1421-1426
- Xue JT, Wu J, Meng L, Dong ZW, Shou CC. Expression of VEGF(121) in gastric carcinoma MGC803 cell line. *World J Gastroenterol* 2000;6:281-283
- Giavazzi R, Sennino B, Coltrini D, Garofalo A, Dossi R, Ronca R, Tosatti MP, Presta M. Distinct role of fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor on tumor growth and angiogenesis. *Am J Pathol* 2003;162:1913-1926
- Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 2002;29(6 Suppl 16):10-14
- Ziemer LS, Koch CJ, Maity A, Magarelli DP, Horan AM, Evans SM. Hypoxia and VEGF mRNA expression in human tumors. *Neoplasia* 2001;3:500-508
- Salgado R, Benoy I, Bogers J, Weytjens R, Vermeulen P, Dirix L, Van Marck E. Platelets and vascular endothelial growth factor (VEGF): a morphological and functional study. *Angiogenesis* 2001;4:37-43
- Cascinu S, Graziano F, Catalano V, Staccioli MP, Barni S, Giordani P, Rossi MC, Baldelli AM, Muretto P, Valenti A, Catalano G. Differences of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression between liver and abdominal metastases from colon cancer. Implications for the treatment with VEGF inhibitors. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:651-655
- Riedel F, Gotte K, Li M, Hormann K, Grandis JR. Abrogation of VEGF expression in human head and neck squamous cell carcinoma decreases angiogenic activity in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 2003;23:577-583
- Gu ZP, Wang YJ, Li JG, Zhou YA. VEGF165 antisense RNA suppresses oncogenic properties of human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:44-48
- Im SA, Kim JS, Gomez-Manzano C, Fueyo J, Liu TJ, Cho MS, Seong CM, Lee SN, Hong YK, Yung WK. Inhibition of breast cancer growth in vivo by antiangiogenesis gene therapy with adenovirus-mediated antisense-VEGF. *Br J Cancer* 2001;84:1252-1257
- 刘都户, 张渭, 粟永萍, 张学庸, 黄裕新. VEGF<sub>165</sub> 正反义表达载体的构建及其对胃癌细胞 VEGF 表达的调节. *世界华人消化杂志* 2001;9:886-891
- Liu Q, Lu Z, Zhang W, Yan J. Construction and identification of recombinant adenovirus vector containing the hVEGF165 gene. *J Tongji Med Univ* 2000;20:186-189
- Fluiter K, ten Asbroek AL, de Wissel MB, Jakobs ME, Wissenbach M, Olsson H, Olsen O, Oerum H, Baas F. In vivo tumor growth inhibition and biodistribution studies of locked nucleic acid (LNA) antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 2003;31:953-962
- Maksymowycz WP, Blackburn WD Jr, Tami JA, Shanahan WR Jr. A randomized, placebo controlled trial of an antisense oligodeoxynucleotide to intercellular adhesion molecule-1 in the treatment of severe rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002;29:447-453
- Taylor AH, al-Azzawi F, Pringle JH, Bell SC. Inhibition of endometrial carcinoma cell growth using antisense estrogen receptor oligodeoxyribonucleotides. *Anticancer Res* 2002;22:3993-4003
- Ross PJ, George M, Cunningham D, DiStefano F, Andreyev HJ, Workman P, Clarke PA. Inhibition of Kirsten-ras expression in human colorectal cancer using rationally selected Kirsten-ras antisense oligonucleotides. *Mol Cancer Ther* 2001;1:29-41
- Yang PY, Rui YC, Jin YX, Li TJ, Qiu Y, Zhang L, Wang JS. Antisense oligodeoxynucleotide inhibits vascular endothelial growth factor expression in U937 foam cells. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24:610-614
- 孟冬娅, 薛文成, 胡晓芳, 王一楠, 罗军. 反义核酸对放疗诱导前列腺癌细胞 VEGF 高表达的抑制作用. *中华男科学* 2002;8:95-97
- Shi W, Siemann DW. Inhibition of renal cell carcinoma angiogenesis and growth by antisense oligonucleotides targeting vascular endothelial growth factor. *Br J Cancer* 2002;87:119-126
- 朱金海, 黄建富, 陈燕凌, 殷凤峙, 唐南洪, 李秀全. PCNA、VEGF 反义寡核苷酸联合治疗裸鼠肝癌的研究. *中华外科杂志* 2001;39:875-877
- 陈汝福, 孙宏武, 童宜欣, 邹声泉. 反义寡核苷酸抑制胆管癌细胞血管内皮生长因子基因表达的效应. *中华实验外科杂志* 2000;17:14-15
- 董凡, 许新, 景乃禾, 金由辛. 反义寡核苷酸抑制肿瘤细胞表达 VEGF 的研究. *肿瘤* 1997;17:63-66



# 三氧化二砷抗肿瘤血管形成研究

华海清, 秦叔逵, 王锦鸿, 陈惠英

华海清, 南京军区南京总医院博士后科研工作站八一分站  
江苏省南京市 210002  
秦叔逵, 陈惠英, 中国人民解放军第八一医院全军肿瘤中心  
江苏省南京市 210002  
王锦鸿, 南京中医药大学 江苏省南京市 210029  
华海清, 男, 1961-11-16 生, 江苏省江阴市人, 汉族, 南京军区南京总医院博士  
后科研工作站博士后, 副教授, 主要从事中西医结合治疗恶性肿瘤研究。  
解放军全军“十五”攻关科研基金项目, No.01MB028。  
项目负责人: 秦叔逵, 210002, 江苏省南京市杨公井 34 标 34 号, 中国人民  
解放军第八一医院全军肿瘤中心肿瘤内科。 qinsk@hotmail.com  
电话: 025-84453932 传真: 025-84453906  
收稿日期: 2003-05-10 接受日期: 2003-06-02

## Effect of arsenic trioxide on vascularization of tumor

Hai-Qing Hua, Shu-Kui Qin, Jin-Hong Huang, Hui-Ying Cheng

Hai-Qing Hua, Post-doctor Scientific Research Program, Nanjing Military Region General Hospital, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China  
Shu-Kui Qin, Hui-Ying Chen, Center for Oncology, 81 Hospital of PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China  
Jin-Hong Wang, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China  
Supported by PLA Scientific Research Fund, No.01MB028  
Correspondence to: Shu-Kui Qin, Center for Oncology, 81 Hospital of PLA, 34 Yanggongjing Street, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. qinsk@hotmail.com  
Received: 2003-05-10 Accepted: 2003-06-02

## Abstract

**AIM:** To explore the effects and mechanisms of anti-vascularization of arsenic trioxide ( $As_2O_3$ ) injection on the human hepatocellular carcinoma (HCC) cells.

**METHODS:** Human umbilical vein cell line ECV304 and the nude mice with the high metastatic human HCC transplanted in situ LCI-D20 were used. The growth of ECV304 was analyzed by MTT assay. The inhibitory effect of  $As_2O_3$  on tumor neo-vascularization was investigated by the method of chick chorioallantoic membrane (CAM). The changes of VEGF's expression in the transplanted HCC tissue were investigated by using immunohistochemical SP staining.

**RESULTS:**  $As_2O_3$  could inhibit the growth of ECV304 cell line, and down-regulate VEGF's expression.  $As_2O_3$  could also inhibit the vascularization in the CAM, and electron microscopy showed that  $As_2O_3$  could damage primitive mesenchymal cells and vascular endothelial cells, and inhibit neovascular gemmation. The expression of VEGF was down-regulated *in vivo* studies.

**CONCLUSION:**  $As_2O_3$  injection can inhibit the tumor neovascularization by suppressing the growth of vascular endothelial cell, down-regulating the expression of VEGF,

damaging the primitive mesenchymal cells and inhibiting neovascular fromation.

Hua HQ, Qin SK, Huang JH, Cheng HY. Effect of arsenic trioxide on vascularization of tumor. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(1):27-31

## 摘要

**目的:** 探讨三氧化二砷( $As_2O_3$ )注射液抗肿瘤血管形成的作用及其相关机制。

**方法:** 采用MTT比色法、鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)血管形成实验和免疫组化等方法观察  $As_2O_3$  对内皮细胞株 ECV304 增生、CAM 血管形成以及对裸鼠肝癌移植瘤 LCI-D20 表达血管内皮生长因子(VEGF)的影响。

**结果:**  $As_2O_3$  有显著抑制内皮细胞增生作用; 能抑制CAM血管形成, 其机制与损伤形成血管的原始间充质细胞、破坏血管形成中的内皮细胞的结构和功能有关;  $As_2O_3$  并能降低裸鼠人肝癌转移模型肝移植瘤 VEGF 的表达。

**结论:**  $As_2O_3$  注射液有明显的抗肿瘤血管形成作用, 其机制可能与破坏内皮细胞结构和功能、抑制内皮细胞增生以及抑制肿瘤组织表达 VEGF 有关。

华海清, 秦叔逵, 王锦鸿, 陈惠英. 三氧化二砷抗肿瘤血管形成研究. 世界华人消化杂志 2004;12(1):27-31

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/27.asp>

## 0 引言

近年来, 有关肿瘤血管形成的研究已成为肿瘤研究的热点<sup>[1-15]</sup>。肿瘤的生长、扩散与转移离不开肿瘤血管的形成, 肿瘤细胞通过新形成的血管吸取营养而无限制的生长, 使肿瘤不断增大, 同时又可通过不健全的血管进入血液循环而向远处扩散和转移, 因此, 如何应用药物来阻断肿瘤新生血管的形成已是控制肿瘤生长和转移的关键措施之一<sup>[16-22]</sup>。三氧化二砷( $As_2O_3$ )注射液已获得我国 SDA 和美国 FDA 批准上市。研究表明,  $As_2O_3$  具有诱导和促进肿瘤细胞凋亡和细胞毒等作用, 是否具有抗肿瘤血管形成作用尚未见报道。我们通过观察  $As_2O_3$  对内皮细胞、肿瘤组织表达血管内皮生长因子(VEGF)的影响以及对鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)新生血管形成的作用, 意在阐明  $As_2O_3$  抗肿瘤的作用机制, 为临床用药奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 材料 人类肝癌细胞株 SMMC-7221 和建株人脐静脉

内皮细胞(ECV304),均引自中国科学院上海细胞生物研究所;As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>注射液(亚砷酸注射液)为哈尔滨伊达药业有限公司产品;胰蛋白酶为美国Difco公司产品;小牛血清系杭州四季青生物工程公司产品.MTT试剂为美国Fluka公司产品;M-450甲基纤维素为南京化工原料公司产品.鼠抗人VEGFmAb、鼠抗人CD34mAb及超敏SP(鼠)试剂盒为美国Maxim Biotech, Inc.公司产品;液体DAB酶底物显色试剂盒为福建迈新生物技术开发公司产品;受精鸡胚购自中牧集团南京小行药械厂动物繁殖场.ECV304细胞接种于无菌培养瓶中,加入适量RPMI1640培养液(含100 mL/L的小牛血清、青霉素100 ku/L、链霉素100 mg/L),于37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养箱中培养.细胞呈单纯贴壁生长,每3-5 d传代1次.传代时用2.5 g/L胰蛋白酶消化2-3 min,用培养液吹打成细胞悬液,按需要的浓度接种.甲基纤维素碟制备: M<sub>450</sub>甲基纤维素0.5 g,加双蒸水100 mL,高压灭菌.取上述溶液120 μL分6次加入自制的直径为4 mm、深0.5 mm的塑料板圆形小槽中,超净台内吹干,将膜取下,无菌保存备用.

## 1.2 方法

1.2.1 抑制细胞生长 取3 × 10<sup>7</sup>/L的ECV304细胞接种于96孔培养板中,每孔100 μL,设4复孔,待细胞贴壁后(4-5 h),加入浓度分别为2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L的As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>注射液100 μL/孔,对照孔加入100 μL培养液,置于37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>的培养箱中培养至预定时间,每孔加入5 g/L的MTT20 μL,继续培养4 h,弃去全部上清,每孔加入0.04 mol/L盐酸异丙醇100 μL,微型振荡器振荡5-10 min使结晶完全溶解,在酶联仪波长570 nm处测出用药后24 h、48 h、72 h各孔吸光度值(A),按下列公式计算细胞生长抑制率:抑制率(%) = (1 - 加药孔平均A值/对照孔平均A值) × 100%.实验共重复3次.

1.2.2 鸡胚尿囊膜[CAM]新生血管形成 取繁殖场孵化的9 d龄受精鸡卵,在照卵灯下寻找胚头右下方血管稀少区(约胚头右下方0.5-1 cm处),划定1 × 1 cm开窗位置,在鸡胚气室端钻1 mm小孔并穿透壳膜.用75%乙醇消毒开窗部位,用手术剪轻轻揭去蛋壳及壳膜,暴露出鸡胚尿囊膜,将甲基纤维素碟轻轻放置于尿囊膜上血管较少的部位,用微量进样器将浓度分别为40 mg/L, 20 mg/L, 10 mg/L的As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>注射液20 μL滴入甲基纤维素碟中,阳性对照组用人参皂甙Rg3溶液(用无菌等渗盐水配制),浓度为250 mg/L,阴性对照组用生理盐水,滴入量同As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>组,用无菌透明胶带封窗后放入孵化箱,37.8℃继续孵化,3 d后揭去透明胶带,加入若干甲醇、丙酮等量混合固定液,在室温下固定15 min,待绒毛尿囊膜血管中的血液凝固后,以纤维素小碟为中心剪下直径约3 cm的尿囊膜,放入盛有水的平皿内展开,然后平铺于滤纸上,解剖显微镜下观察用药区血管形成情况.甲基纤维素碟覆盖区及周围血管形成正常

为(-);甲基纤维素碟覆盖区无血管或血管明显稀少且直径大于或等于4 mm为阳性(+);直径大于6 mm为强阳性(++).根据这一评定标准,计算出20个经药物作用的鸡胚尿囊膜血管受到抑制(+)的百分率.

1.2.3 SMMC-7721细胞诱导新生血管形成 9天龄鸡胚45只,随机分为3组,每组15只,按上述方法暴露鸡胚尿囊膜,在相对无血管处接种对数生长期的SMMC-7721细胞,每只5 × 10<sup>6</sup>/L,共接种2组.接种24 h后以甲基纤维素碟为载体,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>组每只给予40 mg/L的As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>注射液20 μL,对照组及未接种SMMC-7721细胞的空白组给予等量的生理盐水,用无菌透明胶带封窗后放入孵化箱,37.8℃继续孵化,3 d后,CAM用40 g/L多聚甲醛原位固定15 min,以接种区为中心取膜,常规石蜡包埋,切片,HE染色,光镜下观察接种区新生血管的分布、数量等情况.

1.2.4 透射电镜观察 取9天龄鸡胚24只,随机分为As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>用药1 d组、2 d组、3 d组及生理盐水对照组共4组,每组6只,按上述方法暴露鸡胚尿囊膜,在相对无血管处放入甲基纤维素碟,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>各组每只给予40 mg/L的As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>注射液20 μL,对照组给予等量的生理盐水,用无菌透明胶带封窗后放入孵化箱,37.8℃继续孵化,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>1 d组于第1 d、2 d组于第2 d、3 d组及对照组于第3 d取CAM,40 g/L戊二醛固定,PBS缓冲液漂洗,10 g/L锇酸后固定,梯度酒精脱水,Epon812包埋,超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双染色,透射电镜观察CAM超微结构变化.

1.2.5 免疫组化检测 将已构建的裸鼠人肝癌转移模型(LCI-D20)21只裸鼠,随机分为As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>高剂量治疗组(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>注射液每日3.5 mg/kg组)、低剂量治疗组(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>注射液每日2.0 mg/kg组)和生理盐水对照组各7只,于肝移植瘤块后第11 d开始用药,均腹腔注射,1次/d,连续3 wk,于停药后次日解剖裸鼠,完整剥取肝移植瘤,100 g/L甲醛固定,石蜡包埋,切片,二甲苯中脱蜡,高温高压组织抗原修复,按说明滴加一抗和二抗,DAB显色,苏木素复染,中性树胶封固,镜检.采用已知阳性切片作阳性对照,用PBS代替一抗作阴性对照.观察裸鼠人肝癌转移模型肝移植瘤表达VEGF基因蛋白的情况.阳性判断标准:以胞质呈棕黄色为阳性细胞.表达情况根据细胞染色强度(A)和染色细胞所占面积(B)二者积分之积来判断.染色强度积分为:不染色=0,轻度染色(浅黄色)=1,中度染色(棕黄色)=2,强染色(棕褐色)=3;染色面积分为:小于25%细胞染色=1,大于或等于25%细胞染色=2.若两种积分之积(A × B)大于2,则为表达阳性,小于或等于2则为表达阴性.CD34所表达的MVD的计数方法:采用Weidner的校正技术,先在低倍镜(100倍)下寻找新生血管最密集区即“热点”(hotspot),然后在高倍镜下(200倍)观察被染成棕黄色或棕褐色的新生血管数目及分布情况.

统计学处理 应用SPSS10.0统计软件进行相关资料

处理, 统计变量以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用 t 检验和  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  表示有显著性差异;  $P < 0.01$  表示有非常显著性差异。

## 2 结果

**2.1 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 ECV304 细胞生长的影响** As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 ECV304 细胞有显著的抑制作用, 各剂量组随着作用时间的延长, 其抑制作用增强, 特别是 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1 mg/L 组差异显著 ( $P < 0.05$ ); 相同时间、不同浓度, 除 24 h 和 48 h As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1 mg/L 组与 2 mg/L 组、2 mg/L 组与 4 mg/L 组差异不显著外, 其余均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 但与阳性对照组 5-Fu 比较, 相同时间与相应浓度其抑制率低于 5-Fu ( $P < 0.01$ , 表 1)。

表 1 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和 5-Fu 对 ECV304 细胞生长的抑制率 ( $\bar{x} \pm s$ , %)

	mg/L	24 h	48 h	72 h
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1	8.0 $\pm$ 3.7	20.9 $\pm$ 1.7	38.0 $\pm$ 3.1
	2	15.7 $\pm$ 0.5	28.2 $\pm$ 3.1	45.3 $\pm$ 1.0
	4	22.9 $\pm$ 3.3	34.7 $\pm$ 3.1	49.5 $\pm$ 1.1
5-Fu	62.5	27.1 $\pm$ 3.7	30.7 $\pm$ 5.6	46.9 $\pm$ 2.1
	125	32.8 $\pm$ 5.5	36.3 $\pm$ 1.6	52.6 $\pm$ 2.0
	250	40.0 $\pm$ 3.3	44.4 $\pm$ 3.2	65.1 $\pm$ 3.9

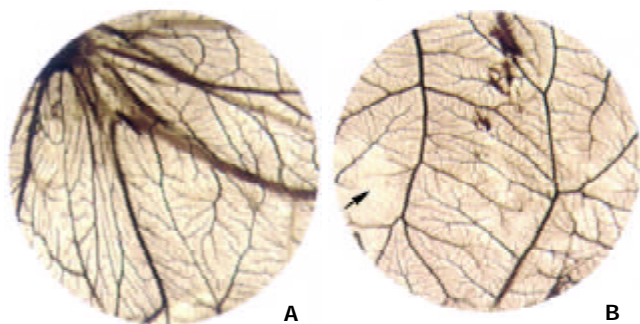


图 1 CAM 新生血管解剖显微镜观察. A: 生理盐水组毛细血管丰富; B: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 40 mg/L 组 CAM 血管形成受到明显抑制。

**2.2 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 CAM 新生血管形成的影响** As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 各个剂量组对 CAM 新生血管的形成均有抑制作用, 用药后新生血管得到完全抑制或明显减少, 而生理盐水对照组 (阴性对照) 则新生血管正常, 毛细血管丰富, 经统计学处理, 用药各组与生理盐水组比较, 均有非常显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 与 人参皂甙 Rg3 250 组比较, 则差异不明显 ( $P > 0.05$ ), 抑制率以 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 40 组为最高, 达 60.0% (表 2, 图 1)。透射电镜观察: 生理盐水对照组见到胚外中胚层间充质细胞向毛细血管分化, 部分新形成的毛细血管腔中可见红细胞, 亦可见单个间充质细胞胞质突起围成的单细胞血管腔。毛细血管内皮细胞结构完整, 未见明显改变。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 40 mg/L 用药后 1 d, 2 d, 血管内皮细胞和间充质细胞的改变与对照组基本相同, 未

见明显改变。用药后 3 d, 部分间充质细胞出现程度不同的退行性改变, 胞膜断裂, 胞质中线粒体嵴消失、空泡化, 出现髓样小体; 毛细血管内皮细胞出现大小不一的空泡; 新生毛细血管内皮细胞空泡化, 线粒体基质电子密度增高, 部分血管壁缺损; 有些单细胞血管芽的细胞核常染色质部分溶解, 胞质内线粒体空泡化 (图 2)。

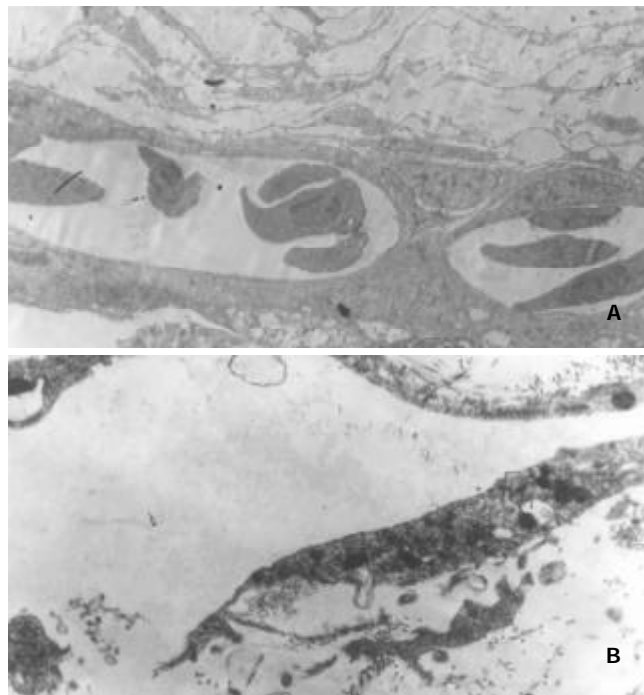


图 2 CAM 新生血管 EM 观察. A: 生理盐水组毛细血管内皮细胞结构完整  $\times 4\ 500$ ; B: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组新生毛细血管内皮细胞空泡化  $\times 10\ 500$ 。

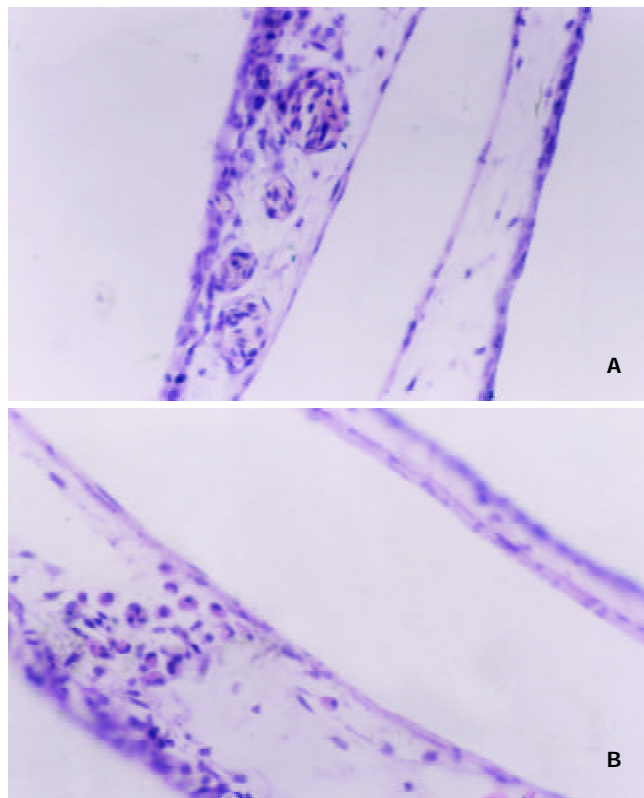


图 3 CAM 接种 SMMC-7721 细胞后新生血管光镜观察  $\times 200$ . A: 生理盐水组新生血管明显增多; B: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组新生血管明显减少。

2.3 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对CAM接种SMMC-7721细胞后新生血管形成的影响 CAM接种7721肿瘤细胞后,生理盐水对照组可见瘤细胞弥漫分布,有些地方呈团状,诱生的新生血管较未接种7721肿瘤细胞组明显增多,而As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>组则肿瘤细胞较少,分布稀疏,新生血管较生理盐水对照组明显为少,说明As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>具有抑制肿瘤细胞诱导新生血管生成的作用(图3)。

表2 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对鸡胚尿囊膜新生血管形成的影响

分组	鸡胚数(个)	剂量(μg/鸡胚)	新生血管			抑制率(%)
			+	++	-	
生理盐水组	20	20 μL	0	0	20	0
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 40 mg/L 组	20	0.8 μg	8	4	8	60.0 <sup>a</sup>
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 20 mg/L 组	20	0.4 μg	7	2	11	45.0 <sup>a</sup>
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 10 mg/L 组	20	0.2 μg	7	1	12	40.0 <sup>a</sup>
Rg3 250 mg/L 组	20	5.0 μg	8	1	11	45.0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P < 0.01 vs 生理盐水组。

2.4 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对裸鼠人肝癌转移模型肝移植瘤表达VEGF的影响 生理盐水组VEGF表达率为83.3%,而As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>高、低剂量治疗组则分别为28.6%和42.9%,经统计学处理有显著性差异(P < 0.05)。免疫组化实验表明,用CD34标记的裸鼠移植瘤血管内皮细胞生理盐水组血管密度较高,血管杂乱无序,而As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>高剂量组及低剂量组则肿瘤血管密度明显低于生理盐水组,血管结构较为规则,血窦样结构少。

### 3 讨论

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>是中药砒霜的主要成分,研究表明该药对肿瘤细胞有一定的细胞毒作用,并可促进和诱导肿瘤细胞凋亡,对APL有突出疗效<sup>[23]</sup>。我们发现该药对肝癌亦有较好的作用,能诱导肝癌细胞凋亡,抑制肝癌细胞端粒酶活性,并有一定的抗肝癌细胞浸润与转移作用<sup>[24-35]</sup>。本结果表明,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>的抗转移作用可能与其有一定的抗肿瘤血管形成作用有关,不同浓度的As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>均能抑制建株人脐静脉内皮细胞ECV304的增生,且其抑制作用与时间和剂量呈一定的相关性,即随着时间的延长,剂量的增加,其抑制作用不断增强。鸡胚尿囊膜的实验显示,无论是正常鸡胚绒毛尿囊膜的血管生长还是接种肿瘤细胞后的血管生长,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>均有较显著的抑制作用,且疗效略优于目前认为有抗肿瘤血管形成作用的国家一类新药人参皂甙Rg3,其机制与As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>能损伤形成血管的原始间充质细胞、使新生毛细血管内皮细胞空泡化等有关,这提示As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>抗肿瘤血管形成作用可能是通过破坏内皮细胞的结构和功能实现的。

VEGF是血管生成因子和相关因子中特异性最强、作用最大的一种。我们选择复旦大学肝癌研究所(原上海医科大学肝癌研究所)孙昉究 et al<sup>[36]</sup>所构建的裸鼠人肝

癌高转移模型LCI-D20为研究对象,观察As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对VEGF基因蛋白表达的影响。该模型转移率高(100%),表现为肝内播散、淋巴结和肺转移,类似于临床肝癌患者,是目前研究人肝癌转移机制及抗转移治疗较为理想的模型。本结果显示,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>能抑制裸鼠肝移植瘤表达VEGF,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>每日2.0 mg/kg组和As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 3.5 mg/kg组表达率分别为42.9%和28.6%,而生理盐水组表达率为83.3%(P均 < 0.05),提示As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>抑制肿瘤血管形成的作用还可能与调节VEGF的表达有关。

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>是我国从传统有毒中药砒霜中自主开发的抗肿瘤新药,自发现该药对肿瘤细胞有诱导分化和促进凋亡作用以来,围绕其抗癌机制进行了大量的研究,特别是抗实体肿瘤的研究目前仍是方兴未艾。本结果提示,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>可作为抗肿瘤血管形成药物用于抗肿瘤治疗,特别是抗肿瘤转移的治疗,但其临床实际疗效如何,尚待进一步验证。

### 4 参考文献

- Gupta MK, Qin RY. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1144-1155
- Zheng S, Han MY, Xiao ZX, Peng JP, Dong Q. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1227-1230
- Xiong B, Sun TJ, Yuan HY, Hu MB, Hu WD, Cheng FL. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:1237-1240
- Du JR, Jiang Y, Zhang YM, Fu H. Vascular endothelial growth factor and microvascular density in esophageal and gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2003;9:1604-1606
- Shi BM, Wang XY, Mu QL, Wu TH, Liu HJ, Yang Z. Angiogenesis effect on rat liver after administration of expression vector encoding vascular endothelial growth factor D. *World J Gastroenterol* 2003;9:312-315
- Sun HC, Li XM, Xue Q, Chen J, Gao DM, Tang ZY. Study of angiogenesis induced by metastatic and non-metastatic liver cancer by corneal micropocket model in nude mice. *World J Gastroenterol* 1999;5:116-118
- Xiong B, Gong LL, Zhang F, Hu MB, Yuan HY. TGFβ1 expression and angiogenesis in colorectal cancer tissue. *World J Gastroenterol* 2002;8:496-498
- Boudreau N, Myers C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res* 2003;5:140-146
- Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2003;3:422-433
- Streit M, Detmar M. Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. *Oncogene* 2003;22:3172-3179
- Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002;29(6 Suppl 16):15-18
- Jain RK. Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol* 2002;29(6 Suppl 16):3-9
- 陈治, 杜钰. 血管内皮细胞特异性受体在肿瘤血管靶向治疗中的应用. *世界华人消化杂志* 2001;9:702-705
- 戚跃勇, 邹利光, 卞修武. 肝癌的血管生成与肝动脉灌注化疗栓塞. *世界华人消化杂志* 2002;10:960-965
- 张燕敏, 邓长生, 朱尤庆, 毛永荣, 张可, 杨院平. 胃腺癌中缺氧诱导因子-1α mRNA表达和血管生成的关系. *世界华人消化杂志* 2002;10:633-637
- Li X, Fu GF, Fan YR, Shi CF, Liu XJ, Xu GX, Wang JJ. Potent inhibition of angiogenesis and liver tumor growth by administration of an aerosol containing a transferrin-liposome-endostatin complex. *World J Gastroenterol* 2003;9:262-266

- 17 Fan YF, Huang ZH. Angiogenesis inhibitor TNP-470 suppresses growth of peritoneal disseminating foci of human colon cancer line Lovo. *World J Gastroenterol* 2002;8:853-856
- 18 Giles FJ. The vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway: a therapeutic target in patients with hematologic malignancies. *Oncologist* 2001;(6 Suppl 5):32-39
- 19 Gu ZP, Wang YJ, Li JG, Zhou YA. VEGF165 antisense RNA suppresses oncogenic properties of human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:44-48
- 20 Baguley BC. Antivascular therapy of cancer: DMXAA. *Lancet Oncol* 2003;4:141-148
- 21 Ellis LM. A targeted approach for antiangiogenic therapy of metastatic human colon cancer. *Am Surg* 2003;69: 3-10
- 22 吴静, 樊代明. 肿瘤血管生成与肿瘤血管抑制治疗. 世界华人消化杂志 2001;9:316-321
- 23 张鹏, 王树叶, 胡龙虎, 邱凤芹, 杨惠芬, 肖彧君, 李晓霞, 韩雪英, 周晋, 刘彭. 三氧化二砷治疗急性早幼粒细胞白血病 7 a 总结 - 附 242 例分析. 中华血液学杂志 2000;21:67-70
- 24 秦叔逵, 陈洪, 陈惠英, 马军, 潘其声, 刘文虎. 三氧化二砷诱导人肝癌细胞株凋亡的初步研究. 临床肿瘤学杂志 1998;3:40
- 25 陈洪, 秦叔逵, 陈惠英, 潘其声, 马军, 刘文虎. 三氧化二砷诱导人肝癌细胞株 SMMC-7721 凋亡的实验研究. 肿瘤防治研究 1998;25:336-338
- 26 刘琳, 秦叔逵, 陈惠英, 陈洪, 刘文虎, 王锦鸿. 三氧化二砷对人肝癌细胞株选择性抑制作用的实验研究. 临床肿瘤学杂志 1999;4:39-41
- 27 陈洪, 秦叔逵, 潘其声, 陈惠英, 马军. 三氧化二砷抗肝癌作用的实验研究. 中华肝脏病杂志 2000;8:27-29
- 28 刘琳, 秦叔逵, 陈惠英, 王锦鸿, 陈洪, 马军, 刘文虎. 三氧化二砷选择性诱导人肝癌细胞凋亡及相关基因的实验研究. 中华肝脏病杂志 2000;8:70-73
- 29 陈惠英, 刘文虎, 秦叔逵. 三氧化二砷对肝癌细胞株凋亡的诱导作用. 世界华人消化杂志 2000;8:532-535
- 30 陈惠英, 王为, 秦叔逵. 三氧化二砷对人肝癌细胞株 VEGF 表达的影响. 临床肿瘤学杂志 2000;5:2
- 31 钱军, 秦叔逵, 何泽明, 王琳, 陈映霞, 邵志坚, 刘秀峰. 三氧化二砷注射液治疗中晚期原发性肝癌的临床研究. 中华肿瘤杂志 2001;23:487-489
- 32 钱军, 秦叔逵, 何泽明, 王琳, 陈映霞, 邵志坚, 刘秀峰. 三氧化二砷治疗中晚期原发性肝癌的临床研究. 中华肝脏病杂志 2001;23:487-489
- 33 Wang W, Qin SK, Chen BA, Chen HY. Experimental study on antitumor effect of arsenic trioxide in combination with cisplatin or doxorubicin on hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:702-705
- 34 苏颖, 陈增, 林可焄, 邹长梭, 林华妹. 三氧化二砷抑制肝癌细胞端粒酶表达及诱导细胞凋亡作用. 世界华人消化杂志 2003;11:264-267
- 35 Wang SS, Zhang T, Wang XL, Hong L, Qi QH. Effect of arsenic trioxide on rat hepatocarcinoma and its renal cytotoxicity. *World J Gastroenterol* 2003;9:930-935
- 36 孙防宪, 汤钊猷, 刘康达, 叶胜龙, 薛琼. 裸鼠人肝癌原位移植转移模型的生长特性及转移潜能. 中华医学杂志 1995;75:673-675

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告: 2002年度世界华人消化杂志 影响因子1.926, WJG 影响因子2.92

本刊讯 中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告: 2002 年度世界华人消化杂志总被引频次 4 151, 影响因子 1.926, 即年指标 0.424, 他引总引比 0.45, 引用刊数 173, 扩散因子 4.2, 被引半衰期 2.99, 国际论文比 0.03, 地区分布数 26, 基金和资助论文比例 0.27.

2002 年度 World Journal of Gastroenterology(WJG) 总被引频次 1633, 影响因子 2.579, 即年指标 0.691, 他引总引比 0.08, 引用刊数 66, 扩散因子 4.0, 被引半衰期 2.43, 地区分布数 24, 基金和资助论文比例 0.67, 国际论文比 0.14.

(世界胃肠病学杂志社 2003-12-27)



# 砷剂对实验性鼠肝癌血管生成的影响

谭兵, 黄介飞, 魏群, 张弘, 倪润洲

谭兵, 黄介飞, 倪润洲, 南通医学院附属医院消化内科 江苏省南通市 226001  
魏群, 张弘, 南通医学院附属医院消化实验室 江苏省南通市 226001  
谭兵, 女, 1976-03-05 生, 河南洛阳市人, 汉族, 1999 年河南医科大学本科毕业, 2003 年南通医学院硕士研究生毕业, 住院医师. 主要从事消化系统疾病的研究.

项目负责人: 黄介飞, 226001, 江苏省南通市西寺路 20 号, 江苏省南通市, 南通医学院附属医院消化内科.

电话: 0513-5806629

收稿日期: 2003-06-13 接受日期: 2003-08-18

## Anti-hepatoma effect and its mechanism of arsenic trioxide on experimental liver cancer

Bing Tan, Jie-Fei Huang, Qun Wei, Hong Zhang, Run-Zhou Ni

Bing Tan, Jie-Fei Huang, Qun Wei, Hong Zhang, Run-Zhou Ni,  
Department of Digestive Medicine, the Affiliated Hospital, Nantong  
Medical College, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Dr. Jie-Fei Huang, 20 Xisi Road, Nantong 226001,  
Jiangsu Province, China.

Received: 2003-06-13 Accepted: 2003-08-18

## Abstract

**AIM:** To study the synergistic anti-hepatoma efficacy of arsenic trioxide ( $As_2O_3$ ) and matrine in the treatment of experimental rat hepatocellular carcinoma (HCC) induced by 2-acetamidofluorene (2-FAA) and to elucidate the possible mechanisms.

**METHODS:** SD rats (2 months old) were fed with 2-FAA for 8 weeks to induce HCC, then treated with  $As_2O_3$  and matrine. On day 29, we weighed the liver and counted liver tumors. The histological changes of the liver were observed under microscope, and the cellular dynamic parameters were studied by flow cytometry. Immunohistochemistry (two-step method) was used to observe the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and to show micro-vessel density (MVD) on consecutive sections. The pathological parameters were analyzed at the same time. The levels of serum AST, ALT, TBI and DBI were also investigated.

**RESULTS:** The number of liver tumors decreased significantly in groups treated with  $As_2O_3$ , especially in middle-dose (1 mg/kg) group ( $P < 0.01$ ). Treatment with  $As_2O_3$  caused HCC cell death via apoptosis. Necrosis was seldomly found and apoptosis was common when the dose was appropriate (1 mg/kg). Proliferation index (PI) decreased sharply in middle-dose (1 mg/kg) group ( $P < 0.01$ ), but not in another (0.2 mg/kg) group ( $P > 0.05$ ). However, S phase fraction (SPF) decreased dramatically in the two groups, it reached the top only when the dose (1 mg/kg) was appropriate ( $P < 0.01$ ), and it was obviously accompanied with accumulation of cells in  $G_0/G_1$  ( $G_0/G_1$  restriction). The inhibitory effects of  $As_2O_3$  on HCC cells were not signifi-

cantly enhanced by matrine. Compared with single treatment with  $As_2O_3$  1 mg/kg or 0.2 mg/kg,  $G_0/G_1$  phase cells in the group of combination treatment with  $As_2O_3$  1 mg/kg or 0.2 mg/kg and matrine 4.2 g/kg did not increased, and apoptotic cells with fractional DNA content did not increased either. The expression of VEGF and MVD was significantly lower in middle-dose (1 mg/kg) group ( $P < 0.01$ ) than that in normal saline group. In comparison with normal saline group, administration of  $As_2O_3$  or/and matrine lowered the levels of AST in serum ( $P < 0.05$ ), but had no effect on the amount of serum AST, TBI and DBI ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Arsenic trioxide inhibits growth of experimental hepatocellular carcinoma in rats induced by 2-acetamidofluorene, but  $As_2O_3$  has no obvious effect on the normal hepatic cells. The mechanisms may involved in decreasing cell mitosis, accumulating cells in  $G_0/G_1$  phase, inducing apoptosis of tumor cells, and having inhibitory effects on the angiogenesis through inhibiting vascular endothelial growth factor. Matrine with  $As_2O_3$  has not significantly synergistic anti-hepatoma effects.

Tan B, Huang JF, Wei Q, Zhang H, Ni RZ. Anti-hepatoma effect and its mechanism of arsenic trioxide on experimental liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):32-37

## 摘要

**目的:** 研究三氧化二砷( $As_2O_3$ )对大鼠体内实验性肝癌的治疗作用及其作用机制.

**方法:** 选择健康成年封闭群♂ SD大鼠(2月龄), 以含0.5 g/L 2-乙酰氨基芴(2-FAA)进行喂饲制备大鼠肝癌模型. 治疗组以两种浓度的  $As_2O_3$  溶液与复方苦参分别注射于大鼠腹腔, 1次/d, 2 wk后改为2次/wk, 总给药时间为4 wk; 同时设生理盐水对照组(NS). 治疗4 wk末处死大鼠, 获取肝脏组织和血清; 称肝湿重; 记录肝表面肿瘤结节分布情况; 肝肿瘤组织HE染色后在光镜下观察肝脏组织形态学变化; 流式细胞仪检测肿瘤细胞动力学变化; 并分别应用VEGF多克隆抗体和FⅧRag多克隆抗体染色的免疫组化方法检测致癌组织的血管内皮生长因子(VEGF)和微血管密度(MVD)表达情况; 并测定血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、谷丙转氨酶(AST)及总胆红素(TBI)和结合胆红素(DBI)水平.

**结果:**  $As_2O_3$  治疗组, 肝肿瘤结节明显少于生理盐水对照组, 尤以中剂量  $As_2O_3$  治疗组表现最为显著( $P < 0.01$ ). 免疫组化显示  $As_2O_3$  治疗组 VEGF 表达强度及相应的 MVD 明显低于生理盐水对照组( $P < 0.001$ ). 复方苦参和生理盐水对照组上述各项指标相比差异无显著性( $P > 0.05$ ). 各治疗组的血清 AST 活性明显低于生理盐水对照组( $P < 0.05$ ), 但各组之



间无显著性差异( $P > 0.05$ ); 血清 ALT、TBI 及 DBi 水平各组之间以及与生理盐水对照组差异均无显著性( $P > 0.05$ ).

结论:  $As_2O_3$  对大鼠肝细胞肝癌生长具有明显抑制作用, 并且对肝功能又无明显毒副作用. 作用机制可能与抑制 VEGF 合成间接抗肿瘤血管形成有关. 复方苦参无明显治疗作用.

谭兵, 黄介飞, 魏群, 张弘, 倪润洲. 砷剂对实验性鼠肝癌血管生成的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(1):32-37

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/32.asp>

## 0 引言

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是消化系统常见的肿瘤<sup>[1-10]</sup>, 其恶性程度高, 预后差<sup>[11-16]</sup>. 近年来, 已证实砷剂(主要成分三氧化二砷,  $As_2O_3$ )可通过诱导肿瘤细胞凋亡达到治疗的目的<sup>[17-22]</sup>, 肿瘤生长、转移依赖于新生血管的形成, 而血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)与肿瘤新生血管的形成有关, 但  $As_2O_3$  对实验性 HCC VEGF 的表达和微血管密度(micro-vessel density, MVD)的影响的研究国内尚未见报道. 我们通过建立大鼠肝癌模型并给予  $As_2O_3$  治疗后分别应用 VEGF 多克隆抗体及 F VIII RAg 多克隆抗体染色的免疫组化方法检测 HCC 的 MVD, 研究  $As_2O_3$  对体内 HCC 的治疗作用及其作用机制.

## 1 材料和方法

1.1 材料 选取 ♂ 封闭群 SD 大鼠(2 月龄)100 只, 体重 140-180 g (由南通医学院实验动物中心提供), 喂饲的颗粒饲料中拌入浓度为 0.5 g/kg 的致癌剂 2-乙酰氨基苄(2-FAA, 购自美国 Sigma 公司), 所有 SD 大鼠均以恒环境饲养. 致癌 3-5 wk 大鼠死亡较多, 其中 4 wk 开始死亡的大鼠尸体解剖均发现肝脏表面有肉眼可见的白色结节, 病理证实呈明显的异型性改变, 并且随造模时间的延长结节数量及大小亦呈增加趋势. 8 wk 末 100 只大鼠仅 50 只存活. 9 wk 开始所有大鼠均喂饲正常颗粒饲料.

1.2 方法 将上述 50 只致癌大鼠按体重大小均衡地分为四组: A 组, 用中剂量  $As_2O_3$  (1 mg/kg)(亚砷酸注射液, 哈尔滨伊达药业有限公司生产)治疗, 按 1:4 与生理盐水的体积稀释后腹腔注射, 1 次/d, 2 wk 后改为 2 次/wk; B 组, 用小剂量  $As_2O_3$  (0.2 mg/kg)治疗; C 组, 应用复方苦参(山西金晶药业有限公司惠赠)治疗, 剂量为 4.2 g/kg 质量, 给药途径和给药时间同上; D 组, 以生理盐水 1.5 ml/kg 质量, 治疗方法同上. 治疗开始后每日观察大鼠用药后情况及反应、每周称体重并按体重变化调整用药剂量.  $As_2O_3$  治疗剂量的选择以  $As_2O_3$  治疗人白血病的剂量为依据(10 mL/d), 按人与大鼠间体表面积折算的等效剂量等值表<sup>[23]</sup>计算得出, 以此为中等剂量(1 mg/kg), 并同时得出小剂量(0.2 mg/kg). 复方苦参剂量的选择根据药理实验小鼠化疗剂量(6.4 g/kg), 按小鼠与大鼠体表面积折算的等效剂量比<sup>[23]</sup>值表计算得出. 治疗满 4 wk

时, 分别处死大鼠, 尽量手术获取肝肿瘤结节, 肿瘤结节固定于 40 g/L 中性甲醛中, 进行形态学和免疫组化检查.

1.2.1 病理组织学检查 取 40 g/L 甲醛液前固定后的肝组织, 再以 150 mL/L 酒精甲醛后固定, 经无水酒精脱水、浸蜡、包埋、机器切片 4  $\mu$ m、烘干、二甲苯脱蜡、蒸馏水洗涤后进行常规 HE 染色. 光镜标本在光镜下观察肝脏组织学变化. 观察肝组织内肿瘤形成情况及细胞凋亡形态学变化, 并用 OLYMPUS BH2BHS-313 显微摄影显微镜进行摄像.

1.2.2 免疫组化检测 分别应用 VEGF 多克隆抗体和 F VIII RAg 多克隆抗体染色的免疫组化方法检测致癌肿瘤组织的 VEGF 和 MVD 表达情况. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)Ab-1 兔多克隆抗体(购自 Neomarkers 公司), 二步法免疫组化检测试剂 PV-9000(北京中山生物技术有限公司). F VIII RAg 多克隆抗体(北京中山生物技术有限公司). 冰冻切片(购自 LEICA CM3050S) (1) VEGF 免疫组化染色 按北京中山生物技术有限公司二步法免疫检测试剂盒的操作步骤执行, 每次染色过程, 均以 PBS 代替一抗作阴性对照, 已知阳性切片作阳性对照. VEGF 以肿瘤细胞胞质内出现棕黄色颗粒为阳性, 参照王影 et al<sup>[24]</sup>标准, 每张切片分别观察 10 个高倍视野(200  $\times$ ), 每个高倍视野计数 100 个细胞的免疫染色阳性细胞数, 计算出每张切片的阳性细胞百分数并分为五个等级, 低于 10% 为阴性(-), 高于或等于 10% 为阳性, 其中 10-25% 为 +, 26-50% 为 ++, 51-75% 为 +++, 76% 以上为 ++++; 再将阳性细胞所占百分比打分: 0 分为小于或等于 10%、1 分为 10-25%, 2 分为 26-50%, 3 分为 51-75%, 4 分为大于或等于 76%. 每张切片有 2 名病理医师双盲观察. (2) MVD 免疫组化染色 按北京中山生物技术有限公司二步法免疫检测试剂盒的操作步骤执行, 每次染色过程, 均以 PBS 代替一抗作阴性对照, 已知阳性切片作阳性对照. MVD 的计数参照 Weidner (Am J Pathol 1995;147:9-15)报道的方法, 先在低倍镜(100  $\times$ )下观察切片以确定肿瘤内血管密度最高处为检测区, 再在高倍镜(400  $\times$ , 0.1885 mm<sup>2</sup>/视野)下, 以与周围肿瘤细胞和结缔组织成分明显区分的任何一个棕黄色染色的内皮细胞或幼稚内皮细胞(核不规则或无)形成的或细胞丛作为“一个血管”, 只要结构不相连, 其分支结构也作为“一个血管”计数, 有肌层及明显管腔的血管均不计数. 记录 3 个视野内的微血管数, 取其平均数作为标本的 MVD 值.

1.2.3 血清酶学检查血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性测定 采用 2, 4 二硝基苯胺显色法(赖式法)检测. 主要试剂: 丙氨酸氨基转移酶(ALT)测定试剂盒(购自上海玉兰生物技术研究). 血清谷丙转氨酶(AST)活性测定: 采用比色法检测. 主要试剂: 谷丙转氨酶测定试剂盒(购自上海玉兰生物技术研究). 血清总胆红素和结合胆红素测

定采用卫生部临检中心推荐方法(J-G法). 主要试剂: 血清总胆红素和结合胆红素测定试剂盒(购自上海玉兰生物技术有限公司).

统计学处理 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 EXCEL 和 STATA7.0 统计分析软件进行数据处理, 采用单因素方差分析等,  $P < 0.05$  被认为差异具有显著性.

## 2 结果

在中剂量三氧化二砷治疗的第 1 wk, 有个别 SD 大鼠有一过性呼吸急促、心跳加快, 四肢末梢紫绀, 约 6 h-1 d 后自行恢复. 另外各治疗组及对照组腹腔注射的局部出现皮肤硬结, 每天更换腹腔注射部位可避免皮肤硬结的形成.

2.1 形态学改变 致癌大鼠的肝脏与正常大鼠相比较, 颜色偏灰白, 肝脏质地变硬, 切面结节内偶有出血坏死; 体积和重量均明显增加, 肝表面呈多发结节样改变, 大小不一, 直径多在 1-6 mm 之间, 其中生理盐水对照组有一个结节直径达 9 mm; 部分肝叶上结节呈弥漫分布, 生理盐水对照组中表面弥漫分布的结节多为粗颗粒状, 且累及叶数多; 相比而言,  $As_2O_3$  治疗组中结节弥漫分布于肝叶的数量少, 范围小, 且多呈细颗粒状; 其他各组界于二者之间(表 1).

表 1 肝脏表面肿瘤结节数量的变化

分组	n	直径 2-4 mm 结节数 (平均结节数/只)	直径 >4 mm 结节数 (平均结节数/只)	弥漫性分布肝叶数 (平均肝叶数/只)
A 组	8	0 (0)	1 (0.13)	0 (0)
B 组	9	50 (5.56)	9 (1.00)	17.5 (1.94)
C 组	8	137 (15.22)	13 (1.44)	29 (3.22)
D 组	8	223 (24.78)	49 (5.44)	39 (4.33)

在治疗 4 wk 末, A 组有 5 只大鼠肝脏表面未找到肉眼可见的结节, D 组有 3 只大鼠肝脏表面未找到肉眼可见的结节, 而同期生理盐水对照组肝脏表面均见有结节分布, 可见弥漫分布于肝叶的结节, 仅 1 只大鼠肝结节呈散在分布(图 1、2). 各治疗组治疗 4 wk 末, A 组大鼠肝表面肿瘤结节数及弥漫性分布肝叶数与 B、C 组相比差异具有显著性( $P < 0.05$ ), B 组与 C 组相比差异无显著性( $P > 0.05$ ), A 组与 F 组相比差异具有极显著性( $P < 0.01$ ). 各组 2-FAA 致癌的 SD 大鼠肝脏组织显微镜下可见肝细胞变性, 卵圆细胞增生, 汇管区炎症细胞浸润、结缔组织增生, 有大小不等的再生结节和癌巢结节形成. 其中生理盐水对照组有较广泛炎症细胞浸润和假小叶形成, 肝细胞癌变形成较多的癌巢结节. A 组治疗组病理改变明显轻, 汇管区炎症细胞浸润少、再生结节相对较多, 部分细胞出现异型性改变, 但癌巢结节少或偶见(图 3). 治疗组中部分肝癌细胞呈现凋亡特征, 凋亡细胞与周围细胞分离, 呈圆形或卵圆形, 胞膜完

整, 核染色质固缩、边集或碎裂, 形成大小不等的胞内小体, 胞质皱缩, 嗜酸性增加, 周围无炎症细胞浸润(图 4). 复方苦参治疗组病理改变界于二者之间.

## 2.2 免疫组化检测结果

2.2.1 VEGF 表达的分布及强度 A 组 8 例中 VEGF 表达阳性 4 例(4/8, 50%), 多为 +, 4 例阴性(图 7、8), 积分与 D 组相比有显著性差异( $P < 0.05$ ), 但与其他各组相比差异无显著性( $P > 0.05$ ); 在生理盐水对照组则全部阳性, 多为 ++ - +++(图 9、10); 其他各组界于二者之间, 各组之间及与 D 组相比无显著性差异( $P > 0.05$ , 表 2). 阳性表达的癌细胞多见于浸润到间质的癌巢中, 呈灶性或弥漫分布. 在组织附近的血管内皮细胞也可见阳性反应.

表 2 VEGF、MVD 表达强度

分组	n	VEGF					积分	MVD
		-	+	++	+++	++++		
A	8	4	3	1	0	0	$0.63 \pm 0.74^a$	$15.75 \pm 3.99^{bd}$
B	9	1	5	2	1	0	$1.33 \pm 0.87$	$28.22 \pm 9.28^b$
C	8	1	1	3	3	0	$2.00 \pm 1.07$	$41.13 \pm 7.70$
D	8	3	4	0	1	0	$2.44 \pm 0.88$	$47.44 \pm 13.41$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  <sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs D 组; <sup>a</sup> $P < 0.01$ , vs C 组.

2.2.2 MVD 的检测结果 F VIII RAg 免疫染色定位于肝癌组织中微血管内皮细胞. 癌区组织中微血管形态不规整, 分布不均, 癌灶边缘血管最密集, 呈簇状, 部分呈分芽状(图 11、12).  $As_2O_3$  治疗 4 wk 后, 肝组织中微血管管腔相对规则, 中剂量  $As_2O_3$  治疗组所得组织中则分布较少而均匀. 除 C 组差异无显著性( $P > 0.05$ )外, 其他各组均明显低于生理盐水对照组( $P < 0.001$ ); A 和 B 组、B 和 C 组( $P > 0.05$ ); A 极显著低于 C 组( $P < 0.001$ ), E 组也较 C 组明显低下( $P < 0.001$ , 表 2).

2.3 肝功能改变情况 在 4 wk 的治疗过程中, 各治疗组与生理盐水对照组相比, ALT, TBI, DBI 的差异均无显著性( $P > 0.05$ ), AST 均低于生理盐水对照组( $P < 0.05$ ), AST, ALT, TBI, DBI 在各治疗组差异均无显著性( $P > 0.05$ , 表 3).

表 3 AST、ALT、TBI、DBI 的变化( $\bar{x} \pm s$ )

分组	AST( $\mu$ L)	ALT( $\mu$ L)	TBI( $\mu$ mol/L)	DBI( $\mu$ mol/L)
A 组	$61.46 \pm 9.46^a$	$31.65 \pm 9.25$	$0.52 \pm 0.11$	$0.35 \pm 0.15$
B 组	$63.75 \pm 20.40^a$	$34 \pm 12.58$	$0.62 \pm 0.27$	$0.40 \pm 0.24$
C 组	$61.18 \pm 13.00^a$	$33.45 \pm 16.44$	$0.51 \pm 0.14$	$0.30 \pm 0.12$
D 组	$108.98 \pm 29.86$	$40 \pm 16.12$	$0.47 \pm 0.13$	$0.60 \pm 0.28$

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs D 组.

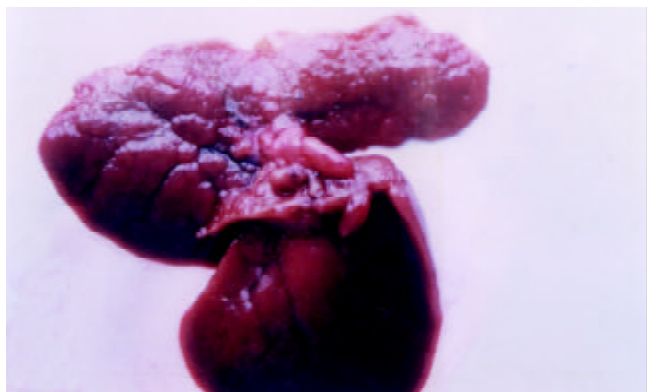


图1 实验4 wk 末生理盐水对照组肝脏大体观.

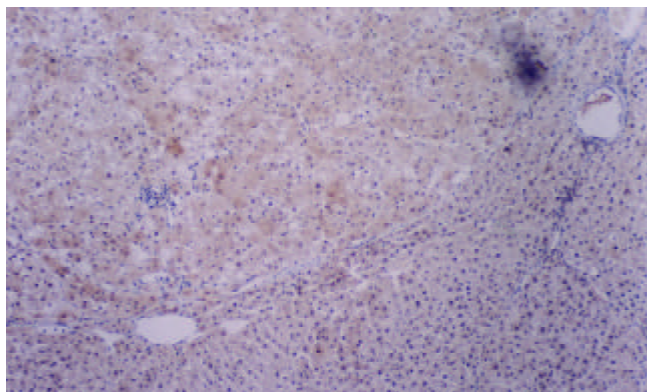


图5 实验4 wk 末生理盐水对照组 VEGF 强阳性表达( $\times 10$ ).

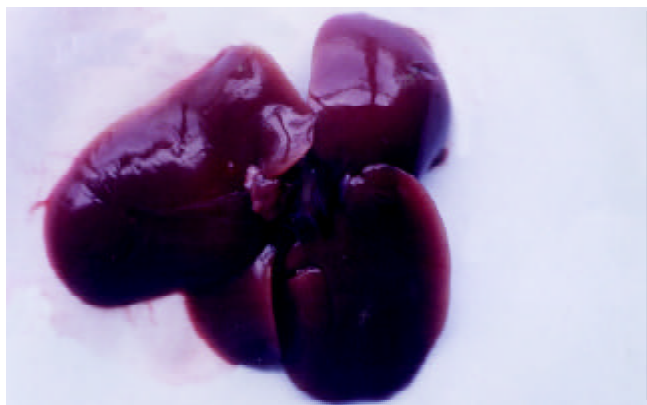


图2 实验4 wk 末中剂量三氧化二砷治疗组肝脏大体观.

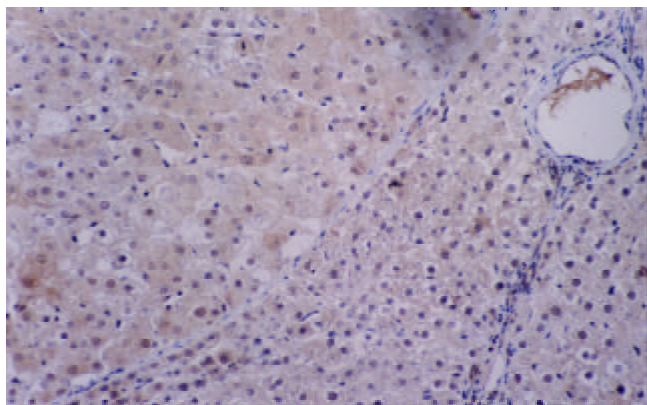


图6 实验4 wk 末生理盐水对照组 VEGF 强阳性表达( $\times 20$ ).

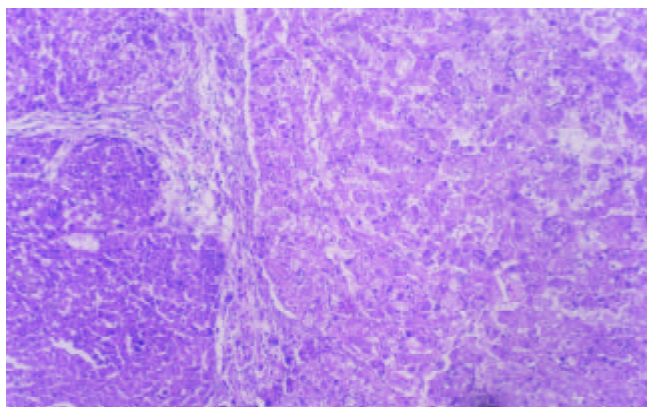


图3 实验4 wk 末生理盐水对照组的组织学改变(HE $\times 10$ ).

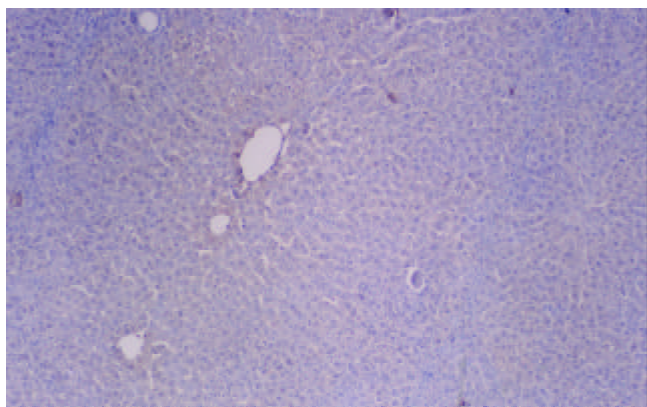


图7 实验4 wk 末中剂量三氧化二砷治疗组 VEGF 弱阳性表达( $\times 10$ ).

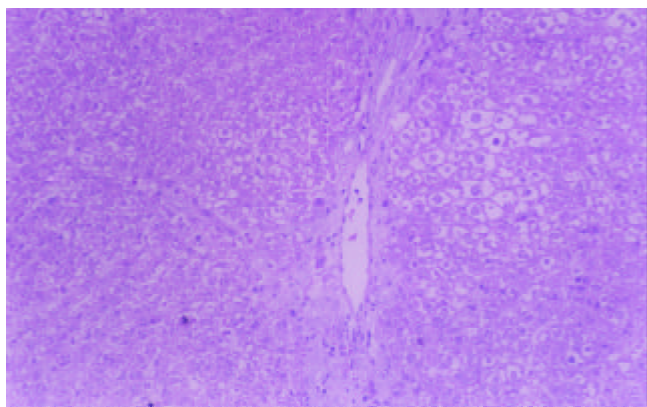


图4 实验4 wk 末中剂量三氧化二砷治疗组的组织学(HE $\times 10$ ).

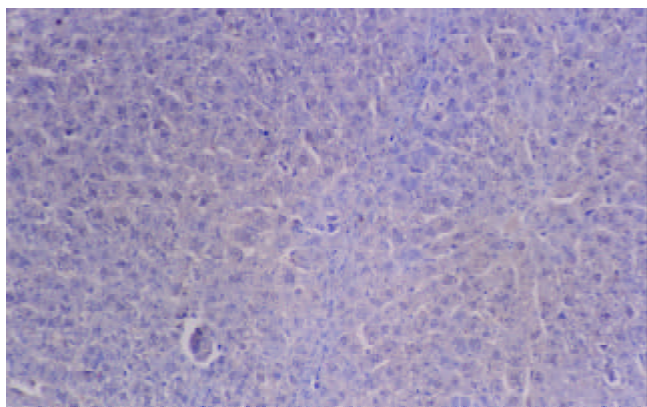


图8 实验4 wk 末中剂量三氧化二砷治疗组 VEGF 弱阳性表达( $\times 20$ ).



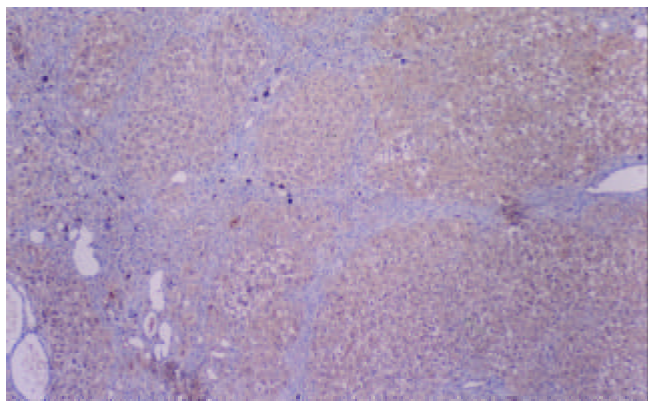


图9 实验4 wk末生理盐水对照组 FVIIIIRAg 强阳性表达( $\times 10$ ).

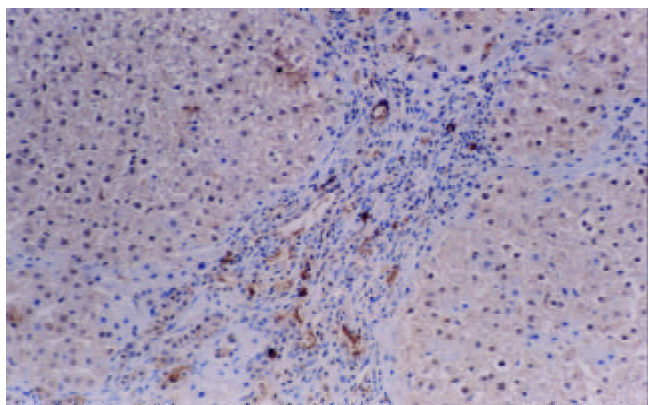


图10 实验4 wk末生理盐水对照组 FVIIIIRAg 强阳性表达( $\times 20$ ).

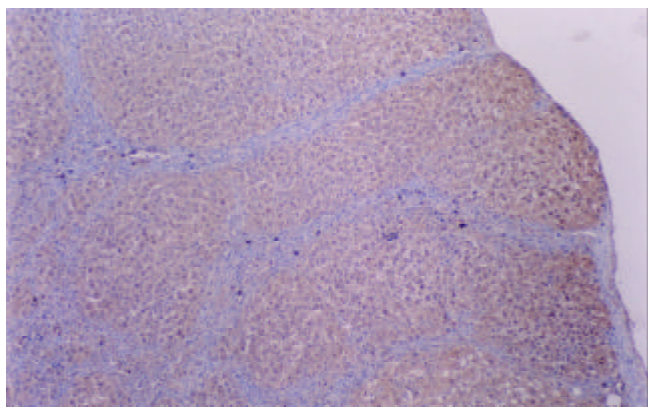


图11 实验4 wk末中剂量三氧化二砷治疗组 FVIIIIRAg 弱阳性表达( $\times 10$ ).

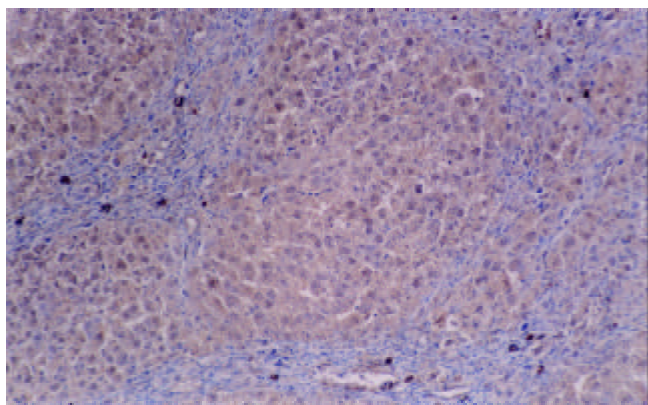


图12 实验4 wk末中剂量三氧化二砷治疗组 FVIIIIRAg 弱阳性表达( $\times 20$ ).

### 3 讨论

对于不能手术切除的 HCC 的药物治疗的有关报道很多,治疗效果都不太理想,常由于严重的毒副作用,患者耐受性差.目前认为血管生成与实体肿瘤的发生、发展有着密切联系.从血管新生的角度探讨肿瘤的发生和发展规律,将有可能阐明肿瘤的发病机制,并为肿瘤的治疗开辟新的途径. HCC 与所有实体肿瘤一样,肿瘤细胞旺盛的代谢、增生需要充足的血液供应,肿瘤新生血管形成与肿瘤发生、发展及预后密切相关.肿瘤血管生成是一个非常复杂的过程,他是有多多种血管生成因子(包括正、负调节因子)间相互协调的结果.目前,已识别的新生血管形成因子较多, VEGF 是其中最重要的一种,他能增加血管通透性,促进内皮细胞增生,对活体血管形成有强烈的诱发作用.在肿瘤的生长过程中,肿瘤细胞分泌血管生长因子的急剧增加,能够显著增加肿瘤血管形成,加速肿瘤演进过程,表现出转移特征<sup>[25, 26]</sup>.实验从 VEGF 和 MVD 的检测结果可以看出经中剂量  $As_2O_3$  作用后 VEGF 和 MVD 的表达强度均明显减弱,即表明  $As_2O_3$  能通过抑制 VEGF 合成间接抗肿瘤血管形成,以中剂量  $As_2O_3$  治疗组降低为著.本实验还表明单用复方苦参对 HCC 无明显抑制 VEGF 合成间接抗肿瘤形成作用.

本实验中  $As_2O_3$  对大鼠形态学上改变亦能用其在细胞动力学方面的作用得到合理解释.大体观察发现  $As_2O_3$  治疗组肝脏表面平均结节数及平均弥漫分布肝叶数少于生理盐水对照组,以中剂量  $As_2O_3$  治疗组表现为著.我们发现,各治疗组的 HCC 大鼠血清 AST 活性低于生理盐水对照组,各组 HCC 大鼠血清 ALT 活性差异无显著性,说明  $As_2O_3$  和复方苦参对肝细胞无明显毒副作用.

总之,人们对  $As_2O_3$  的抗肿瘤作用机制的认识已进入一个崭新的阶段.  $As_2O_3$  因其对 HCC 增生的有效抑制以及诱导凋亡的作用,又可通过抑制 VEGF 合成间接抗肿瘤血管形成,加之中剂量又无明显的毒副作用,故有望成为治疗 HCC 的一个依从性较好的有效药物,这为肝癌的综合治疗有开辟了一个新的领域.

### 4 参考文献

- 1 Tang YW, Yao XX. Regulating effect of HCC cells on the activation of stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9: 202-204
- 2 Cui J, Yang DH, Qin HR. Mutation and clinical significance of *c-fms* oncogene in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:392-395
- 3 Cheng H, Liu YF, Zhang HZ, Shen WA, Zhang SZ. Construction and expression of anti-HCC immunotoxin of sFv-TNF- $\alpha$  and GFP fusion proteins. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9: 640-644
- 4 Jiang YG, Wang YM, Li QF. Expression significance of HLA-DR antigen and heat shock protein 70 in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1139-1142
- 5 Su YH, Zhu SN, Lu SL, Gu YH. HCV genotypes expression in hepatocellular carcinoma by reverse transcription *in situ* polymerase chain reaction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8: 874-878

- 6 Zhai SH, Liu JB, Liu YM, Zhang LL, Du ZP. Expression of HBsAg, HCV-Ag and AFP in liver cirrhosis and hepatocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000; 8:524-527
- 7 Fu JM, Yu XF, Shao YF. Telomerase and primary liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:461-463
- 8 Lee JH, Ku JL, Park YJ, Lee KU, Kim WH, Park JG. Establishment and characterization of four human hepatocellular carcinoma cell lines containing hepatitis B virus DNA. *World J Gastroenterol* 1999;5:289-295
- 9 Worman HJ, Lin F, Mamiya N, Mustacchia PJ. Molecular biology and the diagnosis and treatment of liver diseases. *World J Gastroenterol* 1998;4:185-191
- 10 He XX, Wang JL. The current status and prospect in the gene therapy of liver cancer. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:158-159
- 11 Yang LJ, Wang WL. Preparation of monoclonal antibody against apoptosis-associated antigens of hepatoma cells by subtractive immunization. *World J Gastroenterol* 2002;8:808-814
- 12 Wang FS, Liu MX, Zhang B, Shi M, Lei ZY, Sun WB, Du QY, Chen JM. Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells in vitro and *In vivo*. *World J Gastroenterol* 2002;8:464-468
- 13 Zhang G, Long M, Wu ZZ, Yu WQ. Mechanical properties of hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:243-246
- 14 Sun ZJ, Pan CE, Liu HS, Wang GJ. Anti-hepatoma activity of resveratrol *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2002;8:79-81
- 15 Liu WW. Etiological studies of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:93-95
- 16 程虹, 刘彦仿, 张惠中, 沈万安, 张菊, 张静. 抗肝癌单链免疫毒素基因修饰的 PBMCs 在动物体内的抑瘤作用. *世界华人消化杂志* 2003;11:708-711
- 17 陈惠英, 刘文虎, 秦叔逵. 三氧化二砷对肝癌细胞株凋亡的诱导作用. *世界华人消化杂志* 2000;8:532-535
- 18 刘连新, 姜洪池, 朱安龙, 周津, 王秀琴, 吴昊. 三氧化二砷对肝癌细胞凋亡的诱导及机制的探讨. *中华医学杂志* 2001;18:1526-1527
- 19 张恂, 王绍山, 齐清会. 砷剂作用下大鼠肝癌的形态学及细胞动力学变化. *肿瘤* 2001;21:101-105
- 20 刘琳, 秦叔逵, 陈惠英, 王锦鸿, 陈洪, 马军, 刘文虎. 三氧化二砷选择性诱导人肝癌细胞凋亡及相关基因的实验研究. *中华肝脏病杂志* 2000;8:367-369
- 21 陈洪, 秦叔逵, 潘麒麟, 陈惠英, 马军. 三氧化二砷抗肝癌作用的实验研究. *中华肝脏病杂志* 2000;8:27-29
- 22 苏颖, 陈增, 林可焯, 邹长梭, 林华妹. 三氧化二砷抑制肝癌细胞端粒酶表达及诱导细胞凋亡作用. *世界华人消化杂志* 2003;11:264-267
- 23 孙瑞元. 定量药理学. 第1版. 北京:人民卫生出版社, 1987:245
- 24 王影, 杨素琼, 王在国, 覃胜, 刘光中. 原发性肝细胞癌中 ras p21, C-erbB-2 和 p16 蛋白的表达意义. *世界华人消化杂志* 1999;7:207-209
- 25 Zagzag D. Angiogenic growth factors in neural embryogenesis and neoplasia. *Am J Pathol* 1995;146:293-309
- 26 Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/Vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-1039

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## World Journal of Gastroenterology 获得2002年度百种中国杰出学术期刊

本刊讯 期刊的学术质量是一个综合指标, 1999 年中国科技信息所研制了中国科技期刊综合指标评价体系, 该指标体系已应用于中国科协一年一度的期刊择优资助工作中. 综合指标评价体系是根据期刊的多项重要指标, 如被引总频次、影响因子、即年指标、基金论文比、他引总引比、扩散因子等, 对期刊分学科进行综合打分. 通过对中国科技论文与引文数据库收录的科技期刊进行综合评定, 今年中国科学技术信息研究所评出了第二届中国百种杰出学术期刊. World Journal of Gastroenterology 荣获 2002 年度百种中国杰出学术期刊称号.

(世界胃肠病学杂志 2003-12-27)

# 肝癌患者不同剂量化疗药物经导管动脉化疗栓塞后肝功能的变化

卢伟, 李彦豪, 何晓峰, 陈勇, 赵剑波

卢伟, 李彦豪, 何晓峰, 陈勇, 赵剑波, 中国人民解放军第一军医大学南方医院介入治疗科 广东省广州市 510515  
卢伟, 男, 1967-02-02 生, 江西波阳人, 汉族. 1989 年江西医学院本科毕业, 1997 年和 2002 年在第一军医大学分别获得硕士和博士学位, 主治医师, 讲师. 主要从事肿瘤和外周血管的介入诊疗研究.  
广东省科技计划项目, No.2KB0461S  
项目负责人: 李彦豪, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学附属南方医院介入治疗科. liyanhao@fimmu.com  
电话: 020-61642084 传真: 020-61642082  
收稿日期: 2003-06-26 接受日期: 2003-07-24

## Changes of liver function after transcatheter arterial chemoembolization with use of different dose of anticancer drugs in hepatocellular carcinoma

Wei Lu, Yan-Hao Li, Xiao-Feng He, Yong Chen, Jian-Bo Zhao

Wei Lu, Yan-Hao Li, Xiao-Feng He, Yong Chen, Jian-Bo Zhao, Department of Interventional Radiology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China  
Supported by Science and Technique Program of Guangdong Province, No.2KB0461S  
Correspondence to: Dr. Yan-Hao Li, Department of Interventional Radiology, Nanfang Hospital, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China. liyanhao@fimmu.com  
Received: 2003-06-26 Accepted: 2003-07-24

## Abstract

**AIM:** To study the damage to liver function after transcatheter arterial chemoembolization (TACE) with use of low-dose and conventional-dose of anticancer drugs in patients with hepatocellular carcinoma (HCC).

**METHODS:** One hundred and twelve patients with unresectable HCC were randomly divided into two groups to receive superselective TACE. Patients in group A ( $n=52$ ) received low-dose anticancer drugs: 2-4mg mitomycin C (MMC) was used when the tumor was less than 5cm in size, while 4-6 mg MMC and 10 mg epirubicin (EPI) were given if tumors were between 5 cm and 8cm in diameter, and 6-8 mg MMC, 10 mg EPI and 100 mg CBP were employed when tumors were larger than 8 cm. Patients in group B ( $n=60$ ) were given conventional-dose of anticancer drugs (10 mg MMC, 40 mg EPI and 300 mg CBP). Lipiodol-anticancer-drugs emulsion was injected into the feeding arteries of tumors followed by gelfoam or polyvinyl alcohol (PVA) particles embolization. Liver function was evaluated with Child-Pugh scores, total bilirubin levels (TBIL), albumin (ALB) and alanine aminotransferase (ALT) before TACE, 3 days, one-week and 4 weeks after procedures.

**RESULTS:** There was no significant difference between groups A and B in all baseline parameters (Child-Pugh

scores, TBIL, ALT and ALB) before TACE ( $t=0.722, 0.962, 0.725$  and  $0.872$  respectively,  $P>0.05$ ). In group A, Child-Pugh scores, TBIL and ALT increased significantly 3 days after TACE ( $t=5.319, 6.707$  and  $7.355$  respectively,  $P<0.01$ ) and significant difference were exhibited between baseline and parameters 1 wk after TACE ( $t=2.243, 4.774$  and  $2.568$  respectively,  $P<0.05, P<0.01$  and  $P<0.05$  respectively). ALB was found significant decrease 3 days and 1 wk after TACE in group A ( $t=2.704$  and  $7.120$  respectively,  $P<0.01$ ). The difference between the parameters obtained 4 weeks after the procedure and baseline parameters was not significant in group A ( $t=1.890, 0.167, 0.396$  and  $1.273$  respectively,  $P>0.05$ ). In group B, statistical differences exhibited between the four baseline parameters and those 3 d after TACE ( $t=8.859, 8.203, 9.820$  and  $3.463$  respectively,  $P<0.01$ ), and baseline parameters versus those 1 wk after the procedures ( $t=4.645, 6.774, 8.747$  and  $9.798$  respectively,  $P<0.01$ ). The difference between the parameters (Child-Pugh scores, TBIL, ALB) obtained 4 weeks after TACE and baseline parameters was significant ( $t=2.603, 2.361, 8.881$ ;  $P<0.05, P<0.05, P<0.01$  respectively), while no significant difference was observed in ALT ( $t=1.596, P>0.05$ ).

**CONCLUSION:** Superselective TACE with use of low-dose anticancer drug(s) induces transient impairment to liver function, but it can cause lasting, more serious worsening of liver function with use of conventional-dose of anticancer drugs.

Lu W, Li YH, He XF, Chen Y, Zhao JB. Changes of liver function after transcatheter arterial chemoembolization with use of different dose of anticancer drugs in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):38-41

## 摘要

**目的:** 探讨肝癌患者经导管肝动脉栓塞术(TACE)中化疗药物用量对肝功能的影响。

**方法:** 112 例肝癌患者随机分为两组行选择性 TACE, A 组 ( $n=52$ ) 给予小剂量化疗药物: 肿瘤直径小于 5cm 者给予丝裂霉素(MMC) 2-4 mg; 在 5-8 cm 之间者给予 MMC 4-6 mg, 表阿霉素(EPI) 10 mg; 大于 8 cm 者给予 MMC 6-8 mg, EPI 10 mg, 卡铂(CBP) 100 mg; B 组 ( $n=60$ ) 给予常规剂量化疗药物(丝裂霉素 10 mg, 卡铂 300 mg, 表阿霉素 40 mg)。经导管向供血动脉内注入碘油-化疗药物乳化剂, 随后用明胶海绵粒或聚乙烯醇(PVA)微球栓塞供血动脉。TACE 术前、术后 3d、1 wk、4 wk 分别行肝功能检查, 比较总胆红素(TBIL)、白蛋白(ALB)、谷丙转氨酶(ALT)及 Child-Pugh 评分的变化情况。



结果: 两组术前各指标(Child 评分、TBIL、ALT、ALB)均无显著差异( $t$  值分别为 0.722、0.962、0.725 和 0.872,  $P$  均 $>0.05$ )。A 组术后 3 d, Child 评分、TBIL、ALT 均显著升高( $t$  值分别为 5.319、6.707、7.355,  $P$  均 $<0.01$ )。A 组术后 1 wk, Child 评分、TBIL、ALT 与术前比较有显著差异( $t$  值分别为 2.243、4.774、2.568,  $P$  分别 $<0.05$ ,  $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ )。A 组术后 3 d 和 1 wk, ALB 较术前显著下降( $t$  为 2.704 和 7.120,  $P$  均 $<0.01$ )。术后 4 wk, A 组所有参数均与术前没有显著差异( $t$  值分别为 1.890、0.167、0.396 和 1.273,  $P$  均 $>0.05$ )。B 组术后 3 d 和 1 wk, Child 评分、TBIL、ALT 和 ALB 与术前相比均显著差异( $t$  值分别为 8.859、8.203、9.820、3.463 和 4.645、6.774、8.747、9.798,  $P$  均 $<0.01$ )。术后 4 wk, B 组除 ALT 与术前没有显著性差异( $t = 1.596$ ,  $P > 0.05$ )外, Child-Pugh、TBIL 和 ALB 仍与术前有显著差异( $t$  分别为 2.603、2.361、和 8.881,  $P$  分别 $<0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

结论: HCC 超选择 TACE 中, 使用小剂量化疗药物引起短暂的、一过性肝功能损害, 而应用常规剂量化疗药物可导致更为持久、严重的肝功能损害。

卢伟, 李彦豪, 何晓峰, 陈勇, 赵剑波. 肝癌患者不同剂量化疗药物经导管动脉化疗栓塞后肝功能的变化. 世界华人消化杂志 2004;12(1):38-41  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/38.asp>

## 0 引言

众所周知, 肝动脉 TACE 在控制肿瘤生长的同时, 又不可避免地带来肝功能的损伤。尽管许多患者 TACE 后肝功能损伤是短暂的, 短期内(4 wk)可以恢复到术前水平, 但仍有相当多的患者出现不可逆肝功能损伤, 少数甚至出现急性肝功能衰竭, 尤其经过多次 TACE 后肝功能损伤明显, 肝硬化加重, 许多患者最终死于肝衰竭或肝硬化的并发症<sup>[1]</sup>。经导管动脉内化疗栓塞(TACE)中使用小剂量化疗药物, 可取得很好的疗效<sup>[2, 3]</sup>。为了进一步减少肝功能损害, 提高患者远期疗效, 我们研究小剂量化疗药物 TACE 旨在比较 TACE 中使用小剂量和常规剂量化疗对肝功能的影响。

## 1 材料和方法

1.1 材料 肝癌患者 112 例, 男 107 例, 女 5 例。平均年龄 49.6 (20-76) 岁。其中经手术病理或穿刺细胞学证实者 39 例, 其余均经症状、体征、AFP、增强 CT 或 MRI、动脉造影诊断。肝功能: Child A 级 96 例, B 级 16 例。病期 Okuda I 87 例, II 25 例。摒除小肝癌或可以通过手术切除的患者、肝功能严重异常如 Child 分级 C 级或 Okuda III 期的患者。

1.2 方法 动脉造影后随机分两组行肝动脉 TACE 治疗, A 组( $n = 52$ )给予小剂量化疗药物: 肿瘤直径小于 5 cm 者给予丝裂霉素(MMC) 2-4 mg; 在 5-8 cm 之间者给予 MMC 4-6 mg, 表阿霉素(EPI) 10 mg; 大于 8 cm 者给予 MMC

6-8 mg, EPI 10 mg, 卡铂(CBP) 100 mg; B 组( $n = 60$ )给予常规剂量化疗药物(MMC 10 mg, CBP 300 mg, EPI 40 mg)。均超选择插管至肿瘤供血动脉(必要时使用微导管)内注入碘油-化疗药物乳化剂, 必要时再用明胶海绵或聚乙烯醇(PVA)微球做供血动脉栓塞直到动脉血流停滞。是否再次行 TACE 治疗根据 CT, AFP 和肝功能检查。两组患者一般情况、栓塞方法、碘油用量以及治疗次数, 二者间一般资料和治疗措施没有明显差异, 具有可比性(表 1)。TACE 术前、术后 3 d、1 wk、4 wk 分别行肝功能检查, 包括总胆红素(TBIL)、白蛋白(ALB)、谷丙转氨酶(ALT)、凝血酶原时间(PT)等, 并根据 TBIL, ALB, PT 腹水和脑病情况评定 Child-Pugh 分级和评分, 比较两组患者 TACE 前后各时间点肝功能变化情况, 以及两组间治疗前、后的差别。

表 1 HCC 患者 112 例的基本情况

项目	小剂量组( $n = 52$ )	常规剂量组( $n = 60$ )
性别(男/女)	50/2	57/3
年龄(岁)	48.5 $\pm$ 11.4	50.6 $\pm$ 12.3
肿瘤大小(cm)	8.29 $\pm$ 2.97	8.42 $\pm$ 2.76
肿瘤数目(单个/多个)	47/5	54/6
Child-Pugh 分级(例)		
(A/B/C)	47/5/0	54/6/0
Okuda 分期(例)		
(I / II / III)	43/9/0	48/12/0
总胆红素( $\mu\text{mol/l}$ )	16.89 $\pm$ 7.38	17.78 $\pm$ 6.83
白蛋白(g/l)	36.95 $\pm$ 4.82	37.52 $\pm$ 3.87
门脉分支癌栓(有/无)	48/4	55/5
AFP(正常/升高)	8/44	13/47
碘油用量/次(ml)	11.6 $\pm$ 4.9	10.7 $\pm$ 5.5
栓塞物(PVA/GF)	36/16	40/20
平均栓塞次数(次)	2.05 $\pm$ 0.97	2.12 $\pm$ 0.76

## 2 结果

肝癌患者 112 例共行 234 次 TACE 治疗(42 例经过 1 次治疗, 37 例 2 次, 19 例 3 次, 9 例 4 次, 5 例 5 次)。两组术前肝功能各指标(Child 评分、TBIL、ALT、ALB)均无显著差异( $t$  值分别为 0.722、0.962、0.725 和 0.872,  $P$  均 $>0.05$ )。表 2 所示两组 TACE 前后各指标的变化情况。小剂量组(A 组)TACE 后 3d Child-Pugh 评分明显升高, 由术前的 5.8  $\pm$  1.1 升至 7.0  $\pm$  1.6, 二者比较差异有显著性( $t = 5.319$ ,  $P < 0.01$ )。术后 1 wk 后 Child-Pugh 评分明显下降, 术后 4 wk 基本恢复到术前水平( $t = 1.890$ ,  $P > 0.05$ )。常规剂量组(B 组)TACE 后 3d Child-Pugh 评分明显升高, 术后 1 wk 后 Child-Pugh 评分逐渐下降, 但术后 4wk 仍与术前有显著性差异( $t = 2.603$ ,  $P < 0.05$ )。

无论是 A 组还是 B 组, TACE 后 Child 评分升高的主要原因均为 TBIL 的升高和 ALB 的减低。早期 TBIL 升高明显, 术后 3 d 达到高峰, 随后下降。A 组下降速度

较快, 4 wk可恢复到术前水平( $t=0.167$ ,  $P>0.05$ ); 而B组术后4 wk TBIL仍高于术前, 差异有显著性意义( $t=2.361$ ,  $P<0.05$ ). ALT的变化规律大致与TBIL一致, 术后4 wk两组均接近术前水平.

ALB的变化虽然变化较为迟缓, 但持续时间较长. 两组术后ALB均下降明显, 小剂量组术后1 wk降到最低( $t=7.120$ ,  $P<0.01$ ), 术后4 wk虽然明显回升, 接近术前水平( $t=1.273$ ,  $P>0.05$ ). B组呈持续性下降趋

势, 术后4 wk仍保持在较低水平( $t=8.881$ ,  $P<0.01$ ).

A组2例患者由Child A级转为Child B级, 1例由Child B级转为C级; B组有5例Child A级变为Child B级, 3例患者由Child B级变为Child C. B组1例患者出现严重肝功能恶化, 黄疸加深、腹水加重, ALT明显升高或保持低水平(胆酶分离), Child评分由术前8分升为11分, 随后出现肝性脑病, 肝肾综合征, 酸碱平衡紊乱, 于TACE后1 mo内死亡. A组未见急性肝衰发生.

表2 两组TACE前后Child评分、TBIL、ALT、ALB的变化

		Child-Pugh 评分	TBIL( $\mu\text{mol/L}$ )	ALT ( $\mu\text{kat/L}$ )	ALB(g/L)
小剂量组 $n=107$	术前	$5.8 \pm 1.1$	$16.9 \pm 7.4$	$0.96 \pm 0.85$	$37.0 \pm 4.8$
	术后3d	$7.0 \pm 1.6^b$	$30.3 \pm 19.3^b$	$3.43 \pm 2.59^b$	$35.1 \pm 5.2^b$
	术后1wk	$6.2 \pm 1.4^a$	$24.7 \pm 15.2^b$	$1.97 \pm 1.68^a$	$34.1 \pm 4.5^b$
	术后4wk	$6.2 \pm 1.5$	$17.6 \pm 9.9$	$1.00 \pm 0.53$	$36.1 \pm 4.8$
	术前 vs 术后3d	$t=5.319$	$t=6.707$	$t=7.355$	$t=2.704$
	术前 vs 术后1wk	$t=2.243$	$t=4.774$	$t=2.568$	$t=7.120$
	术前 vs 术后4wk	$t=1.890$	$t=0.167$	$t=0.396$	$t=1.273$
常规剂量组 $n=127$	术前	$5.7 \pm 1.0$	$17.8 \pm 6.8$	$0.89 \pm 0.57$	$37.5 \pm 3.8$
	术后3d	$7.3 \pm 1.6^b$	$42.1 \pm 32.3^b$	$2.79 \pm 2.11^b$	$34.8 \pm 4.1^b$
	术后1wk	$6.7 \pm 1.2^b$	$37.7 \pm 15.2^b$	$1.64 \pm 0.78^b$	$33.2 \pm 3.2^b$
	术后4wk	$6.6 \pm 1.4^a$	$27.6 \pm 18.8^a$	$1.08 \pm 0.65$	$33.5 \pm 3.1^b$
	术前 vs 术后3d	$t=8.859$	$t=8.203$	$t=9.820$	$t=3.463$
	术前 vs 术后1wk	$t=4.645$	$t=6.774$	$t=8.747$	$t=9.798$
	术前 vs 术后4wk	$t=2.603$	$t=2.361$	$t=1.596$	$t=8.881$

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 术前.

### 3 讨论

经导管注入碘油-化疗药物乳化剂, 然后用明胶海绵颗粒栓塞该动脉是治疗肝癌最常用TACE方法. 碘油选择行沉积在肿瘤血窦、组织间隙及25-150  $\mu\text{m}$ 的小动脉, 抗癌药物混在碘油内, 使药物能以高浓度并长时间贮留于肿瘤内缓慢释放, 增强了药物的抗癌作用. 光镜和电镜观察发现, 碘油大部分以颗粒的形式存在于癌细胞胞质甚至细胞核内, 使癌细胞坏死. 但是, TACE对周围正常肝组织也产生损伤. 研究发现, TACE后肝功能损伤是影响远期疗效的重要因素. 目前减少肝功能损伤的方法除了超选择插管行肿瘤供血动脉栓塞外, 还可适当减少碘油及化疗药物用量和延长治疗间隔时间、减少治疗次数等. 已知许多药物可以造成不同程度的肝损害, 在爆发性肝功能衰竭的患者中, 有相当高的比例(20-50%)与药物有关<sup>[4]</sup>. TACE后自碘油内释放的高浓度化疗药物作用于病灶周围肝组织造成肝细胞变性、坏死. 化疗药物可通过抑制ATP酶活性、破坏细胞超微结构(细胞骨架、毛细胆管)、干扰DNA、RNA代谢等, 使肝细胞大量坏死, 小叶结构紊乱, 纤维组织增生, 最终使肝硬化加重. 有关TACE中化疗药物用量存在较大差异, 国内常为大剂量的联合应用:

如顺铂(60-80 mg)或CBP(100-300 mg)、多柔比星(40-60 mg)或EPI(40-80 mg)、MMC(10-20 mg)、5-氟尿嘧啶(1 000 mg)等<sup>[5, 6]</sup>. 人们现已认识到大剂量化疗TACE可以加重肝功能损伤、使免疫功能下降, 因此小剂量化疗药物成为一种趋势<sup>[7]</sup>. 小剂量化疗TACE同样可以取得较好疗效, 我们的研究<sup>[3]</sup>发现, TACE中采用小剂量和常规剂量化疗药物, 其肿瘤细胞坏死和凋亡程度均没有显著差异. Kamada et al<sup>[2]</sup>报道TACE中使用小剂量顺铂(41 mg)的1 a, 3 a, 5 a和7 a生存率分别为81%、41%、19%和13%. 因此我们主张TACE中采用小剂量化疗药物.

化疗药物剂量对肝功能的影响研究较少. Caturelli et al<sup>[8]</sup>使用小剂量阿霉素(40 mg)行TACE, 结果111例患者术前与术后4 mo Child-Pugh评分没有明显差异, 未见肝功能分级下降者, 但作者并未行对照研究, 也未观察近期肝功能变化. 笔者通过随机对照研究在TACE中化疗药物用量对肝功能的影响, 结果显示TACE中使用小剂量化疗药物可以明显减轻肝功能的损伤, 能缩短肝功能恢复的时间, 而常规大化疗剂量肝功能损伤重, 持续时间长, 不易于恢复甚至会出现肝功能衰竭. 说明大剂量化疗药物可以明显损伤正常肝组织而使肝储备功能减退. 尽管常规肝功能检查如TBIL、ALB、ALT、

PT 以及 Child-Pugh 等可以反应肝功能损伤的情况, 但是对早期肝储备功能损伤的反应仍不够敏感. 因此本研究发现, 虽然两组患者经过首次 TACE 后肝功指标大多可以短期恢复, 但是经过多次(2-4 次)TACE 后, 大剂量组的肝功能损伤较小剂量组明显, 一部分患者的损伤是不可逆的, 说明化疗药物对肝功能的损伤有累积效应. Huang et al<sup>[4]</sup>报道单乙基甘胺酰二甲苯胺(MEGX)试验对 TACE 后的肝功能损伤较常规肝功能检查敏感, 可检测有正常功能的肝细胞总数, 是预测 TACE 后是否出现肝衰竭的显著性因素. 朱顺康 et al<sup>[9]</sup>发现 TACE 后肝硬化血清学指标(透明质酸、人三型前胶原、四型胶原、层粘蛋白)明显升高, 认为大剂量化疗药物可以造成肝组织的直接损伤, 启动肝纤维化, 加重肝硬化. 所以为了减少肝组织损伤, 保护肝储备功能, 延缓肝硬化进程, 应采用小剂量化疗药物. 在肝硬化严重、脾功能亢进、腹水、黄疸、ALT 升高、白细胞记数偏低者, 减少化疗药物用量尤其重要.

常规剂量组 1 例患者 TACE 后出现急性肝功能衰竭而死亡. 该例患者术前 Child-Pugh 评分为 8 分, 术前 TBIL 22.3  $\mu\text{mol/L}$ , ALT 86  $\text{u/L}$ , ALB30  $\text{g/L}$ , 有明显腹水及有较大肿瘤(15 cm). 术后 TBIL 211.5, ALT 93, 出现腹水加重、肝昏迷、肝肾综合征等. 因此术前要选择适当的病例行 TACE, 对基础肝功能较差的患者特别 Child-Pugh>8 分、有明显腹水、ALT 升高及肿瘤巨大者, 应尽量避免行 TACE, 仅在超选择插管的情况下, 使用小剂量化疗行 TACE. 否则勉强行 TACE

将导致急性肝功能衰竭, 造成患者早期死亡.

#### 4 参考文献

- 1 Huang YS, Chiang JH, Wu JC, Chang FY, Lee SD. Risk of hepatic failure after transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: predictive value of the monothylglycinexylidide test. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1223-1227
- 2 Kamada K, Nakanishi T, Kitamoto M, Aikata H, Kawakami Y, Ito K, Asahara T, Kajiyama G. Long-term prognosis of patients undergoing transcatheter arterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma: comparison of cisplatin lipiodol suspension and doxorubicin hydrochloride emulsion. *J Vasc Intervent Radiol* 2001;12:847-854
- 3 卢伟, 李彦豪, 何晓峰, 陈勇, 赵剑波. 小剂量和常规剂量化疗药物经导管动脉栓塞化疗后肝癌细胞坏死和凋亡的比较研究. *中华放射学杂志* 2003;37:232-237
- 4 金玉, 郑长青, 何凤云, 林连捷. 药物性肝病 28 例. *世界华人消化杂志* 2002;10:1065-1066
- 5 Chen MS, Li JQ, Zhang YQ, Lu LX, Zhang WZ, Yuan YF, Guo YP, Lin XJ, Li GH. High-dose iodized oil transcatheter arterial chemoembolization for patients with large hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:74-78
- 6 黄正明, 杨新波, 田文辉. 肝癌的药物治疗. *世界华人消化杂志* 2002;10:958-959
- 7 胡道予. 原发性肝癌介入治疗若干问题的商榷. *放射学实践* 2001;16:359
- 8 Caturelli E, Siena DA, Villani MR, Schiavone G, Nardella M, Balzana S, Florio F. Transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: evaluation of damage to nontumorous liver tissue-long-term prospective study. *Radiology* 2000;215:123-128
- 9 朱顺康, 单鸿, 黄明声, 姜在波, 邝月明, 关守海, 马壮. 肝癌化疗栓塞后血清肝纤维化指标的含量及临床意义. *临床放射学杂志* 2000;19:208-209

# 乙型肝炎病毒基因组高变区界定的初步研究

董菁, 成军, 杨倩

董菁, 成军, 杨倩, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
董菁, 男, 1969-02-07生, 河北省徐水县人, 汉族, 2001年北京大学医学部毕业, 医学博士, 主治医师, 主要学术研究方向: 乙型肝炎病毒分子生物学与病毒性肝炎的治疗。  
国家自然科学基金资助项目, No. C30070690, C39970674, C03011402  
归国留学人员科研启动基金资助项目, No. 98H038  
项目负责人: 成军, 北京市, 100039, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2003-06-25 接受日期: 2003-07-16

## Identification and characterization of high variable regions in hepatitis B virus genome of adr and adw serotypes

Jing Dong, Jun Cheng, Qian Yang

Jing Dong, Jun Cheng, Qian Yang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. C30070690, C39970674, C03011402  
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn  
Received: 2003-06-25 Accepted: 2003-07-16

## Abstract

**AIM:** To identify a hypervariable region or a hyperconservative region in hepatitis B virus (HBV) genome and to study the pre-X region and the pre-pre-S region.

**METHODS:** Full-length of HBV genomes deposited in GenBank were searched and compared for their identity and homology. According to their sequences, the HBV genomes of adr or adw serotypes were selected. The Vector 6.0 software was used to compare the identity and difference among the strains of HBV genomes.

**RESULTS:** Twenty-eight strains of HBV genome in GenBank belong to adr serotype HBV genome, and 22 strains belong to adw serotype. After being compared, the total identity rates were 76.6% and 73.9%, respectively. There might be a hypervariable region and a hyperconservative region in adr serotype HBV genome, with the regional identity rate of 54.5% and 92.1%, respectively. There might be a hyperconservative region in adw serotype HBV genome, with the regional identity rate of 85.0%. Region coding pre-pre-S gene was popular in the strains. Pre-X region might be a serotype-specific gene. A<sup>2608</sup> C/T and/or C/A<sup>2733</sup> T replacement mutation resulted in disability of coding pre-X gene.

**CONCLUSION:** There may be a hyperconservative region in HBV genome. Pre-pre-S gene and pre-X gene are worthy of further study.

Dong J, Cheng J, Yang Q. Identification and characterization of high variable regions in hepatitis B virus genome of adr and adw serotypes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):42-46

## 摘要

**目的:** 探讨乙型肝炎病毒(HBV)基因组是否存在高保守区或高变区, 并探讨前-X基因和前-S基因的存在方式。

**方法:** 自GenBank中按血清型搜索符合要求的HBV全基因组序列, 并应用Vector 6.0版软件进行核苷酸序列同源性的分析和比较。

**结果:** GenBank中搜索出28个adr血清型和22个adw血清型HBV病毒株全基因组, 比较后发现2种血清型的核苷酸序列总一致率分别为76.6%和73.9%; adr血清型病毒株存有高度变异区和高度保守区, 一致率分别为54.5%和92.1%; adw血清型基因组内部含有高度保守区, 一致率为85.0%, 不含有高度变异区。前-X区的存在是较为普遍的现象, 而前-S区的编码具有adr血清型特异性特点, 在某些病毒基因组中, 因为存在A<sup>2608</sup>→C/T和C/A<sup>2733</sup>→T替换突变, 导致其前-X基因编码区起始密码子突变, 因此部分HBV基因组无前-X基因结构区。

**结论:** HBV基因组内部可能存在高度保守区, 前-X区的存在是一个重要的现象, 而前-X编码区具有adr血清型特异性的特点。

董菁, 成军, 杨倩. 乙型肝炎病毒基因组高变区界定的初步研究. 世界华人消化杂志 2004;12(1):42-46

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/42.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)基因组全长在3 200个核苷酸(nt)左右, 为部分双链的DNA病毒。Galibert et al<sup>[1-2]</sup>于1979年发表了HBV基因组的第一个全长核苷酸序列, 长度为3 182 nt, 为ayw血清型, 我国学者<sup>[3-4]</sup>于1984年报道了中国大陆流行的adr血清型全基因序列。Gelibert et al最初的研究将HBV基因组划分出4个开放读码框架(ORF)<sup>[5]</sup>, 分别命名为S、C、P、X区, 之后又先后发现两个直接重复序列(DR I和DR II)<sup>[6]</sup>、四个启动子区和两个增强子<sup>[7-8]</sup>。1993年, Blum et al<sup>[9]</sup>和Carman et al<sup>[10]</sup>提出HBV在患者体内是以准种(quasispecies)形式存在。多年来, 世界各地对于HBV基因组的一些热点突变区进行了研究, 并部分阐明了这些突变的生物学意义和临床医学意义。HBV基因组的各个区段的变异速度和程度可能是不同的。但是, 从整个基因组水平来讲, 目前还不清楚HBV基因组各个区段的保守或者变异是否是一致的。随着对HBV全基因组序列的测定以及核苷酸数据

库的积累,使得我们对于HBV全基因组的比较成为可能.本文参考丙型肝炎病毒(HCV)和人免疫缺陷病毒(HIV)高变区(hypervariable region, HVR)的研究方法<sup>[11-13]</sup>,对于我们克隆的5株HBV全基因组,以及GenBank中收录的HBV全基因组序列进行分析、比较,试图阐述HBV基因组内是否存在基因序列高变区或保守区.

## 1 材料和方法

1.1 HBV全基因组的克隆的选择 进入美国国立卫生院(NIH)网站,在GenBank中搜寻HBV基因组序列,之后进一步限定血清学分为adr和adw血清型,将搜寻结果下载备用,其中也包括本研究组以往报告<sup>[14-15]</sup>的全基因组序列.

1.2 核苷酸序列一致性分析 应用Vector 6.0版软件对下载的存储于GenBank中不同血清型的HBV核苷酸序列进行比较.比较前将原存储于GenBank中的HBV基因组序列进行了初步处理,即参考Gunther et al<sup>[16]</sup>报告的HBV排列顺序和我们以前的报告<sup>[14-15]</sup>的全基因组序列的排列方式,自DR I(5'-TTC ACC TCT GC-3')上游3个核苷酸(TTT)为起始点,以第一个T为记数1,之后将所有参加比较的序列重新排列,即各序列均以5'-TTT TTC ACC TCT GC-3'为开始,统一排列,保证了各序列之间的可比较性.

该软件比较后提供两个数据:阳性率和一致率,阳性率是选定区域推定序列的核苷酸序列数目与区域总长度之比,推定序列是软件自动比较所有序列,参考每个核苷酸位点上每个克隆的编码方式,由大多数克隆(多于70%)编码的核苷酸组成的一致性序列,阳性率用于展示区域内部的插入突变或/和缺失突变,以及较少的单一位点多种核苷酸编码方式;一致率是选定区域全部克隆均为一致的核苷酸数目与最长的单一克隆核苷酸序列数目之比,表示该段区域核苷酸序列一致性,用于展示区域内部的替换突变或/和缺失突变.各区段之间的划分是在计算机软件比较的基础上,人为划定的,最短的分区至少大于200 nt,不选择阳性率小于97%的区域,因为这提示该段内有较长的缺失突变.

1.3 前-X区及前-前-S区开放读码框架(ORF)的判读 将本研究组最近发现的前-X区<sup>[17]</sup>和前-前-S区<sup>[18]</sup>基因序列加入到上述比较序列中,主要用于筛检出新的编码前-X区和前-前-S区已知克隆.

## 2 结果

2.1 在GenBank中搜寻的HBV基因组结果 以往的研究<sup>[14-15]</sup>我们获得了5个HBV全基因组克隆,分别命名为G683-A1、G683-A2、G683-A3、G376-A6和G376-A7,测序结果在NIH GenBank中的序列号分别为AF363961、AF363962、AF363963、AF384371和AF384372,均为adr血清型.经过在GenBank中按不同血清型进行搜寻,获得的adr血清型28个克隆,最长的克隆长度为3215 nt;

另23个克隆序列号如下: D12980、D00630、X14193、D16665<sup>[19]</sup>、AY123041<sup>[20]</sup>、AB033550<sup>[21]</sup>、AF458665、AF411412、AF458664、AF411410、AF411409、AF411408、AB042285<sup>[22]</sup>、AB042284、AB042283、AB026815<sup>[23]</sup>、AB026814、AB026813、AB026812、AF286594、M38636、AF068756、V008676,其中来自中国大陆11例、日本13例、韩国3例、泰国1例.

adw血清型搜寻结果共22个克隆,最长的克隆长度为3221 nt,其克隆号如下: AY152726、AB059661、X51970、D00331<sup>[24]</sup>、D00330、AB033553<sup>[21]</sup>、AB033552、AB033551、M57663<sup>[25]</sup>、AB033557、M54923、AB033555、AB033554、AF282918、AF282917、AF100309、AF100308、X98077、AB059660、AF537372、AY034878、AF536524,其中,来自中国大陆4例、美国6例、日本7例、瑞士1例、印度尼西亚3例、Goettingen 1例.

2.2 核苷酸序列的一致性分析 按克隆G683-1(AF363961)为比较的参照标准,即以5'-TTT TTC ACC TCT GC-3'为开始,各ORF的位置如下:前-C/C基因位置为3209-3215 nt和1-632 nt, P基因位置为487-3018 nt,前-S1、前-S2和S基因位置为1028-2230 nt, X基因为2769-3215 nt和1-18 nt;另前-X区基因位于2601-2768 nt,前-前-S区基因位于893-1027 nt.按不同血清型进行的一致性比较结果见表1和表2,所选择序列群组中,adr血清型的病毒株总一致率为76.6%,adw血清型的病毒株总一致率为73.9%;adr血清型1451-1883 nt区域的阳性率为100%,一致率为92.1%,提示为高保守区,相应的,adw血清型1585-2165 nt区域的阳性率为99.7%,一致率为85.1%,相对于总一致率的73.9%,该段相对较为保守.

表1 HBV adr血清型基因组序列一致性比较结果

	阳性率(%)	一致率(%)
1-782	100	80.2
783-1450	99.9	54.5
1451-1883	100	92.1
1884-3012	99.2	83.4
3013-3218	100	67.0
总计	99.7	76.6

表2 HBV adw血清型基因组序列一致性比较结果

	阳性率(%)	一致率(%)
1-221	100	80.5
222-1584	97.9	67.8
1585-2165	99.7	85.0
2166-2539	98.9	69.3
2540-3217	99.3	77.0
总计	98.8	73.9

adr血清型783-1450 nt区域阳性率为99.9%,一

致率为54.5%，较总一致率76.6%明显为低，我们初步将此区定义为HBV adr血清型的高变区；adw血清型222-1 584 nt区域阳性率为97.9%，一致率为67.8%，较总一致率73.9%略低。

2.3 前-前-S区和前-X区比较结果 将文献[17]和[18]中推断的前-前-S和前-X区基因序列输入软件中进行编码分析，结果发现：adr血清型28个克隆中，27个克隆在前-前-S区起始密码子处编码为ATG，仅有来自泰国的克隆AF068756在起始密码子编码为ATA；这27个克隆之后自起始密码子ATG至前-S1基因起始密码子ATG之间的区域共135 nt，中间无终止密码子，提示27个克隆均编码前-前-S基因。adr血清型28个克隆中，25个克隆在前-X区起始密码子处编码为ATG，中国上海Wen et al报告的6个HBV全基因组病毒株中，2个病毒株(AF458665和AF41108)编码CTG，泰国病毒株AF068756在此位点的编码为TTG，即此位点发生A<sup>2608</sup>→C/T替换突变；前-X区起始密码子处编码为ATG的25个病毒株中，14株自起始密码子ATG至X基因起始密码子ATG之间的区域的168 nt中无终止密码子，提示这14个克隆均编码前-X基因；另11株克隆在2733位点表现为C/A<sup>2733</sup>→T的替换突变，导致编码终止密码子TGA。adr血清型28个克隆中前-前-S区的阳性率为100%，一致率为85.2%；前-X区阳性率为99.4%，一致率为81.5%，比adr血清型总一致率的76.6%高。

adw血清型22个克隆中，16个克隆在前-前-S区起始密码子处编码为ATG，来自美国的6个病毒株中有4株(AY152726、AY034878、AF537372和AF536524)在该位置编码子为AGG，来自Goettingen的病毒株(X51970)编码AGG，来自日本的一株(AB033557)编码ATA。16个前-前-S区起始密码子处编码为ATG的病毒株在之后的135 nt中无终止密码子，提示16个克隆均编码前-前-S基因。adw血清型22个克隆中前-S区的阳性率为98.5%，一致率为74.8%，与adw血清型总一致率的73.9%极为相近。adw血清型22个克隆中，在前-X区起始密码子处均不表现ATG，13个病毒株编码CTG，9个克隆编码TTG，提示前-X区可能是adr血清型特异性的一种表现。

根据本研究分析结果，将HBV基因组结构图重新定义如图1。

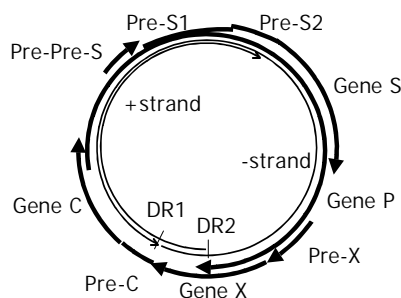


图1 HBV基因组基因结构修正示意图。其中adr血清型含有前-X基因，而adw血清型不含有前-X编码区；这两种血清型多包含前-前-S编码区。

### 3 讨论

本研究组在以往的研究中着重研究了HBV准种现象<sup>[14, 15, 26-37]</sup>，研究的结果提示HBV在慢性乙型肝炎患者体内是以准种群形式存在的。借鉴关于HCV和HIV准种研究的成果，随之提出的新问题是HBV是否也象HCV和HIV基因组序列一样存在有序列高保守区或/和高变区？本文应用新的序列分析软件，利用GenBank中的信息资源，对来自多家实验室的关于HBV基因组的数据进行了比较分析，结果提示HBV存在有高保守区域。

目前在美国国立卫生院的GenBank中，存储了200多个HBV全基因组序列，本研究初始以限定条件搜索出符合条件的HBV基因组序列共50株，其中adr血清型28株，adw血清型22株，经过比较发现，28株adr血清型的病毒株总一致率为76.6%，22株adw血清型的病毒株总一致率为73.9%，提示近四分之一的序列位点表现为编码的多样性，基因位点包括替换、缺失和插入突变等多种突变形式。我们又进一步分析了HBV两种血清型的节段差异性，在计算机软件分析的基础上，人工的分段展示各区域的一致率，条件是：(1)选择区域至少大于200 nt；(2)避免选择区域为某一克隆株发生完全缺失突变的部位；(3)根据一致率最大法或最小法确定区域。结果发现adr血清型的病毒株可被分为3类区域：(1)局部区域一致率远高于总一致率的区域，1 451-1 883 nt之间的一致率高达92.1%，可将该区域定义为高度保守区；(2)局部区域一致率与总一致率相近的区域，如1-782 nt、1 884-3 012 nt和3 013-3 218 nt等区域，一致率分别80.2%、83.4%和67.0%，与总一致率的差距在10%以内；(3)局部区域一致率远低于总一致率的区域，如783-1 450 nt，该段区域的一致率仅为54.5%，可将该区域定义为高度变异区。

为了解上述在adr血清型病毒株比较的过程中所定义出的高度保守区和高度变异区，我们又搜索出22株adw血清型病毒株进行比较，结果未发现上述的高度变异区，但有区域的一致率远大于总一致率，即1 585-2 165 nt区，一致率为85.0%；其余的区域一致率与总一致率的差异不超出10%。初步分析认为adw血清型病毒株不包含基因高度变异区，高度变异区可能是adr血清型病毒株的一种特异性表现。结合HBV基因组的ORF分区，adr血清型的病毒株的高变区涵盖了HBV前-S区和前-X区<sup>[38]</sup>，P基因的末段结合蛋白和间隔区，而高保守区位于前-S区后半部分和S基因主蛋白的N端部分，以及P基因的部分间隔区编码基因。adw血清型病毒株高保守区位于S基因主蛋白的大部分和P基因的间隔区和逆转录酶区N端部分。

我们以往的研究<sup>[17]</sup>在分析所获得的5个克隆<sup>[14-15]</sup>的过程中，在X区之前发现还存在一个ORF，长度168 bp，编码56 aa，该多肽分子量约为6.2 kD，有15个疏水氨基酸，命名该区为前-X区。早期有学者<sup>[39-41]</sup>报告了前-X区的存在，但不认为该现象是一种广泛存在的情况。



我们针对这 50 个病毒株的研究揭示: adr 血清型 28 个克隆中, 25 个克隆在前 -X 区起始密码子处编码为 ATG, 前 -X 区起始密码子处编码为 ATG 的 25 个病毒株中, 14 株自起始密码子 ATG 至 X 基因起始密码子 ATG 之间的区域的 168 nt 中无终止密码子, 提示这 14 个克隆均编码前 -X 基因, 另 11 株克隆发生 C/A<sup>2733</sup>→T 的替换突变, 导致前 -X 区表达被提前终止. adw 血清型 22 个克隆中, 在前 -X 区起始密码子处均不表现 ATG, 提示前 -X 区可能是 adr 血清型特异性的一种表现. 不表达前 -X 多肽的病毒株均是因为在前 -X 区起始密码子发生替换突变, 突变形式为 A<sup>2608</sup>→C/T. adr 血清型 28 个克隆中前 -X 区阳性率为 99.4%, 一致率为 81.5%, 比 adr 血清型总一致率的 76.6% 高, 提示此段相对还是比较保守的. 来自多个研究组的 HBV 病毒株基因组中均编码前 -X 基因, 我们认为这说明前 -X 基因是事实存在, 是被忽视的一段重要序列. 被忽略的主要原因在于: (1)获得的 HBV 基因组序列的数目尚少, 不足以展示 HBV 序列的多样性; (2)前 -X 区为 adr 血清型特异性现象, 在既往的研究中缺少对 adr 血清型 HBV 基因组的深入研究; (3)A<sup>2608</sup>→C/T 替换突变(AF458665、AF068756 等)、C/A<sup>2733</sup>→T 替换突变(D12980、D00630 等)以及上述 2 个位点的双替换突变(AF411408)导致前 -X 区多肽表达被终止, HBV 编码的 X 蛋白自然自下一个 ATG 开始. 因此针对前 -X 区域的替换突变的研究仍需要进一步加强.

我们以往的研究<sup>[18]</sup>在分析所获得的 5 个克隆<sup>[14-15]</sup>的过程中, 在前 -S1 区之前发现还存在一个 ORF, 长度 135 bp, 编码 45 aa, 命名为前 -前 -S 区. 关于前 -前 -S 基因的存在, 本文较以前又进一步进行了分析, 发现研究的 50 个病毒株中, 一共有 43 个克隆编码前 -前 -S 基因, 不表达的 7 个克隆中 5 个克隆在前 -前 -S 区起始密码子编码 ATG 处编码 AGG, 而另 2 个克隆编码 ATA. adr 血清型 28 个克隆中前 -前 -S 区的阳性率为 100%, 一致率为 85.2%, 高于 adr 血清型病毒株的总一致率 76.6%; adw 血清型 22 个克隆中前 -前 -S 区的阳性率为 98.5%, 一致率为 74.8%, 与 adw 血清型总一致率的 73.9% 极为相近. 这些数据说明 adr 血清型病毒株在前 -前 -S 区(893-1 027 nt)是接近高度保守的, 是在高度变异区(783-1 450 nt)中的高保守区; adw 血清型病毒株前 -前 -S 区的一致率为 74.8%, 高于该区域(222-1 584 nt)的一致率 67.8%, 也提示前 -前 -S 区是相对保守的.

重新定义 S 基因和 X 基因的范围是由于这 2 个基因产物在病毒的生活史中起重要作用, 而且早先的研究发现 S 基因产物<sup>[42-43]</sup>、截短型 S 基因产物<sup>[44-45]</sup>和 X 蛋白<sup>[46-47]</sup>具有反式激活作用, 这种作用可能通过激活癌基因导致肿瘤的发生<sup>[48]</sup>. 重新定义基因区域的一项重要工作是确定基因的启动子区域, 杨倩 et al<sup>[49-50]</sup>的研究发现前 -前 -S 区和前 -X 区之前的核苷酸序列具有启动子作用, 这些研究结果为证实前 -前 -S 区和前 -X 区的存在提

供了具有说服力的直接证据.

总之, 我们应用现有的计算机软件对 GenBank 中存储的 50 个 HBV 病毒株全基因组进行了深入分析, 结果发现 adw 血清型病毒株存有高度变异区和高度保守区, adr 血清型病毒株基因组内部不含有高度变异区, 高度变异区一致率仅 54.5%, 较总一致率 76.6% 明显为低. 围绕前 -前 -S 区和前 -X 区的研究发现前 -前 -S 区的存在是较为普遍的现象, 而前 -X 区的编码具有 adr 血清型特异性特点, A<sup>2608</sup>→C/T 和 C/A<sup>2733</sup>→T 替换突变是导致前 -X 基因编码失败的主要原因. 结合上述结果, 我们修正 HBV 基因结构图见图 1, 进一步的分子生物学和前 -前 -S 区和前 -X 区抗体流行病学研究正在进行之中.

#### 4 参考文献

- Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in E. coli. *Nature* 1979;281:646-650
- Charnay P, Mandart E, Hampe A, Fitoussi F, Tiollais P, Galibert F. Localization on the viral genome and nucleotide sequence of the gene coding for the two major polypeptides of the hepatitis B surface antigen (HBsAg). *Nucleic Acids Res* 1979; 7:335-346
- 吴祥甫, 周翊钟, 冯宗铭, 李戟平, 夏绍源. 人乙型肝炎病毒 -HBV adr 血清型基因组的克隆和限制酶切图谱. *中国科学 B 辑* 1983; 2:162-167
- 甘人宝, 储美谨, 沈绿萍, 钱苏雯, 李戟平. 克隆的 adr 血清型乙型肝炎病毒(pADR-1)的核苷酸顺序. *中国科学 B 辑* 1986;5:55-65
- 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京:人民军医出版社, 1997:179-182
- Dejean A, Sonigo P, Wain-Hobson S, Tiollais P. Specific hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma DNA through a viral 11-base-pair direct repeat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:5350-5354
- Schaller H, Fischer M. Transcriptional control of hepadnavirus gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991;168:21-39
- Seifer M, Heermann KH, Gerlich WH. Expression pattern of the hepatitis B virus genome in transfected mouse fibroblasts. *Virology* 1990;179:287-299
- Blum HE. Hepatitis B virus: significance of naturally occurring mutants. *Intervirology* 1993;35:40-50
- Carman W, Thomas H, Domingo E. Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example. *Lancet* 1993;341:349-353
- Sakamoto N, Enomoto N, Kurosaki M, Marumo F, Sato C. Sequential change of the hypervariable region of the hepatitis C virus genome in acute infection. *J Med Virol* 1994;42:103-108
- Haigwood NL, Shuster JR, Moore GK, Lee H, Skiles PV, Higgins KW, Barr PJ, George-Nascimento C, Steimer KS. Importance of hypervariable regions of HIV-1 gp120 in the generation of virus neutralizing antibodies. *AIDS Res Hum Ret* 1990;6:855-869
- Simmonds P, Balfe P, Ludlam CA, Bishop JO, Brown AJ. Analysis of sequence diversity in hypervariable regions of the external glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1990;64:5840-5850
- 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 李莉. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. *解放军医学杂志* 2002; 27:116-118
- 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 DNA 序列异质性及准种特点的研究. *中华医学杂志* 2002;82:81-85
- Gunther S, Li BC, Miska S, Kruger DH, Meisel H, Will H. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol* 1995; 69:5437-5444

- 17 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前 - X 编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1097-1101
- 18 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前 - 前 - S 区编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1091-1096
- 19 Mukaide M, Kumazawa T, Hoshi A, Kawaguchi R, Hikiji K. The complete nucleotide sequence of hepatitis B virus, subtype adr (SRADR) and phylogenetic analysis. *Nucleic Acids Res* 1992;20:6105
- 20 Kobayashi M, Koike K. Complete nucleotide sequence of hepatitis B virus DNA of subtype adr and its conserved gene organization. *Gene* 1984;30:227-232
- 21 Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988;69(Pt 10):2575-2583
- 22 Sugauchi F, Mizokami M, Orito E, Ohno T, Hayashi K, Kato T, Tanaka Y, Kato H, Ueda R. Molecular evolutionary analysis of the complete nucleotide sequence of hepatitis B virus (HBV) in a case of HBV infection acquired through a needlestick accident. *Clin Infect Dis* 2000;31:1195-1201
- 23 Rokuhara A, Tanaka E, Yagi S, Mizokami M, Hashikura Y, Kawasaki S, Kiyosawa K. De novo infection of hepatitis B virus in patients with orthotopic liver transplantation: analysis by determining complete sequence of the genome. *J Med Virol* 2000;62:471-478
- 24 Okamoto H, Imai M, Kametani M, Nakamura T, Mayumi M. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission. *Jpn J Exp Med* 1987;57:231-236
- 25 Estacio RC, Chavez CC, Okamoto H, Lingao AL, Reyes MT, Domingo E, Mayumi M. Nucleotide sequence of a hepatitis B virus genome of subtype adw isolated from a Philippino: Comparison with the reported three genomes of the same subtype. *J Gastroenterol Hepatol* 1988;3:215-222
- 26 Dong J, Cheng J, Wang QH, Liu Y, Wang G, Shi SS, Xia XB, Shao Q, Si CW. The preliminary study on hepatitis B virus (HBV) quasispecies in patients with chronic HBV infection. *Chin J Infect Dis* 2001;19:199-203
- 27 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 王刚, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前 C/C 基因准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:122-123
- 28 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 X 基因准种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 29 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 洪源, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子区异质性检测的初步研究. 临床检验杂志 2002;20:72-74
- 30 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉. 乙型肝炎病毒表面抗原 / 抗体同时阳性患者体内 S 基因序列的分析研究. 中国公共卫生 2002;18:535-537
- 31 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶区基因序列准种与变异研究. 解放军医学杂志 2001;26:823-825
- 32 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及准种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325
- 33 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒前 - S2 序列异质性的初步研究. 中华内科杂志 2002;41:233
- 34 成军, 董菁, 刘妍, 李莉, 斯崇文, 王勤环, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒准种研究的临床意义. 世界华人消化杂志 2002;10:209-211
- 35 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 X 基因准种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 36 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列准种个体化特征的研究. 解放军医学杂志 2002;27:119-121
- 37 董菁, 刘妍, 皇甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原基因多态性的初步研究. 胃肠病学和肝病杂志 2002;11:130-135
- 38 Kann M, Gerlich C. Chapter 7: Structure and Molecular Virology. *Viral Hepatitis* (Eds Zuckerman AJ, et al.), 2nd edition, Harcourt Publishers Limited, 1998:77-106
- 39 Loncarevic IF, Zentgraf H, Schroder CH. Sequence of a replication competent hepatitis B virus genome with a preX open reading frame. *Nucleic Acids Res* 1990;18:4940
- 40 Takahashi K, Kishimoto S, Ohori K, Yoshizawa H, Akahane Y, Okamoto H, Mishiro S. A unique set of mutations in the "preX" region of hepatitis B virus DNA frequently found in patients but not in asymptomatic carriers: implication for a novel variant. *Int Hepatol Commun* 1995;3:131-138
- 41 Takahashi K, Akahane Y, Hino K, Ohta Y, Mishiro S. Hepatitis B virus genomic sequence in the circulation of hepatocellular carcinoma patients: comparative analysis of 40 full-length isolates. *Arch Virol* 1998;143:2313-2326
- 42 Lauer U, Weiss L, Hofschneider PH, Kekule AS. The hepatitis B virus pre-S/S(t) transactivator is generated by 3' truncations within a defined region of the S gene. *J Virol* 1992;66:5284-5289
- 43 Hildt E, Hofschneider PH. The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:315-329
- 44 Hildt E, Saher G, Bruss V, Hofschneider PH. The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* 1996;225:235-239
- 45 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调 c-myc 基因表达的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:141-144
- 46 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:217-219
- 47 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙型肝炎病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 48 成军. 肿瘤相关基因. 第 1 版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000: 96-100
- 49 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 王琳, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前 - X - 编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;28:763-765
- 50 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前 - 前 - S - 编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;28:761-762

# 乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 结合蛋白1的基因克隆化研究

洪源, 成军

洪源, 成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
洪源, 男, 1974-12生, 汉族, 福建省莆田市人, 医师. 1998年毕业于第四军医大学军医系, 获医学学士学位, 2003年毕业于解放军军医进修学院, 获内科学硕士学位, 主要课题方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制. 国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689  
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063  
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038  
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138  
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心. cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2003-06-25 接受日期: 2003-07-16

## Cloning of the gene of preS1 promoter of hepatitis B virus specific DNA-binding protein 1

Yuan Hong, Jun Cheng

Yuan Hong, Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China  
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn  
Received: 2003-06-25 Accepted: 2003-07-16

### Abstract

**AIM:** To identify the protein which has unknown function binding with the preS1 promoter of hepatitis B virus, and to clone its coding sequence.

**METHODS:** Yeast one-hybrid system was employed to screen a human liver cDNA library using 3 copies of SP I core sequence as a bait, and one unknown gene was obtained. The coding sequence of the preS1 promoter of hepatitis B virus specific DNA-binding protein 1 (SBP I) was cloned by bioinformatics methods.

**RESULTS:** The coding sequence of SBP1 was cloned successfully.

**CONCLUSION:** SBP1 has a complete open reading frame, and biological functions by binding with SP I. The sequence similarity results indicate that the human SBP1 is a new member of transcription factor C/EBP $\beta$ .

Hong Y, Cheng J. Cloning of the gene of preS1 promoter of hepatitis B virus specific DNA-binding protein 1. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004; 12(1):47-50

### 摘要

**目的:** 发现了与乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I (HBV-

SP I) 结合的未知功能蛋白, 并克隆了他的全长基因。

**方法:** 以 SP I 核心序列为“诱饵”, 应用酵母单杂交技术对人肝细胞 cDNA 文库进行筛选, 得到了一个未知基因, 命名为乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 结合蛋白 1 (SBP1)。结合生物信息学技术, 应用分子生物学技术, 克隆了 SBP 1 的基因编码序列。

**结果:** 经酶切和测序鉴定, 结果正确, 成功克隆了 SBP 1 的基因编码序列。

**结论:** SBP 1 具有完整的开放读码框, 可能通过与 SP I 的结合发挥生物学作用。

洪源, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 结合蛋白 1 的基因克隆化研究. 世界华人消化杂志 2004;12(1):47-50

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/47.asp>

### 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)一种严重危害人类健康的致病因子<sup>[1]</sup>. 他感染人体除引起急慢性乙型肝炎和肝硬化外, 还与肝癌的发生有密切关系<sup>[2-10]</sup>. HBV 属嗜肝 DNA 病毒, 其基因组为 3.2 kb 部分双链的环状 DNA. 目前在 HBV 基因组中已发现并鉴定的顺式元件有四个启动子、两个增强子和糖皮质激素应答元件. 其中表面抗原基因含有两个串联的启动子 -SP I 和 SP II. SP I (2 219-2 780 nt) 的主要作用是调节 2.4 kb mRNA 的转录, 编码表面抗原大蛋白. 研究证实, SP I 含有典型 TATA 盒序列<sup>[11]</sup>, 其上游 50 bp 处为肝细胞特异性核因子 1 (hepatocyte nuclear factor 1, HNF1) 结合位点<sup>[12]</sup>. 该结合位点是 HBV 转录调节的重要组分, 也是 HBV 嗜肝性的重要原因之一; 另有证据<sup>[13]</sup>表明这一位点可能还有其他肝特异因子与之结合, 从而调节 2.4 kb mRNA 的转录. 为了寻找与 SP I 结合的肝特异性转录作用因子, 进一步探讨 SP I 的转录调节机制. 我们应用酵母单杂交体系<sup>[14]</sup>, 以 3 重复的 SP I 核心序列为“诱饵”, 对人肝细胞 cDNA 文库成功进行了筛选, 得到了一个未知基因, 命名为 SBP1. 结合生物信息学方法, 应用分子生物学技术, 克隆了 SBP1 的基因编码序列。

### 1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 肝母细胞瘤细胞系 HepG2

为本室保存. 人肝细胞 cDNA 文库购自 clontech 公司, Taq DNA 聚合酶购自鼎国生物公司, 限制性内切酶购自Takara公司. 质粒DNA提取试剂盒及逆转录扩增试剂盒(Promega 公司), 玻璃奶 DNA 回收试剂盒(博大公司). 引物合成、核苷酸序列测序由上海博亚公司完成.

## 1.2 方法

1.2.1 “饵”载体及酵母报告菌株的构建 根据 HBV ayw 全基因组序列以表面抗原前 S1 区翻译起始点上游 90-64 nt 设计靶序列 5' -AGTTAATCATTACTTCCAA ACTAGACA-3' 和 5' -TGTCTAGTTTGGAAGTAATG ATTAAGT-3' 的串联三聚体, 其片段两端分别加入 EcoR I 和 Xba I 或 EcoR I 和 Sal I 限制内切酶识别序列. 将退火的靶序列分别与各自的载体相连接. 转化大肠杆菌感受态细胞, 挑取在 Amp 平皿上生长的菌落提取质粒, 构建成重组质粒 pHISi-sp1 和 pHISi-1-sp1 和 pLacZi-sp1, 经酶切及 DNA 测序鉴定. 将 pHISi-sp1 和 pHISi-1-sp1 以 Xho I 酶切, 参照氯化锂酵母转化方案转化酵母菌株 YM4271, 取多个克隆转涂于添加了 0-60 mmol/L 的 3-AT SD/-His 平板, 30 °C 培养 7 d. pLacZi-sp1 以 Nco I 酶切线性化后, 转化酵母菌株 YM4271, 培养于 SD/-Ura 缺陷平板, 30 °C 培养 7 d.

1.2.2 以酵母报告菌株筛选人肝 cDNA 文库 以碱裂解法提取人肝细胞文库质粒. 参照氯化锂酵母转化方案, 转化文库质粒入 YMSP1-HIS 菌株, 铺板于含 30 mmol/L 3-AT 的 SD/-Leu/-His(亮氨酸和组氨酸)缺陷平板上, 30 °C 培养 7 d 后, 挑选直径大于 2 mm 的阳性克隆. 将阳性克隆以玻璃珠法提取酵母质粒. 转化入大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 以碱裂解法提取质粒后转化入 YMSP1-LacZ 菌株, 铺板于 SD/-Ura/-Leu(尿嘧啶和亮氨酸)缺陷平板上. 按 clontech 克隆提取滤膜反应方案验证阳性克隆是否有激活酵母报告株  $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -gal)的活性.

1.2.3 阳性 cDNA 序列的测定及分析 提取阳性克隆质粒后, 以双脱氧终止法测定 DNA 序列, 并将所得到的序列与 GenBank 提供的数据库进行同源性比较,

拼接.

1.2.4 从人肝癌细胞 cDNA 中扩增 SBP1 肝母细胞瘤细胞系 HepG2 以完全 DMEM 培养基培养, 于 55 mm 培养皿中 100% 融合后, 提取总 RNA, 并进行逆转录扩增. 以该逆转录产物为模板, 设计引物 5' -ATG CCA ACA GGC CTG GTC AG-3' 和 5' -TCT CCC CTG CAT GGC AAG TC-3' (设计长度为 470 bp), 进行聚合酶链反应(PCR), 反应产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 并进行测定 DNA 序列测定.

1.2.5 人 SBP1 基因和蛋白质序列的生物信息学分析 利用在线软件, 对于克隆的人 SBP1 基因序列和蛋白质序列进行生物信息学分析<sup>[15]</sup>.

## 2 结果

2.1 酵母报告株的制备 线性化的 pHISi-sp1 和 pHISi-1-sp1 质粒转化入 YM4271 酵母后, 发现有些克隆在 45 mmol/L 3-AT 存在下仍能生长, 而有些在 30 mmol/L 3-AT 存在下不能生长, 说明不同的报告酵母 his3 渗漏表达水平并不一致. 选取在 30 mmol/L 3-AT 存在下不能生长的克隆为报告株, 命名为 YMSP1-HIS. 线性化后的 pLacZi-sp1 转化入 YM4271 酵母, 培养于 SD/-Ura 缺陷平板. 挑取能在其上生长的克隆作为报告株, 命名为 YMSP1-LacZ.

2.2 cDNA 文库的筛选 取人肝 cDNA 文库质粒 20  $\mu$ g, 转化入酵母报告株 YMSP1-HIS, 铺于 20 块 150 mm 含 30 mmol/L 3-AT 的 SD/-Leu/-His 缺陷平板上. 30 °C 培养 7 d 后, 挑选其中直径大于 2 mm 阳性克隆(共 24 个), 提取酵母质粒后转化入 YMSP1-LacZ 酵母报告株, 涂于 SD/-Ura/-Leu 缺陷平板, 30 °C 培养 7 d, 进行克隆提取滤膜反应, 3 h 内菌落变蓝者即为双阳性克隆. 从 24 个单阳性克隆中得到 12 个双阳性克隆.

2.3 双阳性克隆的测序及计算机拼接 对双阳性克隆进行测序, 并根据 GenBank 数据库进行 Blastn 同源性搜索和比对, 选择其中 1 个未知基因进行了拼接, 发现其开放读码框长 279 bp, 编码 93 aa 的蛋白质(图 1).

```

ATG CCA ACA GGC CTG GTC AGG CCG CCT GGC ACC TTC CCT CCA TGG
M   P   T   G   L   V   R   P   P   G   T   F   P   P   W
GTG CTG TGG AAG AGC TTG GCA CCC GTC TTC CCC TGT GGG CCC AGC
V   L   W   K   S   L   A   P   V   F   P   C   G   P   S
TGC TAT TCG GCA CTG GCG GCG GGC CAG GGC CCC TCG GGG TGC TTT
C   Y   S   A   L   A   A   G   Q   G   P   S   G   C   F
AAG GAT GTC GAT GTC AGC ACC AAA CCC TTG TTC TCA ATT AGC GTG
K   D   V   D   V   S   T   K   P   L   F   S   I   S   V
TCA CAA ACC CTG GAT TTG ATG CAG CTG GGA AAC CAG CCC ACT AAC
S   Q   T   L   D   L   M   Q   L   G   N   Q   P   T   N
AGA GGC TGC CTC ATC TTC ATG CAG GCA CTG CCA GAT GCA GAA GAG
R   G   C   L   I   F   M   Q   A   L   P   D   A   E   E
GAT GTC TAG
D   V   *

```

图 1 乙型肝炎病毒 SPI 结合蛋白 1(SBP1)的编码序列.

2.4 获得 SBP1 全长编码序列 以 HepG2 细胞系 cDNA 文库为模板, PCR 反应后经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 可见长度为 470 bp 的电泳条带(图 2). PCR 产物送测序, 结果完全符合 SBP1 的拼接序列.

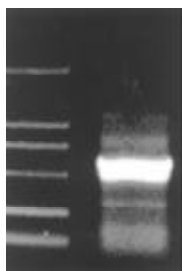


图 2 以 HepG2 cDNA 为模板, PCR 扩增 SBP1 启动子序列.

2.5 SBP1 基因及蛋白的生物信息学分析 将克隆的人

SBP1 基因序列, 在 [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTN](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTN) 同源序列的比对中, 发现本文克隆的人 SBP1 基因序列与“clone RP11-6B20 on chromosome 6”基因序列完全同源, 因此, 可以将人 SBP1 的染色体基因序列定位于 6 号染色体上. 通过同源序列的比对, 没有发现内含子(intron)序列.

应用 [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 中 Swissprot 数据库同源蛋白质序列的比对, 发现本文克隆的人 SBP1 蛋白质序列与鸡的 CCAAT/ 增强子结合蛋白  $\beta$  (CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$ , C/EBP  $\beta$ )(图 3)的 145-183 aa 之间的序列高度同源. 这一结构同源性序列的比对提示本文克隆的 SBP1 蛋白可能是一种转录调节因子, 而且属于 C/EBP  $\beta$ . 因为人的核苷酸序列的数据库中目前还没有登录的相关序列, 因此可以认为本文克隆的人 SBP1 基因可能是一种新型的 C/EBP  $\beta$ , 是这一转录因子蛋白家族的一个新成员.

```
>gi|729096|sp|Q05826|CEBB_CHICK CCAAT/ENHANCER BINDING PROTEIN BETA
(C/EBP BETA) (TRANSCRIPTION FACTOR NF-M) (CCR PROTEIN) Length = 328 aa

Score = 28.1 bits (61), Expect = 3.0
Identities = 15/39 (38%), Positives = 18/39 (46%), Gaps = 4/39 (10%)

SBP1:          9  PGTFFPWVLWKSLAPVFPCGPSCYSAL----AAGQGPPSG  43
                PG  FPP ++      + PVF      SC          AG  GP G
CCR PROTEIN: 145  PGCFFPQIVETKVEPVFETLDSCKGPRKEEGGAGPGPGG 183
```

图 3 人 SBP1 蛋白质序列同源性比对结果.

### 3 讨论

真核生物的转录起始需要转录因子的参与. 结构上, 这些转录因子通常由一个 DNA 结合结构域和一个或多个与其他调控蛋白相互作用的激活结构域组成. 酵母 GAL4 蛋白即是一种典型的转录因子, 研究<sup>[16]</sup>表明 GAL4 的 DNA 结合结构域可结合酵母半乳糖苷酶的上游激活位点(UAS); 而转录激活结构域可与 RNA 聚合酶或转录因子 TFIID 相互作用, 提高 RNA 聚合酶的活性. 在这一过程中, DNA 结合结构域和转录激活结构域可完全独立地发挥作用. 酵母单杂交系统正是基于这一理论, 将 GAL4 的 DNA 结合功能域置换为文库蛋白, 当他与我们导入的“饵”基因结合后, 就照常可以通过 DNA 激活结构域激活 RNA 聚合酶, 从而启动对下游报告基因的转录. 这样, 只要对酵母细胞内报告基因表达的筛选, 我们就可以对 DNA 与细胞内蛋白质的相互作用进行分析. 应用这一系统, 既可以寻找 DNA 结合位点, 对 DNA 结合位点进行分析; 也可以直接从基因文库中得到编码 DNA 结合蛋白质的核苷酸序列, 无需复杂的蛋白质分离纯化操作. 本实验采用 Clontech 公司首创的 MATCHMAKER 酵母单杂交系统<sup>[17]</sup>, 以组氨酸和  $\beta$ -gal 为报告基因, 进行双阳性筛选. 即首先以 his3 报告酵母对人肝 cDNA 文库进行大规模初筛, 从中提取阳性克

隆质粒, 在大肠杆菌中扩增后, 再转入 LacZ 报告酵母, 验证  $\beta$ -gal 的活性, 从而使假阳性的可能性尽可能降低.

SP I 是 HBV 的一个重要转录元件, 调节 HBV 表面抗原大蛋白的表达. 对携带 HBV DNA 的转基因小鼠及感染 HBV 的黑猩猩模型的研究<sup>[18-27]</sup>表明, 表面抗原主蛋白可在不同的组织中表达, 而表面抗原大蛋白只在肝内特异发现, 这一结果强烈提示: 表面抗原大蛋白的表达具有肝特异性, SP I 在肝特异性表达中起着关键作用<sup>[28-38]</sup>. Chang et al<sup>[39]</sup>通过应用瞬时转染分析、体外 RNase 保护分析等方法, 对这一现象的原因进行了研究, 结果显示, HNF1 与 SP I 的结合可能是主要原因. 将该因子去除后, SP I 的转录活性下降了 20 倍. 同时可能还有其他肝特异因子参与调节<sup>[39-40]</sup>. 为了寻找新的肝特异结合蛋白, 了解 SP I 嗜肝性的原因. 我们以 3 重复的 SP I 核心序列为“诱饵”, 整合入酵母基因组, 构建了酵母报告株; 经加入人肝 cDNA 文库进行筛选, 得到了 12 个双阳性克隆, 其中有 3 个为未知基因. 经用计算机分析、拼接后, 得到了其中一个未知基因的编码序列, 命名为 SBP1. 根据这一序列设计引物, 从人肝癌细胞 cDNA 文库中 PCR 扩增得到了 SBP1 基因序列. 反应产物经测序完全符合计算机分析结果, 这表明

我们已顺利得到了SBP1编码序列. 这一结果为我们下一步继续研究SP I的转录调控机制及验证SP I和SBP1的体内、外结合作用打下了良好的基础. 但目前新基因的生物学作用和HBV致病机制中的作用和地位尚不明确, 需要进一步对其进行生物学功能的研究, 以阐明新基因的生物学意义.

#### 4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第1版. 北京:人民军医出版社, 1997:86-198
- 2 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调 *c-myc* 基因表达的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:141-144
- 3 洪源, 成军. 肝炎病毒DNA疫苗的研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:221-223
- 4 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:213-215
- 5 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:217-219
- 6 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. 世界华人消化杂志 2002;10:161-164
- 7 陆荫英, 李克, 刘妍, 王琳, 成军, 张玲霞. 乙型及丙型肝炎病毒受体的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:211-213
- 8 成军, 董菁, 刘妍, 李莉, 斯崇文, 王勤环, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒准种研究的临床意义. 世界华人消化杂志 2002;10:209-211
- 9 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 10 洪源, 成军, 董菁, 李克, 王琳, 王刚, 刘妍. 乙型肝炎病毒HBsAg重组疫苗与表面抗原DNA疫苗诱导H-2<sup>b</sup>小鼠免疫应答的实验研究. 世界华人消化杂志 2002;10:137-140
- 11 Siddiqui A, Jameel S, Mapoles J. Transcriptional control elements of hepatitis B surface antigen gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:566-570
- 12 Raney A, Easton AJ, McLanchlan A. Characterization of the minimal elements of the hepatitis B virus large surface antigen promoter. *J Gen Virol* 1994;75(Pt 10):2671-2679
- 13 Li JJ, Herskowitz I. Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* 1993;262:1870-1873
- 14 Liu JD, Wilson TE, Milbrandt J, Johnston M. Identifying DNA-binding sites and analyzing DNA-binding domains using a yeast selection system. *A Comp Meth Enzymol* 1993;5:125-137
- 15 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 生物信息学技术与新基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:474-477
- 16 Luo Y, Vijaychander S, Stile J, Zhu L. Cloning and analysis of DNA-binding proteins by yeast one-hybrid and one-two-hybrid systems. *Biotechniques* 1996;20:564-568
- 17 Araki K, Miyazaki O, Hino N, Tomita N, Chisaka O, Matsubara K, Yamamura K. Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:207-211
- 18 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 牟劲松, 洪源, 刘妍, 段惠娟, 王刚, 李莉, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白与染色体转位蛋白的相互作用. 中华医学杂志 2002;82:673-677
- 19 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙型肝炎病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙型肝炎病毒基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:765-769
- 20 成军, 任进余, 李莉, 陆志檬, 李克, 洪源, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. 世界华人消化杂志 2002;10:1022-1026
- 21 陆荫英, 成军, 李克, 刘妍, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒进入肝细胞机制的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1028-1029
- 22 洪源, 成军, 李莉. 丙型肝炎病毒转基因小鼠模型的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1032-1034
- 23 成军. 新基因结构与功能研究的策略. 世界华人消化杂志 2003;11:373-377
- 24 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因和蛋白的生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2003;11:378-384
- 25 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选Hcbp6结合的肝细胞蛋白编码基因. 世界华人消化杂志 2003;11:385-388
- 26 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. 世界华人消化杂志 2003;11:394-398
- 27 陈天燕, 成军, 张树林. 酵母双杂交系统的原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:451-455
- 28 马守东, 洪源, 成军. 酵母单杂交技术的原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:450-451
- 29 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:472-474
- 30 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 肿瘤抑制因子P21/waf1与肝炎病毒复制与表达的调节研究. 世界华人消化杂志 2003;11:469-471
- 31 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选HBcAg肝细胞结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:426-429
- 32 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBeAg肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:422-425
- 33 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活基因10的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11:935-938
- 34 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒X蛋白反式调节基因. 世界华人消化杂志 2003;11:920-924
- 35 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白3反式调节靶基因. 世界华人消化杂志 2003;11:930-934
- 36 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 乙型肝炎病毒X蛋白反式激活基因10的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11:925-929
- 37 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:943-946
- 38 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式调节基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:939-942
- 39 Chang HK, Ting LP. The surface gene promoter of the human hepatitis B virus displays a preference for differentiated hepatocytes. *Virology* 1989;170:176-183
- 40 Cattaneo R, Will N, Schaller H. Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *EMBO J* 1984;3:2191-2196



# 白细胞中与NS5A TP5蛋白结合的蛋白基因的筛选与克隆

张 健, 成 军, 王 琳, 邵 清, 陆荫英, 梁耀东, 李 强, 刘 敏

张健, 成军, 王琳, 邵清, 陆荫英, 梁耀东, 李强, 刘敏, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

张健, 男, 1973-05-18生, 北京市人, 汉族. 1997年解放军第四军医大学本科毕业, 2001年解放军军医进修学院内科传染病学专业硕士研究生, 医师. 主要从事传染病的临床与基础研究.

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-25 接受日期: 2003-07-16

## Screening and cloning of human gene 5 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus

Jian Zhang, Jun Cheng, Lin Wang, Qing Shao, Yin-Ying Lu, Yao-Dong Liang, Qiang Li, Min Liu

Jian Zhang, Jun Cheng, Lin Wang, Qing Shao, Yin-Ying Lu, Yao-Dong Liang, Qiang Li, Min Liu, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2003-06-25 Accepted: 2003-07-16

## Abstract

AIM: Human gene 5 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus (NS5ATP5) is a kind of protein with unknown function from the study with suppression subtractive hybridization (SSH). To investigate the biological function of NS5ATP5, we performed yeast-two hybrid to seek for proteins in leucocytes interacting with NS5ATP5.

METHODS: NS5ATP5 bait plasmid was constructed by ligating the gene of NS5ATP5 into pGBKT7, then transformed into yeast AH109 (a type), the transformed yeast mated with yeast Y187 ( $\alpha$  type) containing leucocyte cDNA library plasmid in 2 $\times$ YPDA medium. Diploid yeast was plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing x- $\alpha$ -gal for selection and screening. After extracting and sequencing of plasmids from blue colonies, we underwent sequence analysis by bioinformatics.

RESULTS: Ten colonies were sequenced. Among them, 8 colonies were genes with known functions and two colonies were new genes.

CONCLUSION: The preliminary successful cloning of gene of protein interacting with NS5ATP5 paves the way for studying the physiological function of NS5ATP5 and asso-

ciated protein.

Zhang J, Cheng J, Wang L, Shao Q, Lu YY, Liang YD, Li Q, Liu M. Screening and cloning of human gene 5 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1): 51-53

## 摘要

目的: 采用酵母双杂交体系寻找与NS5ATP5相互作用的白细胞蛋白, 以探讨NS5ATP5的生物功能.

方法: 应用酵母双杂交系统3, 构建NS5ATP5诱饵质粒, 转化酵母AH109, 与含人白细胞cDNA文库质粒的酵母Y187进行配合, 于涂有x- $\alpha$ -gal营养缺陷型培养基上筛选生长. 挑选蓝色克隆, 提取此酵母克隆的质粒转化大肠杆菌提取质粒DNA后进行测序, 然后进行生物信息学分析.

结果: 筛选出10个与NS5ATP5特异性相互作用的克隆, 其中1个为金属硫蛋白, 1个为热休克蛋白HSP60, 1个为主要组织相容性复合体II淋巴细胞抗原DQB, 5个为人类重排免疫球蛋白 $\lambda$ -轻链, 2个是未知功能基因.

结论: 初步克隆了NS5ATP5与白细胞结合蛋白基因, 对NS5ATP5的功能研究有一定的提示作用; 为以后研究这些能与NS5ATP5相互作用的基因在白细胞中的生理功能奠定了基础.

张健, 成军, 王琳, 邵清, 陆荫英, 梁耀东, 李强, 刘敏. 白细胞中与NS5ATP5蛋白结合的蛋白基因的筛选与克隆. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):51-53  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/51.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)感染, 与肝纤维化和肝细胞癌发生发展过程密切相关. HCV感染机体后可形成病毒的持续感染, 导致肝脏的慢性化损伤. 另外, 目前许多研究发现, 丙型肝炎患者易发生肝外疾病如糖尿病、肾脏疾病、淋巴瘤等. 多数HCV慢性感染时的肝外症状为自身免疫性的, HCV病程的慢性化与此类疾病密切相关. 这提示我们HCV可能与人类免疫系统有相互作用<sup>[1-13]</sup>.

本实验室已经应用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)构建HCV NS5A作用于肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞后反式调节的cDNA消减文库, 筛选差异表达的基因片段, 并应用生物信息学(bioinformatics)技术对所得片段进行序列同源性分析, 获得其全长基因序列, 筛选到了一系列未知功能基因, 并把其中一个

命名为丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活蛋白 5 (human gene 5 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus, NS5ATP5). 为进一步研究 NS5ATP5 是否与免疫系统存在着某种关系, 本实验采用酵母双杂交系统 3 寻找与 NS5ATP5 相互作用的白细胞蛋白, 通过相互作用蛋白的研究探讨 NS5ATP5 可能的功能与作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 酵母双杂交系统及筛选培养基 pGBKT7-BD 克隆载体、pGADT7-AD 克隆载体、pGBKT7-53 对照质粒、pGBKT7-Lam 对照质粒, *Saccharomyces cerevisiae* AH109 酵母株、Y187 酵母株(K1612-1)、预转化入酵母的对照质粒 pGBKT7-53(AH109)、编码 DNA-BD/鼠 p53 融合蛋白、pTD1-1 (Y187)、质粒 pACT2 中编码 AD/SV40 大 T 抗原融合蛋白、酵母 YPDA 培养基、SD/-Trp 培养基、SD/-Leu 培养基、SD/-Trp/-Leu 培养基、SD/-Trp/-Leu/-His 培养基、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基、X- $\alpha$ -半乳糖苷酶(Gal)等购自 Clontech 公司; 半硫酸腺苷、醋酸锂购自 Sigma 公司. cDNA 白细胞文库(Y187)为本室自行转化。

**1.2 方法** 诱饵质粒载体的构建及酵母配合实验 NS5ATP5 的酵母表达载体 pGBKT7-NS5ATP5 由本室构建, 用醋酸锂<sup>[14]</sup>法转入酵母细胞 AH109 后, 在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基上培养, 无集落生长, 排除其自身激活作用. 挑取在 SD/-Trp 培养基上的转化子 - 即 GBKT7-NS5ATP5(AH109)(计数大于  $1 \times 10^9$  细胞/mL), 与白细胞文库混合, 30 °C 轻摇配合过夜, 24 h 后铺板 SD/-Trp/-Leu/-His 25 块、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 25 块. 同时进行阳性对照实验及文库滴定. 生长 6-18 d 后把长出的大于 2 mm 的酵母集落, 在铺有 X- $\alpha$ -半乳糖苷酶的 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 上检查  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性, 认为在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基上生长且出现蓝色菌落的配合为阳性集落. 挑取真正的阳性集落按照试剂盒提供的 Lyticase 法提取酵母质粒. 提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的 SOB 平板培养, 所获得的菌落酶切鉴定后测序. 阳性克隆 DNA 测序后, 提交 GenBank 分析, 所获新的基因存入 GenBank 数据库。

## 2 结果

**2.1 部分筛选克隆 Bgl II 酶切鉴定结果** 因质粒 pACT2 内含有两个 Bgl II 酶切位点, 分别位于多克隆位点两侧, 故使用该内切酶消化将释放出所筛选到的肝细胞文库的基因片段(图 1). 图 1 中出现的各个大小不同的 DNA 片段证实我们筛选的克隆为阳性克隆, 而非配合后在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基生长的假阳性克隆。

**2.2 cDNA 测序与同源性分析初步结果** 挑选 10 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较. 其中 2 个克隆为新基因, 其余 8 个均与已知基因的部分序列高度同

源(94-99%), 这 8 个已知基因包括金属硫蛋白 2A、热休克蛋白 HSP60、主要组织相容性复合体 II 淋巴细胞抗原 DQB、人类重排免疫球蛋白  $\lambda$  - 轻链共 4 种(表 1)。

表 1 NS5ATP5 结合蛋白筛选结果

序号	已知的同源序列编码蛋白	相同克隆数	同源性(%)
1	金属硫蛋白 2A	1	99
2	热休克蛋白 HSP60	1	98
3	主要组织相容性复合体 II 淋巴细胞抗原 DQB	1	98
4	人类重排免疫球蛋白 $\lambda$ - 轻链	5	94-96
5	未知功能基因	2	97-98

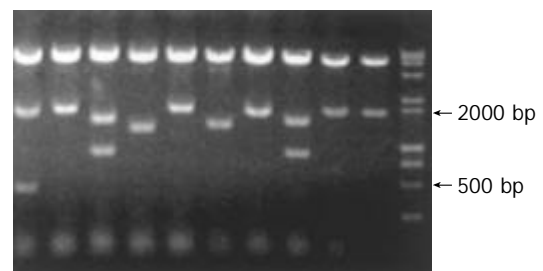


图 1 部分不同的克隆 Bgl II 酶切鉴定。

## 3 讨论

HCV 基因组含有单一的开放读码框架, 编码 3 010-3 033 个氨基酸残基的多蛋白前体, 两侧是 5' - 非翻译区及 3' - 非翻译区. 多蛋白前体至少被加工为 10 种结构蛋白和非结构蛋白, 其中非结构蛋白 NS5A 具有多种生物学功能, HCV NS5A 是病毒编码的一种功能广泛的蛋白质, 参与许多重要的调节过程<sup>[15-20]</sup>. 基于对 HCV 复制子亚基因组的研究, Blight et al<sup>[21]</sup>发现 NS5A 与 RNA 的复制有关, 当对该序列进行多种突变实验时, 他们均可不同程度的增强病毒的复制能力. 除了参与 HCV 多蛋白的成熟和 RNA 的复制过程外, 还具有多种调控细胞、病毒基因表达、细胞生长、凋亡以及免疫调节等功能. 近年研究发现, NS5A 是转录反式激活因子, 其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸, 这是真核细胞转录因子特有的结构特征<sup>[22-24]</sup>. 尽管 NS5A 蛋白存在于细胞质中, 但其具有功能性核定位信号(nucleic localization signal, NLS)序列, 即 PPRKKRVV(354-362 aa), 因此有核信号转导功能. Ghosh et al<sup>[25-26]</sup>研究发现, NS5A 蛋白可以抑制细胞周期调节基因 p21/WAF1 的转录, 而后者是介导细胞凋亡的 p53 的下游效应基因, 说明 NS5A 对细胞凋亡有抑制作用, 对细胞生长有促进作用. 通过酵母双杂交筛选试验发现 NS5A 蛋白可以和一种新近被确认的细胞转录因子 SRCAP 的 C 末端相互作用. HCV NS5A 位于 HCV 多蛋白的羧基末端, 是丝氨酸磷酸化蛋白质, 依磷酸化程度的不同而产生两种不同分子量大小的多肽 p56 和 p58. 另外, NS5A 表现出对抗干扰素  $\alpha$

(IFN $\alpha$ )的治疗效应也引起人们广泛的关注, NS5A 能够与肝细胞中的 IFN 刺激蛋白 - 双链 RNA 依赖的激酶 (PKR)相互作用, 抑制 PKR 的功能, 从而下调 IFN 刺激的抗病毒效应. NS5A 蛋白中央包括一段干扰素敏感决定区 (ISDR), 该区被认为是介导 NS5A 与 IFN $\alpha$  诱导的双链 RNA 依赖的蛋白激酶 (PKR) 结合的部位, 后者是 IFN $\alpha$  诱导的早期细胞内抗病毒合成反应. 同时 NS5A 显示出诱导 CXC 趋化因子、白介素 - 18 (IL-18), 可抵消 IFN $\alpha$  抗病毒效应<sup>[27-28]</sup>.

本实验室利用 SSH 技术筛选出 HCV NS5A 反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库, 对挑选的克隆进行分析, 发现其中一个新基因与 GenBank 中注册的已知功能基因序列没有同源性. 电子拼接推定该基因的开放读码框架获得相应的全长编码基因, 将该未知功能基因命名为 NS5ATP5. 为进一步验证 NS5ATP5 与白细胞蛋白的相互作用, 本实验采用了酵母双杂交技术筛选 NS5ATP5 与白细胞文库中有相互作用的蛋白. 酵母双杂交系统是近年来新发展起来的分析真核细胞中蛋白 - 蛋白、蛋白 - DNA、蛋白 - RNA 相互作用的一种有效的基因分析方法, 他的产生为研究蛋白在体内生理情况下的相互作用提供了一种新的遗传学方法. 本次实验共筛选出金属硫蛋白 2A、热休克蛋白 HSP60、主要组织相容性复合体 II 淋巴细胞抗原 DQB、人类重排免疫球蛋白  $\lambda$  - 轻链 4 种已知基因及 2 个未知功能基因, 对 NS5ATP5 功能的研究有一定的提示作用, 并为以后研究这些能与 NS5ATP5 相互作用的基因在白细胞中的生理功能奠定了基础.

#### 4 参考文献

- 1 成军, 朱传琳. 丙型肝炎病毒感染慢性化的分子生物学机制. 国外医学·病毒学分册 2000;7:29-32
- 2 Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol* 1995;69:3893-3896
- 3 Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol* 1996;70:4438-4443
- 4 刘妍, 成军. HCV 致肝细胞癌的分子生物学机制. 国外医学·流行病学传染病学分册 2000;27:10-13
- 5 Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-362
- 6 Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura TJ, Dienstag L, Alter MJ, Stevens CE, Tagtmeier GE, Bonino F, Colombo M, Lee WS, Kuo C, Berger K, Shister JR, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-364
- 7 Assy N, Minuk GY. A comparison between previous and present histologic assessments of chronic hepatitis C viral infections in humans. *World J Gastroenterol* 1999;5:107-110
- 8 Huang F, Zhao GZ, Li Y. HCV genotypes in hepatitis C patients and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 1999;5:547-549
- 9 Deng ZL, Ma Y, Yuan L, Teng PK. The importance of hepatitis C as a risk factor for hepatocellular carcinoma in Guangxi. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):75-79
- 10 Song ZQ, Hao F, Min F, Ma QY, Liu GD. Hepatitis C virus infection of human hepatoma cell line 7721 in vitro. *World J Gastroenterol* 2001;7:685-689
- 11 Zhang LF, Peng WW, Yao JL, Tang TH. Immunohistochemical detection of HCV infection in patients with hepatocellular carcinoma and other liver diseases. *World J Gastroenterol* 1998;4:64-65
- 12 Yang JM, Wang RQ, Bu BG, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. Effect of HCV infection on expression of several cancer associated gene products in HCC. *World J Gastroenterol* 1999;5:25-27
- 13 Cheng J. Progress in gene therapy for liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(Suppl):A261
- 14 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 15 成军, 钟彦伟, 施双双, 王刚, 董菁, 夏小兵, 杨继珍, 陈菊梅. HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体可变区基因的筛选与鉴定. 中华微生物和免疫学杂志 2000;20:567
- 16 钟彦伟, 成军, 施双双, 杨继珍, 董菁, 夏小兵, 李克, 刘妍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体的筛选与表达. 中华中西医结合杂志 2001;2:97-99
- 17 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的生物学调节作用. 国外医学·微生物学分册 2001;24:12-14
- 18 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136
- 19 钟彦伟, 成军, 王刚, 田小军, 陈新华, 刘妍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS<sub>5</sub>A 抗原模拟表位的筛选与鉴定. 中华肝脏病杂志 2002;10:266-268
- 20 刘妍, 陆荫英, 成军, 王建军, 李莉, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因的克隆化研究. 解放军医学杂志 2003;28:40-43
- 21 Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000;290:1972-1974
- 22 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- 23 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- 24 Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- 25 Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80(Pt 5):1179-1183
- 26 Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Yaciuk P, Chivria J, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 2000;275:7184-7188
- 27 Gale M Jr, Kwieciszewski B, Dossett M, Nakao H, Katze MG. Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase. *J Virol* 1999;73:6506-6516
- 28 Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001;75:6095-6106

# 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活基因6的反式激活基因的筛选

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

王建军, 男, 1975-60-17生, 汉族, 吉林省通化市人, 1999年第一军医大学本科毕业, 现为军医进修学院2001级内科传染病学专业硕士研究生。主要从事肝炎病毒蛋白的反式调节作用研究。

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-25 接受日期: 2003-07-16

## Screening and cloning of target genes transactivated by human gene 6 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus using suppression subtractive hybridization technique

Jian-Jun Wang, Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Dong Ji, Xiao-Yan Dang, Chun-Hua Wang

Jian-Jun Wang, Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Dong Ji, Xiao-Yan Dang, Chun-Hua Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Supported by Grants from National Natural Science Foundation of China, No. C030114020, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2003-06-25 Accepted: 2003-07-16

## Abstract

**AIM:** To clone and identify human genes transactivated by NS5ATP6 by constructing a cDNA subtractive library with suppression subtractive hybridization technique.

**METHODS:** Suppression subtractive hybridization (SSH) and bioinformatics techniques were used for screening and cloning of the target genes transactivated by NS5ATP6 protein. The mRNA was isolated from HepG2 cells transfected pcDNA3.1(-)-NS5ATP6 and pcDNA3.1(-) empty vector, respectively, and SSH method was employed to analyze the differentially expressed DNA sequence between the two groups. After restriction enzyme Rsa I digestion, small sizes of cDNAs were obtained. Then tester cDNA was divided into two groups and ligated to the specific adaptor 1 and adaptor 2, respectively. After tester cDNA was hybridized with driver cDNA twice and underwent two times of nested PCR and then was subcloned into T/A plasmid vectors to set up the subtractive library. Amplification of the library was carried out with E. coli strain

JM109. The cDNA was sequenced and analyzed in GenBank with Blast search after PCR.

**RESULTS:** The subtractive library of genes transactivated by NS5ATP6 was constructed successfully. The amplified library contained 33 positive clones. Colony PCR showed that these clones contained 200-2 000 bp inserts. Sequence analysis was performed in 33 clones, and the full length sequences were obtained with bioinformatics method. Altogether 26 coding sequences were obtained, which consisted of 24 known and 2 unknown ones.

**CONCLUSION:** The obtained sequences may be target genes transactivated by NS5ATP6, among which some genes coding proteins involve in cell cycle regulation, signal transduction, tumor immunity and development, and apoptosis. Advanced experiments need to be done to prove those findings.

Wang JJ, Liu Y, Cheng J, Yang Q, Ji D, Dang XY, Wang CH. Screening and cloning of target genes transactivated by human gene 6 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus using suppression subtractive hybridization technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):54-57

## 摘要

**目的:** 筛选与克隆NS5A反式激活的新型靶基因NS5ATP6的反式激活基因, 探讨其可能存在的调节功能。

**方法:** 应用抑制性消减杂交(SSH)技术及生物信息学(bioinformatics)技术筛选并克隆NS5ATP6反式激活的新型靶基因。以NS5ATP6表达质粒pcDNA3.1(-)-NS5ATP6转染HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取mRNA并逆转录为cDNA, 经Rsa I酶切后, 将实验组cDNA分成两组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与对照组cDNA进行两次消减杂交及两次抑制性聚合酶链反应(PCR), 将产物与T/A载体连接, 构建cDNA消减文库, 并转染大肠杆菌进行文库扩增, 随机挑选克隆PCR扩增后进行测序及同源性分析。

**结果:** 成功构建人NS5ATP6反式激活基因差异表达的cDNA消减文库。文库扩增后得到33个阳性克隆, 进行菌落PCR分析, 均得到200-2 000 bp插入片段。对插入片段测序, 并通过生物信息学分析获得其全长基因序列, 结果共获得26种编码基因, 包括24种已知基因和2种未知基因。

**结论:** 筛选到的cDNA全长序列, 包括一些与细胞生长调节、信号转导、肿瘤免疫发生及细胞凋亡密切相关的蛋

白编码基因, 推测了 NS5ATP6 可能存在的调控机制的线索, 尚需进一步的实验证明.

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 6 的反式激活基因的筛选. 世界华人消化杂志 2004;12(1): 54-57

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/54.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白 5A(NS5A)是 HCV 基因组编码的一种最为重要的具有多种生物学活性的非结构蛋白质<sup>[1-3]</sup>, 是 HCV 基因组编码的一种具有反式激活作用等多种生物学活性的非结构蛋白质. 其基因序列的变异, 决定部分 HCV 病毒株对于干扰素  $\alpha$ (IFN $\alpha$ )治疗的疗效应答. HCV NS5A 蛋白还具有结合双链 RNA 激酶(PKR)的生物学活性, 与 HCV 感染的靶细胞的细胞周期和细胞凋亡的分子生物学调节机制密切相关<sup>[4]</sup>. NS5A 蛋白是一种作用很强的转录激活因子, 能够影响细胞信号转导途径, 激活多种病毒及细胞基因启动子, 调控着细胞基因的转录, 推测 NS5A 蛋白的这种反式激活作用, 可能是 HCV 感染与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发生发展密切相关的重要分子生物学机制<sup>[5-6]</sup>.

本室利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH), 对于表达 HCV NS5A 载体转染的 HepG2 细胞进行研究, 结合生物信息学技术(bioinformatics)克隆了 NS5A 蛋白反式激活作用的新靶基因, 命名为 HCV NS5A 蛋白反式激活基因 6(NS5ATP6)<sup>[7]</sup>. 并继续应用抑制性消减杂交技术筛选与克隆 NS5ATP6 反式激活的基因, 推测其在体内可能存在功能的线索, 为研究 HCV 的致病机制及探索未知基因的功能提供了新的方向.

## 1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 JM109 (本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); FuGENE6 转染试剂(Roche), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50 $\times$ PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体(Promega).

### 1.2 方法

1.2.1 真核表达载体及细胞转染 HCV NS5ATP6 核表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS5ATP6 由本室构建. 用 FuGENE6 转染试剂将 2  $\mu$ g pcDNA3.1(-)-NS5ATP6 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞.

1.2.2 细胞 mRNA 提取 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了核心表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性、

定量分析.

1.2.3 双链 cDNA(dscDNA)合成 用 Clontech 公司的 PCR-Select<sup>TM</sup> cDNA Subtraction Kit 中的试剂, 以获得的 mRNA 为模板逆转录合成 cDNA.

1.2.4 消减杂交文库的建立 采用 Clontech 公司的 PCR-Select<sup>TM</sup> cDNA Subtraction Kit<sup>[3]</sup>, 常规 SSH 方法按说明书进行: 转染了核心表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 cDNA 分别标记为 Tester 和 Driver, 经 Rsa I (一种识别 4 碱基序列的内切酶)消化, 产生相对较短的平端片段, 纯化酶切产物. 将 Tester 的 cDNA 分为两份, 分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头 adapter 1 和 adapter 2, 然后与过量的 Driver cDNA 进行杂交; 合并两种杂交产物后再与 Driver cDNA 作第 2 次杂交; 然后将杂交产物做选择性 PCR 扩增, 使 Tester cDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增.

1.2.5 克隆鉴定分析 扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 JM109 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37  $^{\circ}$ C 培养 18 h. 挑取白色菌落, 增菌, 以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增, 证明含有插入片段后(100-2 000 bp), 测序(上海申友公司). 应用生物信息学将测得序列与 GenBank 数据库进行同源性分析.

## 2 结果

2.1 mRNA 的定性、定量分析 使用高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提. 紫外分光检测显示, 转染了 pcDNA3.1(-)-NS5ATP6 质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 4.64  $\mu$ g 和 4.38  $\mu$ g, A260/A280=1.87. 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带.

2.2 dscDNA 两端连接效率检测 dscDNA 与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的最关键步骤. 将连接有 adaptor 1 和 adaptor 2 的两组 dscDNA 分别用不同的特异性引物(看家基因甘油三磷酸脱氢酶 G3PDH 引物)进行 28 个循环扩增, 产物用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定. 结果显示两组 dscDNA 扩增产物浓度相当, 说明 dscDNA 已与接头高效率连接.

2.3 cDNA 消减文库消减效率的鉴定 分别取 1  $\mu$ L 抑制性及非抑制性 PCR 产物为模板, 用看家基因 G3PDH 引物进行 PCR 扩增, 分别在 18、23、28、33 次循环结束时从体系中吸取 5  $\mu$ L 进行电泳鉴定. 结果显示: 与非抑制性 PCR 产物相比, 抑制性 PCR 产物中 G3PDH 基因产物大大减少, 说明所构建的消减文库具有很高的消减效率(图 1).

2.4 差异表达 cDNA 片段的扩增及克隆 杂交产物经两轮 PCR 扩增后, 菌落 PCR 扩增结果显示为 200-2 000 bp 大小不等的插入片段, 所获得的 33 个克隆中几乎均含有插入片段, 这些条带可能代表差异表达的基因片段(图 2).

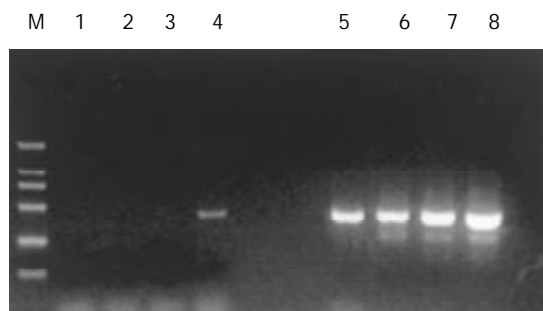


图1 消减效率分析结果. 1-4: 消减组, 引物为 G3PDH3', 5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33; 5-8: 未消减组, 引物为 G3PDH3', 5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33.

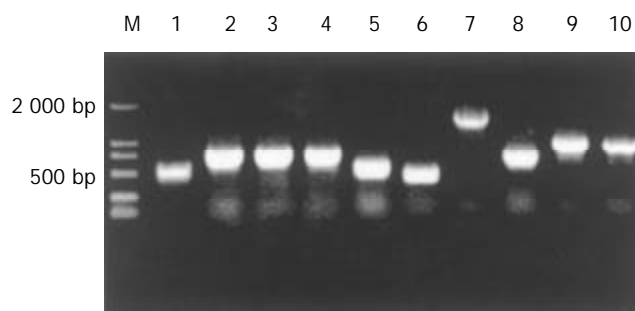


图2 部分克隆菌落 PCR 鉴定电泳图.

2.5 cDNA 测序与同源性分析初步结果 全部克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较. 其中有 2 个克隆未检索到任何对应的相似序列, 可能代表了某些新基因, 进一步的分析和功能鉴定正在进行中. 有 31 个克隆与已知基因的部分序列高度同源(96-100%)(表 1).

表 1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较结果

序号	同源序列编码蛋白	相同克隆数	同源性
1	核糖体蛋白质	6	99%
2	尿苷二磷酸氨基半乳糖基转移酶	1	97%
3	甲硫氨酸腺苷基转移酶 II	1	100%
4	磷脂酶 A2	1	100%
5	线粒体单倍型	2	100%
6	丝氨酸 / 苏氨酸激酶 17a	1	97%
7	细胞色素 C 氧化酶 III	1	97%
8	肿瘤蛋白翻译调控因子 1	1	100%
9	微粒体氨肽酶	1	99%
10	肿瘤排斥抗原 1	1	99%
11	抗胰蛋白酶	1	100%
12	桥粒斑蛋白	1	100%
13	含有 TCP1 亚单位 5 的伴侣蛋白	1	99%
14	脂肪酸结合蛋白 1	1	99%
15	短小杆菌素类似物 1	1	96%
16	转铁蛋白	2	100%
17	白蛋白	1	99%
18	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白	1	100%
19	环孢素 A 受体	1	100%
20	醛脱氢酶 7 家族 A1	1	99%
21	黄体酮受体膜结构 1	1	97%
22	磷酸核糖酰氨基咪唑羧化酶	1	99%
23	甘露糖苷酶	1	98%
24	肌动蛋白 γ	1	100%

### 3 讨论

丙型肝炎病毒的 NS5A 蛋白是转录反式激活因子, 其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸, 这是真核细胞转录因子特有的结构特征, 但是其参与细胞转录调节的机制仍不十分清楚<sup>[7-9]</sup>. 一般来说, 转录的反式激活因子是在细胞核中起作用的, 而 NS5A 定位于细胞内质网 (ER), 因此推测 NS5A 可能参与了细胞信号传导途径. NS5A 能够反式激活核转录因子 NF-κB 及 STAT3, 在细胞炎症反应、肿瘤发生及转移过程中起重要作用<sup>[8]</sup>. Ghosh et al<sup>[9]</sup>研究发现, NS5A 蛋白能够抑制细胞周期调节基因 p21WAF1, 激活人肝癌细胞中增生的细胞核抗原基因 (PCNA), 从而调节细胞凋亡, 促进细胞增生. NS5A cDNA 能够使转染的小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 具有转化特性, 且转化细胞移植入裸鼠体内可形成纤维肉瘤灶, 这一证据直接证明了 HCV NS5A 蛋白的恶性转化潜能. 可见, HCV 非结构蛋白 NS5A 的反式激活功能在 HCV 致病中发挥了重要作用. 本室利用 SSH 对表达 HCV NS5A 载体转染的 HepG2 细胞进行研究, 结合生物信息学技术克隆了 NS5A 蛋白反式激活作用的新靶基因, 命名为 HCV NS5A 蛋白反式激活基因 6 (NS5ATP6), 并构建其真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5ATP6<sup>[7]</sup>. 继续应用 SSH 筛选与克隆 NS5ATP6 反式激活的基因, 推测其在体内可能存在功能的线索.

SSH 方法是近年发展起来的一项新的基因克隆技术, 与传统的方法比较, 具有实验周期短、易操作、可靠性高、假阳性率低等特点, 能有效地分离扩增低丰度特异表达的基因, 可以在较短的时间内获得较理想的实验结果<sup>[10]</sup>. 我们将真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5ATP6, 转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 并以转染空白载体的相同细胞系作为对照, 以 2 种转染的细胞系中提取的 mRNA 为起始材料, 应用 SSH 方法成功地构建了 NS5ATP6 反式激活相关基因差异表达的 cDNA 消减文库, 挑选 33 个克隆测序分析, 结果主要包括 2 种类型, 第一种是已知基因的序列, 共 31 个克隆, 与 GenBank 中数据高度同源(96-100%). 这些克隆大致可分三类: (1)与细胞的结构、代谢相关, 如线粒体蛋白、核糖体蛋白编码基因, 肌动蛋白基因, 细胞色素 C 氧化酶 III (CO III), FABP1, 桥粒斑蛋白 (DSP) 和白蛋白与细胞的转录、代谢功能及维持细胞结构相关<sup>[11-13]</sup>. 微粒体氨肽酶可影响血清白蛋白活性<sup>[14]</sup>. (2)与肿瘤的发生、免疫等相关, 如 GalNAc-T2 常常与上皮细胞鳞状细胞癌相关<sup>[15-17]</sup>, 甲硫氨酸腺苷基转移酶 II 和 TPT1 可上调肿瘤蛋白的表达<sup>[18-20]</sup>, TRA1 和环孢素 A 受体和体内的抗肿瘤机制有关<sup>[21-22]</sup>, 而有报道醛脱氢酶的过表达可抑制环磷酰胺的抗癌作用<sup>[23]</sup>, 抗胰蛋白酶也有报道在肝癌早期升高<sup>[24]</sup>. (3)与细胞周期生长调节及信号转导途径密切相关基因, 如 G-蛋白可参与细胞内信号传导, PCA2 也与信号传导系统相关, 并且近来的研究发现其在体内的升高具有一定的抗微生物感染, 抗肿瘤的作用<sup>[25-30]</sup>. 丝氨酸 / 苏氨酸激



酶被认为可调节 c-fos 和 p27 基因的表达<sup>[31]</sup>, 并且参与对细胞凋亡的调节, 可以抑制前凋亡蛋白的活性, 抑制 T 细胞的活性<sup>[32]</sup>. 第二种是未知基因序列, 共获得 2 个差异表达的未知序列. 我们采用生物信息学方法对其中的 2 个序列分析, 获得了其全长基因序列, 已被 GenBank 收录.

通过对 NS5ATP6 的上述反式激活基因的分析, 我们发现他有可能参与体内肿瘤蛋白的表达与免疫的调控, 对于细胞内信号转导系统及细胞凋亡也可能有一定作用. NS5ATP6 是正常人体存在的基因, 在病毒蛋白 NS5A 的存在下其功能可能被进一步激活. 本文所研究的, 仅仅是其在体内可能上调的基因的功能, 这是由于 SSH 实验本身的特点决定的. 关于其在体内是否存在下调某些基因的功能及与各种活性因子的具体调节机制, 仍需进一步实验来研究.

#### 4 参考文献

- 1 成军. 丙型肝炎病毒基因的干扰素敏感决定区. 国外医学·流行病学传染病学分册 2000;27:55-58
- 2 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136
- 3 成军, 钟彦伟, 施双双, 刘妍, 王刚, 董菁, 夏小兵, 陈菊梅. HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链可变区抗体基因的筛选与鉴定. 中华实验与临床病毒学杂志 2001;15:216-218
- 4 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的生物学调节作用. 国外医学微生物学分册 2001;24:12-14
- 5 Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997;71:8856-8859
- 6 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32: 405-412
- 7 王建军, 杨倩, 成军, 刘妍, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 HS5A 反式激活基因 HS5ATP6 的克隆化研究. 胃肠病学与肝病杂志 2003;12:251
- 8 Gong GZ, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF- $\kappa$ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
- 9 Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80(Pt 5):1179-1183
- 10 Kuang WW, Thompson DA, Hoch RV, Weigel RJ. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. *Nucleic Acids Res* 1998;26: 1116-1123
- 11 Wu S, Moreno-Sanchez R, Rottenberg H. Involvement of cytochrome c oxidase subunit III in energy coupling. *Biochemistry* 1995;34:16298-16305
- 12 Vasioukhin V, Bowers E, Bauer C, Degenstein L, Fuchs E. Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation. *Nat Cell Biol* 2001;3:1076-1085
- 13 Palmer DG, Rutter GA, Tavare JM. Insulin-stimulated fatty acid synthase gene expression does not require increased sterol response element binding protein 1 transcription in primary adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:439-443
- 14 Dehm P, Nordwig A. Influence of serum albumin on the activity of a microsomal aminopeptidase. *FEBS Lett* 1970;9:225-228
- 15 Mandel U, Hassan H, Therkildsen MH, Rygaard J, Jakobsen MH, Juhl BR, Dabelsteen E, Clausen H. Expression of polypeptide GalNAc-transferases in stratified epithelia and squamous cell carcinomas: immunohistological evaluation using monoclonal antibodies to three members of the GalNAc-transferase family. *Glycobiology* 1999;9:43-52
- 16 Rottger S, White J, Wandall HH, Olivo JC, Stark A, Bennett EP, Whitehouse C, Berger EG, Clausen H, Nilsson T. Localization of three human polypeptide GalNAc-transferases in HeLa cells suggests initiation of O-linked glycosylation throughout the Golgi apparatus. *J Cell Sci* 1998;111(Pt 1):45-60
- 17 Sutherlin ME, Nishimori I, Caffrey T, Bennett EP, Hassan H, Mandel U, Mack D, Iwamura T, Clausen H, Hollingsworth MA. Expression of three UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide GalNAc N-acetylgalactosaminyltransferases in adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 1997;57:4744-4748
- 18 Martinez-Chantar ML, Garcia-Trevijano ER, Latasa MU, Martin-Duce A, Fortes P, Caballeria J, Avila MA, Mato JM. Methionine adenosyltransferase II beta subunit gene expression provides a proliferative advantage in human hepatoma. *Gastroenterology* 2003;124:940-948
- 19 LeGros HL Jr, Halim AB, Geller AM, Kotb M. Cloning, expression, and functional characterization of the beta regulatory subunit of human methionine adenosyltransferase (MAT II). *J Biol Chem* 2000;275:2359-2366
- 20 Tuynder M, Susini L, Prieur S, Besse S, Fiucci G, Amson R, Telerman A. Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:14976-14981
- 21 Harada K, Yamada A, Yang D, Itoh K, Shichijo S. Binding of a SART3 tumor-rejection antigen to a pre-mRNA splicing factor RNPS1: a possible regulation of splicing by a complex formation. *Int J Cancer* 2001;93:623-628
- 22 Howard BR, Vajdos FF, Li S, Sundquist WI, Hill CP. Structural insights into the catalytic mechanism of cyclophilin A. *Nat Struct Biol* 2003;10:475-481
- 23 Bunting KD, Lindahl R, Townsend AJ. Oxazaphosphorine-specific resistance in human MCF-7 breast carcinoma cell lines expressing transfected rat class 3 aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem* 1994;269:23197-23203
- 24 Zelvyte I, Lindgren S, Janciauskiene S. Multiple effects of alpha1-antitrypsin on breast carcinoma MDA-MB 468 cell growth and invasiveness. *Eur J Cancer Prev* 2003;12:117-124
- 25 Edwards SH, Thompson D, Baker SF, Wood SP, Wilton DC. The crystal structure of the H48Q active site mutant of human group IIA secreted phospholipase A2 at 1.5 Å resolution provides an insight into the catalytic mechanism. *Biochemistry* 2002;41:15468-15476
- 26 Leung SY, Chen X, Chu KM, Yuen ST, Mathy J, Ji J, Chan AS, Li R, Law S, Troyanskaya OG, Tu IP, Wong J, So S, Botstein D, Brown PO. Phospholipase A2 group IIA expression in gastric adenocarcinoma is associated with prolonged survival and less frequent metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99: 16203-16208
- 27 Koprivnjak T, Peschel A, Gelb MH, Liang NS, Weiss JP. Role of charge properties of bacterial envelope in bactericidal action of human group IIA phospholipase A2 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 2002;277:47636-47644
- 28 Gronroos JO, Laine VJ, Nevalainen TJ. Bactericidal group IIA phospholipase A2 in serum of patients with bacterial infections. *J Infect Dis* 2002;185:1767-1772
- 29 Koumanov KS, Momchilova AB, Quinn PJ, Wolf C. Ceramides increase the activity of the secretory phospholipase A2 and alter its fatty acid specificity. *Biochem J* 2002;363:45-51
- 30 Jiang J, Neubauer BL, Graff JR, Chedid M, Thomas JE, Roehm NW, Zhang S, Eckert GJ, Koch MO, Eble JN, Cheng L. Expression of group IIA secretory phospholipase A2 is elevated in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2002;160:667-671
- 31 Choudhury GG. Akt serine threonine kinase regulates platelet-derived growth factor-induced DNA synthesis in glomerular mesangial cells: regulation of c-fos AND p27(kip1) gene expression. *J Biol Chem* 2001;276:35636-35643
- 32 Ohteki T, Parsons M, Zakarian A, Jones RG, Nguyen LT, Woodgett JR, Ohashi PS. Negative regulation of T cell proliferation and interleukin 2 production by the serine threonine kinase GSK-3. *J Exp Med* 2000;192:99-104

# 应用表达谱芯片技术对乙型肝炎病毒前-S2抗原结合蛋白 S2-29 反式调节基因的研究

陆荫英, 刘 妍, 成 军, 梁耀东, 陈天艳, 邵 清, 王 琳, 张玲霞

陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 张玲霞, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

陆荫英, 女, 1973-08-27 生, 贵州贵阳人, 汉族, 博士, 2003 年军医进修学院毕业, 主治医师。主要从事肝病的基础研究及临床工作。

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-25 接受日期: 2003-07-16

## Genes trans-regulated by a novel hepatitis B virus preS2 antigen binding protein S2-29 by cDNA microarray

Yin-Ying Lu, Yan Liu, Jun Cheng, Yao-Dong Ling, Tian-Yan Chen, Qing Shao, Lin Wang, Ling-Xia Zhang

Yin-Ying Lu, Yan Liu, Jun Cheng, Yao-Dong Ling, Tian-Yan Chen, Qing Shao, Lin Wang, Ling-Xia Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China Supported by Grants from National Natural Science Foundation of China, No. C030114020, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2003-06-25 Accepted: 2003-07-16

## Abstract

**AIM:** To study the biological functions of a novel hepatitis B virus preS2 antigen binding protein S2-29, and to analyze the gene expression profiles of HepG2 cell transfected with S2-29 gene.

**METHODS:** S2-29 gene was screened and identified by using yeast two-hybrid system 3 and coimmunoprecipitation technique. Full-length encoding frame S2-29 and its amino acid sequences were identified by using bioinformatics method and the recombined eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1(-)-S2-29 was constructed and transfected into HepG2 cells. Total mRNA was isolated from the HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1(-)-S2-29, respectively. cDNA microarray was employed for detecting and analysing of mRNA from the HepG2 cells.

**RESULTS:** S2-29 cDNA sequence was obtained and identified by yeast two-hybrid screening and the bioinformatics analysis. Among 1 152 genes, there were 10 differences, of which 9 genes were upregulated and 1 gene were downregulated in HepG2 cells transfected with S2-29 protein

expression plasmid. These genes differentially down-regulated by S2-29 protein included eukaryotic translation elongation factor 2, MAP-kinase activating death domain, glutathione peroxidase 5, gelsolin-like capping protein (actin filament), NDRG family member 2, prosaposin, SUMO-1 activating enzyme subunit 1, insulin receptor and a novel protein.

**CONCLUSION:** Microarray technique is successfully used to screen the genes trans-regulated by S2-29, which brings some new clues for studying the trans-regulation and biological function of S2-29.

Lu YY, Liu Y, Cheng J, Ling YD, Chen TY, Shao Q, Wang L, Zhang LX. Genes trans-regulated by a novel hepatitis B virus preS2 antigen binding protein S2-29 by cDNA microarray. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12(1):58-61

## 摘要

**目的:** 应用基因表达谱芯片技术, 研究未知功能的乙型肝炎病毒(HBV)前-S2(preS2)抗原肝细胞结合蛋白基因S2-29 过表达, 对 HepG2 细胞的基因表达的影响。

**方法:** 应用酵母双杂交技术筛选并验证HBV 前-S2的肝细胞结合蛋白基因。反转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术从 HepG2 细胞中扩增 S2-29 蛋白编码基因片段, 经测序鉴定后构建表达载体 pcDNA3.1(-)-S2-29, 应用基因表达谱芯片技术对 pcDNA3.1(-)-S2-29 转染的人肝母细胞瘤细胞系 (HepG2) 细胞和转染空载体的相同细胞的差异表达 mRNA 进行检测和分析。

**结果:** 筛选出肝文库中 HBV 前-S2 结合蛋白 S2-29 的编码基因, 构建的表达载体经限制性内切酶分析和 DNA 序列测定鉴定正确。提取转染细胞的总 mRNA 并进行逆转录成为 cDNA, 进行 DNA 芯片技术分析。在 1152 个基因表达谱的筛选中, 发现有 9 个基因表达水平显著下调, 包括真核翻译延伸因子 2、MAP 激酶激活的死亡域、谷胱甘肽过氧化物酶、肌动蛋白、NDRG、Prosaposin、SUMO-1 激活酶亚基 1、胰岛素受体和 1 个未知功能蛋白。1 个未知蛋白编码基因的表达上调。

**结论:** 应用基因表达谱芯片成功筛选了 HBV 前-S2 结合蛋白 S2-29 蛋白的反式调节基因, 为进一步阐明 S2-29 蛋白对细胞表达调控的影响提供了新的依据。

陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 张玲霞. 应用表达谱芯片技术对乙型肝炎病毒前-S2 抗原结合蛋白 S2-29 反式调节基因的研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):58-61

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/58.asp>

## 0 引言

基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)是将大量目的基因片段有序、密集地固定于固相载体上而制成, 将两组组织或细胞的 mRNA 逆转录成 cDNA, 掺入荧光标记, 同时与芯片杂交, 通过扫描分析每一位置的荧光信息可以快速有效地检测到二者间差异表达的基因<sup>[1-5]</sup>. 为从不同角度对 HBV 前-S2 结合蛋白 S2-29 的生物学功能进行了解, 探索 HBV 致肝细胞损伤发生的分子生物学机制, 我们应用基因表达谱芯片技术检测肝癌细胞系在 S2-29 基因转染后差异表达的基因谱的变化, 有望对这一未知蛋白功能的深入研究提供有价值的线索和依据.

## 1 材料和方法

1.1 HBV 前-S2 肝细胞结合蛋白 S2-29 的酵母双杂交筛选及鉴定 应用酵母双杂交技术筛选 HBV 前-S2 核心蛋白结合的肝细胞蛋白的研究原理、方法、操作步骤以及 S2-29 基因真核表达载体的构建等参考相关的研究论文<sup>[6-16]</sup>.

1.2 细胞培养及转染 在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞, 细胞生长至对数期时, 分别以脂质体转染试剂FuGENE将2  $\mu$ g pcDNA3.1(-)-S2-29和空载体pcDNA3.1(-)转染HepG2细胞, 48 h后收获细胞, 每 $5 \times 10^6$ 个细胞加入1 mL Trizol试剂, 立即于液氮中保存.

1.3 总RNA及mRNA的提取和纯化 使用Trizol试剂一步法提取S2-29蛋白表达质粒pcDNA3.1(-)-S2-29和空载体pcDNA3.1(-)转染的HepG2细胞总RNA(分别标记为实验组和对照组), 样品经分光光度计检测吸光度A值, 并行热稳定实验, 于-20  $^{\circ}$ C和70  $^{\circ}$ C保温1 h后, 经琼脂糖凝胶电泳检测28 S、18 S条带变化, mRNA主要集中在0.9-4.0 kb间.

1.4 探针标记及芯片制备 逆转录标记cDNA探针并纯化. Cy3-dUTP标记对照组细胞mRNA(5  $\mu$ g), Cy5-dUTP标记实验组细胞mRNA(5  $\mu$ g). 乙醇沉淀后溶解在20  $\mu$ L 5 $\times$ SSC+0.2% SDS杂交液中. 芯片包含的1 152个cDNA由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因、抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行PCR扩增, PCR产物长度为1 000-3 000 bp. 靶基因以0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L溶解于3  $\times$  SSC溶液中, 用Cartesian公司的Cartesian 7 500点样仪及TeleChem公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min), 紫外线交联, 再分别用0.2% SDS、水及0.2%的硼氢化钠溶液处理10 min, 晾干备用.

1.5 杂交及洗涤 将预杂交液放入95  $^{\circ}$ C水浴锅内变性2 min, 将待预杂交的芯片放入95  $^{\circ}$ C水浴锅内变性30 sec, 芯片取出后即放入无水乙醇中30 sec, 晾干. 将已变性的预杂交液加到芯片的点样区域内, 盖上盖玻片, 放入杂交箱内42  $^{\circ}$ C预杂交5-6 h. 将探针置于95  $^{\circ}$ C水浴中变

性2 min; 芯片置于95  $^{\circ}$ C水浴中变性30 sec, 芯片取出浸无水乙醇30 sec, 探针取出后迅速置于冰上. 将探针置于芯片上, 用盖玻片覆盖, 置于杂交舱中, 用Parafilm密封, 放入42  $^{\circ}$ C杂交箱内杂交过夜(16-18 h). 依次以2 $\times$ SSC+0.2% SDS、0.1 $\times$ SSC+0.2% SDS、0.1% SSC洗涤10 min, 室温晾干.

1.6 扫描与分析 用General Scanning公司的ScanArray 3 000扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24条管家基因, 每个基因点2个点, 共48个点)对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正. 用ImaGene 3.0软件分析Cy3、Cy5两种荧光信号的强度, 计算Cy5/Cy3比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3 >2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3 <0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

## 2 结果

2.1 以HBV前-S2为“诱饵”对于肝细胞文库酵母双杂交筛选及鉴定结果 以HBV前-S2为“诱饵”与肝细胞cDNA文库的杂交, 筛选出HBV前-S2结合蛋白新基因S2-29<sup>[17]</sup>, 并用免疫共沉淀技术再次证实.

2.2 总RNA的定性、定量分析 总RNA的吸光度A260/A280 >1.92, 热稳定实验70  $^{\circ}$ C保温1 h与-20  $^{\circ}$ C 1 h的电泳条带比较, 显示28 S条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总RNA.

2.3 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有1 152个cDNA. 为了监控芯片杂交体系, 在芯片上设置了阴性对照(8条水稻基因, 共8个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记Cy5荧光素(呈红色), 对照组探针标记Cy3荧光素(呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 按阳性标准, 从1 152个基因中筛选出差异表达基因共37条, 占3.7%, 其中14条基因表达增强, 23条基因表达降低.

2.4 差异表达基因分析 在差异表达的10个基因中, 有9个基因的表达被下调, 包括与细胞合成代谢、生长分化、凋亡及信号转导相关的一些基因; 1个未知蛋白基因(GenBank号: NM007211)表达被上调, 见表1.

表1 受S2-29影响表达下调的蛋白质编码基因

编码蛋白质	GenBank号
真核翻译延伸因子2	001967
MAP激酶激活的死亡域	003682
谷胱甘肽过氧化物酶	001509
肌动蛋白	001747
NDRG	016250
Prosaposin	002778
SUMO-1激活酶亚基1	005500
胰岛素受体	000208
未知蛋白	AB023160

### 3 讨论

HBV 前-S2蛋白作为HBV包膜蛋白的组成之一,功能复杂,不仅能与PHSA结合介导肝细胞的黏附及入侵,能引起中和抗体和保护性免疫的发生,用于构建新型的乙型肝炎疫苗外,近年来还有报道前-S2蛋白N末端I区可能是截短性中蛋白发挥反式激活作用的重要部分,可能参与HBV慢性化及HCC的发生过程<sup>[18-23]</sup>.为弄清HBV前-S2蛋白在肝细胞中到底与那些蛋白质因子相互作用、如何作用,我们应用酵母双杂交技术筛选出了一个与前-S2蛋白有相互作用的新蛋白基因S2-29,使对前-S2蛋白的研究又有了新的主题.为明确S2-29的生物学功能以及在HBV感染肝细胞过程中所起的作用,我们应用表达谱芯片技术研究受其过表达影响出现表达异常的基因,以期能从中寻找到有价值的线索,为进一步的研究奠定基础.

我们用基因表达谱芯片对新蛋白S2-29作了初步的研究,构建pcDNA3.1(-)-S2-29真核表达载体,将空载体作为对照共同转染HepG2细胞,48h后提取2组细胞的mRNA进行分析,发现S2-29的表达能使9种基因表达水平下调,一种未知功能蛋白基因的表达上调.下调的基因中包括有丝分裂素激活的蛋白(MAP)激酶激活死亡域(MADD)蛋白,MADD通过自身的C末端区域与肿瘤坏死因子I受体(TNFR1)相互作用,激活有丝分裂素激活的蛋白激酶,是TNFR1信号通路复合物中关键的成分.MADD的过表达可激活MAP蛋白激酶细胞外信号调节激酶(ERK),刺激ERK和c-JUN的N末端激酶-MAP蛋白激酶,诱导细胞磷脂酶A2的磷酸化.MADD将TNFR1与MAP蛋白激酶的活化与花生四烯酸的释放连接起来<sup>[24-28]</sup>.Prosaposin是有单拷贝基因编码的一种多功能分泌型的膜蛋白质,含有4个saposin区域,saposin是一种小的热稳定蛋白,是特异性的溶酶体水解酶分解鞘磷脂所必需的成分.存在于多种组织和体液中,有A、B、C、D四种,由共同的前体蛋白Prosaposin分解而来,推测其在体内可能是神经节苷脂的结合和运送蛋白<sup>[28-29]</sup>.Sentrin-1/SUMO-1是一种小的遍在蛋白类似物,能够共价结合并修饰一些蛋白质,包括Ran GTP酶活化蛋白1、I $\kappa$ B $\beta$ 、PML等,使这些蛋白改变其亚细胞靶定及稳定性,从而影响这些因子介导的基因转录<sup>[30-31]</sup>.N-Myc下游调节子(NDRG1)在机体中遍在分布,在细胞生长停止及细胞分化过程中起作用,可能作为一种信号蛋白穿梭于胞质与胞核间,在细胞分化过程中被上调,在胚胎细胞中可以被N-myc、c-myc抑制,在部分肿瘤细胞中受限制<sup>[32-33]</sup>.谷胱甘肽过氧化物酶(GPX5)是氢过氧化物清除系统中的成员,保护细胞免受脂质过氧化损伤<sup>[34]</sup>.S2-29能下调上述基因的表达,提示S2-29可能与细胞信号转导、细胞生长分化及氧化还原过程相关.另外,结合临床上HBV感染的患者部分合并有肝源性糖尿病,在发病机制中胰岛素受体及受体后缺陷是其中关键的因素之一,S2-29能下调胰岛

素受体的表达,且能与HBV前S2蛋白结合,推测其间的作用可能是肝源性糖尿病发病中重要的一环.

随着越来越多的新基因的发现,研究新基因及其表达产物的生理、病理学功能已逐渐成为今后科研工作的热点,但如何从千变万化的蛋白质功能中找出某一新基因的所属,并明确其具体的一种或多种生物学功能,是一项艰难而有极具挑战性的工作.利用基因表达谱芯片能进行大规模筛选的优点,我们从1152中基因中选出被S2-29影响表达的10条基因,基于上述结果的提示,使我们可以设计相应的实验去进行更深入的研究,为更加全面地了解新基因S2-29的功能作铺垫,也为更多新基因功能研究工作积累了经验.

### 4 参考文献

- Zhang MQ. Large-scale gene expression data analysis: a new challenge to computational biologists. *Genome Res* 1999;9: 681-688
- Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ. Combining SSH and cDNA microarray for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 1999; 27:1517-1523
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-537
- 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:461-463
- 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. *世界华人消化杂志* 2003;11:394-398
- 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆HCV核心蛋白结合蛋白基因1. *世界华人消化杂志* 2001; 9:1379-1383
- 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒X基因酵母表达载体的构建及表达. *世界华人消化杂志* 2002; 10:15-18
- 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒NS2基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. *世界华人消化杂志* 2002;10:129-132
- 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. *世界华人消化杂志* 2002;10:161-164
- 陆荫英, 李克, 刘妍, 王琳, 成军, 张玲霞. 乙型及丙型肝炎病毒受体的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:211-213
- 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选Hcbp6结合的肝细胞蛋白编码基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:385-388
- 马守东, 洪源, 成军. 酵母单杂交技术的原理及应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:450-451
- 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选HBcAg肝细胞结合蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:426-429
- 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBeAg肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. *世界华人消化杂志* 2003;11:422-425
- 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S1基因酵母表达载体的构建及表达. *解放军医学杂志* 2002;27:341-342
- 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S2基因酵母表达载体的构建及表达. *胃肠病学和肝病杂志* 2002; 11:222-224
- 陆荫英, 李克, 王琳, 刘妍, 王业东, 成军, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前S2蛋白结合蛋白基因的筛选. *中华肝脏病杂志* 2003;11:8-11
- Kondo J, Shimomura H, Fujioka S, Iwasaki Y, Takagi S, Ohnishi Y, Tsuji H, Sakaguchi K, Yamamoto K, Tsuji T. Mutations in the hepatitis B virus Pre-S2 region and abrogated receptor activity for polymerized human albumin. *Acta Med Okayama* 2002;56:193-198

- 19 Deng H, Cheng J, Shi S, Hong Y, Ren X, Li L. A preliminary study on the heterogeneity of Pre-S2 region in hepatitis B virus. *Zhonghua Neike Zazhi* 2002;41:233-236
- 20 Bock CT, Tillmann HL, Manns MP, Trautwein C. The pre-S region determines the intracellular localization and appearance of hepatitis B virus. *Hepatology* 1999;30:517-525
- 21 Park JH, Cho EW, Lee YJ, Shin SY, Kim KL. Determination of the protective effects of neutralizing anti-hepatitis B virus (HBV) immunoglobulins by epitope mapping with recombinant HBV surface-antigen proteins. *Microbiol Immunol* 2000;44:703-710
- 22 Hildt E, Hofschneider PH. The Pre-S2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:315-329
- 23 Hildt E, Munz B, Saher G, Reifenberg K, Hofschneider PH. The Pre-S2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *EMBO J* 2002;21:525-535
- 24 Chow VT, Lim KM, Lim D. The human DENN gene: genomic organization, alternative splicing, and localization to chromosome 11p11.21-p11.22. *Genome* 1998;41:543-552
- 25 Schievella AR, Chen JH, Graham JR, Lin LL. MADD, a novel death domain protein that interacts with the type 1 tumor necrosis factor receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997;272:12069-12075
- 26 Lim KM, Chow VT. Induction of marked apoptosis in mammalian cancer cell lines by antisense DNA treatment to abolish expression of DENN (differentially expressed in normal and neoplastic cells). *Mol Carcinog* 2002;35:110-126
- 27 Al-Zoubi AM, Efimova EV, Kaithamana S, Martinez O, El-Idrissi Mel-A, Dogan RE, Prabhakar BS. Contrasting effects of IG20 and its splice isoforms, MADD and DENN-SV, on tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis and activation of caspase-8 and -3. *J Biol Chem* 2001;276:47202-47211
- 28 Hazkani-Covo E, Altman N, Horowitz M, Graur D. The evolutionary history of prosaposin: two successive tandem-duplication events gave rise to the four saposin domains in vertebrates. *J Mol Evol* 2002;54:30-34
- 29 Hiraiwa M, Soeda S, Kishimoto Y, O'Brien JS. Binding and transport of gangliosides by prosaposin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11254-11258
- 30 Desterro JM, Rodriguez MS, Kemp GD, Hay RT. Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *J Biol Chem* 1999;274:10618-10624
- 31 Okuma T, Honda R, Ichikawa G, Tsumagari N, Yasuda H. In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:693-698
- 32 Qu X, Zhai Y, Wei H, Zhang C, Xing G, Yu Y, He F. Characterization and expression of three novel differentiation-related genes belong to the human NDRG gene family. *Mol Cell Biochem* 2002;229:35-44
- 33 Ohki T, Hongo S, Nakada N, Maeda A, Takeda M. Inhibition of neurite outgrowth by reduced level of NDRG4 protein in antisense transfected PC12 cells. *Brain Res Dev Brain Res* 2002;135:55-63
- 34 Hall L, Williams K, Perry AC, Frayne J, Jury JA. The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. *Biochem J* 1998;333(Pt 1):5-9

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 读者来信 •

尊敬的编辑:

非常感谢贵刊的扶持. 我的文章在 12 月发表出来(Zhang YW, Ding LS, Lai MD. Reg gene family and human diseases. *World J Gastroenterol* 2003;9(12):2635-2641), 短短几天, 就收到一些国外来信, 有来请教的, 也有索要原文的. 忠心希望贵刊越办越好.

(张宇伟, 东南大学基础医学院病理学系)

# HBsAg 结合蛋白 C-12 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析

陆荫英, 刘 妍, 成 军, 梁耀东, 陈天艳, 邵 清, 王 琳, 张玲霞

陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 张玲霞, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

陆荫英, 女, 1973-08-27 生, 贵州贵阳人, 汉族, 博士, 2003 年军医进修学院毕业, 主治医师。主要从事肝病的基础研究及临床工作。

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-25 接受日期: 2003-07-16

## Gene expression profile of HepG2 cell transfected with a novel gene C-12 coding for HBcAg binding protein

Yin-Ying Lu, Yan Liu, Jun Cheng, Yao-Dong Ling, Tian-Yan Chen, Qing Shao, Lin Wang, Ling-Xia Zhang

Yin-Ying Lu, Yan Liu, Jun Cheng, Yao-Dong Ling, Tian-Yan Chen, Qing Shao, Lin Wang, Ling-Xia Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Supported by Grants from National Natural Science Foundation of China, No. C030114020, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2003-06-25 Accepted: 2003-07-16

## Abstract

**AIM:** To study the biological function of a novel hepatitis B virus core antigen binding protein C-12, and to analyze the gene expression profiles of HepG2 cell transfected with C-12 gene.

**METHODS:** C-12 gene was screened and identified by using yeast two-hybrid system 3 technique. Full-length encoding frame C-12 and its amino acid sequences was identified using bioinformatics method and the recombined eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1(-)-C-12 was constructed. cDNA microarray technology was employed to detect the mRNA from HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-)-C-12 and pcDNA3.1(-), respectively.

**RESULTS:** According to yeast two-hybrid screening and the bioinformatics analysis results, C-12 cDNA sequence was identified. Among 1152 genes, there were 17 differences, of which 16 genes were upregulated and 1 gene were downregulated in HepG2 cells transfected with C-12 protein expression plasmid. These genes differentially regulated by C-12 protein included human genes encoding proteins

involved in cell signal transduction, cell proliferation and differentiation, and cell growth regulation.

**CONCLUSION:** Overexpression of C-12 affects the expression profile of HepG2 cells. The results prove some clues for further clarifying the molecular biology processes of hepatocytes during the interaction between HBV core protein and C-12.

Lu YY, Liu Y, Cheng J, Ling YD, Chen TY, Shao Q, Wang L, Zhang LX. Gene expression profile of HepG2 cell transfected with a novel gene C-12 coding for HBcAg binding protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):62-65

## 摘要

**目的:** 为研究未知功能的乙型肝炎病毒(HBV)核心抗原(HBcAg)结合蛋白 C-12 的生物学功能, 我们应用基因芯片技术对于 C-12 转染的 HepG2 细胞的基因表达谱进行分析, 探索该基因表达对细胞基因表达的影响。

**方法:** 应用酵母双杂交技术筛选并验证 HBcAg 的肝细胞结合蛋白基因。反转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术从 HepG2 细胞中扩增 C-12 蛋白编码基因片段, 经测序鉴定后构建表达载体 pcDNA3.1(-)-C-12。以脂质体技术转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 提取总 mRNA, 逆转录为 cDNA, 与转染空白表达载体 pcDNA3.1(-) 的 HepG2 细胞进行 DNA 芯片分析并比较。

**结果:** 筛选出肝文库中 HBcAg 结合蛋白新基因 C-12, 构建的表达载体经过限制性内切酶分析和 DNA 序列测定鉴定正确。提取转染细胞的总 mRNA 并逆转录成为 cDNA, 进行 DNA 芯片技术分析。在 1 159 个基因表达谱的筛选中, 发现有 16 个基因表达水平显著下调, 包括胰岛素受体、丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶抑制剂、SUMO-1 活化酶亚基 1、肿瘤易感基因 101、磷酸硒合成酶 2 (SPS2)、caspase 4 凋亡相关半胱氨酸蛋白酶 4、急性淋巴细胞性白血病易位子 T、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)、DEAD box 蛋白多肽 21、前折叠素 5 (Prefoldin 5)、丝氨酸棕榈酰转移酶、G 蛋白通路抑制剂、肿瘤坏死因子受体相关蛋白、转化生长因子  $\beta$ 1、ADP-核糖基转移酶及 1 个未知蛋白基因; 1 个未知功能蛋白编码基因的表达水平显著上调。

**结论:** C-12 基因的表达对于肝癌细胞基因表达谱有显著影响, 基因表达谱芯片技术是探索基因功能的有效技术途径, 实验结果为进一步阐明 C-12 与 HBcAg 结合后的肝



细胞生物学变化提供了有力的依据.

陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 张玲霞. HBsAg 结合蛋白 C-12 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. 世界华人消化杂志 2004; 12(1):62-65

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/62.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)核心蛋白(HBcAg)具有保护病毒 mRNA, 防止其被 RNA 酶降解的作用, 对于乙肝病毒前基因组 RNA 的装配、基因组 DNA 的合成具有重要的作用, 还参与介导机体的免疫反应, 在病毒致病过程中起着重要的作用<sup>[1-6]</sup>. 肝炎病毒蛋白与宿主蛋白相互作用, 是病毒感染导致肝细胞损伤、肝纤维化和肝细胞癌发生、发展的重要原因, 研究 HBcAg 与肝细胞蛋白之间的相互作用, 有助于更好地理解 HBV 的致病作用. 我们采用酵母双杂交系统 3, 以 HBcAg 作为“诱饵”, 从肝细胞 cDNA 文库“钓”出一未知蛋白 C-12. 为进一步探索该基因的功能, 我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)筛选 C-12 表达质粒转染 HepG2 细胞后的差异表达基因, 并进行分析, 为全面了解 C-12 基因在肝细胞中的生物过程提供理论基础.

## 1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 JM109(本室保存), Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、EcoR I、BamH I 和 Pst I 等限制性内切酶购于 Takara 生物公司, pcDNA3.1(-) 真核表达载体(Invitrogen); Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50×PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体(Promega), 新基因 E-36 扩增引物(P3 5' - GAATTCATGCTCTATCCA GCCCTTCACCAG-3', P4 5' - GGATCCTCAGCAGC AGGCGGAAA CGCTCGTC-3')由合成及 DNA 测序由上海博亚公司承担.

### 1.2 方法

1.2.1 HBcAg 结合蛋白的酵母双杂交筛选 应用酵母双杂交技术筛选 HCV 核心蛋白结合的肝细胞蛋白的研究原理、方法、操作步骤以及 C-12 基因真核表达载体的构建等参考基因治疗研究中心相关的研究论文<sup>[7-13]</sup>.

1.2.2 总 RNA 提取及 mRNA 纯化 在 35 mm 培养皿中常规培养肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞, 细胞生长至对数期时, 分别以脂质体转染试剂 Lipofectamine PLUS 将 2 μg pcDNA3.1(-)-C-12 和空载体 pcDNA3.1(-)转染 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞, 每 5×10<sup>6</sup> 个细胞加入 1 mL Trizol RNA 提取试剂. 立即于液氮中保存. 使用 Trizol 试剂一步法提取 pcDNA3.1(-)-C-12 和空载体 pcDNA3.1(-)转染的 HepG2 细胞总 RNA (分别标记为实验组和对

照组), 样品经分光光度计检测吸光度 A 值, 并行热稳定实验, 于 -20 °C 和 70 °C 保温 1 h 后, 经琼脂糖凝胶电泳检测 28 S、18 S 条带变化. 以 Qiagen 公司 Oligotex mRNA Midi Kit 纯化得 Mrna(操作按说明书进行), 并行电泳检测.

1.2.3 探针标记及芯片制备 逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA(5 μg), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA(5 μg). 乙醇沉淀后溶解在 20 μL 5 × SSC+2 g/L SDS 杂交液中. 芯片包含的 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000-3 000 bp. 靶基因以 0.5 μg/μL 溶解于 3 × SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min), UV 交联, 再分别用 2 g/L SDS、水及 2 g/L 的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用.

1.2.4 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针 95 °C 水浴变性 5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于 60 °C 杂交 15-17 h. 依次以 2 × SSC+2 g/L SDS、0.1 × SSC+2 g/L SDS、0.1 × SSC 洗涤 10 min, 室温晾干.

1.2.5 检测与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点)对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3>1.8, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3 <0.7, 为绿色荧光, 显示表达减低.

## 2 结果

2.1 以 HBcAg 为“诱饵”对肝细胞文库酵母双杂交筛选及鉴定结果 以 HBcAg 为“诱饵”与肝细胞 cDNA 文库的杂交, 筛选出 HBcAg 结合蛋白新基因 C-12<sup>[14-15]</sup>, 并经回交实验再次证实.

2.2 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 提取 pcDNA 3.1(-)-C-12 和空载体 pcDNA3.1(-)转染的 HepG2 细胞总 RNA, 测得吸光度 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>>1.90, 热稳定实验 70 °C 保温 1 h 与 -20 °C 1 h 电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA. mRNA 主要集中于 0.9-4.0 kb 的连续条带.

2.3 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有 1 152 个 cDNA. 为了监控芯片杂交技术体系的整个过程, 在芯片上设置了阴性对照(8 条水稻基因, 共 8 个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记 Cy5 荧光素(呈红色), 对照组探针标记 Cy3 荧光素(呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 按阳性标准, 从 1 152 个基因中筛选

出差异表达基因共 20 条, 其中 13 条基因表达增强, 7 条基因表达降低。

2.4 差异表达基因分析 在 1152 个基因中筛选出 17 个差异表达的基因, 除一个未知基因表达上调外, 其余 16 种基因的表达下调, 提示 C-12 的过表达对 HepG2 细胞中的这些蛋白表达有抑制作用。这些差异表达基因大多与细胞信号转导、细胞增生分化、肿瘤发生等生物过程密切相关, 如相关肿瘤发生相关基因如肿瘤易感基因 101、急性淋巴细胞性白血病易位子 T 等; 细胞生长调节及细胞信号转导相关基因, 如 G 蛋白通路抑制剂、丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶抑制剂、caspase 4、肿瘤坏死因子受体相关蛋白、转化生长因子、丝氨酸棕榈酰转移酶等及 DNA 复制及翻译相关基因如 DEAD box 蛋白多肽 21 等; 过氧化酶相关基因如 ADP-核糖基转移酶、谷胱甘肽过氧化物酶 4、磷酸硒合成酶 2 等(表 1)。

表 1 C-12 影响表达减低的基因

GenBank 号(NM)	编码蛋白
000208	胰岛素受体
005500	SUMO-1 活化酶亚基 1
006292	肿瘤易感基因 101
012248	磷酸硒合成酶 2 (SPS2)
006217	丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶抑制剂
033306	caspase 4 凋亡相关半胱氨酸蛋白酶 4
L04731	急性淋巴细胞性白血病易位子 T
002085	谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)
004728	DEAD box 蛋白多肽 21
002624	Prefoldin 5
006415	丝氨酸棕榈酰转移酶
004127	G 蛋白通路抑制剂
016614	肿瘤坏死因子受体相关蛋白(TTRAP)
000660	转化生长因子(TGFβ1)
006437	ADP-核糖基转移酶
AK027136	未知蛋白

### 3 讨论

基因表达谱芯片技术是近年来新发展起来的一项研究差异基因表达的分子生物学前沿技术, 通过将大量的基因特异的探针或其 cDNA 片段固定在一块固相载体上, 与待测样品杂交后用激光共聚焦荧光检测系统进行结果扫描、检测, 对来源不同的个体、组织、发育阶段、分化阶段、病变及刺激条件下的细胞内的 mRNA 或 cDNA 进行分析, 获得大量有价值的生命信息<sup>[16-20]</sup>。该技术解决了传统核酸杂交技术操作复杂、检测目的基因少、低通量的缺点, 能一次进行大量的信息分析, 在各种的疾病诊断、基因突变分析、病原体检测、治疗药物筛选、疾病发生发展的分子生物学机制研究等方面具有广泛的应用价值。本研究应用基因表达谱芯片技术, 对肝细胞 cDNA 文库中未知功能的 HBcAg 结合蛋白新基

因 C-12 表达质粒 pcDNA3.1(-)-C-12 和空载体对照分别转染的 HepG2 细胞差异表达的 mRNA 进行检测, 通过分析二者之间基因表达的差异信息, 寻找 C-12 反式调节的基因。在 1152 个基因中筛选出 17 个差异表达的基因, 其中 16 个是表达减低的基因, 与细胞信号转导、细胞增生分化、肿瘤发生及氧化还原有关。

在受 C-12 表达影响下调的基因中, SUMO-1 活化酶能催化 SUMO-1 (一种泛素的类似物) 结合并修饰 RanGAP1, PML, Sp200 及 I kappa B alpha 等转录因子<sup>[21-23]</sup>。DEAD box 蛋白因含有保守的 Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD) 序列, 是一种推定的 RNA 解旋酶, 与许多细胞过程有关如改变 RNA 二级结构包括转录起始、细胞核及线粒体的分裂、核糖体和剪接体的聚合等, 影响着诸如胚胎发育、精子发生、细胞生长、分化等活动。该蛋白可以使双链 RNA 解旋、使单链 RNA 折叠, 并在核糖体 RNA 的产生、RNA 编辑、RNA 转运以及普通转录过程中发挥重要作用<sup>[24]</sup>。前折叠素(Prefoldin)是分子伴侣家族中的一员, 是伴侣蛋白(chaperonin)介导的蛋白质折叠过程中一个重要的中间物质, 他能捕获并转运胞质中未折叠的目的蛋白, 使其特异性地与伴侣蛋白结合, 介导蛋白质的正确折叠和成熟<sup>[25-29]</sup>。

肿瘤易感基因(TSG101 tumor susceptibility gene)在纤维母细胞中的表达产物的失活可以引起细胞发生转化, 导致裸鼠发生转移性肿瘤。而人的 TSG101 基因位于 11 号染色体的 15.1-15.2 长臂上, 该区域被推断含有肿瘤抑制基因, 有研究证实发现乳腺癌组织中发现 TSG101 的等位基因有缺失突变, 而正常的乳腺组织中则没有<sup>[30]</sup>。急性淋巴细胞性白血病基因(ALL-1)位于第 11 号染色体的 23 号长臂上, 在急性白血病时该基因出现中间缺失突变或与第 1、4、6、9、10、19 号染色体的相应区域发生交互转位, 且该基因的异常变化可以引起一些特殊的肿瘤融合蛋白的产生<sup>[31]</sup>。抑制过氧化酶相关基因如 ADP-核糖基转移酶、谷胱甘肽过氧化物酶 4、磷酸硒合成酶 2 等, 可以干扰细胞的能量代谢, 引起细胞炎症坏死。C-12 新基因的表达可抑制以上基因的表达, 提示 C-12 蛋白可能参与细胞转录和蛋白合成、肿瘤发生及细胞的能量代谢等多方面的作用。

总之, 利用基因表达谱芯片对 C-12 蛋白差异调节基因的表达研究表明, 细胞内 C-12 蛋白的过表达引起的生物过程涉及许多不同基因表达的变化, 这些基因与细胞增生与分化、肿瘤发生、能量代谢及生物转化等生物过程密切相关, 结果为深入了解 C-12 基因的生物学功能及其与 HBV 相互作用过程中致病(癌)的分子生物学机制提供重要的线索。

### 4 参考文献

- 1 Pumpens P, Grens E. Hepatitis B core particles as a universal display model: a structure-function basis for development. *FEBS Lett* 1999;442:1-6
- 2 Le Pogam S, Shih C. Influence of a putative intermolecular interaction between core and the Pre-S1 domain of the large

- envelope protein on hepatitis B virus. *J Virol* 2002;76:6510-6517
- 3 Livingston BD, Crimi C, Fikes J, Chesnut RW, Sidney J, Sette A. Immunization with the HBV core 18-27 epitope elicits CTL responses in humans expressing different HLA-A2 supertype molecules. *Hum Immunol* 1999;60:1013-1017
- 4 Riedl P, Stober D, Oehninger C, Melber K, Reimann J, Schirmbeck R. Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace amounts of RNA bound to its arginine-rich domain. *J Immunol* 2002;168:4951-4959
- 5 Cao T, Meuleman P, Desombere I, Sallberg M, Leroux-Roels G. *In vivo* inhibition of anti-hepatitis B virus core antigen (HBcAg) immunoglobulin G production by HBcAg-specific CD4(+) Th1-type T-cell clones in a hu-PBL-NOD/SCID mouse model. *J Virol* 2001;75:11449-11456
- 6 Lazdina U, Cao T, Steinbergs J, Alheim M, Pumpens P, Peterson DL, Milich DR, Leroux-Roels G, Sallberg M. Molecular basis for the interaction of the hepatitis B virus core antigen with the surface immunoglobulin receptor on naive B cells. *J Virol* 2001;75:6367-6374
- 7 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 8 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体的构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:15-18
- 9 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒 NS2 基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132
- 10 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. 世界华人消化杂志 2002;10:161-164
- 11 陆荫英, 李克, 刘妍, 王琳, 成军, 张玲霞. 乙型及丙型肝炎病毒受体的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:211-213
- 12 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选 Hcbp6 结合的肝细胞蛋白编码基因. 世界华人消化杂志 2003;11:385-388
- 13 马守东, 洪源, 成军. 酵母单杂交技术的原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:450-451
- 14 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:426-429
- 15 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBcAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:422-425
- 16 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. 世界华人消化杂志 2003;11:461-463
- 17 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. 世界华人消化杂志 2003;11:394-398
- 18 Zhang MQ. Large-scale gene expression data analysis: a new challenge to computational biologists. *Genome Res* 1999;9:681-688
- 19 Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ. Combining SSH and cDNA microarray for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 1999;27:1517-1523
- 20 Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-537
- 21 Okuma T, Honda R, Ichikawa G, Tsumagari N, Yasuda H. In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:693-698
- 22 Desterro JM, Rodriguez MS, Kemp GD, Hay RT. Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *J Biol Chem* 1999;274:10618-10624
- 23 Gong L, Li B, Millas S, Yeh ET. Molecular cloning and characterization of human AOS1 and UBA2, components of the sentrin-activating enzyme complex. *FEBS Lett* 1999;448:185-189
- 24 Valdez BC, Henning D, Busch RK, Woods K, Flores-Rozas H, Hurwitz J, Perlaky L, Busch H. A nucleolar RNA helicase recognized by autoimmune antibodies from a patient with watermelon stomach disease. *Nucleic Acids Res* 1996;24:1220-1224
- 25 Vainberg IE, Lewis SA, Rommelaere H, Ampe C, Vandekerckhove J, Klein HL, Cowan NJ. Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. *Cell* 1998;93:863-873
- 26 Agashe VR, Hartl FU. Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol* 2000;11:15-25
- 27 Evstigneeva ZG, Solov'eva NA, Sidel'nikova LI. Structure and functions of chaperones and chaperonins. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 2001;37:5-18
- 28 Braig K. Chaperonins. *Curr Opin Struct Biol* 1998;8:159-165
- 29 陆荫英, 成军, 张玲霞. 分子伴侣及其与乙型肝炎病毒的关系. 胃肠病学和肝病杂志 2002;11:177-179
- 30 Li L, Li X, Francke U, Cohen SN. The TSG101 tumor susceptibility gene is located in chromosome 11 band p15 and is mutated in human breast cancer. *Cell* 1997;88:143-154
- 31 Schiffer CA, Hehlmann R, Larson R. Perspectives on the treatment of chronic phase and advanced phase CML and Philadelphia chromosome positive ALL(1). *Leukemia* 2003;17:691-699

# 乙型肝炎病毒e抗原肝细胞结合蛋白新基因E-36基因表达谱芯片分析

陆荫英, 刘 妍, 成 军, 梁耀东, 陈天艳, 邵 清, 王 琳, 张玲霞

陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 张玲霞, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

陆荫英, 女, 1973-08-27 生, 贵州贵阳人, 汉族, 博士, 2003 年军医进修学院毕业, 主治医师。主要从事肝病的基础研究及临床工作。

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-25 接受日期: 2003-07-16

## Screening and identification of genes trans-regulated by a novel HBeAg binding protein E-36 with cDNA microarray assay

Yin-Ying Lu, Yan Liu, Jun Cheng, Yao-Dong Ling, Tian-Yan Chen, Qing Shao, Lin Wang, Ling-Xia Zhang

Yin-Ying Lu, Yan Liu, Jun Cheng, Yao-Dong Ling, Tian-Yan Chen, Qing Shao, Lin Wang, Ling-Xia Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China  
Supported by Grants from National Natural Science Foundation of China, No. C030114020, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2003-06-25 Accepted: 2003-07-16

## Abstract

**AIM:** To investigate the biological functions of a novel hepatitis B virus e antigen (HBeAg) binding protein E-36, and to screen genes regulated by E-36.

**METHODS:** The E-36 coding DNA fragment was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique from HepG2 cell. The expressive vector of pcDNA 3.1-E-36 was constructed by routine molecular biological methods. The HepG2 cells were transfected by pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1-E-36, respectively by using lipofectamine. The total RNA was isolated and reverse transcribed. The cDNAs were subjected to microarray screening with 1 152 cDNA probes.

**RESULTS:** The expressive vector was constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing analysis. High quality mRNA and cDNA of transfected HepG2 cells were prepared and successful microarray screening conducted. From the scanning results, 20 genes were found to be up-regulated, including PTH-responsive

osteosarcoma B1 protein, slit homolog 2, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, interleukin 3 receptor, caspase 2, angiotensin I converting enzyme, Low density lipoprotein 1, interleukin 6, T-cell receptor rearranged beta chain gene V-region, activator of NFκB, tumor suppressing subtransferable candidate 1, cyclin-dependent kinase-like 2, sialyltransferase 8, glutamate receptor, metabotropic 7, and 5 novel genes. Expression of the gene of eukaryotic translation elongation factor 2 could be down-regulated by E-36 protein.

**CONCLUSION:** The expression of E-36 protein affects the expression spectrum of HepG2 cell. The microarray is an important technique for the study of transactivating effects for viral proteins.

Lu YY, Liu Y, Cheng J, Ling YD, Chen TY, Shao Q, Wang L, Zhang LX. Screening and identification of genes trans-regulated by a novel HBeAg binding protein E-36 with cDNA microarray assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):66-69

## 摘要

**目的:** 为了研究未知功能的HBeAg结合蛋白E-36的生物学功能, 我们应用基因芯片技术对于pcDNA3.1(-)和pcDNA3.1(-)-E-36分别转染的HepG2细胞的基因表达谱进行分析, 筛选能被E-36反式调节的靶基因。

**方法:** 应用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术从HepG2细胞中扩增E-36蛋白编码基因片段, 以常规的分子生物学技术构建表达载体pcDNA3.1(-)-E-36。以脂质体技术转染肝母细胞瘤细胞系HepG2, 提取总mRNA, 逆转录为cDNA, 与转染空白表达载体pcDNA3.1(-)的HepG2细胞进行DNA芯片分析并比较。

**结果:** 构建的表达载体经过限制性内切酶分析和DNA序列测定鉴定正确。提取转染细胞的总mRNA并进行逆转录成为cDNA, 进行DNA芯片技术分析。在1 159个基因表达谱的筛选中, 发现有20个基因表达水平显著上调, 包括甲状腺激素应答的骨肉瘤B1蛋白、SLIT2、核因子κB、白介素受体3、白介素6、血管紧张素I转换酶、急性髓细胞性白血病1b、caspase 2、低密度脂蛋白1、T细胞受体重组β链、肿瘤坏死因子受体、肿瘤抑制亚转化因子、细胞周期相关激酶-2、亲代谢性谷氨酸盐受体-7、唾液酸转移酶-8及5个未知蛋白; 真核细胞翻译延伸因子2基因的表达水平显著下调。

**结论:** E-36基因的表达对于肝细胞基因表达谱有显著影响。

DNA芯片技术是分析反式激活靶基因的有效技术途径。

陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 e 抗原肝细胞结合蛋白新基因 E-36 基因表达谱芯片分析. 世界华人消化杂志 2004;12(1):66-69

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/66.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)是由 HBV DNA 前 C 区编码的一种非颗粒性的分泌蛋白, 临床上将其作为判断 HBV 活动性复制的指标之一<sup>[1, 2]</sup>, 现普遍认为他是一种免疫耐受因子, 调节乙型肝炎的免疫发病机制<sup>[3, 4]</sup>. 但 HBeAg 与肝细胞之间是通过那些环节发生作用、如何作用以及作用后产生何种效应, 在此方面的研究较少且没有明确的结果, 因此寻找 HBeAg 与肝细胞间的相互作用蛋白, 并进一步明确其间的作用机制、作用效应, 可望能发现有价值的 HBV 感染防治途径. 前一阶段我们用酵母双杂交技术筛选出了一个未知功能的 HBeAg 结合蛋白基因 E-36, 并进一步用体外免疫共沉淀技术进行再次验证<sup>[5-13]</sup>, 为研究其具体生物学功能, 用基因表达谱芯片技术筛选能被 E-36 反式调节的蛋白基因, 为全面深入了解 E-36 的功能及其在 HBV 致肝细胞损伤中的作用研究铺垫了道路.

## 1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 JM109(本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50×PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体(Promega), Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、EcoR I、BamH I 和 Pst I 等限制性内切酶购于 Takara 生物公司, 新基因 E-36 扩增引物(P3 5' - GAATTCATGTCCTATCCAGCCCTTCACCAG - 3', P4 5' - GGATCCTCAGCAGCAGGCGGAAA CGCT CGTC - 3')由合成及 DNA 测序由上海博亚公司承担.

### 1.2 方法

1.2.1 真核表达载体及细胞转染 E-36 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-E-36 由本室构建. 用 Lipofectamine PLUS 转染试剂将 2 μg pcDNA3.1(-)-E-36 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞.

1.2.2 细胞 mRNA 提取 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了 E-36 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析.

1.2.3 探针标记 逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA (5 μg), Cy5-dUTP 标记实

验组细胞 mRNA (5 μg). 乙醇沉淀后溶解在 20 μL 5×SSC+2g/L SDS 杂交液中.

1.2.4 芯片制备 包含的 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000-3 000 bp. 靶基因以 0.5 μg/μL 溶解于 3 × SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合 (2 h)、室温干燥 (30 min), 紫外线 (uv) 交联, 再分别用 2 g/L SDS、水及 2 g/L 的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用.

1.2.5 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针在 95 °C 水浴变性 5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于 60 °C 杂交 15-17 h. 依次以 2 × SSC+ 2g/L SDS、0.1 × SSC+2 g/L SDS、0.1 × SSC 洗涤 10 min, 室温晾干.

1.2.6 检测与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因 (24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点) 对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene 3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3 > 2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3 < 0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

## 2 结果

2.1 E-36 蛋白的表达载体构建 E-36 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-E-36 构建成功, 经相应的限制性内切酶消化鉴定正确.

表 1 E-36 蛋白影响表达上调的基因

差异表达基因	GenBank Number
甲状旁腺激素应答的骨肉瘤 B1 蛋白	014451
SLIT2	004787
核因子 κB	003998
白介素受体 3	000600
白介素 6	032982
血管紧张素 I 转换酶	021804
急性髓细胞性白血病 1b	D43968
caspase 2	002183
低密度脂蛋白 1	004525
T 细胞受体重组 β 链	M11952
肿瘤坏死因子受体	003839
肿瘤抑制亚转化因子	003310
细胞周期相关激酶 -2	003948
亲代谢性谷氨酸盐受体 -7	000844
唾液酸转移酶 -8	003034
未知蛋白	BG171632
未知蛋白	007211
未知蛋白	AK025638
未知蛋白	AB020676
未知蛋白	014887

2.2 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度  $A_{260}/A_{280} > 1.89$ , 热稳定实验  $70^{\circ}\text{C}$  保温 1 h 与  $-20^{\circ}\text{C}$  1 h 电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA. mRNA 主要集中于 0.9-4.0 kb 的连续条带.

2.3 E-36 蛋白调节的基因表达 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 2.000 以上, 就判断为 E-36 蛋白的上调基因. 在本研究中发现有 20 种基因的表达水平上调(表 1), 1 种真核细胞翻译延伸因子 2 基因表达下调.

### 3 讨论

普遍认为 HBeAg 一种免疫调节因子, 可调节宿主的免疫应答, 与 HBV 感染形成的免疫耐受有关. 当 HBeAg 发生突变时, 失去血清中 HBeAg 的调节, 可导致病情加重; 血中抗-HBe 长期阳性的患者, 发生肝硬化、肝癌的几率较高, 原因不清, 是研究有效防治乙型肝炎病毒(HBV)感染的难点之一<sup>[14-18]</sup>. 前一阶段通过酵母双杂交技术和体外免疫共沉淀技术, 我们发现并验证了肝细胞中与 HBeAg 有相互作用未知蛋白 E-36, 为深入研究 HBeAg 的生物学功能迈出了可喜的一步. 但是, 对于一个新蛋白来说, 由于人们以往对其没有认识, 需要对他的表达调控、翻译后修饰、生物学功能以及相互作用等方面进行研究, 这是一项艰巨而有挑战性的工作, 有望对 HBV 感染的诊断、预后及疗效判断等提出新的参考<sup>[19-21]</sup>.

我们用基因表达谱芯片对新蛋白 E-36 作了初步的研究, 构建 pcDNA3.1(-)-E-36 真核表达载体, 将空载体作为对照共同转染 HepG2 细胞, 发现 E-36 的表达可使 HepG2 细胞中 20 种基因的表达水平上调, 1 种真核细胞翻译延伸因子 2 基因表达下调. 在上调中有肿瘤相关基因如急性髓细胞性白血病 1b、肿瘤抑制亚转化因子、甲状旁腺激素应答的骨肉瘤 B1 蛋白等; 有细胞信号转导、细胞凋亡相关的基因如细胞周期相关激酶-2、caspase 2、核因子  $\kappa\text{B}$  及一些酶.

其中 SLIT2 是一种分泌型的富含亮氨酸重复区的蛋白质, 有明确的肿瘤抑制作用, SLIT2 转染 COS-7 细胞的培养液能延缓细胞的生长和诱导 SW48 结肠癌细胞凋亡, SLIT2 的过表达可以抑制 70% 的体外培养乳腺癌细胞的集落化生长, 在发生肺癌及乳腺癌时, 由于其启动子的甲基化或等位基因的丢失而导致其失活<sup>[22-25]</sup>. 转录因子 NF- $\kappa\text{B}$  在缺乏引导信号时主要存在于细胞质中, 受一些炎性因子如肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素 1(IL-1)等的刺激细胞后发生降解、抑制, 使 NF- $\kappa\text{B}$  能够在胞核内沉积, 从而调节一些特殊基因的表达<sup>[26, 27]</sup>. 唾液酸转移酶-8 是糖基转移酶家族中的成员, 存在于高尔基体中, 具有催化细胞黏附分子-神经节苷酯聚唾液酸化的功能, 神经节苷酯是一类膜结合的含唾液酸的鞘糖脂, 是细胞黏附和体外培养恶性细胞生长的

重要因子. 白介素 3 受体  $\alpha$  链有促进髓样分化的作用, 在急性髓样白血病患者中的高表达可导致白血病细胞的爆发增生, 缩短完全缓解期及存活期, 使病情恶化<sup>[28, 29]</sup>. E-36 能上调这些基因的表达, 说明 E-36 可能在介导 HBeAg 参与肿瘤的发生过程中起作用.

半胱氨酸蛋白酶(caspases-2)是细胞死亡基因(CED-3)/白介素 1 $\beta$  转化酶蛋白酶(interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE) protease)家族中的一员, 定位于细胞核中, 是细胞凋亡早期过程中一个非常重要的蛋白酶, 被细胞因子激活后产生分解细胞的作用, 导致细胞凋亡. caspases-2 还是线粒体渗透必需的酶, 各种细胞因子通过不同途径活化 caspases, 或通过聚合形成受体复合物直接激活 caspases, 引起线粒体渗透扩大而不是起始 caspases 的活化来加速细胞分解<sup>[30, 31]</sup>. 亲代谢性谷氨酸盐受体-7(metabotropic glutamate receptor), 是 G 蛋白耦合受体家族 III, 与环磷腺苷(cAMP)级联途径的抑制有关, 谷氨酸盐在中枢神经系统中是一类主要的兴奋性神经递质, 他可激活亲离子性和亲代谢性谷氨酸盐受体. E-36 能上调这些基因的表达, 提示其可能参与细胞信号转导途径.

随着后基因组时代的到来, 越来越多的未知功能蛋白质被发现, 对新蛋白的生物学功能、与其他蛋白质间的相互作用以及他们在疾病发生、发展、转化过程中的变化规律的研究成为今天生命科学最重要的热点之一, 同时由于新技术的不断创新, 使一系列的研究成为可能. 我们应用基因表达谱芯片技术对 E-36 新基因的功能进行了初步的研究, 并获得一些有价值的结果, 为下一步的深入研究奠定了基础<sup>[32, 33]</sup>.

### 4 参考文献

- 1 Milich DR, Chen MK, Hughes JL, Jones JE. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol* 1998;160:2013-2021
- 2 Chu CM, Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: an immunopathological study. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:218-222
- 3 Ou JH. Molecular biology of hepatitis B virus e antigen. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:178-187
- 4 Barth H, Klein R, Berg PA, Wiedenmann B, Hopf U, Berg T. Induction of T helper cell type 1 response and elimination of HBeAg during treatment with IL-12 in a patient with therapy-refractory chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology* 2001;48:553-555
- 5 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. *世界华人消化杂志* 2001;9:1379-1383
- 6 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体的构建及表达. *世界华人消化杂志* 2002;10:15-18
- 7 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒 NS2 基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. *世界华人消化杂志* 2002;10:129-132
- 8 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. *世界华人消化杂志* 2002;10:161-164



- 9 陆荫英, 李克, 刘妍, 王琳, 成军, 张玲霞. 乙型及丙型肝炎病毒受体的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:211-213
- 10 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选 Hcbp6 结合的肝细胞蛋白编码基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:385-388
- 11 马守东, 洪源, 成军. 酵母单杂交技术的原理及应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:450-451
- 12 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:426-429
- 13 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBcAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. *世界华人消化杂志* 2003;11:422-425
- 14 Lau GK, Nanji A, Hou J, Fong DY, Au WS, Yuen ST, Lin M, Kung HF, Lam SK. Thymosin- $\alpha$ 1 and famciclovir combination therapy activates T-cell response in patients with chronic hepatitis B virus infection in immune-tolerant phase. *J Viral Hepat* 2002;9:280-287
- 15 Merkle H, Deutschle T, Gastrock-Balitsch I, Nusser P, Knehr S, Reifenberg K. H-2(d) mice born to and reared by HBcAg-transgenic mothers do not develop T cell tolerance toward the hepatitis B virus core gene products. *Virology* 2000;273:149-159
- 16 Milich DR. Do T cells "see" the hepatitis B core and e antigens differently? *Gastroenterology* 1999;116:765-768
- 17 Diepolder HM, Ries G, Jung MC, Schlicht HJ, Gerlach JT, Grner N, Caselmann WH, Pape GR. Differential antigen-processing pathways of the hepatitis B virus e and core proteins. *Gastroenterology* 1999;116:650-657
- 18 Papatheodoridis GV, Hadziyannis SJ. Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2001;8:311-321
- 19 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因和蛋白的生物信息学分析. *世界华人消化杂志* 2003;11:378-384
- 20 Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- 21 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 生物信息学技术与新基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:474-477
- 22 Dallol A, Morton D, Maher ER, Latif F. SLIT2 axon guidance molecule is frequently inactivated in colorectal cancer and suppresses growth of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 2003;63:1054-1058
- 23 Dallol A, Da Silva NF, Viacava P, Minna JD, Bieche I, Maher ER, Latif F. SLIT2, a human homologue of the *Drosophila* Slit2 gene, has tumor suppressor activity and is frequently inactivated in lung and breast cancers. *Cancer Res* 2002;62:5874-5880
- 24 Wu W, Wong K, Chen J, Jiang Z, Dupuis S, Wu JY, Rao Y. Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 1999;400:331-336
- 25 Wang KH, Brose K, Arnott D, Kidd T, Goodman CS, Henzel W, Tessier-Lavigne M. Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* 1999;96:771-784
- 26 Cogswell PC, Kashatus DF, Keifer JA, Guttridge DC, Reuther JY, Bristow C, Roy S, Nicholson DW, Baldwin AS Jr. NF-kappa B and I kappa B alpha are found in the mitochondria. Evidence for regulation of mitochondrial gene expression by NF-kappa B. *J Biol Chem* 2003;278:2963-2968
- 27 Figueroa YG, Chan AK, Ibrahim R, Tang Y, Burow ME, Alam J, Scandurro AB, Beckman BS. NF-kappaB plays a key role in hypoxia-inducible factor-1-regulated erythropoietin gene expression. *Exp Hematol* 2002;30:1419-1427
- 28 Testa U, Riccioni R, Militi S, Coccia E, Stellacci E, Samoggia P, Latagliata R, Mariani G, Rossini A, Battistini A, Lo-Coco F, Peschle C. Elevated expression of IL-3R alpha in acute myelogenous leukemia is associated with enhanced blast proliferation, increased cellularity, and poor prognosis. *Blood* 2002;100:2980-2988
- 29 Evans CA, Ariffin S, Pierce A, Whetton AD. Identification of primary structural features that define the differential actions of IL-3 and GM-CSF receptors. *Blood* 2002;100:3164-3174
- 30 Lassus P, Opitz-Araya X, Lazebnik Y. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 2002;297:1352-1354
- 31 Robertson JD, Enoksson M, Suomela M, Zhivotovsky B, Orrenius S. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:29803-29809
- 32 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. *世界华人消化杂志* 2003;11:394-398
- 33 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:461-463

# 应用基因表达谱芯片技术克隆甘草甜素诱导Jurkat细胞后的差异表达基因

刘妍, 成军, 杨倩, 王建军, 纪冬, 王春花, 党晓燕, 徐志强

刘妍, 成军, 杨倩, 王建军, 纪冬, 王春花, 党晓燕, 徐志强, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

刘妍, 女, 1973-01-15生, 辽宁省海城市人, 满族, 1995年北京医科大学毕业, 军事医学科学院免疫学专业2002级硕士学位研究生, 助理研究员。主要从事肝炎病毒的分子生物学与病毒性肝炎的发病机制的研究。

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-25 接受日期: 2003-07-16

## Cloning of genes differentially expressed in Jurkat cells treated with glycyrrhizin using cDNA microarray

Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Jian-Jun Wang, Dong Ji, Chun-Hua Wang, Xiao-Yan Dang, Zhi-Qiang Xu

Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Jian-Jun Wang, Dong Ji, Chun-Hua Wang, Xiao-Yan Dang, Zhi-Qiang Xu, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China  
Supported by Grants from National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070689

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2003-06-25 Accepted: 2003-07-16

## Abstract

**AIM:** To study the difference in gene expression profile in human lymphoma cell line Jurkat cells treated with glycyrrhizin (GL), and to further elucidate the molecular immune mechanism of glycyrrhizin against T lymphocyte.

**METHODS:** cDNA microarray technology was employed to detect the mRNA from Jurkat cells treated with GL and 0.9 percent sodium chloride, respectively.

**RESULTS:** The results indicated that among 1 152 genes which were obtained from gene expression profile analysis, there were 30 genes different from those in GenBank in which 12 genes were up-regulated and 18 genes were down-regulated in Jurkat cells treated with GL, compared to those treated with 0.9 percent sodium chloride. These genes differentially regulated by GL included human genes encoding proteins involved in immune regulation, cell signal transduction, cell proliferation and differentiation.

**CONCLUSION:** cDNA microarray technology is successfully used to screen the genes differentially expressed in Jurkat

cells treated with GL, which brings some new clues for studying the immune regulation mechanism of GL.

Liu Y, Cheng J, Yang Q, Wang JJ, Ji D, Wang CH, Dang XY, Xu ZQ. Cloning of genes differentially expressed in Jurkat cells treated with glycyrrhizin using cDNA microarray. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):70-73

## 摘要

**目的:** 应用基因芯片技术, 阐明甘草甜素作用于T淋巴细胞之后, 甘草甜素对于T淋巴细胞基因表达谱的影响。

**方法:** 应用基因表达谱芯片技术, 对甘草甜素诱导的Jurkat细胞和以生理盐水处理的相同细胞的mRNA进行差异显示分析, 研究甘草甜素诱导人T淋巴细胞系Jurkat细胞后的差异表达基因。

**结果:** Jurkat细胞经甘草甜素诱导后, 所检测的1 152条目的基因中有30条产生差异表达, 其中12条基因表达增强, 18条基因表达降低。表达增强的基因主要有: 胸腺素及促胸腺生成素蛋白编码基因; 白介素-18(IL-18); 细胞代谢相关酶类。表达降低的基因主要有: 细胞信号转导相关基因(如血清/糖皮质激素调节激酶、丝裂素活化的蛋白激酶激酶2、磷脂酶2调节亚基 $\beta$ 、鸟嘌呤核苷结合蛋白、神经营养的酪氨酸激酶3型受体等); La自身抗原。

**结论:** 应用基因表达谱芯片成功筛选了甘草甜素诱导T淋巴细胞后差异表达基因, 为进一步阐明甘草甜素的免疫调节机制及深入了解甘草甜素用于防治病毒性肝炎的药理作用机制提供依据。

刘妍, 成军, 杨倩, 王建军, 纪冬, 王春花, 党晓燕, 徐志强. 应用基因表达谱芯片技术克隆甘草甜素诱导Jurkat细胞后的差异表达基因. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):70-73

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/70.asp>

## 0 引言

从甘草的根茎提取的甘草甜素(glycyrrhizin, GL), 是由2分子的葡萄糖醛酸与甘草酸组成的复合物, 具有抗炎及抗过敏作用, 曾作为过敏性皮肤病的治疗药被广泛使用。自1958年首次用于慢性肝病患者以来, 作为肝病的治疗药物引起人们的关注。研究表明, 甘草甜素在乙型肝炎和丙型肝炎抗病毒治疗、保护肝细胞、避免肝损害中具有重要应用前景, 并且具有潜在的抑制肝细胞肿瘤增生的作用<sup>[1]</sup>。进一步研究发现, 甘草甜素能

诱导小鼠血清中细胞因子干扰素  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) 的产生, 对巨噬细胞及 NK 细胞活性有显著增强作用<sup>[2]</sup>, 并且选择性刺激小鼠肝内 T 细胞的增生<sup>[3]</sup>. 这些初步的研究结果表明, 甘草甜素可能具有免疫调节作用, 但是具体的调节机制目前还不十分清楚.

基因芯片技术(cDNA microarray)是由大量目的基因片段有序、密集地固定于玻片或尼龙膜上而制成芯片, 将两组组织或细胞的 mRNA 逆转录成 cDNA, 掺入荧光标记, 同时与芯片杂交, 通过扫描分析每一位置的荧光信息可以快速有效地检测到二者间差异表达的基因. 本项研究应用基因芯片技术, 筛选甘草甜素作用于 T 淋巴细胞系 Jurkat 细胞后差异表达的免疫调节基因, 并应用生物信息学(bioinformatics)技术初步获得其基因全长序列. 甘草甜素免疫调节靶基因的研究, 为深入了解其免疫调节作用机制及在肝炎病毒的清除过程中的作用机制提供理论依据.

## 1 材料和方法

**1.1 主要试剂及取材** T 淋巴细胞系 Jurkat 细胞由本室保存, 细胞培养相关试剂及总 RNA 提取试剂 Trizol 均购自 Gibco 公司, GL 由深圳健安医药公司提供. 在 35 mm 培养皿中常规培养 Jurkat 细胞, 细胞生长至对数期时分别将 GL 及 0.9% NaCl 加入细胞培养液中, 使终浓度达到 1.0 mM, 24 h 后收获细胞, 每  $5 \times 10^6$  个细胞加入 1 mL Trizol 试剂. 立即于液氮中保存.

**1.2 总 RNA 提取及 mRNA 纯化** 使用 Trizol 试剂一步法提取甘草甜素及 0.9% NaCl 处理的 Jurkat 细胞总 RNA (分别标记为实验组和对照组), 样品经分光光度计检测吸光度 A 值, 并行热稳定实验, 于 -20 °C 和 70 °C 保温 1 h 后, 经琼脂糖凝胶电泳检测 28 S、18 S 条带变化. 以 Qiagen 公司 Oligotex mRNA Midi Kit 纯化得 mRNA. 操作按说明书进行, 并行电泳检测.

**1.3 探针标记** 常规方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA (5  $\mu$ g), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA (5  $\mu$ g). 乙醇沉淀后溶解在 20  $\mu$ l 5  $\times$  SSC+0.2% SDS 杂交液中.

**1.4 芯片制备** 芯片包含的 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000-3 000 bp. 靶基因以 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l 溶解于 3  $\times$  SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(0.5 h), UV 交联, 再分别用 0.2% SDS、水及 0.2% 的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用.

**1.5 杂交及洗涤** 将基因芯片和杂交探针在 95 °C 水浴变性 5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于 60 °C 杂交 15-17 h. 依次以 2  $\times$  SSC+0.2% SDS、0.1%  $\times$  SSC+0.2% SDS、0.1%  $\times$  SSC 洗涤 10 min, 室温晾干.

**1.6 检测与分析** 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点)对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3>1.8, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3<0.6, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

## 2 结果

**2.1 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析** 实验组和对照组总 RNA 的吸光度比值 A260/A280 分别为 1.988 和 2.007, 热稳定实验 70 °C 保温 1 h 与 -20 °C 1 h 电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA (图 1). mRNA 主要集中于 0.9-4.0 kb 的连续条带.

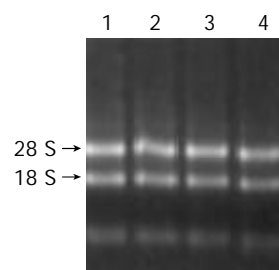


图 1 总 RNA 1% 琼脂糖凝胶电泳. 1, 2: 实验组; 3, 4: 对照组.

**2.2 芯片杂交体系验证及结果分析** 在芯片上共有 1 152 个 cDNA. 为了监控芯片杂交技术体系的整个过程, 在芯片上设置了阴性对照(8 条水稻基因, 共 8 个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记 Cy5 荧光素(呈红色), 对照组探针标记 Cy3 荧光素(呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 按阳性标准, 从 1 152 个基因中筛选出差异常表达基因共 30 条, 占 2.62%, 其中 12 条基因表达增强, 18 条基因表达降低.

表 1 部分表达显著增强的基因

序号	GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_004525	低密度脂蛋白相关蛋白 2	1.804
2	NM_000560	CD53 抗原	1.864
3	NM_003276	促胸腺生成素	1.955
4	AK055976	胸腺素 $\beta$ -4	1.968
5	NM_001562	白介素 18	1.998
6	NM_003129	鲨烯环氧酶	2.463
7	NM_014762	24- 胆固醇脱氢还原酶	2.807

**2.3 差异表达基因分析** 表达增强的基因主要有: 胸腺素及促胸腺生成素蛋白编码基因; 白介素-18; 细胞代谢相关酶类. 部分表达显著增强的基因见表 1. 表达降低的基

因主要有: 细胞信号转导相关基因(如血清/糖皮质激素调节激酶、丝裂素活化的蛋白激酶激酶激酶 2、磷脂酶 2 调节亚基  $\beta$ 、鸟嘌呤核苷结合蛋白、神经营养的酪氨酸激酶 3 型受体等); La 自身抗原. 部分表达显著降低的基因见表 2.

表 2 部分表达显著降低的基因

序号	GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_001762	含 TCP1 的伴侣蛋白	0.374
2	NM_004728	DEAD/H 盒 21 多肽	0.438
3	NM_003142	La 自身抗原	0.453
4	NM_001961	真核翻译延伸因子 2	0.473
5	NM_005627	血清/糖皮质激素调节激酶	0.551
6	NM_006609	丝裂素活化的蛋白激酶激酶激酶 2	0.554
7	NM_002719	磷酸脂酶 2 调节亚基 $\beta$	0.560
8	NM_006098	鸟嘌呤核苷结合蛋白	0.577
9	NM_002530	神经营养的酪氨酸激酶 3 型受体	0.579

### 3 讨论

日本米诺发(Minophagen)制药公司生产的甘草甜素注射液, 具有广泛的药理作用, 在抗炎、抗溃疡、抗过敏反应、皮肤病治疗等方面具有很好疗效. 自首次用于慢性肝病患者以来, 越来越多的临床和流行病学研究显示, 甘草甜素在治疗慢性乙型、丙型肝炎病毒感染, 预防肝硬化、肝细胞癌方面同样具有明显疗效<sup>[1-7]</sup>. 众所周知, 免疫调节作用在抗乙型、丙型肝炎病毒治疗中, 发挥着十分重要的作用. 干扰素、核苷类似物、免疫调节剂、天然药物对于肝炎病毒的清除, 都离不开机体免疫系统的参与. 虽然甘草甜素在慢性病毒性肝炎治疗中有一定的作用, 但应用甘草甜素之后, 究竟是甘草甜素对于免疫系统直接的作用, 还是由于甘草甜素的抗肝炎病毒作用, 抑制病毒复制过程, 使病毒载量降低, 对于机体免疫系统的抑制减轻, 机体免疫功能的自然恢复等, 目前都不十分清楚. 因此关于甘草甜素免疫调节机制的研究, 对于深入阐明甘草甜素的药理作用机制, 提高甘草甜素在慢性病毒性肝炎中的疗效, 都具有十分重要的意义.

基因表达谱芯片是将大量的基因特异的探针或其 cDNA 片段固定在一块基因芯片上, 对来源不同的个体、不同组织、不同细胞周期、不同发育阶段、不同分化阶段、不同病变、不同刺激(包括不同诱导、不同治疗手段)下的细胞内的 mRNA 或逆转录产物 cDNA 进行检测, 从而大规模对这些基因表达的个体特异性、组织特异性、发育阶段特异性、分化阶段特异性、病变特异性、刺激特异性进行综合分析和判断<sup>[8-12]</sup>. 本研究应用基因表达谱芯片对甘草甜素诱导的 Jurkat 细胞和以生理盐水处理的相同细胞系的基因表达进行检测, 通过分析二者之间基因表达的差异信息, 寻找甘草甜素刺激后

的差异表达基因. 在 1 152 个基因中筛选出 30 个差异表达的基因, 从表 1、2 列出的部分表达变化显著的基因中, 看出这些基因涉及细胞信号传导、免疫调节、炎症反应、能量代谢等生物过程, 说明甘草甜素与免疫调节、细胞增生、分化等密切相关.

分析表达增强的基因, 促胸腺生成素和胸腺素, 为广泛使用的免疫增强剂, 由此可以推测甘草甜素通过上调机体的促胸腺生成素及胸腺素的表达水平, 增强机体的免疫力, 发挥其抗病毒感染的作用<sup>[13-17]</sup>. 已知 IL-18 是一种强有力的  $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )诱导因子, 能够诱导各类白细胞产生 IFN- $\gamma$ , 甘草甜素通过上调 IL-18 的表达, 发挥其抗感染、抗肿瘤、介导炎症反应、诱发靶细胞凋亡等多种生物学活性<sup>[18-23]</sup>. 胆固醇脱氢还原酶是黄素腺嘌呤二核苷酸依赖的氧化还原酶家族成员, 降低胆固醇生化合成过程中间产物水平. 鲨烯环氧酶是胆固醇生物合成过程中重要的限速酶, 甘草甜素通过上调两酶的表达水平, 从而影响胆固醇的生物合成<sup>[24, 25]</sup>.

表达降低的基因主要有: 与信号传递相关基因: 如丝裂素活化的蛋白激酶激酶激酶 2、鸟嘌呤核苷结合蛋白、神经营养的酪氨酸激酶 3 型受体等基因在甘草甜素诱导后表达降低, 提示甘草甜素可能通过负调控细胞信号传递途径, 而抑制某些与细胞转录调节密切相关的基因, 间接抑制癌基因的转录, 在抗病毒治疗及抑制肿瘤发生中发挥作用. 已知 La 自身抗原能够与 HBV RNA 结合, 对 HBV RNA 的稳定起决定性作用, 能够干扰细胞因子对 HBV RNA 转录后水平的下调作用, 甘草甜素通过下调 La 自身抗原的表达水平, 降低了 La-HBV RNA 之间的相互作用, 促进了 HBV RNA 的降解, 抑制病毒的增生, 推测这是甘草甜素治疗 HBV 感染的另一重要分子机制<sup>[26-28]</sup>. DEAD/H 盒多肽是核糖体 RNA 合成及加工过程中重要的酶, 真核翻译延伸因子 2 是蛋白质合成过程中必不可少的, 甘草甜素下调上述两基因表达水平, 提示甘草甜素可能在调控肝细胞生长过程中起一定的作用<sup>[29-31]</sup>. 此外, 甘草甜素下调磷酸脂酶 2 调节亚基  $\beta$  的表达, 蛋白磷酸酶 2A 是细胞内主要的丝氨酸/苏氨酸磷酸脂酶, 对细胞的生长及代谢具有广泛的调节作用, 推测甘草甜素间接调节细胞的生长过程<sup>[32]</sup>.

总之, 利用基因表达谱芯片对甘草甜素免疫调节基因的表达研究表明, 甘草甜素能够上调或下调 Jurkat 细胞中许多不同基因表达的变化, 这些基因与细胞信号转导、细胞增生与分化、免疫调节等生物过程密切相关. 本实验结果对于阐明甘草甜素免疫调节机制及其在清除肝炎病毒感染中的作用具有重要意义.

### 4 参考文献

- 1 Khaksa G, Zolfaghari ME, Dehpour AR, Samadian T. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of disodium glycyrrhetic acid hemiphthalate. *Planta Med* 1996;62:326-328
- 2 Kimura M, Watanabe H, Abo T. Selective activation of extrathymic T cells in the liver by glycyrrhizin. *Biotherapy* 1992;5:167-176

- 3 Homma M, Oka K, Ikeshima K, Takahashi N, Niitsuma T, Fukuda T, Itoh H. Different effects of traditional Chinese medicines containing similar herbal constituents on prednisolone pharmacokinetics. *J Pharm Pharmacol* 1995;47:687-692
- 4 Zhang YH, Isobe K, Nagase F, Lwin T, Kato M, Hamaguchi M, Yokochi T, Nakashima I. Glycyrrhizin as a promoter of the late signal transduction for interleukin-2 production by splenic lymphocytes. *Immunology* 1993;79:528-534
- 5 Zhang YH, Kato M, Isobe K, Hamaguchi M, Yokochi T, Nakashima I. Dissociated control by glycyrrhizin of proliferation and IL-2 production of murine thymocytes. *Cell Immunol* 1995;162:97-104
- 6 Jeong HG, You HJ, Park SJ, Moon AR, Chung YC, Kang SK, Chun HK. Hepatoprotective effects of 18beta-glycyrrhetic acid on carbon tetrachloride-induced liver injury: inhibition of cytochrome P450 2E1 expression. *Pharmacol Res* 2002;46:221-227
- 7 Tanahashi T, Mune T, Morita H, Tanahashi H, Isomura Y, Suwa T, Daido H, Gomez-Sanchez CE, Yasuda K. Glycyrrhizic acid suppresses type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;80:441-447
- 8 Kaminski S. DNA microarrays-a methodological breakthrough in genetics. *J Appl Genet* 2002;43:123-130
- 9 Lakhani SR, Ashworth A. Microarray and histopathological analysis of tumours: the future and the past? *Nat Rev Cancer* 2001;1:151-157
- 10 Borrebaeck CA, Ekstrom S, Hager AC, Nilsson J, Laurell T, Marko-Varga G. Protein chips based on recombinant antibody fragments: a highly sensitive approach as detected by mass spectrometry. *Biotechniques* 2001;30:1126-1130
- 11 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:461-463
- 12 李瑶, 陈菊祥, 裘敏燕. 基因芯片的制备研究. *第二军医大学学报* 2000;21:812-814
- 13 Huff T, Muller CS, Otto AM, Netzker R, Hannappel E. beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:205-220
- 14 Sosne G, Szliter EA, Barrett R, Kernacki KA, Kleinman H, Hazlett LD. Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and decreases inflammation in vivo following alkali injury. *Exp Eye Res* 2002;74:293-299
- 15 Oh IS, So SS, Jahng KY, Kim HG. Hepatocyte growth factor upregulates thymosin beta4 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:401-405
- 16 Girardi M, Sherling MA, Filler RB, Shires J, Theodoridis E, Hayday AC, Tigelaar RE. Anti-inflammatory effects in the skin of thymosin-beta 4 splice-variants. *Immunology* 2003;109:1-7
- 17 Oh IS, So SS, Jahng KY. Hepatocyte growth factor upregulates thymosin beta4 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:401-405
- 18 Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori KL. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995;378:88-91
- 19 Liebau C, Baltzer AW, Schmidt S, Roesel C, Karreman C, Prisack JB, Bojar H, Merk H. Interleukin-12 and interleukin-18 induce indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) activity in human osteosarcoma cell lines independently from interferon-gamma. *Anticancer Res* 2002;22:931-936
- 20 Nakamura S, Otani T, Ijiri Y, Motoda R, Kurimoto M, Orita K. IFN-gamma-dependent and -independent mechanisms in adverse effects caused by concomitant administration of IL-18 and IL-12. *J Immunol* 2000;164:3330-3336
- 21 Dinarello CA. Interleukin-18. *Methods* 1999;19:121-132
- 22 Kremer L, Dupre L, Wolowczuk I, Loch C. In vivo immunomodulation following intradermal injection with DNA encoding IL-18. *J Immunol* 1999;163:3226-3231
- 23 Dinarello CA. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:11-24
- 24 Waterham HR, Koster J, Romeijn GJ, Hennekam RC, Vreken P, Andersson HC, FitzPatrick DR, Kelley RI, Wanders RJ. Mutations in the 3beta-hydroxysterol Delta24-reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis. *Am J Hum Genet* 2001;69:685-694
- 25 Nakamura Y, Sakakibara J, Izumi T, Shibata A, Ono T. Transcriptional regulation of squalene epoxidase by sterols and inhibitors in HeLa cells. *J Biol Chem* 1996;271:8053-8056
- 26 Horke S, Reumann K, Rang A, Heise T. Molecular characterization of the human La protein. hepatitis B virus RNA. B interaction in vitro. *J Biol Chem* 2002;277: 34949-34958
- 27 Heise T, Guidotti LG, Chisari FV. La autoantigen specifically recognizes a predicted stem-loop in hepatitis B virus RNA. *J Virol* 1999;73:5767-5776
- 28 Heise T, Guidotti LG, Chisari FV. Characterization of nuclear RNases that cleave hepatitis B virus RNA near the La protein binding site. *J Virol* 2001;75:6874-6883
- 29 Valdez BC, Perlaky L, Henning D. Expression, cellular localization, and enzymatic activities of RNA helicase II/Gu (beta). *Exp Cell Res* 2002;276:249-263
- 30 Zhu K, Henning D, Valdez B, Busch H. Human RNA helicase II/Gu gene: genomic organization and promoter analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:1006-1011
- 31 Kang KR, Lee SY. Effect of serum and hydrogen peroxide on the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent phosphorylation of eukaryotic elongation factor 2(eEF-2) in Chinese hamster ovary cells. *Exp Mol Med* 2001;33:198-204
- 32 Tehrani MA, Mumby MC, Kamibayashi C. Identification of a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit highly expressed in muscle. *J Biol Chem* 1996;271:5164-5170

# 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因 5 的克隆

王琳, 李克, 成军, 张健, 刘敏

王琳, 李克, 成军, 张健, 刘敏, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2003-06-25 接受日期: 2003-07-16

## Cloning and identification of human gene 5 transactivated by hepatitis B virus X protein

Lin Wang, Ke Li, Jun Cheng, Jian Zhang, Min Liu

Lin Wang, Ke Li, Jun Cheng, Jian Zhang, Min Liu, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China  
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn  
Received: 2003-06-25 Accepted: 2003-07-16

### Abstract

**AIM:** To explore the new target genes transactivated by HBx, suppression subtractive hybridization (SSH) method and to pave the way for elucidating the pathogenesis mechanism of HBV infection.

**METHODS:** The mRNA was isolated from HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-)-X and pcDNA3.1(-) empty vector, respectively, using SSH and bioinformatics technique, and the differentially expressed DNA sequence between the two groups was analyzed. The obtained sequences were searched for homologous DNA sequence from GenBank, one of which was a novel gene with unknown function. The new gene with no homology with known genes in this database was confirmed and electric polymerase chain reaction (PCR) was conducted for the cloning of the full-length DNA for the new gene and in conjunction with Kozak role and the exist of polyadenyl signal sequence. The reverse transcription PCR (RT-PCR) was used to amplify the new gene, named as XTP5, from the mRNA of HepG2 cells transfected.

**RESULTS:** The new gene was cloned in combination of molecular biological and bioinformatics methods.

**CONCLUSION:** HBx is a potential transactivator. A new gene has been recognized as the new target transactivated by HBx protein. These results pave the way for study on the transactivation of HBx protein.

Wang L, Li K, Cheng J, Zhang J, Liu M. Cloning and identification of human gene 5 transactivated by hepatitis B virus X protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):74-77

### 摘要

**目的:** 为了阐明乙型肝炎病毒(HBV)感染相关疾病的发病机

制, 筛选并克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白HBx反式激活新型靶基因。

**方法:** 以HBV X蛋白(HBx)表达质粒pcDNA3.1(-)-X转染HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 提取mRNA并进行SSH分析。对于所获基因片段序列分析表明, 其中之一为新型基因片段, 与GenBank中注册的已知功能基因序列没有同源性, 利用表达序列标签(EST)序列的搜索和比对, 确定新型基因序列并命名为XTP5。从HepG2细胞提取总RNA, 以逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术扩增获得该新基因的全长序列。

**结果:** XTP5基因的编码基因序列全长为1 527个核苷酸(nt), 编码产物由508个氨基酸残基(aa)组成。

**结论:** HBx是一种由病毒基因组编码的具有反式激活作用的蛋白。应用SSH技术发现了HBx反式激活作用的新的靶基因, 这一发现, 为阐明HBx蛋白的反式激活作用及其机制, 开辟了新的研究方向。

王琳, 李克, 成军, 张健, 刘敏. 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因 5 的克隆. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):74-77  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/74.asp>

### 0 引言

哺乳类嗜肝 DNA 病毒的 X 基因编码一个小的(17 kD)多功能蛋白 HBx, 他的表达除了为 HBV 自然感染的建立所必需, 还影响宿主的多种细胞内过程, 包括真核细胞转录因子的反式激活、DNA 损伤后的修复、细胞周期检查点的调控、信号转导通路组分的干扰等, 是 HBV 感染后引起急、慢性肝炎、肝纤维化和肝癌的重要分子生物学基础。本研究利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH), 对于表达 HBx 载体转染的 HepG2 细胞进行研究, 阐明了 HBx 蛋白反式激活作用的部分靶基因, 同时我们结合生物信息学技术(bioinformatics)克隆了 HBx 蛋白反式激活作用的新靶基因, 即 HBx 蛋白反式激活基因 5(XTP5), 从而为 HBx 反式激活作用的研究提供新的方向。

### 1 材料和方法

1.1 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 JM109 为本室保存, pcDNA3.1(-)真核表达载体购自 Invitrogen 公司; Lipofectamine PLUS 转染试剂购自 Gibco 公司, mRNA Purification 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech,



PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50×PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒购自 Clontech, High Pure PCR Product Purification 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司. 乙型肝炎病毒 X 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-X 由本室构建<sup>[1]</sup>. DNA 序列测定由上海博亚公司完成.

## 1.2 方法

**1.2.1 消减杂交文库的建立及克隆分析** 分别将 pcDNA3.1(-)-X 及 pcDNA3.1(-) 空载体转染 HepG2 细胞, 48 h 后提取 mRNA, 以此 mRNA 为模板逆转录合成双链 cDNA (dscDNA), 并分别标记为 Tester 和 Driver, 经 Rsa I (一种识别 4 碱基序列的内切酶) 消化后将 Tester cDNA 分为两份, 分别连接特殊设计的寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2, 与过量的 Driver cDNA 进行 2 次消减杂交和 2 次抑制性 PCR, 使 Tester cDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增. 扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 JM109 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 °C 培养 18 h. 挑取白色菌落, 增菌, 以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增, 证明含有插入片段后 (200-1 000 bp), 测序. 对于每一条基因片段的序列提交 GenBank 进行同源基因序列的搜索, 确认所得基因片段的独特性, 然后依据 GenBank 数据库中的同源基因片段进行电子拼接, 根据 Kozak 规则和终止密码子下游的多聚腺苷酸信号序列, 确定完整的编码基因序列.

**1.2.2 新基因的 PCR 扩增与序列分析** 根据电子拼接序列的新基因序列, 设计新基因的序列特异性的引物, 利用转染了 pcDNA3.1(-)-X 的 HepG2 细胞来源的 mRNA, 经过 RT-PCR 扩增与克隆技术, 获得阳性克隆并进行序列分析.

## 2 结果

**2.1 mRNA 的定性、定量分析** 使用高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提. 紫外分光检测显示, 转染了真核表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 4.54 μg 和 4.23 μg, A260/A280=1.7. 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带, 证实

mRNA 质优量足.

**2.2 消减杂交文库的构建与分析** dscDNA 两端连接效率检测结果显示两组 dscDNA 已与接头高效率连接. 消减效率的鉴定结果显示: 与未消减组 PCR 产物相比, 消减组 PCR 产物中看家基因甘油三磷酸脱氢酶 G3PDH 基因产物大大减少, 说明所构建的消减文库具有很高的消减效率. 对差异表达基因片段进行菌落 PCR 扩增, 结果显示为 200-1 000 bp 大小不等的插入片段<sup>[6]</sup>. 挑选克隆测序并与 GenBank 数据库进行初步比较.

**2.3 新基因的序列分析及全长基因的获得** 利用美国国立卫生院 (NIH) 国立医学图书馆 (NLM) 国立生物工程中心 (NCBI) 建立的核苷酸序列数据库 (GenBank) 及其同源基因序列的搜索 (BLASTN), 发现其中的 1 个克隆序列与 GenBank 中注册的已知功能基因序列没有同源性. 电子拼接推定该基因的开放读码框架, 设计引物, 从表达 HCV NS5A 蛋白的 HepG2 细胞提取总 RNA 后, 进行 RT-PCR, 扩增出约 1 500 bp 左右片段 (图 1), 经过测序克隆出全长基因片段, 获得 HCV NS5A 蛋白反式激活作用的新型靶基因, 命名为 XTP5. 新基因的开放读码框架 (ORF) 长度为 1 527 个核苷酸 (nt), 编码产物由 508 个氨基酸残基 (aa) 组成 (图 2).

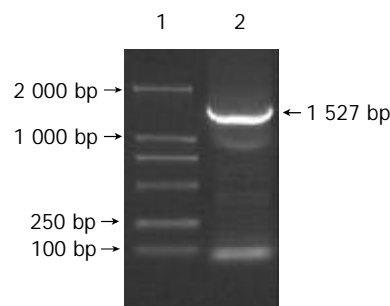


图1 XTP5 反转录 PCR 扩增结果.

## 3 讨论

像多数病毒一样, HBV 基因表达的调节主要是在转录水平上的多水平调控, 病毒借助宿主细胞的一些复制表达元件完成其生活周期及致病过程. HBx 是病毒编码的主要调节成分, 参与 HBV 基因在肝细胞中的表达、增生和再感染<sup>[2-5]</sup>. 由于 HBx 不与双链 DNA 发生结合,

```

      M   W   E   I   L   R   R   K   D   C   D   K   E   K   R   V   K
1  ATG TGG GAG ATT TTA AGA AGA AAA GAC TGT GAC AAA GAA AAA AGA GTA AAG
    L   M   S   D   L   Q   K   L   I   Q   G   K   I   K   T   I   A
52  TTA ATG AGT GAT TTG CAG AAG TTG ATT CAA GGG AAA ATT AAA ACT ATT GCA
    F   A   H   D   S   T   R   V   I   Q   C   Y   I   Q   Y   G   N
103 TTT GCA CAC GAT TCA ACT CGT GTG ATC CAG TGT TAC ATT CAG TAT GGT AAT
    E   E   Q   R   K   Q   A   F   E   E   L   R   D   D   L   V   E
154 GAA GAA CAG AGA AAA CAG GCT TTT GAA GAA TTG CGA GAT GAT TTG GTT GAG
    L   S   K   A   K   Y   S   R   N   I   V   K   K   F   L   M   Y
205 TTA AGT AAA GCC AAA TAT TCG AGA AAT ATT GTT AAG AAA TTT CTC ATG TAT
  
```

```

      G   S   K   P   Q   I   A   E   I   I   R   S   F   K   G   H   V
256 GGA AGT AAA CCA CAG ATT GCA GAG ATA ATC AGA AGT TTT AAA GGC CAC GTG
      R   K   M   L   R   H   A   E   A   S   A   I   V   E   Y   A   Y
307 AGG AAG ATG CTG CGG CAT GCG GAA GCA TCA GCC ATC GTG GAG TAC GCA TAC
      N   D   K   A   I   L   E   Q   R   N   M   L   T   E   E   L   Y
358 AAT GAC AAA GCC ATT TTG GAG CAG AGG AAC ATG CTG ACG GAA GAG CTC TAT
      G   N   T   F   Q   L   Y   K   S   A   D   H   R   T   L   D   K
409 GGG AAC ACA TTT CAG CTT TAC AAG TCA GCA GAT CAC CGA ACT CTG GAC AAA
      V   L   E   V   Q   P   E   K   L   E   L   I   M   D   E   M   K
460 GTG TTA GAG GTA CAG CCA GAA AAA TTA GAA CTT ATT ATG GAT GAA ATG AAA
      Q   I   L   T   P   M   A   Q   K   E   A   V   I   K   H   S   L
511 CAG ATT CTA ACT CCA ATG GCC CAA AAG GAA GCT GTG ATT AAG CAC TCA TTG
      V   H   K   V   F   L   D   F   F   T   Y   A   P   P   K   L   R
562 GTG CAT AAA GTA TTC TTG GAC TTT TTT ACC TAT GCA CCC CCC AAA CTC AGA
      S   E   M   I   E   A   I   R   E   A   V   V   Y   L   A   H   T
613 TCA GAA ATG ATT GAA GCC ATC CGC GAA GCG GTG GTC TAC CTG GCA CAC ACA
      H   D   G   A   R   V   A   M   H   C   L   W   H   G   T   P   K
664 CAC GAT GGC GCC AGA GTG GCC ATG CAC TGC CTG TGG CAT GGC ACG CCC AAG
      D   R   K   V   I   V   K   T   M   K   T   Y   V   E   K   V   A
715 GAC AGG AAA GTG ATT GTG AAA ACA ATG AAG ACT TAT GTT GAA AAG GTG GCT
      N   G   Q   Y   S   H   L   V   L   L   A   A   F   D   C   I   D
766 AAT GGC CAA TAC TCC CAT TTG GTT TTA CTG GCG GCA TTT GAT TGT ATT GAT
      D   T   K   L   V   K   Q   I   I   I   S   E   I   I   S   S   L
817 GAT ACT AAG CTT GTG AAG CAG ATA ATC ATA TCA GAA ATT ATC AGT TCA TTG
      P   S   I   V   N   D   K   Y   G   R   K   V   L   L   Y   L   L
868 CCT AGC ATA GTA AAT GAC AAA TAT GGA AGG AAG GTC CTA TTG TAC TTA CTA
      S   P   R   D   P   A   H   T   V   R   E   I   I   E   V   L   Q
919 AGC CCC AGA GAT CCT GCA CAT ACA GTA CGA GAA ATC ATT GAA GTT CTG CAA
      K   G   D   G   N   A   H   S   K   K   D   T   E   V   R   R   R
970 AAA GGA GAT GGA AAT GCA CAC AGT AAG AAA GAT ACA GAG GTC CGC AGA CGG
      E   L   L   E   S   I   S   P   A   L   L   S   Y   L   Q   E   H
1021 GAG CTC CTA GAA TCC ATT TCT CCA GCT TTG TTA AGC TAC CTG CAA GAA CAC
      A   Q   E   V   V   L   D   K   S   A   C   V   L   V   S   D   I
1072 GCC CAA GAA GTG GTG CTA GAT AAG TCT GCG TGT GTG TTG GTG TCT GAC ATT
      L   G   S   A   T   G   D   V   Q   P   T   M   N   A   I   A   S
1123 CTG GGA TCT GCC ACT GGA GAC GTT CAG CCT ACC ATG AAT GCC ATC GCC AGC
      L   A   A   T   G   L   H   P   G   G   K   D   G   E   L   H   I
1174 TTG GCA GCA ACA GGA CTG CAT CCT GGT GGC AAG GAC GGA GAG CTT CAC ATT
      A   E   H   P   A   G   H   L   V   L   K   W   L   I   E   Q   D
1225 GCA GAA CAT CCT GCA GGA CAT CTA GTT CTG AAG TGG TTA ATA GAG CAA GAT
      K   K   M   K   E   N   G   R   E   G   C   F   A   K   T   L   V
1276 AAA AAG ATG AAA GAA AAT GGG AGA GAA GGT TGT TTT GCA AAA ACA CTT GTA
      E   H   V   G   M   K   N   L   K   S   W   A   S   V   N   R   G
1327 GAG CAT GTT GGT ATG AAG AAC CTG AAG TCC TGG GCT AGT GTA AAT CGA GGT
      A   I   I   L   S   S   L   L   Q   S   C   D   L   E   V   A   N
1378 GCC ATT ATT CTT TCT AGC CTC CTC CAG AGT TGT GAC CTG GAA GTT GCA AAC
      K   V   K   A   A   L   K   S   L   I   P   T   L   E   K   T   K
1429 AAA GTC AAA GCT GCA CTG AAA AGC TTG ATT CCT ACA CTG GAA AAA ACC AAA
      S   T   S   K   G   I   E   I   L   L   E   K   L   S   T   *
1480 AGC ACC AGC AAA GGA ATA GAA ATT CTA CTT GAA AAA CTG AGC ACA TAG

```

图2 HBx 反式激活靶基因 XTP5 核苷酸及其编码产物序列.

其发挥作用的普遍规律是对宿主细胞和病毒启动子转录的反式激活。作为一个有力的转录激活子, HBx可使HBV其他基因产物转录活性增加数倍。大量体内研究证明, HBx可激活多种基本转录因子以及RNA聚合酶包括RNA聚合酶1、2、3, NF $\kappa$ B、NF-AT、AP-1、ATF/CREB、抑癌基因p53<sup>[6-22]</sup>。在体外研究中HBx还可以结合一些转录元件, 包括TATA结合蛋白(TBP), TFIIB, TFIIF, RNA聚合酶亚单位RPB5<sup>[23-26]</sup>。HBx细胞内定位通常在胞质, 他还具有激活胞质内信号转导通路的活性, 特别是Ras-Raf-MAPK途径<sup>[27, 28]</sup>, 细胞应激介导的MEKK1-p38-JNK通路和Src酪氨酸激酶。HBx可影响早期细胞周期的调控点, 通过激活内源性细胞周期素A和周期素A依赖的胞质Src转导通路, 使细胞越过G1期而停滞在S期, 这一时期对病毒的复制是至关重要的。而对于肝细胞的分化、增生、凋亡和肝肿瘤的转化具有重要意义。

本实验将真核表达载体pcDNA3.1(-)-X, 转染肝母细胞瘤细胞系HepG2, 并以转染空白载体的相同细胞系作为对照, 以两种转染的细胞系中提取的mRNA为起始材料, 应用SSH方法成功地构建了HBxAg反式激活相关基因差异表达的cDNA消减文库, 随机挑选克隆测序并与GenBank数据库进行同源性比较分析, 结果主要包括两种类型, 第一种是已知基因的序列, 与GenBank中数据高度同源, 其中包括一些已知的看家基因序列和一些与细胞生长调节密切相关的基因序列, 第二种是未知基因序列, 共获得9个差异表达的未知序列<sup>[1]</sup>。对其中的一个未知功能基因序列, 我们采用生物信息学方法进行电子拼接分析, 获得了其全长基因序列, 命名为XTP5, 是存在于肝细胞内HBx反式激活的新的靶基因, 我们已构建其哺乳动物细胞和酵母细胞表达载体, 为进一步研究该基因的生物学功能和对X蛋白的致病作用提供线索。

#### 4 参考文献

- 刘妍, 成军, 陆荫英. 乙型肝炎病毒X蛋白反式激活基因克隆化的研究. 中华肝脏病杂志 2003;11:5-7
- Andrisani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 1999;15:373-379
- Chen HS, Kaneko S, Girones R, Anderson RW, Hornbuckle WE, Tennant BC, Cote PJ, Gerin JL, Purcell RH, Miller RH. The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *J Virol* 1993;67:1218-1226
- Yen TS. Hepadnaviral X Protein: review of recent progress. *J Biomed Sci* 1996;3:20-30
- Zoulim F, Saputelli J, Seeger C. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Virol* 1994;68:2026-2030
- Aufiero B, Schneider RJ. The hepatitis B virus X-gene product trans-activates both RNA polymerase II and III promoters. *EMBO J* 1990;9:497-504
- Kwee L, Lucito R, Aufiero B, Schneider RJ. Alternate translation initiation on hepatitis B virus X mRNA produces multiple polypeptides that differentially transactivate class II and III promoters. *J Virol* 1992;66:4382-4389
- Wang HD, Trivedi A, Johnson DL. Hepatitis B virus X protein induces RNA polymerase III-dependent gene transcription and increases cellular TATA-binding protein by activating the Ras signaling pathway. *Mol Cell Biol* 1997;17:6838-6846
- Wang HD, Trivedi A, Johnson DL. Regulation of RNA polymerase I-dependent promoters by the hepatitis B virus X protein via activated Ras and TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* 1998;18:7086-7094
- Barnabas S, Hai T, Andrisani OM. The hepatitis B virus X protein enhances the DNA binding potential and transcription efficacy of bZip transcription factors. *J Biol Chem* 1997;272:20684-20690
- Weil R, Sirma H, Giannini C, Kremsdorf D, Bessia C, Dargemont C, Brechot C, Israel A. Direct association and nuclear import of the hepatitis B virus X protein with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. *Mol Cell Biol* 1999;19:6345-6354
- Levrero M, Balsano C, Natoli G, Avantiaggiati ML, Elfassi E. Hepatitis B virus X protein transactivates the long terminal repeats of human immunodeficiency virus types 1 and 2. *J Virol* 1990;64:3082-3086
- Lucito R, Schneider RJ. Hepatitis B virus X protein activates transcription factor NF-kappa B without a requirement for protein kinase C. *J Virol* 1992;66:983-991
- Maguire HF, Hoeffler JP, Siddiqui A. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science* 1991;252:842-844
- Natoli G, Avantiaggiati ML, Chirillo P, Puri PL, Ianni A, Balsano C, Levrero M. Ras-and Raf-dependent activation of c-jun transcriptional activity by the hepatitis B virus transactivator pX. *Oncogene* 1994;9:2837-2843
- Seto E, Mitchell PJ, Yen TS. Transactivation by the hepatitis B virus X protein depends on AP-2 and other transcription factors. *Nature* 1990;344:72-74
- Su F, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates transcription factor NF-kappaB by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins. *J Virol* 1996;70:4558-4566
- Twu JS, Lai MY, Chen DS, Robinson WS. Activation of protooncogene c-jun by the X protein of hepatitis B virus. *Virology* 1993;192:346-350
- Twu JS, Robinson WS. Hepatitis B virus X gene can transactivate heterologous viral sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2046-2050
- Williams JS, Andrisani OM. The hepatitis B virus X protein targets the basic region-leucine zipper domain of CREB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3819-3823
- Feitelson MA, Zhu M, Duan LX, London WT. Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1993;8:1109-1117
- Takada S, Kaneniwa N, Tsuchida N, Koike K. Cytoplasmic retention of the p53 tumor suppressor gene product is observed in the hepatitis B virus X gene-transfected cells. *Oncogene* 1997;15:1895-1901
- Qadri I, Maguire HF, Siddiqui A. Hepatitis B virus transactivator protein X interacts with the TATA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1003-1007
- Haviv I, Shamay M, Doitsh G, Shaul Y. Hepatitis B virus pX targets TFIIB in transcription coactivation. *Mol Cell Biol* 1998;18:1562-1569
- Qadri I, Conaway JW, Conaway RC, Schaack J, Siddiqui A. Hepatitis B virus transactivator protein, HBx, associates with the components of TFIIF and stimulates the DNA helicase activity of TFIIF. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10578-10583
- Cheong JH, Yi M, Lin Y, Murakami S. Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases, binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation. *EMBO J* 1995;14:143-150
- Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;1:10350-10354
- Cross JC, Wen P, Rutter WJ. Transactivation by hepatitis B virus X protein is promiscuous and dependent on mitogen-activated cellular serine/threonine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8078-8082

# 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因1的克隆

刘敏, 成军, 王琳, 张树林, 邵清, 张健, 梁耀东

刘敏, 成军, 王琳, 邵清, 张健, 梁耀东, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061

刘敏, 女, 1969-02-19生, 陕西省西安市人, 汉族. 1993年西安医科大学本科毕业, 西安交通大学2000年内科学在读博士研究生, 主治医师. 主要从事病毒性肝炎的分子生物学发病机制研究.

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-25 接受日期: 2003-07-16

## Cloning and identification of human gene 1 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus

Min Liu, Jun Cheng, Lin Wang, Shu-Lin Zhang, Qing Shao, Jian Zhang, Yao-Dong Liang

Min Liu, Jun Cheng, Lin Wang, Shu-Lin Zhang, Qing Shao, Jian Zhang, Yao-Dong Liang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing, China

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2003-06-25 Accepted: 2003-07-16

## Abstract

**AIM:** To screen and clone the target genes transactivated by hepatitis C virus (HCV) nonstructural protein 5A (NS5A) and to pave the way for elucidating the pathogenesis of HCV infection.

**METHODS:** Suppression subtractive hybridization (SSH) technique and bioinformatics were used. mRNA from HepG2 cells transfected pcDNA3.1(-)-NS5A and pcDNA3.1(-) empty vector, respectively, was isolated, and SSH method was employed to analyze the differentially expressed DNA sequence between the two groups. The coding gene transactivated by HCV NS5A was cloned by bioinformatics methods.

**RESULTS:** The obtained sequences were searched for homologous DNA sequence from GenBank, one of which was a new gene with unknown function. The new gene with no homology with known genes in this database was confirmed and electric polymerase chain reaction was conducted for the cloning of the full-length DNA for the new gene and in conjunction with Kozak role and the exist of polyadenyl signal sequence. The reverse transcription PCR (RT-PCR) was used to amplify the new gene, named as NS5ATP1, from the mRNA of HepG2 cells transfected.

**CONCLUSION:** HCV NS5A is a potential transactivator. Suppression subtractive hybridization is an efficient and convenient method for identification and separation of expressed genes in hepatocytes. These results pave the way

for the study of the molecular mechanism of the transactivating effects of HCV NS5A protein and the development of new therapy for chronic hepatitis C.

Liu M, Cheng J, Wang L, Zhang SL, Shao Q, Zhang J, Liang YD. Cloning and identification of human gene 1 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):78-81

## 摘要

**目的:** 应用抑制性消减杂交技术(SSH)及生物信息学技术(bioinformatics)筛选并克隆丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白NS5A反式激活新型靶基因, 进一步阐明HCV感染相关疾病的发病机制.

**方法:** 以HCV NS5A蛋白表达质粒pcDNA3.1(-)-NS5A转染HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 提取mRNA并进行抑制性消减杂交分析. 应用分子生物学技术, 结合生物信息学技术, 分析并克隆HCV NS5A反式激活作用的新的靶基因.

**结果:** 对于所获基因片段序列分析表明, 其中之一为新型基因片段, 从转染pcDNA3.1(-)-NS5A的HepG2细胞提取总RNA, 以逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术扩增获得该新基因的全长序列, 并测序证实, 命名为NS5ATP1. NS5ATP1基因的编码序列全长为1011个核苷酸(nt), 编码产物由336个氨基酸残基(aa)组成.

**结论:** HCV NS5ATP1是一种典型的病毒基因组编码的具有反式激活作用的蛋白, 而SSH是一种鉴定、分离组织细胞中选择性表达基因的技术. 通过这种技术, 发现了HCV NS5ATP1反式激活作用的新的靶基因, 这一发现, 为进一步研究HCV NS5ATP1蛋白反式激活作用的分子生物学机制和探索新型治疗技术奠定了基础.

刘敏, 成军, 王琳, 张树林, 邵清, 张健, 梁耀东. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因1的克隆. 世界华人消化杂志 2004;12(1):78-81

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/78.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是一种单股正链RNA病毒, 基因组含有惟一的开放读框(ORF), 可以分成结构基因区和非结构基因区<sup>[1-4]</sup>. NS5A是非结构蛋白的一种, 哺乳动物细胞表达的NS5A蛋白以两种形式存在, 分子量分别为56 KD和58 KD. HCV NS5A是HCV基因组编码的一种重要的具有多种生物学活性的非结构蛋白质, 在HCV多蛋白的成熟和RNA的复制过程中具有十分重

要的作用<sup>[5-7]</sup>. NS5A 还是一种作用很强转录激活因子, 调控着细胞内许多病毒及细胞基因的转录, 与感染 HCV 细胞发生恶性转化的过程有关<sup>[8,9]</sup>. 我们利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)及生物信息学技术(bioinformatics)筛选并克隆了 NS5A 蛋白反式激活作用的新靶基因, 命名为丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白反式激活基因 1(NS5ATP1), 为 HCV NS5A 蛋白反式激活作用及 HCV 相关疾病发病机制的研究奠定了基础.

## 1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 JM109 为本室保存, pcDNA3.1(-)真核表达载体购自 Invitrogen 公司; Lipofectamine PLUS 转染试剂购自 Gibco 公司, mRNA Purification 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech, PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50 × PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒购自 Clontech, High Pure PCR Product Purification 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司. 丙型肝炎病毒非结构蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS5A 由本室构建. DNA 测序由上海博亚公司完成.

### 1.2 方法

1.2.1 消减杂交文库的建立及克隆分析 分别将 pcDNA3.1(-)-NS5A 及 pcDNA3.1(-)空载体转染 HepG2 细胞, 48 h 后提取 mRNA, 以此 mRNA 为模板逆转录合成双链 cDNA (dscDNA), 并分别标记为 Tester 和 Driver, 经 Rsa I (一种识别 4 碱基序列的内切酶) 消化后将 Tester cDNA 分为两份, 分别连接特殊设计的寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2, 与过量的 Driver cDNA 进行 2 次消减杂交和 2 次抑制性 PCR, 使 Tester cDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增. 扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 JM109 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 °C 培养 18 h. 挑取白色菌落, 增菌, 以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增, 证明含有插入片段后(200-1 000 bp), 测序. 对于每一条基因片段的序列提交 GenBank 进行同源基因序列的搜索, 确认所得基因片段的独特性, 然后依据 GenBank 数据库中的同源基因片段进行电子拼接, 根据 Kozak 规则和终止密码子下游的多聚腺苷酸信号序列, 确定完整的编码基因序列.

1.2.2 新基因的 PCR 扩增与序列分析 根据电子拼接的新基因序列(1 011 bp), 利用生物软件 Vector NTI 设计新基因的序列特异性的含有特异性核酸内切酶(EcoR

I/BamH I)的引物, 利用转染了 pcDNA3.1(-)-NS5A 的 HepG2 细胞来源的 mRNA, 经过 RT-PCR 扩增, 并与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 JM109 感受态细菌, 在含有氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 °C 培养 18 h. 挑取白色菌落, 增菌, 使用碱裂解法提质粒后进行双酶切(EcoR I/BamH I)鉴定, 证明目的基因约 1 011 bp 后测序, 进一步鉴定正确后获得阳性克隆.

## 2 结果

2.1 mRNA 的定性、定量分析 纯化高质量的 mRNA 是获得 cDNA 高产量的前提. 紫外分光检测显示, 转染了 NS5A 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 4.64 μg 和 4.38 μg, A260/A280=1.97. 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带, 证实获得高质量 mRNA.

2.2 消减杂交文库的构建与分析 dscDNA 两端连接效率检测结果显示两组 dscDNA 已与接头高效率连接. 消减效率的鉴定结果显示: 与未消减组 PCR 产物相比, 消减组 PCR 产物中看家基因甘油三磷酸脱氢酶(G3PDH)基因产物大大减少, 说明所构建的消减文库具有很高的消减效率. 对差异表达基因片段进行菌落 PCR 扩增, 结果显示为 200-1 000 bp 大小不等的插入片段. 挑选克隆测序并与 GenBank 数据库进行初步比较.

2.3 新基因的序列分析及全长基因的获得 利用美国国立卫生院(NIH)国立医学图书馆(NLM)国立生物工程中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)及其同源基因序列的搜索(BLASTN), 发现其中的 1 个克隆序列与 GenBank 中注册的已知功能基因序列没有同源性. 电子拼接推定该基因的开放读码框架, 设计引物, 从表达 HCV NS3 蛋白的 HepG2 细胞提取总 RNA 后, 进行 RT-PCR, 扩增出约 1 011 bp 片段(图 1), 经过测序克隆出全长基因片段, 获得 HCV NS5A 反式激活作用的新型靶基因, 命名为 NS5ATP1. 新基因的开放读码框架(ORF)长度为 1 011 个核苷酸(nt), 编码产物由 336 个氨基酸残基(aa)组成(图 2).

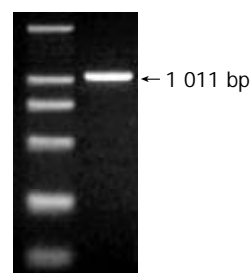


图 1 HCV NS5A 蛋白反式激活靶基因 NS5ATP1 的 PCR 扩增电泳图.

```

      M   A   A   S   L   R   L   L   G   A   A   S   G   L   R
1  ATG GCA GCC TCC TTA CGG CTC CTC GGA GCT GCC TCC GGT CTC CGG
      Y   W   S   R   R   L   R   P   A   A   G   S   F   A   A
46 TAC TGG AGC CGG CGG CTG CGG CCG GCA GCC GGC AGC TTT GCA GCG

```

```

      V  C  S  R  S  V  A  S  K  T  P  V  G  F  I
91  GTG TGT TCT AGG TCA GTG GCT TCA AAG ACT CCA GTT GGA TTC ATT
      G  L  G  N  M  G  N  P  M  A  K  N  L  M  K
136 GGA CTG GGC AAC ATG GGG AAT CCA ATG GCA AAA AAT CTC ATG AAA
      H  G  Y  P  L  I  I  Y  D  V  F  P  D  A  C
181 CAT GGC TAT CCA CTT ATT ATT TAT GAT GTG TTC CCT GAT GCC TGC
      K  E  F  Q  D  A  G  E  Q  V  V  S  S  P  A
226 AAA GAG TTT CAA GAT GCA GGT GAA CAG GTA GTA TCT TCC CCA GCA
      D  V  A  E  K  A  D  R  I  I  T  M  L  P  T
271 GAT GTT GCT GAA AAA GCT GAC AGA ATT ATT ACA ATG CTG CCC ACC
      S  I  N  A  I  E  A  Y  S  G  A  N  G  I  L
316 AGT ATC AAT GCA ATA GAA GCT TAT TCC GGA GCA AAT GGG ATT CTA
      K  K  V  K  K  G  S  L  L  I  D  S  S  T  I
361 AAA AAA GTG AAG AAG GGC TCA TTA TTA ATA GAT TCC AGC ACT ATT
      D  P  A  V  S  K  E  L  A  K  E  V  E  K  M
406 GAT CCT GCA GTT TCA AAA GAA TTG GCC AAA GAA GTT GAG AAA ATG
      G  A  V  F  M  D  A  P  V  S  G  G  V  G  A
451 GGA GCA GTT TTC ATG GAT GCC CCT GTT TCT GGT GGT GTA GGA GCT
      A  R  S  G  N  L  T  F  M  V  G  G  V  E  D
496 GCA CGA TCT GGG AAC CTC ACG TTT ATG GTG GGA GGA GTT GAA GAT
      E  F  A  A  A  Q  E  L  L  G  C  M  G  S  N
541 GAA TTT GCT GCT GCC CAA GAG TTG CTG GGG TGC ATG GGC TCC AAC
      V  V  Y  C  G  A  V  G  T  G  Q  A  A  K  I
586 GTG GTG TAC TGT GGA GCT GTT GGG ACT GGG CAG GCG GCA AAG ATC
      C  N  N  M  L  L  A  I  S  M  I  G  T  A  E
631 TGC AAC AAC ATG CTG TTA GCT ATT AGT ATG ATT GGA ACT GCT GAA
      A  M  N  L  G  I  R  L  G  L  D  P  K  L  L
676 GCT ATG AAT CTT GGA ATC AGG TTA GGG CTT GAC CCA AAA CTA CTG
      A  K  I  L  N  M  S  S  G  R  C  W  S  S  D
721 GCT AAA ATC CTA AAT ATG AGC TCA GGA CGG TGT TGG TCA AGT GAC
      T  Y  N  P  V  P  G  V  M  D  G  V  P  S  A
766 ACT TAT AAT CCT GTA CCT GGA GTG ATG GAT GGC GTT CCC TCG GCT
      N  N  Y  Q  G  G  F  G  T  T  L  M  A  K  D
811 AAT AAC TAT CAG GGT GGA TTT GGA ACA ACA CTC ATG GCT AAG GAT
      L  G  L  A  Q  D  S  A  T  S  T  K  S  P  I
856 CTG GGA TTG GCA CAA GAC TCT GCT ACC AGC ACA AAG AGC CCA ATC
      L  L  G  S  L  A  H  Q  I  Y  R  M  M  C  A
901 CTT CTT GGC AGT CTG GCC CAT CAG ATC TAC AGG ATG ATG TGT GCA
      K  G  Y  S  K  K  D  F  S  S  V  F  Q  F  L
946 AAG GGC TAC TCA AAG AAA GAC TTC TCA TCC GTG TTC CAG TTC CTA
      R  E  E  E  T  F  *
991 CGA GAG GAG GAG ACC TTC TGA

```

图2 NS5ATP1 基因序列及编码产物一级结构序列.

### 3 讨论

HCV 感染是引起慢性肝炎的主要原因, 与肝纤维化及肝细胞癌(HCC)的发生密切相关, 其中病毒编码的NS5A 蛋白起着重要的作用. NS5A 是反式转录激活因子, 其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸, 这是真核

细胞转录因子特有的结构特征, 但是其参与细胞转录调节的机制仍不十分清楚<sup>[9-11]</sup>. 一般来说, 反式转录激活因子是在细胞核中起作用的. 尽管已有明确证据显示NS5A 蛋白全长定位于细胞内质网, 但在细胞核内仍可检测到NS5A 的N-末端定位信号<sup>[12-16]</sup>, 提示NS5A



的部分结构可进入细胞核内并成为转录激活因子的一部分. 缺失 N-末端 146 aa 和 DNA 结合区域在 GAL4(一种酵母细胞转录激活因子)的 HCV NS5A 蛋白可强烈的激活酵母和哺乳动物细胞的转录活性. 结合到 GAL4 DNA 结合区域的全长 HCV NS5A 蛋白并没有激活转录的作用, NS5A 片段转录激活作用最强的位点定位于 2 135 和 2 331 aa 之间. NS5A 的转录激活区域包括两个酸性氨基酸区 (2 143-2 184 aa, 2 220-2 273 aa) 和一个脯氨酸富集区 (2282-2327 aa). 酸性氨基酸区的酸性氨基酸残基的数量与 NS5A 的反式激活活性相关, 2 个酸性氨基酸区是 NS5A 的转录激活作用的核心区域, 因此酸性氨基酸区 2 的一些氨基酸的突变可明显影响 NS5A 的转录激活作用, 但是这些突变更多的是引起蛋白二级结构的改变. 脯氨酸富集区被认为对 NS5A 的转录激活作用只有一定的加强作用, 相对而言并不特别重要.

Gong et al<sup>[17]</sup> 研究发现, NS5A 能够反式激活核转录因子 NF- $\kappa$ B 及 STAT3, 在细胞炎症反应、肿瘤发生及转移过程中起重要作用. NS5A 在细胞质内通过氧化应激作用激活 NF- $\kappa$ B 和 STAT-3 转录因子. NS5A 引起细胞内钙离子的紊乱.  $\text{Ca}^{2+}$  作为第二信使激发线粒体内的活性氧簇水平, 使 NF- $\kappa$ B 和 STAT-3 易位入细胞核内. 有证据表明 STAT-3 的激活部分有 NS5A 的作用. 在抗氧化剂 N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)或者  $\text{Ca}^{2+}$  拮抗剂(EGTA-AM, TMB-8)作用下, NS5A 诱导的 NF- $\kappa$ B 和 STAT-3 的反式激活作用消失. 这些结果说明 NS5A 可引起细胞内与病毒感染相关的病理改变的发病机制. Ghosh et al<sup>[18]</sup> 研究发现, NS5A 蛋白能够抑制细胞周期调节基因 p21<sup>WAF1</sup>, 激活人肝癌细胞中增生细胞核抗原(PCNA)基因, 从而调节细胞凋亡, 促进细胞增生. NS5A cDNA 能够使转染的小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 具有转化特性, 且转化细胞移植入裸鼠体内可形成纤维肉瘤灶, 直接证明了 HCV NS5A 蛋白的恶性转化潜能. 由于 NS5A 表现出对抗干扰素  $\alpha$ (IFN $\alpha$ )的治疗效应而引起人们广泛的关注, NS5A 能够与肝细胞中的 IFN 刺激蛋白-双链 RNA 依赖的激酶(PKR)相互作用, 抑制 PKR 的功能, 从而下调 IFN  $\alpha$  刺激的抗病毒效应<sup>[19]</sup>.

本项研究中发现了 HCV NS5A 蛋白反式激活的新的靶基因, 为研究 HCV NS5A 蛋白的反式激活作用及其后果提供了新的研究方向和思路. 由于目前对于新克隆的 NS5A 蛋白反式激活的靶基因的结构与功能、表达与调控, 以及新基因的生物作用和在丙型肝炎致病机

制中的作用和地位不明, 需要进一步研究, 以阐明新基因的研究意义.

#### 4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1997:83
- 2 成军. 病毒性肝炎的分子发病机制. 临床肝胆病杂志 2001;17(增刊):31-35
- 3 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 4 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;16(Suppl):A185
- 5 成军. 丙型肝炎病毒干扰素敏感决定区的研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 2000;27:55-58
- 6 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136
- 7 成军, 陈菊梅, 钟彦伟, 施双双, 倪勤, 刘妍, 王刚, 董菁, 夏小兵, 刘友昭, 王琳, 李克, 杨继珍, 邵得志, 陈菊梅. HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链可变区抗体基因的筛选与鉴定. 中华实验与临床病毒学杂志 2001;15:216-218
- 8 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的生物学调节作用. 国外医学·微生物学分册 2001;24:12-14
- 9 Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997;71:8856-8859
- 10 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 11 Chung KM, Song OK, Jang SK. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A contains potential transcriptional activator domains. *Mol Cells* 1997;7:661-667
- 12 Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80(Pt 5):1179-1183
- 13 No authors listed. Post-transfusion hepatitis leading to chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1978;75:732-741
- 14 Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001;75:6095-6106
- 15 Tan SL, Katze MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 2001;284:1-12
- 16 Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001;59:1271-1276
- 17 Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF- $\kappa$ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
- 18 Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80:1179-1183
- 19 Tan SL, Katze MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 2001;284:1-12

# 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因NS5ATP7的克隆

张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 梁耀东, 刘敏

张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 梁耀东, 刘敏, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

张健, 男, 1973-05-18生, 北京市人, 汉族. 1997年解放军第四军医大学本科毕业, 2001年解放军军医进修学院内科传染病学专业硕士研究生, 医师. 主要从事传染病的临床与基础研究.

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-25 接受日期: 2003-07-16

## Cloning and identification of human gene 7 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus

Jian Zhang, Yan Liu, Jun Cheng, Lin Wang, Qing Shao, Yao-Dong Liang, Min Liu

Jian Zhang, Yan Liu, Jun Cheng, Lin Wang, Qing Shao, Yao-Dong Liang, Min Liu, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, 100039 Beijing, China  
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2003-06-25 Accepted: 2003-07-16

## Abstract

**AIM:** To screen and clone the target genes transactivated by nonstructural protein 5A (NS5A) of hepatitis C virus (HCV) using suppression subtractive hybridization (SSH) technique and bioinformatics technique.

**METHODS:** The mRNA was isolated from HepG2 cells which were transfected with pcDNA3.1(-)-NS5A and pcDNA3.1(-) empty vector, respectively, and SSH method was employed to analyze the differentially expressed DNA sequence between the two groups. The obtained sequences were searched for homologous DNA sequence from GenBank, one of which was a new gene with unknown function. The new gene with no homology with known genes in this database was confirmed and electric polymerase chain reaction (PCR) was conducted for the cloning of the full-length cDNA for the new gene and in conjunction with Kozak role and the exist of polyadenyl signal sequence. The reverse transcription PCR (RT-PCR) was used to amplify the new gene, named NS5ATP7, from the mRNA of HepG2 cells. The sequence for the NS5ATP7 gene was deposited into GenBank, and the accession number was AF529368.

**RESULTS:** The full-length DNA sequence for the NS5ATP7 gene was of 894 nucleotides (nt), and its coding product consisted of 297 amino acid (aa) residues.

**CONCLUSION:** These results will pave the way for the study of the molecular mechanism of the transactivating effects of NS5A protein of HCV and the development of new therapy for chronic hepatitis C.

Zhang J, Liu Y, Cheng J, Wang L, Shao Q, Liang YD, Liu M. Cloning and identification of human gene 7 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):82-85

## 摘要

**目的:** 应用抑制性消减杂交(SSH)技术及生物信息学技术筛选并克隆丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白5A(NS5A)反式激活新型靶基因.

**方法:** 以 HCV NS5A 表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS5A 转染 HepG2 细胞, 以空载体 pcDNA3.1(-) 为平行对照, 提取 mRNA 并进行 SSH 分析. 对于所获基因片段序列分析表明, 其中之一为新型基因片段, 与 GenBank 中注册的已知功能基因序列没有同源性, 利用表达序列标签(EST)序列的搜索和比对, 进行电子拼接, 根据基因起始密码子的 Kozak 规则和终止密码子下游保守的多聚腺苷酸信号序列, 确定新型基因序列. 从 HepG2 细胞提取总 RNA, 以逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术扩增获得该新基因的全长序列, 并测序证实, 命名为 NS5ATP7, 在 GenBank 中注册, 注册号为 AF529368.

**结果:** NS5ATP5 基因的编码序列全长为 894 个核苷酸(nt), 编码产物由 297 个氨基酸残基(aa)组成.

**结论:** HCV NS5A 反式激活新型靶基因 NS5ATP5 的筛选与克隆, 为进一步研究 HCV NS5A 反式激活作用的分子生物学机制和探索新型治疗技术奠定了基础.

张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 梁耀东, 刘敏. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因 NS5ATP7 的克隆. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):82-85  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/82.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)的感染, 不仅能够引起急慢性病毒性肝炎, 且与肝脏纤维化(liver cirrhosis, LC)和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生密切相关

关。值得注意的是, HCV 感染具有较高的慢性化比例, 有时高达 80% 以上。目前我国一般人群的感染率达 3.2%, 因而具有很大的危害性<sup>[1-14]</sup>。丙型肝炎病毒是单股正链 RNA 病毒, 全长约 9 500 个核苷酸, 含有一个大的开放读码框架(ORF), 编码 3 010-3 033 个氨基酸残基的多肽前体, 多肽前体至少被加工为 10 种结构蛋白和非结构蛋白。其中, HCV 非结构蛋白 5A(NS5A) 基因(位于 6 258-7 601 bp 之间)编码的 56 kD 的 NS5A 蛋白(448 aa)除了参与 HCV 多蛋白的成熟和 RNA 的复制过程外, 还具有多种生物学功能。目前, 不同磷酸化形式的 NS5A 蛋白具有反式激活作用是国内外学者关于 NS5A 生物学功能研究的热点。NS5A 蛋白是一种作用很强的转录激活因子, 能够影响细胞信号转导途径, 激活多种病毒及细胞基因启动子, 调控着细胞基因的转录, 推测 NS5A 蛋白的这种反式激活作用, 可能是 HCV 感染与肝细胞癌发生发展密切相关的重要分子生物学机制<sup>[15, 16]</sup>。

本研究利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH), 对于表达 HCV NS5A 载体转染的 HepG2 细胞进行研究, 阐明了 NS5A 蛋白反式激活作用的部分靶基因, 同时我们结合生物信息学技术(bioinformatics)克隆了 NS5A 蛋白反式激活作用的新靶基因, 即 HCV NS5A 蛋白反式激活基因 7(NS5ATP7), 从而为 HCV NS5A 反式激活作用的研究提供新的方向。

## 1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为本室保存, pcDNA3.1(-)真核表达载体购自 Invitrogen 公司; Lipofectamine PLUS 转染试剂购自 Gibco 公司, mRNA Purification 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech, PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50  $\times$  PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒购自 Clontech, High Pure PCR Product Purification 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, T7、SP6 通用引物及 pGEM-T vector 载体购自 Promega 公司。丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS5A 由本室构建<sup>[17]</sup>。DNA 测序由上海博亚公司完成。

### 1.2 方法

1.2.1 消减杂交文库的建立及克隆分析 分别将 pcDNA3.1(-)-NS5A 及 pcDNA3.1(-)空载体转染 HepG2 细胞, 48 h 后提取 mRNA, 以此 mRNA 为模板逆转录合成双链 cDNA(dscDNA), 并分别标记为 Tester 和 Driver, 经 Rsa I(一种识别 4 碱基序列的内切酶)消化后将 Tester cDNA 分为两份, 分别连接特殊设计的寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2, 与过量的 Driver cDNA 进行 2 次消减杂交和 2 次抑制性 PCR, 使 Tester cDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增。扩增产物与 pGEM-T 载体连接, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37  $^{\circ}$ C 培养 18 h。挑取白色菌落, 增菌, 以 pGEM-T 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进

行菌落 PCR 扩增, 证明含有插入片段后(2 00-1 000 bp)测序。对于每一条基因片段的序列提交 GenBank 进行同源基因序列的搜索, 确认所得基因片段的独特性, 然后依据 GenBank 数据库中的同源基因片段进行电子拼接, 根据 Kozak 规则和终止密码子下游的多聚腺苷酸信号序列, 确定完整的编码基因序列。

1.2.2 新基因的 PCR 扩增与序列分析 根据电子拼接序列的新基因序列, 设计新基因特异性引物, 利用转染了 pcDNA3.1(-)-NS5A 的 HepG2 细胞来源的 mRNA, 经过逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)扩增与克隆技术, 获得阳性克隆并进行序列分析。

## 2 结果

2.1 mRNA 的定性、定量分析 使用高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提。紫外分光检测显示, 转染了真核表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 4.54  $\mu$ g 和 4.23  $\mu$ g, A260/A 280=1.7。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带。

2.2 消减杂交文库的构建与分析 dscDNA 两端连接效率检测结果显示两组 dscDNA 已与接头高效率连接。消减效率的鉴定结果显示: 与未消减组 PCR 产物相比, 消减组 PCR 产物中看家基因甘油三磷酸脱氢酶 G3PDH 基因产物大大减少, 说明所构建的消减文库具有很高的消减效率。对差异表达基因片段进行菌落 PCR 扩增, 结果显示为 200-1 000 bp 大小不等的插入片段。挑选克隆测序, 并与 GenBank 数据库进行初步比较。

2.3 新基因的序列分析及全长基因的获得 利用美国国立卫生研究院(NIH)国立医学图书馆(NLM)国立生物工程中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)及其同源基因序列的搜索(BLASTN), 发现其中的 1 个克隆序列与 GenBank 中注册的已知功能基因序列没有同源。电子拼接推定该基因的开放读码框架, 设计引物, 从表达 HCV NS5A 蛋白的 HepG2 细胞提取总 RNA 后, 进行 RT-PCR, 扩增出约 1 000 bp 片段(图 1), 经过测序克隆出全长基因片段, 获得 HCV NS5A 蛋白反式激活作用的新型靶基因, 命名为 NS5ATP7。新基因的开放读码框架(ORF)长度为 894 个核苷酸, 编码产物由 297 个氨基酸残基组成(图 2)。新基因的核苷酸序列被 GenBank 收录, 收录号为 AF529368。

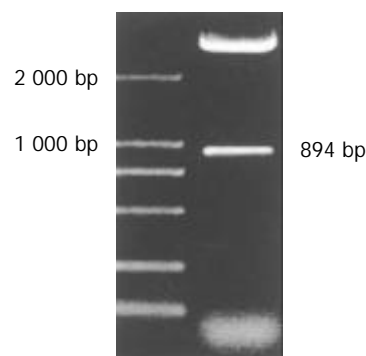


图 1 NS5ATP7 逆转录 PCR 扩增结果。

```

      M   S   N   R   V   V   C   R   E   A   S   H   A   G   S
1  ATG TCC AAC CGA GTG GTC TGC CGA GAA GCC AGT CAC GCC GGG AGC
      W   Y   T   A   S   G   P   Q   L   N   A   Q   L   E   G
46 TGG TAC ACA GCC TCA GGA CCG CAG CTG AAT GCA CAG CTA GAA GGT
      W   L   S   Q   V   Q   S   T   K   R   P   A   R   A   I
91 TGG CTT TCA CAA GTA CAG TCT ACA AAA AGA CCT GCT AGA GCC ATT
      I   A   P   H   A   G   Y   T   Y   C   G   S   C   A   A
136 ATT GCC CCC CAT GCA GGA TAT ACG TAC TGT GGG TCT TGT GCT GCC
      H   A   Y   K   Q   V   D   P   S   I   T   R   R   I   F
181 CAT GCT TAT AAA CAA GTG GAT CCG TCT ATT ACC CGG AGA ATT TTC
      I   L   G   P   S   H   H   V   P   L   S   R   C   A   L
226 ATC CTT GGG CCT TCT CAT CAT GTG CCC CTC TCT CGA TGT GCA CTT
      S   S   V   D   I   Y   R   T   P   L   Y   D   L   R   I
271 TCC AGT GTG GAT ATA TAT AGG ACA CCT CTG TAT GAC CTT CGT ATT
      D   Q   K   I   Y   G   E   L   W   K   T   G   M   F   E
316 GAC CAA AAG ATT TAC GGA GAA CTG TGG AAG ACA GGA ATG TTT GAA
      R   M   S   L   Q   T   D   E   D   E   H   S   I   E   M
361 CGC ATG TCT CTG CAG ACA GAT GAA GAT GAA CAC AGT ATT GAA ATG
      H   L   P   Y   T   A   K   A   M   E   S   H   K   D   E
406 CAT TTG CCT TAT ACA GCT AAA GCC ATG GAA AGC CAT AAG GAT GAG
      F   T   I   I   P   V   L   V   G   A   L   S   E   S   K
451 TTT ACC ATT ATT CCT GTA CTG GTT GGA GCT CTG AGT GAG TCA AAA
      E   Q   E   F   G   K   L   F   S   K   Y   L   A   D   P
496 GAA CAG GAA TTC GGA AAA CTC TTC AGT AAA TAT CTA GCG GAT CCT
      S   N   L   F   V   V   S   S   D   F   C   H   W   G   Q
541 AGT AAT CTC TTT GTG GTT TCT TCT GAT TTC TGC CAT TGG GGT CAA
      R   F   R   Y   S   Y   Y   D   E   S   Q   G   E   I   Y
586 AGG TTC CGT TAC AGT TAC TAT GAT GAA TCC CAG GGG GAG ATT TAT
      R   S   I   E   H   L   D   K   M   G   M   S   I   I   E
631 AGA TCC ATT GAA CAT CTA GAT AAA ATG GGT ATG AGT ATT ATA GAA
      Q   L   D   P   V   S   F   S   N   Y   L   K   K   Y   H
676 CAA TTA GAC CCT GTA TCT TTT AGC AAT TAC TTG AAG AAA TAC CAT
      N   T   I   C   G   R   H   P   I   G   V   L   L   N   A
721 AAT ACT ATA TGT GGA AGA CAT CCC ATT GGG GTG TTA TTA AAT GCT
      I   T   E   L   Q   K   N   G   M   N   M   S   F   S   F
766 ATC ACA GAG CTC CAG AAG AAT GGA ATG AAT ATG AGT TTT TCG TTT
      L   N   Y   A   Q   S   S   Q   C   R   N   W   Q   D   S
811 TTG AAT TAT GCC CAG TCG AGC CAG TGT AGA AAC TGG CAA GAC AGT
      S   V   S   Y   A   A   G   A   L   T   V   H   *
856 TCA GTG AGT TAT GCA GCT GGA GCA CTC ACG GTC CAC TGA

```

图2 HCV NS5A 反式激活靶基因 NS5ATP7 核苷酸及其编码产物序列。

### 3 讨论

HCV 基因组的翻译是在有关酶的作用下合成一个长约 3 011 氨基酸的多蛋白前体, 然后在宿主信号肽酶和病毒编码的蛋白酶作用下裂解为各种蛋白, 即: 结构蛋白 C、E1、E2、p7, 和非结构蛋白 NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B<sup>[18-23]</sup>。NS5A 是非结构蛋白的一种, 哺乳动物细胞表达的 HCV NS5A 位于 HCV 多蛋白

的羧基末端, 是丝氨酸磷酸化蛋白质, 依磷酸化程度的不同而产生两种分子量不同的多肽 p56 和 p58, 分子量分别为 56 kD 和 58 kD, p58 被认为是 p56 的超级磷酸化产物, 目前认为 NS5A 蛋白是在细胞蛋白激酶作用下发生磷酸化修饰后发挥生物调节作用的<sup>[24]</sup>。不同磷酸化形式的 NS5A 蛋白具有反式激活作用是关于 NS5A 生物学功能研究的热点。研究发现, NS5A 片段转

录激活作用最强的位点定位于2 135和2 331 aa之间. NS5A 的转录激活区域包括两个酸性氨基酸区(2 143-2 184, 2 220-2 273 aa)和一个脯氨酸富集区(2 282-2 327 aa). 酸性氨基酸区的酸性氨基酸残基的数量与NS5A的反式激活活性相关, 两个酸性氨基酸区是NS5A的转录激活作用的核心区域, 因此酸性氨基酸区2的一些氨基酸的突变可明显影响NS5A的转录激活作用, 但是这些突变更更多的是引起蛋白二级结构的改变. 最近的研究表明缺失N-末端146个氨基酸残基和DNA结合区域在GAL4(一种酵母细胞转录激活因子)的HCV NS5A蛋白可强烈的激活酵母和哺乳动物细胞的转录活性. 结合到GAL4 DNA结合区域的全长的HCV NS5A蛋白并没有激活转录的作用. 尽管已有明确证据显示NS5A蛋白全长定位于细胞质内, 在细胞核内仍可以检测到NS5A的N-末段的具有功能性核定位信号(nucleic localization signal, NLS)序列, 即PPRKKRVV(354-362 aa), 因此NS5A蛋白具有核信号转导功能, 这就提示这部分结构可进入细胞核内并成为转录激活因子的一部分. Gong et al 研究发现, NS5A能够反式激活核转录因子NF- $\kappa$ B及STAT3, 在细胞炎症反应、肿瘤发生及转移过程中起重要作用. 通过反式激活作用, NS5A还可抑制细胞周期调节基因p21WAF1的表达, 抑制p53介导的对转录的反式激活作用和细胞凋亡作用. 此外, 由于NS5A表现出对抗干扰素 $\alpha$ (IFN $\alpha$ )的治疗效应而引起人们广泛的关注, NS5A能够与肝细胞中的IFN刺激蛋白-双链RNA依赖的激酶(PKR)相互作用, 抑制PKR的功能, 从而下调IFN刺激的抗病毒效应. 位于NS5A蛋白中央包括一段干扰素敏感决定区(ISDR), 该区被认为是介导NS5A与IFN $\alpha$ 诱导的双链RNA依赖的蛋白激酶结合的部位, 后者是IFN $\alpha$ 诱导的早期细胞内抗病毒合成反应. 同时NS5A显示出诱导CXC趋化因子、白介素-18(IL-18), 可抵消IFN $\alpha$ 抗病毒效应.

本研究建立了真核表达载体pcDNA3.1(-)-NS5A, 转染肝母细胞瘤细胞系HepG2, 以转染空白载体的肝母细胞瘤细胞系HepG2作为对照, 将2种转染的细胞系中提取的mRNA做为起始材料, 应用SSH方法成功地构建了HCV NS5A反式激活相关基因差异表达的cDNA消减文库, 挑选90个克隆测序, 并与GenBank数据库进行同源性比较分析, 结果主要包括2种类型, 第一种是已知基因的序列, 与GenBank中数据高度同源, 其中包括已知的看家基因序列和与细胞生长调节密切相关的基因序列, 第二种是未知基因序列, 共获得15个差异表达的未知序列<sup>[6]</sup>. 对其中的一个未知功能基因序列, 我们采用生物信息学方法进行电子拼接分析, 获得了其全长基因序列, 被GenBank收录. 本项研究中发现的HCV NS5A蛋白反式激活的新靶基因, 命名为NS5ATP7, 为研究HCV NS5A蛋白的反式激活作用及其作用机制提供了新的研究方向和思路.

#### 4 参考文献

- 1 成军, 朱传琳. 丙型肝炎病毒感染慢性化的分子生物学机制. 国外医学·病毒学分册 2000;7:29-32
- 2 Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol* 1995;69:3893-3896
- 3 Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol* 1996;70:4438-4443
- 4 刘妍, 成军. 丙肝病毒致肝细胞癌的分子生物学机制. 国外医学·流行病学传染病学分册 2000;27:10-13
- 5 Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-362
- 6 Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redecker AG, Purcell RH, Miyamura TJ, Dienstag L, Alter MJ, Stevens CE, Tagtmeier GE, Bonino F, Colombo M, Lee WS, Kuo C, Berger K, Shister JR, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-364
- 7 Assy N, Minuk GY. A comparison between previous and present histologic assessments of chronic hepatitis C viral infections in humans. *World J Gastroenterol* 1999;5:107-110
- 8 Huang F, Zhao GZ, Li Y. HCV genotypes in hepatitis C patients and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 1999;5:547-549
- 9 Deng ZL, Ma Y, Yuan L, Teng PK. The importance of hepatitis C as a risk factor for hepatocellular carcinoma in Guangxi. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):75-79
- 10 Song ZQ, Hao F, Min F, Ma QY, Liu GD. Hepatitis C virus infection of human hepatoma cell line 7721 *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2001;7:685-689
- 11 Zhang LF, Peng WW, Yao JL, Tang TH. Immunohistochemical detection of HCV infection in patients with hepatocellular carcinoma and other liver diseases. *World J Gastroenterol* 1998;4:64-65
- 12 Yang JM, Wang RQ, Bu BG, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. Effect of HCV infection on expression of several cancer associated gene products in HCC. *World J Gastroenterol* 1999;5:25-27
- 13 Cheng J. Progress in gene therapy for liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(Suppl): A261
- 14 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 刘妍, 王刚, 洪源, 王贺, 芮莉莉. 筛选与克隆丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白结合蛋白基因. 解放军医学杂志 2003;28:50-52
- 15 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1997:37-47
- 16 Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001;59:1271-1276
- 17 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙型肝炎病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 18 成军, 钟彦伟, 施双双, 王刚, 董菁, 夏小兵, 杨继珍, 陈菊梅. HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体可变区基因的筛选与鉴定. 中华微生物和免疫学杂志 2000;20:567
- 19 钟彦伟, 成军, 施双双, 杨继珍, 董菁, 夏小兵, 李克, 刘妍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体的筛选与表达. 中华中西医结合杂志 2001;2:97-99
- 20 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的生物学调节作用. 国外医学·微生物学分册 2001;24:12-14
- 21 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136
- 22 钟彦伟, 成军, 田小军, 陈新华, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 抗原模拟表位的筛选与鉴定. 中华肝脏病杂志 2002;10:266-268
- 23 刘妍, 陆荫英, 成军, 王建军, 李莉, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因的克隆化研究. 解放军医学杂志 2003;28:40-43
- 24 Reed KE, Xu J, Rice CM. Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein *in vitro* and *in vivo*: properties of the NS5A-associated kinase. *J Virol* 1997;71:7187-7197

# 酵母双杂交技术筛选白细胞中HCV核心蛋白结合蛋白基因

邵清, 成军, 白雪帆, 王琳, 张健, 梁耀东, 刘敏, 李强

邵清, 成军, 王琳, 张健, 梁耀东, 刘敏, 李强, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

白雪帆, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院传染科 陕西省西安市 710039  
邵清, 男, 1966-10-22 出生, 汉族, 北京市人, 1991 年第四军医大学本科毕业, 第四军医大学唐都医院感染科 2001 年硕士研究生。主要从事病毒性肝炎的基因治疗研究。

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-25 接受日期: 2003-07-16

## Screening of the genes of HCV core interacting proteins from human leucocyte cDNA library by yeast two-hybrid system

Qing Shao, Jun Cheng, Xie-Fan Bai, Lin Wang, Jian Zhang, Yao-Dong Liang, Min Liu, Qiang Li

Qing Shao, Jun Cheng, Lin Wang, Jian Zhang, Yao-Dong Liang, Min Liu, Qiang Li, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Xie-Fan Bai, Department of Infectious Diseases, Tangdu hospital, The Fourth Military Medical University, Xian, 710039, Shanxi Province, China

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2003-06-25 Accepted: 2003-07-16

## Abstract

**AIM:** To investigate the binding protein of hepatitis C virus core protein (HCVcore).

**METHODS:** The HCVcore gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and HCVcore bait plasmid was constructed by using yeast-two hybrid system 3, then transformed into yeast AH109. The transformed yeast mated with yeast Y187 containing leucocyte cDNA library plasmid in 2xYPDA medium. Diploid yeast was plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing x- $\alpha$ -gal for selecting two times and screening. After extracting and sequencing of plasmid from blue colonies, we underwent analysis by bioinformatics.

**RESULTS:** Six colonies were sequenced, among which, two colonies were golgi complex associated protein 1 (GOCAP1), one colony was Ran binding protein M (RanBPM), one colony was pellino homolog 2 (PELI2), and two colonies

were KIAA1949 protein (KIAA1949).

**CONCLUSION:** Genes of HCV core interacting proteins in leucocyte are successfully cloned and the results bring some new clues for studying the biological functions of HCVcore and associated proteins.

Shao Q, Cheng J, Bai XF, Wang L, Zhang J, Liang YD, Liu M, Li Q. Screening of the genes of HCV core interacting proteins from human leucocyte cDNA library by yeast two-hybrid system. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(1):86-88

## 摘要

**目的:** 用酵母双杂交技术筛选白细胞中与丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白结合蛋白的基因。

**方法:** 用多聚酶链反应(PCR)法扩增 HCV 核心蛋白基因, 连接入酵母表达载体 pGBKT-7 中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞 AH109 并在其内表达, 然后与转化了人白细胞文库质粒的酵母细胞 Y187 进行配合, 在营养缺陷型培养基上进行双重筛选阳性菌落, 增菌后提取质粒, 转化入大肠杆菌, 提取质粒并测序, 进行生物信息学分析。

**结果:** 成功克隆出核心蛋白基因并在酵母细胞中表达, 配合后选出在四缺 (SD/-Trp-Leu-Ade-His) 培养基和辅有 X- $\alpha$ -半乳糖 (X- $\alpha$ -gal) 的四缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落共 6 个, 其中 2 个高尔基复合体关联蛋白 1, 1 个 Ran 结合蛋白 M, 1 个 pellino 同族体 2, 2 个未知功能蛋白基因 (KIAA1949)。

**结论:** 成功克隆出丙型肝炎病毒核心蛋白的结合蛋白, 为进一步研究 HCV 的作用提供了新线索。

邵清, 成军, 白雪帆, 王琳, 张健, 梁耀东, 刘敏, 李强. 酵母双杂交技术筛选白细胞中 HCV 核心蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004;12(1):86-88  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/86.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 于 1989 年被发现, 是输血后病毒性肝炎的重要病原体, 可引起急、慢性病毒性肝炎, 慢性肝炎迁延不愈, 导致肝纤维化 (LC), 甚至肝细胞癌 (HCC)<sup>[1-5]</sup>. 丙型肝炎病毒是单股正链 RNA 病毒, 全长约 9 500 个核苷酸 (nt), 含有一个大的开放读码框架 (ORF), 编码 3 010-3 033 个氨基酸残基 (aa) 的多肽前体, 多肽前体至少被加工为 10 种结构蛋白



和非结构蛋白, 其中结构蛋白核心蛋白基因(1-573nt)编码的 21kD HCV 核衣壳蛋白(191 aa)是一种多功能蛋白质, 在 HCV 致病过程中可能起着重要的作用<sup>[6-10]</sup>, 我们曾用酵母双杂交技术筛选了肝细胞中与丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白结合蛋白的基因<sup>[11]</sup>, 为探讨 HCV 致病的分子生物学机制提供了重要线索, 为进一步研究 HCV 核心蛋白与免疫系统的关系, 我们用酵母双杂交技术筛选白细胞中 HCV 核心蛋白结合蛋白基因。

## 1 材料和方法

1.1 材料 *Saccharomyces cerevisiae* AH109 酵母株、Y187 酵母株(K1612-1)、cDNA 淋巴文库、酵母 YPDA 培养基、SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade、X- $\alpha$ -半乳糖苷酶(Gal)等购自 Clontech 公司。半硫酸腺苷、醋酸锂购自 Sigma 公司。复杂高效感受态(FSB), 本室自制。大肠杆菌(DH5 $\alpha$ ), 本室保存<sup>[12]</sup>。

## 1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒的构建及表达 HCV 核心蛋白的酵母表达载体 pGBKT7-HCV core 用醋酸锂法转入酵母细胞 AH109, 由本室构建<sup>[11]</sup>。

1.2.2 酵母白细胞文库的构建 cDNA 白细胞文库进行增菌后, 提取质粒, 转化入酵母细胞(Y187), 经文库滴定, 确定文库细胞计数大于  $1 \times 10^9$  细胞/mL, 由本室构建<sup>[13-16]</sup>。

1.2.3 诱饵与白细胞文库的酵母配合 挑取在 SD/-Trp 选择培养基上生长转化子(计数大于  $1 \times 10^9$  细胞/mL)与淋巴文库混合, 30 °C 轻摇配合过夜, 24 h 后铺板 SD/-Trp/-Leu/-His 25 块、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 25 块。同时进行阳性对照实验及文库滴定。生长 16 d 后把长出的大于 3 mm 的酵母集落, 在铺有 X- $\alpha$ -半乳糖苷酶的 QDO 上检查  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性, 认为在 QDO 培养基上生长且出现蓝色菌落的配合为阳性集落。

1.2.4 阳性质粒的克隆和分析 挑取真正的阳性集落, 按照试剂盒提供的操作指南 Lyticase 法提取酵母质粒。提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的 SOB 平板培养, 所获得的菌落酶切鉴定后测序。阳性克隆 DNA 测序后, 提交 GenBank 比对, 进行生物信息学分析。

表 1 丙型肝炎病毒核心蛋白结合的白细胞蛋白的筛选结果

序号	筛选出的目的基因	同源性	相同克隆数
1	高尔基复合体关联蛋白 1	99-100%	2
2	Ran 结合蛋白 M	99%	1
3	1 个 pellino 同族体 2	99%	1
4	未知功能蛋白基因(KIAA1949)	99-100%	2

## 2 结果

cDNA 测序与同源性分析初步结果配合后筛选出在 4 缺(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)培养基和铺有 X- $\alpha$ -gal 的 4 缺

培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落 6 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较。2 个为未知功能蛋白基因, 其余 4 个均与已知基因的部分序列高度同源(99-100%)表 1。

## 3 讨论

酵母双杂交系统是近年来新发展起来的一种分析真核细胞中蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA 相互作用的一种有效的基因分析方法, 他的产生为研究蛋白在体内生理情况下的相互作用提供了一种新的遗传学方法。酵母双杂交系统通过将两个推定有相互作用的蛋白 X 和 Y 分别融合到一酵母转录激活因子的 BD 和 AD 上, X 与 Y 的相互作用重构了激活因子, 从而导致下游“报告基因”的转录, 产生容易探测到的表型<sup>[17-21]</sup>。我们使用的是酵母双杂交系统 3(Clontech 公司商品化的双杂交系统), 由于有 3 个表达基因用来筛选及严格的对照, 其阳性率达 95% 以上, 假阳性率 5% 以下。实验中我们在真核表达载体 pGBK-T7 中构建 pGBKT7-HCVNS3 诱饵质粒并在酵母菌株 AH109 中表达了 HCVcore 基因<sup>[7]</sup>, 与人白细胞 cDNA 文库的酵母菌株 Y187 进行配合, 配合后选出在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基和铺有 X- $\alpha$ -半乳糖(X- $\alpha$ -gal)的四缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落共 6 个, 其中 2 个高尔基复合体关联蛋白 1, 1 个 Ran 结合蛋白 M, 1 个 pellino 同族体 2, 2 个未知功能蛋白基因(KIAA1949)。

Ohda et al<sup>[22]</sup>研究表明高尔基复合体关联蛋白 1 是高尔基体的外围结构, 通过与高尔基体的巨大端的相互作用来保持高尔基体的结构, 影响从内质网到高尔基体的蛋白质运输。

Rao et al<sup>[23]</sup>研究表明 RanBPM 与类固醇受体相互作用并选择性地改变其活性, 类固醇受体包括雄激素受体、糖皮质激素受体、盐皮质激素受体和黄体酮受体。Nakamura et al<sup>[24]</sup>研究表明 RanBPM 与微管成核作用有关, Ran 通过 RanBPM 调节细胞中心体。Wang et al<sup>[25]</sup>报道 MET 是肝生长因子(HGF)的蛋白酪氨酸激酶受体, 是 1 个控制细胞生长、形态发生和运动性的多功能细胞因子。在人类多种肿瘤发生时均可查到 MET 的过表达。RanBPM 的功能是 MET 酪氨酸激酶区域的衔接蛋白, 可增大 HGF-MET 信号传导途径, RanBPM 的过表达可导致 Ras 信号传导途径的组成部分激活。Shimotohno et al<sup>[26]</sup>研究表明 HCV 核心蛋白影响细胞增生主要通过两个机制, 即激活 Ras/Raf 的活性和抗凋亡作用。

通过以上结果提供的这些线索, 我们可以进行更深入的研究, 进一步弄清各种蛋白与 HCV 核心蛋白的相互作用及 HCV 核心蛋白确切的作用, 为寻找阻断 HCV 感染及 HCC 发生的有效方法探索新道路<sup>[27-32]</sup>。当然, 这些结合蛋白的发现只是研究病毒蛋白功能的一个起点, 在极其复杂的体内环境中, 需要更多的实验证据来揭示这种结合的生物学意义<sup>[33-44]</sup>。

## 4 参考文献

- 1 成军, 李莉. 清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制. 世界华人消化杂志 2002;10:73-76
- 2 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因区结合的研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 3 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 4 成军. 慢性丙型肝炎病毒肝脏脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 5 成军. 新基因结构与功能研究的策略. 世界华人消化杂志 2003;11:373-377
- 6 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒X基因酵母表达载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:15-18
- 7 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒NS2基因酵母双杂交“饵”载体构建与表达. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132
- 8 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调c-myc基因表达的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:141-144
- 9 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- 10 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:213-215
- 11 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆HCV核心蛋白结合蛋白基因1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 12 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. 世界华人消化杂志 2002;10:161-164
- 13 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙肝病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病病毒基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:765-769
- 14 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选Hcbp6结合的肝细胞蛋白编码基因. 世界华人消化杂志 2003;11:385-388
- 15 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选HBcAg肝细胞结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:426-429
- 16 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBcAg肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:422-425
- 17 夏小兵, 成军, 王刚, 杨继珍, 刘妍, 董菁, 王琳, 李克. 人肝再生增强因子在毕赤酵母中的表达. 世界华人消化杂志 2001;9:743-746
- 18 皇甫克坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及准种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325
- 19 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒NS5A抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136
- 20 洪源, 成军, 董菁, 李克, 王琳, 王刚, 刘妍. 乙型肝炎病毒HBsAg重组疫苗与表面抗原DNA疫苗诱导H-2<sup>o</sup>小鼠免疫应答实验研究. 世界华人消化杂志 2002;10:137-140
- 21 王刚, 刘妍, 牟劲松, 洪源, 邵得志, 张耀新, 李莉, 成军. 大鼠肝再生相关基因LRP1的克隆化. 世界华人消化杂志 2002;10:165-168
- 22 Ohda M, Misumi Y, Yamamoto A, Yano A, Nakamura N, Ikehara Y. Identification and characterization of a novel Golgi protein, GCP60, that interacts with the integral membrane protein giantin. *J Biol Chem* 2001;276:45298-45306
- 23 Rao MA, Cheng H, Quayle AN, Nishitani H, Nelson CC, Rennie PS. RanBPM, a nuclear protein that interacts with and regulates transcriptional activity of androgen receptor and glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 2002;277:48020-48027
- 24 Nakamura M, Masuda H, Horii J, Kuma K, Yokoyama N, Ohba T, Nishitani H, Miyata T, Tanaka M, Nishimoto T. When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *J Cell Biol* 1998;143:1041-1052
- 25 Wang D, Li Z, Messing EM, Wu G. Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM. *J Biol Chem* 2002;277:36216-36222
- 26 Shimotohno K, Watashi K, Tsuchihara K, Fukuda K, Marusawa H, Hijikata M. Hepatitis C virus and its roles in cell proliferation. *J Gastroenterol* 2002;37:50-54
- 27 Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- 28 Nagpal S, Ghoshn CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
- 29 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- 30 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- 31 Zhong YW, Cheng J, Wang G, Shi SS, Li L, Zhang LX, Chen JM. Preparation of human single chain Fv antibody against hepatitis C virus E2 protein and its application in immunohistochemistry. *World J Gastroenterol* 2002;8:863-867
- 32 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L, Chen JM. Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein-a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:300-303
- 33 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白AI结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 34 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因和蛋白的生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2003;11:378-384
- 35 钟彦伟, 成军, 张忠东, 孙敏, 李强, 李克, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 噬菌体表面展示技术筛选HCBP6人源单链可变区抗体. 世界华人消化杂志 2003;11:389-393
- 36 牟劲松, 刘妍, 王刚, 成军, 段惠娟, 李克, 陆荫英, 王琳, 王惠芬. 应用抑制性消杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3反式激活的相关基因. 世界华人消化杂志 2003;11:399-403
- 37 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. 世界华人消化杂志 2003;11:394-398
- 38 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活基因10的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11:935-938
- 39 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒X蛋白反式调节基因. 世界华人消化杂志 2003;11:920-924
- 40 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白3反式调节靶基因. 世界华人消化杂志 2003;11:930-934
- 41 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 乙型肝炎病毒X蛋白反式激活基因10的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11:925-929
- 42 成军. 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制. 世界华人消化杂志 2003;11:888-896
- 43 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:943-946
- 44 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式调节基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:939-942

# 氧化苦参碱对HBV转基因鼠HBV抗原表达的抑制作用

陆伦根, 曾民德, 茅益民, 李继强, 邱德凯, 沈朝晖, 宋育林, 曹爱平

陆伦根, 曾民德, 茅益民, 李继强, 邱德凯, 沈朝晖, 宋育林, 曹爱平, 上海第二医科大学附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所 上海市 200001  
陆伦根, 男, 1965-11-09, 江苏省扬州市人, 博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事消化系疾病尤其是肝脏疾病的基础和临床研究. 发表论文 50 篇, 主编专著 2 部, 参编专著 20 篇, 获上海市和教育部科技成果奖 3 项.

上海市医学发展基金重点研究项目, No.99ZDI001 和 1999 年中华肝病学会中青年肝病科研基金

项目负责人: 陆伦根, 200001, 上海市, 上海第二医科大学附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所. lulungen@online.sh.cn

电话: 021-33070834 传真: 021-63364118

收稿日期: 2003-04-07 接受日期: 2003-05-16

## Inhibitory effect of oxymatrine on expression of hepatitis B virus in HBV transgenic mice

Lun-Gen Lu, Min-De Zeng, Yi-Min Mao, Ji-Qing Li, De-Kai Qiu, Zhao-Hui Shen, Yu-Lin Song, Ai-Ping Cao

Lun-Gen Lu, Min-De Zeng, Yi-Min Mao, Ji-Qing Li, De-Kai Qiu, Zhao-Hui Shen, Yu-Lin Song, Ai-Ping Cao, Shanghai Institute of Digestive Disease, Renji Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200001, China  
Supported by the Key Project of Shanghai Medical Development Foundation, No.99ZDI001 and grants from 1999 Youth Liver Diseases Foundation of Chinese Liver Diseases Association.

Correspondence to: Lun-Gen Lu, Shanghai Institute of Digestive Disease, Renji Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200001, China. lulungen@online.sh.cn

Received: 2003-04-07 Accepted: 2003-05-16

## Abstract

**AIM:** To study the inhibitory effect of oxymatrine on HBsAg, HBeAg, and HBcAg expression in the liver tissue of HBV transgenic mice, and to further expound the mechanisms of oxymatrine anti-HBV.

**METHODS:** HBV transgenic mice models were established by microinjecting methods, and detected by HBV DNA integration and replication. Replicating HBV transgenic mice were divided into three groups: injected with normal saline ( $n=9$ ), 50 mg/kg ( $n=8$ ) and 100mg/kg ( $n=9$ ) oxymatrine intraperitoneally once a day for 30 days, respectively. After treatment, detection of HBsAg and HBeAg by ELISA, HBsAg and HBcAg by immunohistochemistry in the liver tissues was conducted.

**RESULTS:** Compared with group normal saline, HBsAg content in 50 mg/kg and 100 mg/kg oxymatrine decreased, but there was no statistic significance ( $F=1.29$ ,  $P>0.05$ ). Compared with normal saline group, HBeAg content in 50 mg/kg and 100 mg/kg oxymatrine groups obviously decreased ( $F=9.09$ ,  $P<0.01$ ), but there was no obvious significance between 50 mg/kg and 100 mg/kg oxymatrine groups ( $F=1.58$ ,  $P>0.05$ ). The number of HbsAg-positive cells in the normal saline group, 50 mg/kg and 100 mg/kg oxymatrine had no changes in the liver tissues ( $\chi^2=1.61$ ,  $P>0.05$ ). The number of HBcAg-positive cells in the liver

tissues was significantly lower in the group of 100 mg/kg oxymatrine than that in the group of normal saline ( $\chi^2=4.73$ ,  $P<0.05$ ), but the number between normal saline group and 50 mg/kg oxymatrine group, and between the groups of 50 mg/kg and 100 mg/kg oxymatrine had no obvious significance.

**CONCLUSION:** There is an inhibitory effect of oxymatrine on expression of hepatitis B virus in HBV transgenic mice.

Lu LG, Zeng MD, Mao YM, Li JQ, Qiu DK, Shen ZH, Song YL, Cao AP. Inhibitory effect of oxymatrine on expression of hepatitis B virus in HBV transgenic mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(1):89-92

## 摘要

**目的:** 研究氧化苦参碱对 HBV 转基因鼠表达 HBsAg, HBeAg, HBcAg 的抑制作用, 探讨氧化苦参碱抗 HBV 的机制.

**方法:** 用显微注射法建立 HBV 转基因鼠动物模型, 并进行 HBV 整合和表达鉴定. 获得的 HBV 复制型转基因鼠随机分成 3 组, 分别用生理盐水(9 只), 氧化苦参碱 50 mg/kg (8 只)和 100 mg/kg (9 只)腹腔注射, 1 次/d, 30 d 后处死, 取肝组织定量测定 HBsAg 和 HBeAg 的量, 免疫组织化学观察肝组织表达 HBsAg 和 HBcAg.

**结果:** HBV 转基因鼠经氧化苦参碱治疗后, 与生理盐水组相比, 肝脏组织 HBsAg 的量有所降低, 但统计学无显著差异 ( $F=1.29$ ,  $P>0.05$ ); 而 HBV 转基因鼠经氧化苦参碱高和低剂量组治疗后, 肝脏组织 HBeAg 量明显降低 ( $F=9.09$ ,  $P<0.01$ ), 但在氧化苦参碱高和低剂量组之间无显著性差异 ( $F=1.58$ ,  $P>0.05$ ). 肝脏组织免疫组化 HBsAg 和 HBcAg 检测结果显示生理盐水组, 氧化苦参碱低和高剂量组肝组织内 HBsAg 阳性细胞数变化不明显, 统计学无显著性差异 ( $\chi^2=1.61$ ,  $P>0.05$ ). 氧化苦参碱高剂量组肝组织内 HBcAg 阳性细胞数明显低于生理盐水组 ( $\chi^2=4.73$ ,  $P<0.05$ ), 而生理盐水组与氧化苦参碱低剂量组, 氧化苦参碱低和高剂量组之间均无显著性差异.

**结论:** 氧化苦参碱对 HBV 转基因鼠 HBV 的表达有抑制作用.

陆伦根, 曾民德, 茅益民, 李继强, 邱德凯, 沈朝晖, 宋育林, 曹爱平. 氧化苦参碱对 HBV 转基因鼠 HBV 抗原表达的抑制作用. 世界华人消化杂志 2004;12(1):89-92

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/89.asp>

## 0 引言

目前对慢性乙型病毒性肝炎尚缺少特效治疗方法, 所

以寻找新的有效抗病毒药物, 仍为当务之急<sup>[1-12]</sup>. 大量基础和临床研究证实, 氧化苦参碱能抑制柯萨基病毒(一种RNA病毒)的蛋白合成, 从而具有直接抗病毒作用. 体外实验表明, 氧化苦参碱对 HBV DNA 转染的细胞株 2.2.15 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 有抑制作用. 临床研究发现其可用于治疗慢性乙型病毒性肝炎及其引起的肝纤维化<sup>[13-24]</sup>. 因此, 氧化苦参碱具有抗乙型肝炎病毒的作用, 有较好的临床应用前景. 我们研究氧化苦参碱对 HBV 转基因 HBV 抗原的表达影响, 为氧化苦参碱抑制乙型肝炎病毒提供实验依据.

## 1 材料和方法

1.1 材料 质粒 p1.0HBV 由中国科学院生物化学研究所吴祥甫教授惠赠, 3.2 kb 的 adr 型 HBV 全基因组 DNA 克隆在 pUC18 载体 BamHI 酶切位点上. 试验用小鼠购自扬州大学实验动物室 8 周龄以上的性成熟 ICR 小鼠, 饲养环境为清洁级动物房. HBV 转基因鼠的制备方法按文献[南京师范大学学报自然科学版 1995;18(增刊):129]所述. HBV 转基因鼠于 4 周龄剪尾 0.1-0.5 cm, 以组织消化液消化, 饱和苯酚/氯仿抽提 DNA, 行 PCR 扩增, PCR 所用引物为 I: 5' -AGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTT-3' 和 II: 5' -TACGAACCACTGAACAAATGGCAC-3', 扩增片段位于 HBcDNA 区域, 长度为 470 bp. 反应循环如下: 93 °C 变性 60 s, 60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 次循环, 最后 72 °C 延伸增加 10 min. 取 1/10 扩增产物进行电泳鉴定. Amplicor HBV Monitor 检测试剂盒购自 Roche Diagnostic Systems, Inc. HBV 转基因鼠的表达鉴定的具体步骤按说明书推荐的方法进行. 从 HBV 转基因整合阳性的鼠取血, 用眼眶静脉丛取血法收集血清, 抽取 DNA 后, 行 PCR. 上游引物序列如下: 5' -GTTGCCCGTTTGTCTCTAC-3', 下游引物 5' 端以生物素标记, 序列如下: 5' -Biotin-GATGATGTGGTATTGGGGGC-3'. PCR 扩增条件为, 94 °C 变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 30 次循环, 最后 72 °C 延伸增加 5 min. 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳证实存在目的条带, 再行产物杂交鉴定. 实验用药物为氧化苦参碱注射液(博尔泰力注射液), 由宁夏博尔泰力药物有限公司宁夏药物研究所提供, 批准文号: 宁卫药准字(1994)第 000029 号, 批号: 20001214.

1.2 方法 取鉴定的 8-12 周龄 HBV 转基因鼠 26 只, 雌雄不分随机分为 3 组, 生理盐水组(9 只), 氧化苦参碱低剂量组(8 只)和氧化苦参碱高剂量组(9 只), 分别予生理盐水, 氧化苦参碱 50 mg/kg 和氧化苦参碱 100 mg/kg, 腹腔注射, 1 次/d. 治疗 30 d 后处死小鼠, 分别取肝脏组织进行匀浆抽提蛋白, 测定组织中 HBsAg 和 HBeAg 量, 肝组织固定后免疫组化检测 HBsAg 和 HBcAg. (1) ELISA 检测肝组织中 HBsAg 和 HBeAg. 取 HBV 转基因小鼠肝脏组织 1-2 g 置于蛋白抽提液匀浆抽提蛋白质. 运

用紫外分光光度仪测定蛋白抽提液中的蛋白质浓度, 分别测定样品在 260 nm 和 280 nm 的光密度值, 计算二者的比值, 并且按照如下公式计算蛋白质浓度: 蛋白质浓度(g/L) =  $F \times OD_{280} \times \text{稀释倍数}$  ( $F$  为校正因子). 检测 HBsAg 和 HBeAg 的 ELISA 试剂盒购自上海华美生物工程公司, 具体检测方法按试剂盒推荐的方法进行. 为使检测结果有较强的可比性, 每孔所加的总蛋白的量基本相同. (2) 免疫组织化学检测肝组织中 HBsAg 和 HBcAg. 兔抗人 HBsAg、生物素化的羊抗兔、羊抗人 HBcAg、生物素化的兔抗羊均购自福州迈新生物工程公司. 每次实验均设阳性对照和阴性对照, 阳性对照以人肝组织 HBsAg 和 HBcAg 阳性作为阳性对照, 结果显示为阳性; 阴性对照以 PBS 代替一抗, 结果显示阴性.

统计学处理 测定值以均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示. 用 SAS 软件包 Dunnett's 检验和秩和检验进行统计学处理.  $P < 0.05$  为差异有显著性.

## 2 结果

我们所用的 396 只 HBV 转基因鼠中, 共检测到 HBV DNA 整合转基因鼠 137 只, 占 34.6%, 其中血清中复制 HBV DNA 的转基因鼠共 26 只, 占 6.6%.

ELISA 检测肝组织匀浆中 HBsAg 和 HBeAg 氧化苦参碱治疗后 HBV 转基因鼠肝脏组织匀浆 HBsAg ( $A: 2.18 \pm 0.47$  和  $2.12 \pm 0.42$ ), 与生理盐水组相比 ( $A: 2.46 \pm 0.55$ ), 虽有所降低, 但统计学无显著差异 ( $F = 1.29$ ,  $P > 0.05$ ). 氧化苦参碱治疗后 HBV 转基因鼠肝脏组织匀浆 HBeAg ( $A: 0.52 \pm 0.13$  和  $0.42 \pm 0.19$ ), 与生理盐水组相比 ( $A: 0.74 \pm 0.15$ ), HBV 转基因鼠经氧化苦参碱高和低剂量组治疗后, 肝脏组织 HBeAg 量明显降低 ( $F = 9.09$ ,  $P < 0.01$ ), 但在氧化苦参碱高和低剂量组之间无显著性差异 ( $F = 1.58$ ,  $P > 0.05$ ).

免疫组织化学检测肝组织中 HBsAg 和 HBcAg HBsAg 和 HBcAg 阳性在肝细胞内呈棕黄色, 依据肝组织内阳性细胞数可分为三级: 肝组织内仅有个别散在的阳性细胞为 +, 除了散在的阳性细胞外, 可见少数成群的阳性细胞为 ++, 出现多数成堆的阳性细胞为 +++. 生理盐水组, 氧化苦参碱低和高剂量组肝组织内 HBsAg 阳性细胞数变化不明显, 统计学无显著性差异 ( $\chi^2 = 1.61$ ,  $P > 0.05$ ). 生理盐水组、氧化苦参碱低和高剂量组的 HBcAg 检测 0, +, ++, +++ 分别为 0, 1, 4, 4; 3, 3, 2, 0 和 4, 4, 1, 0 例. 氧化苦参碱高剂量组肝组织内 HBcAg 阳性细胞数明显低于生理盐水组 ( $\chi^2 = 4.73$ ,  $P < 0.05$ ), 而生理盐水组与氧化苦参碱低剂量组, 氧化苦参碱低和高剂量组之间均无显著性差异.

## 3 讨论

Chisari et al<sup>[25]</sup> 通过受精卵显微注射法, 建立的能表达 HBsAg 的转基因小鼠模型, 为抗 HBV 药物的筛选研究开辟了新的途径. Morrey et al<sup>[26, 27]</sup> 利用已知对 HBV 感染

有明确疗效的拉米呋啶和无效的 zidovudine 对高水平复制 HBV 转基因小鼠进行干预试验, 证实了这种小鼠作为抗病毒药物筛选模型的可行性. 我们用显微注射法建立的 HBV 转基因鼠进行实验, 结果显示 HBV 基因组 DNA 已整合至小鼠基因组, 且能有效表达, 证明获得了携带 HBV 全基因组小鼠, 本实验 396 只 HBV 转基因鼠中, 共检测到 HBV DNA 整合转基因鼠 137 只, 占 34.6% (137/396), 其中血清中复制 HBV DNA 的转基因鼠共 26 只, 占 6.6% (26/396). 血清中 HBV DNA 的存在, 说明 HBV 基因在小鼠体内有复制, 表明本实验所建立的 HBV 转基因小鼠可用于观察药物对 HBV 表达的影响. 然而, 该模型的制备技术要求高, 设备昂贵, 成功率低, 推广应用有一定的难度, 且同人乙型肝炎的复杂表现尚有些差异, 因此在研究药物疗效时需考虑及注意<sup>[28-34]</sup>.

氧化苦参碱是从苦参及苦豆子中提取的生物碱, 国内学者通过氧化苦参碱的基础和临床研究发现氧化苦参碱有抗 HBV 作用<sup>[14, 16, 20, 21]</sup>, 因此开发和应用我国中草药资源治疗慢性乙型病毒性肝炎, 将有十分重要的社会和经济意义. 体外实验表明<sup>[14, 20]</sup>, 氧化苦参碱对 HBV DNA 转染的细胞株 2.2.15 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 有抑制作用, 在一定范围内随着药物浓度增加及作用时间延长, 抑制率逐渐增高, 在同一浓度和同一作用时间下, 都表现为对 HBsAg 的抑制率高于对 HBeAg 的抑制率. HBV 转基因鼠体内研究发现<sup>[21]</sup>, HBV 转基因鼠分别用氧化苦参碱 100 mg/kg、200 mg/kg、300 mg/kg 1 次/d 腹腔注射 30 d 后, 肝内 HBsAg 和 HBeAg 的量与对照组相比均有明显的下降, 在各剂量组之间无显著性差异. 我们的临床研究显示<sup>[16]</sup>氧化苦参碱可用于治疗慢性乙型病毒性肝炎, 对 HBeAg 和 HBV DNA 阴转率在 40.0% 左右, 与  $\alpha$ -干扰素等转阴率相比较差异不显著, 表明氧化苦参碱是治疗慢性乙型病毒性肝炎比较理想的药物. 我们发现 HBV 转基因鼠经氧化苦参碱治疗后, 肝脏组织 HBcAg 或 HBeAg 量明显降低, 但氧化苦参碱对肝组织中 HBsAg 表达影响较少, 这可能与氧化苦参碱治疗疗程较短以及对 HBV 仅是抑制作用等因素有关. 这些实验结果说明, 氧化苦参碱有抑制 HBV 复制及抗 HBV 作用. 至于氧化苦参碱确切的抗 HBV 机制尚不十分明确, 从不多的研究推测其机制可能为: (1) 氧化苦参碱诱导细胞内某种物质 (如干扰素等细胞因子) 的产生, 从而加强了 HBV 基因产物的降解; (2) 氧化苦参碱的化学结构与嘌呤的结构类似, 其在细胞或体内可干扰 HBV 核酸的合成. 但其确切抗 HBV 机制还有待于深入探讨研究.

#### 4 参考文献

- 1 Nguyen MH, Wright TL. Therapeutic advances in the management of hepatitis B and hepatitis C. *Curr Opin Infect Dis* 2001;14:593-601
- 2 Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000-summary of a workshop. *Gastroenterology* 2001; 120:1828-1853
- 3 Ramrakhiani S, Bacon BR. Hepatology in the new millennium. *Advances in viral hepatitis, hepatic disorders, and liver transplantation. Med Clin North Am* 2000;84:1085-1105
- 4 Kinchington D. Recent advances in antiviral therapy. *J Clin Pathol* 1999;52:89-94
- 5 Doo E, Liang TJ. Molecular anatomy and pathophysiologic implications of drug resistance in hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 2001;120:1000-1008
- 6 Torresi J, Locarnini S. Antiviral chemotherapy for the treatment of hepatitis B virus infections. *Gastroenterology* 2000; 118(2 Suppl 1):S83-103
- 7 Malik AH, Lee WM. Chronic hepatitis B virus infection: treatment strategies for the next millennium. *Ann Intern Med* 2000; 132:723-731
- 8 Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 2002;122:1554-1568
- 9 Chin R, Locarnini S. Treatment of chronic hepatitis B: current challenges and future directions. *Rev Med Virol* 2003;13:255-272
- 10 Yuen MF, Yuan HJ, Hui CK, Wong DK, Wong WM, Chan AO, Wong BC, Lai CL. A large population study of spontaneous HBeAg seroconversion and acute exacerbation of chronic hepatitis B infection: implications for antiviral therapy. *Gut* 2003; 52:416-419
- 11 Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002;123:1848-1856
- 12 Yao N, Hong Z, Lau JY. Application of structural biology tools in the study of viral hepatitis and the design of antiviral therapy. *Gastroenterology* 2002;123:1350-1363
- 13 陈紫喧, 李继强, 曾民德, 陆伦根, 邱德凯, 茅益民, 范竹萍, 华静. 氧化苦参碱抗丙型肝炎病毒的体外实验研究. *中华肝病杂志* 2001;9(增刊):12-14
- 14 李继强, 陈紫喧, 曾民德, 陆伦根, 邱德凯, 茅益民, 范竹萍, 华静. 氧化苦参碱抗乙型肝炎病毒的体外实验研究. *中华消化杂志* 2001;21:550-552
- 15 杨文卓, 曾民德, 范竹萍, 茅益民, 宋育林, 贾一韬, 陆伦根, 陈成伟, 彭延申, 朱红音. 氧化苦参碱防治半乳糖胺诱导大鼠肝纤维化的实验研究. *中华肝病杂志* 2002;10:193-196
- 16 陆伦根, 曾民德, 茅益民, 李继强, 万谟彬, 李成忠, 陈成伟, 傅青春, 王吉耀, 余为民, 蔡雄, 叶军, 周霞秋, 王晖, 巫善明, 唐美芳, 朱金水, 陈维雄, 张惠泉. 氧化苦参碱胶囊治疗慢性乙型病毒性肝炎的随机、双盲、安慰剂对照多中心临床研究(I). *肝脏* 2002;7:218-221
- 17 茅益民, 曾民德, 陆伦根, 李继强, 万谟彬, 李成忠, 陈成伟, 傅青春, 王吉耀, 余为民, 蔡雄, 叶军, 周霞秋, 王晖, 巫善明, 唐美芳, 朱金水, 陈维雄, 张惠泉. 氧化苦参碱胶囊治疗慢性病毒性肝炎肝纤维化的随机、双盲、安慰剂对照多中心临床研究(II). *肝脏* 2002;7:222-225
- 18 李继强, 陆伦根, 华静, 吴亚云, 曾民德. 氧化苦参碱对大鼠肝星状细胞增生的影响. *上海医学* 1999;22:598-599
- 19 李继强, 李超群, 曾民德, 余祥奎, 李国钦, 范建高, 华静, 邱德凯, 萧树东. 氧化苦参碱治疗慢性丙型肝炎的初步研究. *中国中西医结合杂志* 1998;18:227-229
- 20 陆海英, 王勤环, 曾争, 于敏, 席宏丽, 张乃临, 公维波, 张国庆, 刘丹. 不同剂型苦参素体外抗 2.2.15 细胞乙型肝炎病毒的作用及其作用机制的研究. *中国中西医结合杂志* 2002;22:168-169
- 21 Chen XS, Wang GJ, Cai X, Yu HY, Hu YP. Inhibition of hepatitis B virus by oxymatrine in vivo. *World J Gastroenterol* 2001; 7:49-52
- 22 Chen YX, Mao BY, Jiang JH. Relationship between serum load of HBV-DNA and therapeutic effect of oxymatrine in patients with chronic hepatitis B. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2002; 22:335-336
- 23 Yu YY, Wang QH, Zhu LM, Zhang QB, Xu DZ, Guo YB, Wang CQ, Guo SH, Zhou XQ, Zhang LX. A clinical research on oxymatrine for the treatment of chronic hepatitis B. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2002;10:280-281
- 24 Wang BE. Treatment of chronic liver diseases with traditional Chinese medicine. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):E67-70

- 25 Chisari FV, Pinkert CA, Milich DR, Filippi P, McLachlan A, Palmiter RD, Brinster RL. A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. *Science* 1985; 230:1157-1160
- 26 Morrey JD, Bailey KW, Korba BE, Sidwell RW. Utilization of transgenic mice replicating high levels of hepatitis B virus for antiviral evaluation of lamivudine. *Antiviral Res* 1999;42:97-108
- 27 Morrey JD, Korba BE, Sidwell RW. Transgenic mice as a chemotherapeutic model for hepatitis B virus infection. *Antivir Ther* 1998;3(Suppl 3):59-68
- 28 Barone M, Maiorano E, Ladisa R, Cuomo R, Pece A, Berloco P, Caruso ML, Valentini AM, Iolascon A, Francavilla A, Di Leo A, Ierardi E. Influence of ursodeoxycholate-enriched diet on liver tumor growth in HBV transgenic mice. *Hepatology* 2003; 37:880-886
- 29 Dong Y, Xi H, Yu Y, Wang Q, Jiang K, Li L. Effects of oxymatrine on the serum levels of T helper cell 1 and 2 cytokines and the expression of the S gene in hepatitis B virus S gene transgenic mice: a study on the anti-hepatitis B virus mechanism of oxymatrine. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1299-1306
- 30 Xiong Y, Jia Y, Wang H, Liu G, Ren H, Zhuo Z, Zhang D. Hepatitis B virus transgenic mice for the model of anti-hepatitis B virus drug study. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2001;9: 19-21
- 31 Kajino K, Kamiya N, Yuasa S, Takahara T, Sakurai J, Yamamura K, Hino O. Evaluation of anti-hepatitis B virus (HBV) drugs using the HBV transgenic mouse: application of the semiquantitative polymerase chain reaction (PCR) for serum HBV DNA to monitor the drug efficacy. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:43-48
- 32 Julander JG, Sidwell RW, Morrey JD. Characterizing antiviral activity of adefovir dipivoxil in transgenic mice expressing hepatitis B virus. *Antiviral Res* 2002;55:27-40
- 33 Ilan E, Burakova T, Dagan S, Nussbaum O, Lubin I, Eren R, Ben-Moshe O, Arazi J, Berr S, Neville L, Yuen L, Mansour TS, Gillard J, Eid A, Jurim O, Shouval D, Reisner Y, Galun E. The hepatitis B virus-trimera mouse: a model for human HBV infection and evaluation of anti-HBV therapeutic agents. *Hepatology* 1999;29:553-562
- 34 Akbar SK, Onji M. Hepatitis B virus (HBV)-transgenic mice as an investigative tool to study immunopathology during HBV infection. *Int J Exp Pathol* 1998;79:279-291

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助工作 中期检查暨交流座谈会会议纪要

由国家自然科学基金委员会科学基金杂志部主办,西北有色金属研究院稀有金属杂志社承办的“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助工作中期检查暨交流座谈会”于2003-11-25~26日在西安举行。国家自然科学基金会管理科学部副主任黄海军和数理科学部、生命科学部代表共40人出席会议。

《中国物理快报》、《世界胃肠病学杂志》和《计算机科学技术学报》三刊的负责人介绍了各自网站的开发过程、功能及特点。对于科学基金杂志部提出的建立重点学术期刊综合网站的构想,与会代表反响热烈,认为此举对进一步提升重点学术期刊在国内、外的知名度,扩大国际影响将起到积极作用。

会上32个受资助期刊就本刊2002-2003年的工作进展分别进行了汇报,并就目前存在的问题和下一步的改革设想等进行介绍与交流。主要体现在以下四个方面。

### 1 加快期刊的国际化进程

为适应期刊发展,大部分期刊的编委会进行了换届或改选,使一批年富力强活跃在国际科技前沿的青年学者充实进来,不仅使编委会的平均年龄有所下降,而且带来新的学术思想和管理理念。如《中国科学》采用国际流行的编委责任制,真正做到由科学家直接掌握办刊方向和标准。

### 2 期刊质量逐步提高

受基金资助的学术期刊在科研工作者中的影响力大大增强,稿源扩大,来稿量增加,稿件质量也明显提高,使期刊能够保持较高退稿率,从而保证了期刊质量。期刊质量的提高又在SCI影响因子和被引频次上得以体现,更进一步扩大了期刊的影响,增强了期刊的吸引力,形成了良性循环。1999年,“重点学术期刊专项基金”刚开始实施时,国内受资助的科技期刊的影响因子只有两刊在0.5以上,被引频次最高只有853次,没有一刊超过1000次。而到目前,影响因子超过1的期刊已经达到5个,最高的已经超过2.532;被引频次超过1000次的已经有8刊。国内检索系统的情况则更好。

### 3 开发使用网络办公系统

不少期刊认识到实现办公自动化是提高工作效率、缩短出版周期的基础。两年前,大部分期刊利用基金资助款添置电脑、传真机、扫描仪等设备。在此基础上,许多编辑部已投资开发了自己的网络办公系统,在统一化、规范化、标准化的界面内,实现了作者投稿、编辑加工、专家审稿、作者查询及签发的网络化,并在实践中不断改进和完善,大大提高了工作效率。

### 4 建立并完善期刊网站

随着信息技术的迅猛发展,不仅编辑出版业告别传统的模式,进入“光与电”的时代,整个科技期刊界都面临一场新的革命,即计算机网络所创造的新的资源架构,科技期刊将走进数字化与网络时代。许多期刊早已意识到这一发展趋势,纷纷投入资金和人力着力搞好期刊网站建设。据统计,32个重点学术期刊中,已有26个建立了自己的主页或网站,另有2个正在筹建当中,其中18个期刊实现了期刊目次、摘要及全文上网,有些期刊电子版的检索和查询功能已达到国际水平。

(莫京, 武长白整理)



# 幽门螺杆菌对肝细胞系 HepG2 cyclinD1, PCNA mRNA 表达的影响

张 艳, 范学工, 田雪飞, 黄 燕

张艳, 范学工, 田雪飞, 黄燕, 中南大学湘雅医院传染科 湖南省长沙市 410008  
张艳, 女, 1969-08-18 生, 湖南衡阳人, 汉族. 1992 年衡阳医学院本科毕业, 1999 年南华大学(原衡阳医学院)微生物学硕士研究生毕业, 现为湘雅医院传染病学 2001 级博士研究生. 主要从事幽门螺杆菌方面的研究.  
国家自然科学基金资助项目, No.30271171  
湖南省自然科学基金资助项目, No.01jyy2114  
湖南省卫生厅科研基金资助项目, No.00022  
项目负责人: 范学工, 410008, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅医院传染科.  
xgfan@hotmail.com  
电话: 0731-4328926 传真: 0731-4127332  
收稿日期: 2003-04-15 接受日期: 2003-06-02

## Influence of *H pylori* on cyclinD1 and PCNA mRNA expression in HepG2 cell line

Yan Zhang, Xue-Gong Fan, Xue-Fei Tian, Yan Huang

Yan Zhang, Xue-Gong Fan, Xue-Fei Tian, Yan Huang, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No.30271171, Nature Scientific Foundation of Hunan Province, No.01jyy2114, and the Scientific Research foundation of Health Department, Hunan Province, No.00022  
Correspondence to: Xue-Gong Fan, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China. xgfan@hotmail.com  
Received: 2003-04-15 Accepted: 2003-06-20

## Abstract

AIM: To observe the effects of *H pylori* on cyclinD1 and PCNA mRNA expression in a human hepatoma cell line HepG2.

METHODS: *H pylori* was co-cultured with HepG2 for 1, 3, 6, 12 and 24 hours. The cyclinD1 and PCNA mRNA expression was detected by semi-quantitative RT-PCR.

RESULTS: When HepG2 cells were cocultured with *H pylori* CagA<sup>+</sup> strain, the amount of cyclinD1 mRNA was increased 4.0-fold by 3 hours and PCNA mRNA was increased 2.0-fold by 6 hours, compared with that of uninfected control. Neither cyclinD1 mRNA nor PCNA mRNA of the HepG2 cells was increased after incubation with *H pylori* CagA<sup>-</sup> strain.

CONCLUSION: *H pylori* can induce increasing expression of cyclinD1 and PCNA mRNA in HepG2, which may play some roles in the development of hepatocellular carcinoma.

Zhang Y, Fan XG, Tian XF, Huang Y. Influence of *H pylori* on cyclinD1 and PCNA mRNA expression in HepG2 cell line. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(1):93-96

## 摘要

目的: 研究幽门螺杆菌(*H pylori*)处理对肝细胞系 HepG2

cyclinD1, PCNA mRNA 表达的影响.

方法: 将 *H pylori* 与 HepG2 共同培养 1 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h, 采用半定量 RT-PCR 方法分析共培养不同时间后 HepG2 cyclinD1, PCNA mRNA 的表达水平.

结果: CagA<sup>+</sup> *H pylori* 与 HepG2 细胞共同孵育 1 h 后, 即可见 cyclinD1 mRNA 表达升高, 3h 达高峰, 约为对照的 4.0 倍( $P < 0.01$ ); 共同孵育 3 h 后即可见 PCNA mRNA 表达升高, 6 h 达高峰, 约为对照的 2.0 倍( $P < 0.05$ ). 而 CagA<sup>-</sup> *H pylori* 和 HepG2 细胞共同孵育后, 未见两基因的表达升高.

结论: CagA<sup>+</sup> *H pylori* 能诱导 HepG2 cyclinD1, PCNA mRNA 表达升高, 提示其在肝癌的发生中起一定作用.

张艳, 范学工, 田雪飞, 黄燕. 幽门螺杆菌对肝细胞系 HepG2 cyclinD1, PCNA mRNA 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(1):93-96  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/93.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)在胃十二指肠疾病中的病因作用已得到人们的广泛共识<sup>[1-17]</sup>. 近年的若干研究发现, *H pylori* 与某些肝脏疾病的发生相关<sup>[18-23]</sup>. 我们新近的工作证实, 肝癌患者肝组织存在螺杆菌感染, 通过测序表明, 该螺杆菌 16SrDNA 与 *H pylori* 16SrDNA 具有 99% 的同源性<sup>[24]</sup>. 我们采用体外肝细胞和 *H pylori* 共培养, 并测定 *H pylori* 作用后肝细胞系细胞周期素 D1(cyclinD1)和增生细胞核抗原(PCNA)mRNA 的表达, 以进一步探讨 *H pylori* 在肝癌发生中的可能作用.

## 1 材料和方法

1.1 材料 ATCC49503(CagA<sup>+</sup>)为本室保存的 *H pylori* 国际标准株, CC020821 为临床株, 由本室鉴定为 CagA<sup>+</sup>. 人肝细胞系 HepG2 购自上海细胞生物研究所. *H pylori* 菌株培养按我室建立的 *H pylori* 培养方法进行<sup>[25]</sup>. 3 d 后收集细菌, 用 0.01 mol/L PBS 洗下菌落, 紫外分光光度仪测定细菌浓度( $1A_{660} \approx 1 \times 10^{11}$  CFU/L), 用含 20 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基(不加双抗)调 *H pylori* 终浓度为  $1 \times 10^{11}$  CFU/L. HepG2 采用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub> 温箱培养, 2-4 d 更换培养基 1 次, 1:3 常规传代培养, 取对数生长期细胞进行实验.

1.2 方法 *H pylori* 与 HepG2 的共同孵育. 细胞以  $1 \times 10^6$  孔密度接种至 6 孔细胞培养板, 置于  $37^\circ\text{C}$ , 50 mL/L  $\text{CO}_2$  环境中培养 24 h, 弃去原有细胞培养液, 加入 DMEM 培养基稀释的 *H pylori* 菌液, 使细菌与细胞数之比为 100:1. 对照孔不加细菌, 只加含 20 mL/L 胎牛血清的 DMEM. 分别于 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h 收集细胞, 收集之前用预冷 PBS 洗 3 次. 每个时间点重复 4 孔. 细胞总 RNA 的提取按 Trizol(Gibco)RNA 提取试剂盒说明进行操作, 紫外分光光度计测定总 RNA 浓度, A260/A280 比值均在 1.8-2.0 之间,  $-70^\circ\text{C}$  冰箱保存. PCR 引物根据 GenBank 中人 cyclinD1, PCNA,  $\beta$ -actin cDNA 序列进行设计, 由上海 Sangon 生物工程公司合成(表 1). 逆转录合成 cDNA 第一链: 每个反应管加 2  $\mu\text{g}$  总 RNA, Oligo(dT)<sub>15</sub> 1  $\mu\text{L}$ , 用 DEPC 水补至总体积 12  $\mu\text{L}$  后,  $70^\circ\text{C}$  5 min, 冰上骤冷后加入 5 $\times$ buffer 4  $\mu\text{L}$ , 20 MU/L RNA 酶抑制剂 1  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L dNTP 2  $\mu\text{L}$ , 200 MU/L M-MuLV 1  $\mu\text{L}$  200MU/L,  $37^\circ\text{C}$  保温 1 h 后,  $94^\circ\text{C}$  灭活 5 min,

冰上骤冷后进行 PCR 或  $-20^\circ\text{C}$  保存. PCR 扩增反应总体积 50  $\mu\text{L}$ , 其中 10 $\times$ Buffer 5  $\mu\text{L}$ , 4 种 dNTP 各 200  $\mu\text{mol/L}$ , Tag 酶 1 U, cyclinD1 及  $\beta$ -actin, PCNA 及  $\beta$ -actin 引物各 0.5  $\mu\text{mol/L}$ , 模板 cDNA 5  $\mu\text{L}$ , 余下体积用无菌双蒸水补足. 在 DNA 扩增仪(PE480)上  $94^\circ\text{C}$  预变性 4 min 后进行扩增, 最后  $72^\circ\text{C}$  延伸 5 min. 取 PCR 产物 5  $\mu\text{L}$  在 15 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/L 溴化乙锭)上电泳, 紫外照相, 应用美国 Stralagene 公司 Eagle Eye II 图像分析处理系统对电泳带密度进行扫描, 获各条带光密度, 然后算出每一种基因的相对表达水平. 计算式如下: 某基因的相对表达水平 = 该基因 RT-PCR 产物电泳条带的密度 /  $\beta$ -actin RT-PCR 产物电泳条带的密度.

统计学处理 实验数据  $\bar{x} \pm s$  表示, 多样本均数比较用单因素方差分析(one-way ANOVA), 多个实验组与一个对照组的两两比较用最小显著差法(the least significant difference, LSD)分析. 全部资料上机经 SPSS 软件包处理,  $P < 0.05$  为统计学上差异有显著性.

表 1 PCR 引物序列、反应条件及扩增的目的片段大小

基因	引物序列	PCR 反应条件	目的片段大小
cyclinD1	TGGATGCTGGAGGTCTGCGAGGAA	$94^\circ\text{C}$ 1 min, $55^\circ\text{C}$ 1 min, $72^\circ\text{C}$ 1 min 35 cycle	573 bp
	GGCTTCGATCTGCTCCTGGCAGGC		
PCNA	GCTGACATGGGACACTTA	$94^\circ\text{C}$ 1 min, $56^\circ\text{C}$ 1 min, $72^\circ\text{C}$ 1 min 35 cycle	610 bp
	CTCAGGTACAACTTGGTG		
$\beta$ -actin	CCAGCCATGTACGTTGCTATC	$94^\circ\text{C}$ 1 min, $55^\circ\text{C}$ 或 $56^\circ\text{C}$ 1 min, $72^\circ\text{C}$ 1 min 35 cycle	150 bp
	CAGGTCCAGACGCAGGATGGC		

## 2 结果

2.1 cyclinD1 mRNA 表达 未经 *H pylori* 处理时, HepG2 cyclinD1 mRNA 有较弱表达. 将每一泳道中 cyclinD1 及  $\beta$ -actin 基因 PCR 扩增条带进行凝胶扫描后图像分析发现, 加入 CagA<sup>+</sup>*H pylori* 与细胞共同孵育 1 h 后, 即可见 cyclinD1 mRNA 表达升高, 3 h 达高峰, 约为对照的 4.0 倍( $\bar{x} \pm s$  分别为  $0.98 \pm 0.04$ ,  $0.24 \pm 0.02$ ,  $P < 0.01$ ). 而 CagA<sup>-</sup>*H pylori* 菌液和 HepG2 细胞共同孵育后, 未见 cyclinD1 mRNA 表达升高(图 1, 3).

2.2 PCNA mRNA 表达 未经 *H pylori* 处理时, HepG2 PCNA mRNA 有表达. 将每一泳道中 PCNA 及  $\beta$ -actin 基因 PCR 扩增条带进行凝胶扫描后图像分析发现, 加入 CagA<sup>+</sup>*H pylori* 与细胞共同孵育 3 h 后, 即可见 PCNA mRNA 表达升高, 6 h 达高峰, 约为对照的 2.0 倍( $\bar{x} \pm s$  分别为  $1.04 \pm 0.06$ ,  $0.54 \pm 0.02$ ,  $P < 0.05$ ). 用 CagA<sup>-</sup>*H pylori* 处理后未见 PCNA mRNA 表达升高(图 2, 4).

随着处理时间的延长, cyclinD1、PCNA mRNA 表达量呈一下降趋势.

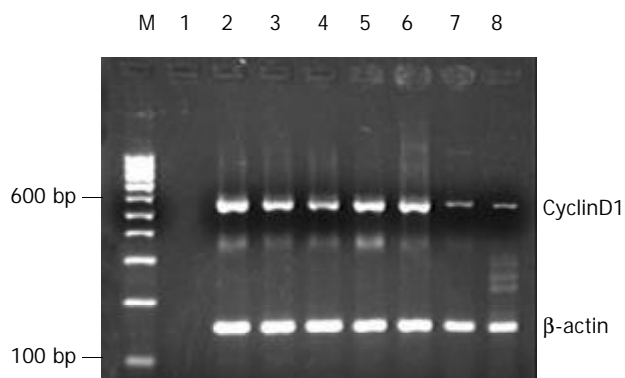


图 1 RT-PCR 扩增 HepG2 cyclinD1 mRNA 表达结果. M: 100 bp 相对分子质量参照标准; 1: 阴性对照; 2-6: CagA<sup>+</sup>*H pylori* 处理后 24 h, 12 h, 6 h, 3 h, 1 h; 7: CagA<sup>-</sup>*H pylori* 处理; 8: 未处理 HepG2 细胞.

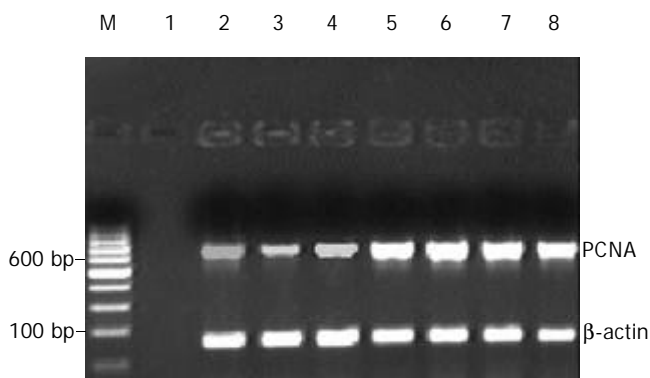


图 2 RT-PCR 扩增 HepG2 PCNA mRNA 表达结果. M: 100 bp 相对分子质量参照标准; 1: 阴性对照; 2: 未处理 HepG2 细胞; 3: CagA<sup>+</sup>*H pylori* 处理; 4-8: CagA<sup>+</sup>*H pylori* 处理后 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h,

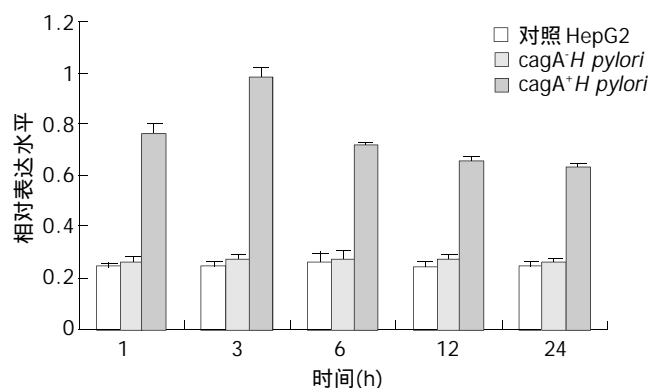


图3 H pylori 对 HepG2 cyclinD1 mRNA 表达的影响.

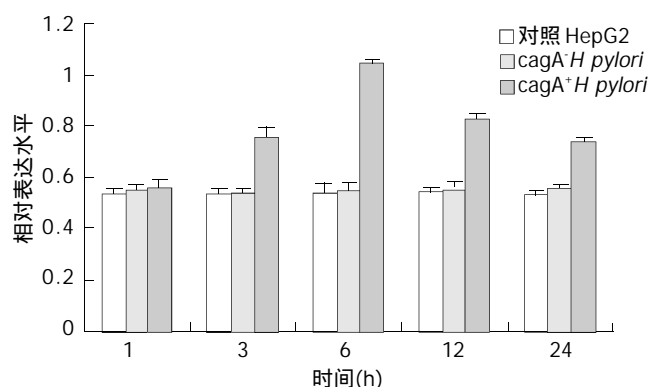


图4 H pylori 对 HepG2 PCNA mRNA 表达的影响.

### 3 讨论

近年来, 螺杆菌感染与人和动物胃、肝、肠疾病的关系愈来愈引起相关领域学者们的兴趣和重视. H pylori 作为人消化性溃疡、慢性胃炎的主要病因已被确认, 其与胃癌的密切关系亦为许多研究所肯定. H pylori 与肝脏疾病是否有关以及是否引起肝细胞损伤亦引起了研究者的关注. Ponzetto et al<sup>[20, 26]</sup>研究发现, HBV, HCV 感染者 H pylori IgG 抗体阳性率明显高于对照组. Dore et al<sup>[27]</sup>报道肝硬化患者 H pylori 血清 IgG 阳性率比无症状的献血者要高. 我们曾报道, 慢性乙型肝炎患者的 H pylori 感染率要显著高于一般人群, 且感染 H pylori 的乙肝患者 HBV DNA 复制水平明显增高<sup>[28]</sup>. 国外学者在慢性胆囊炎、原发性硬化性胆管炎(PSC)、原发性胆汁性肝硬化(PBS)、原发性胆管癌和原发性肝癌患者的胆汁、胆囊和肝组织中均检测到了螺杆菌 16SrDNA, 测序证明与 H pylori 有 97-99% 同源性<sup>[18-23]</sup>. 新近, 我们亦从 9 例(9/15)原发性肝癌患者的肝组织中发现了螺杆菌 16SrDNA, 测序证明与 H pylori 16SrRNA 有 99% 同源性<sup>[24]</sup>. Wadstrom et al<sup>[29]</sup>还用电子镜和免疫组化方法在原发性硬化性胆管炎(PSC)患者的肝组织中观察到似 H pylori 形态的弯曲状细菌. de Magalhães Queiroz et al<sup>[30]</sup>从 1 例肝豆状核变性患者的肝硬化标本中分离出的 1 株螺杆菌菌株的 16SrRNA 与 H pylori 有 99.38% 的同源性, 并且经过形态特征、生化反应等鉴定认为该菌株就是 H pylori, 推测定植于胃部的 H pylori 可能会从十二指肠逆行转移

到肝脏或从肠腔迁移到门脉循环. 新近, 瑞典学者在用 3 种不同的 H pylori 菌株感染 C57BL/6 和 Balb/cA 小鼠诱发胃 MALT 淋巴瘤的同时, 发现感染后 23 mo 有 1 例 C57BL/6 小鼠诱发出了肝癌<sup>[31]</sup>. 肝组织螺杆菌感染是部分病因不明慢性肝病患者的病因亦或重叠螺杆菌感染? 迄今为止, 有关人类螺杆菌感染与肝胆疾病的因果关系尚缺乏系统和肯定的报道.

cyclinD1 是细胞周期 G1/S 期监控点重要的正向调控因子, cyclinD1 的作用是使 Rb 蛋白磷酸化而导致他与转录因子 E2F 的解离, 而发挥 E2F 转录因子的作用, 使细胞周期通过 G1 限制点进入 S 期, 导致细胞增生. 近年来, 有不少研究表明 cyclinD1 基因参与肿瘤的发生、发展, 并认为是一种原癌基因, 在进展期肝癌中发现有 cyclinD1 的过量表达, 提示 cyclinD1 的过量表达与肝癌进展有关. PCNA 是 DNA 多聚酶的一种辅助蛋白, 在静止期细胞中, 其量很少, 于 G1 晚期开始增加, S 期达到高峰, G2, M 期明显下降, 他的出现与细胞增生有关, 是反映细胞增生状态、评价肿瘤恶性潜能的主要生物学指标. 我们发现, CagA<sup>+</sup> H pylori 对 HepG2 细胞的 cyclinD1 和 PCNA mRNA 的表达有明显的上调作用. CagA<sup>+</sup> H pylori 作用 1 h 后, HepG2 cyclinD1 mRNA 表达升高, 3 h 达高峰, 约为正常的 4.0 倍; 在 CagA<sup>+</sup> H pylori 作用 3 h 后 HepG2 PCNA mRNA 表达增加, 6 h 达表达高峰, 约为正常的 2.0 倍, 而 CagA<sup>-</sup> H pylori 未显示这一作用. 这些结果表明, CagA<sup>+</sup> H pylori 确能促进 HepG2 cyclinD1 和 PCNA mRNA 的表达. 由于 cyclinD1 和 PCNA 是肿瘤发生、发展的重要生物学指标, 因而我们认为 H pylori 的 CagA 毒力因子在肝癌的发生上可能起一定作用.

### 4 参考文献

- Wang RT, Wang T, Chen K, Wang JY, Zhang JP, Lin SR, Zhu YM, Zhang WM, Cao YX, Zhu CW, Yu H, Cong YJ, Zheng S, Wu BQ. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: evidence from a retrospective cohort study and nested case-control study in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:1103-1107
- Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of *H pylori* infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. *World J Gastroenterol* 2001;7:801-804
- Miehlke S, Kirsch C, Dragosics B, Gschwantler M, Oberhuber G, Antos D, Dite P, Lauter J, Labenz J, Leodolter A, Malfertheiner P, Neubauer A, Ehninger G, Stolte M, Bayerdorffer E. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: current status of the Austrain Czech German gastric cancer prevention trial (PRISMA Study). *World J Gastroenterol* 2001;7:243-247
- Hobsley M, Tovey FI. *Helicobacter pylori*: the primary cause of duodenal ulceration or a secondary infection? *World J Gastroenterol* 2001;7:149-151
- Gao HJ, Yu LZ, Bai JF, Peng YS, Sun G, Zhao HL, Miu K, Lü XZ, Zhang XY, Zhao ZQ. Multiple genetic alterations and behavior of cellular biology in gastric cancer and other gastric mucosal lesions: *H pylori* infection, histological types and staging. *World J Gastroenterol* 2000;6:848-854
- Gao H, Wang JY, Shen XZ, Liu JJ. Effect of *Helicobacter pylori* infection on gastric epithelial cell proliferation. *World J Gastroenterol* 2000;6:442-444
- Zhuang XQ, Lin SR. Research of *Helicobacter pylori* infection in precancerous gastric lesions. *World J Gastroenterol* 2000;6:428-429

- 8 Cai L, Yu SZ, Zhang ZF. *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric cancer in Changle County, Fujian Province, China. *World J Gastroenterol* 2000;6:374-376
- 9 Pace F, Porro GB. Gastroesophageal reflux and *Helicobacter pylori*: a review. *World J Gastroenterol* 2000;6:311-314
- 10 Vandenplas Y. *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2000;6:20-31
- 11 Zhang H, Jiang SL, Yao XX. Study of T-lymphocyte subsets, nitric oxide, hexosamine and *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic gastric diseases. *World J Gastroenterol* 2000;6:601-604
- 12 Lu XL, Qian KD, Tang XQ, Zhu YL, Du Q. Detection of *H pylori* DNA in gastric epithelial cells by in situ hybridization. *World J Gastroenterol* 2002;8:305-307
- 13 Lai YC, Wang TH, Huang SH, Yang SS, Wu CH, Chen TK, Lee CL. Density of *Helicobacter pylori* may affect the efficacy of eradication therapy and ulcer healing in patients with active duodenal ulcers. *World J Gastroenterol* 2003;9:1537-1540
- 14 Xia HH, Lam SK, Wong WM, Hu WH, Lai KC, Wong SH, Leung SY, Yuen ST, Wright NA, Wong BC. Antralization at the edge of proximal gastric ulcers: does *Helicobacter pylori* infection play a role? *World J Gastroenterol* 2003;9:1265-1269
- 15 Hu GY, Yu BP, Dong WG, Li MQ, Yu JP, Luo HS, Rang ZX. Expression of TFF2 and *Helicobacter pylori* infection in carcinogenesis of gastric mucosa. *World J Gastroenterol* 2003;9:910-914
- 16 Guo XL, Wang LE, Du SY, Fan CL, Li L, Wang P, Yuan Y. Association of cyclooxygenase-2 expression with Hp-cagA infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:246-249
- 17 Lan J, Xiong YY, Lin YX, Wang BC, Gong LL, Xu HS, Guo GS. *Helicobacter pylori* infection generated gastric cancer through p53-Rb tumor-suppressor system mutation and telomerase reactivation. *World J Gastroenterol* 2003;9:54-58
- 18 Nilsson HO, Taneera J, Castedal M, Glatz E, Olsson R, Wadstrom T. Identification of *Helicobacter pylori* and other *Helicobacter* species by PCR, hybridization, and partial DNA sequencing in human liver samples from patients with primary sclerosing cholangitis or primary biliary cirrhosis. *J Clin Microbiol* 2000;38:1072-1076
- 19 Avenaud P, Marais A, Monteiro L, Le Bail B, Bioulac Sage P, Balabaud C, Mégraud F. Detection of *Helicobacter* species in the liver of patients with and without primary liver carcinoma. *Cancer* 2000;89:1431-1439
- 20 Ponzetto A, Pellicano R, Leone N, Cutufia MA, Turrini F, Grigioni WF, D'Errico A, Mortimer P, Rizzetto M, Silengo L. *Helicobacter* infection and cirrhosis in hepatitis C virus carriage: is it an innocent bystander or a troublemaker? *Med Hypotheses* 2000;54:275-277
- 21 Nilsson HO, Mulchandani R, Tranberg K, Wadstrom T. *Helicobacter* species identified in liver from patients with cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2000;120:323-324
- 22 Nilsson HO, Castedal M, Olsson R, Wadstrom T. Detection of *Helicobacter* in the liver of patients with chronic cholestatic liver diseases. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:875-882
- 23 Fallone CA, Tran S, Semret M, Discepolo F, Behr M, Barkun AN. *Helicobacter* DNA in bile: correlation with hepato-biliary diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:453-458
- 24 Fan XG, Peng XN, Huang Y, Yakoob J, Wang ZM, Chen YP. *Helicobacter* species ribosomal DNA recovered from the liver tissue of chinese patients with primary hepatocellular carcinoma. *Clin Infect Dis* 2002;35:1555-1557
- 25 Fan XG, Chua A, Li TG, Zeng QS. Survival of *Helicobacter pylori* in milk and tap water. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:1096-1098
- 26 Ponzetto A, Pellicano R, Leone N, Berrutti M, Turrini F, Rizzetto M. *Helicobacter pylori* seroprevalence in cirrhotic patients with hepatitis B virus infection. *Neth J Med* 2000;56:206-210
- 27 Dore MP, Realdi G, Mura D, Graham DY, Sepulveda AR. *Helicobacter* infection in patients with HCV-related chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2002;47:1638-1643
- 28 Fan XG, Zou YY, Wu AH, Li TG, Hu GL, Zhang Z. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with hepatitis B. *Br J Biomed Sci* 1998;55:176-178
- 29 Wadstrom T, Ljungh A, Willen R. Primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis are of infectious origin. *Gut* 2001;49:454
- 30 de Magalhaes Queiroz DM, Santos A. Isolation of a *Helicobacter* strain from the human liver. *Gastroenterology* 2001;121:1023-1024
- 31 Wang X, Willen R, Svensson M, Ljungh A, Wadstrom T. Two-year follow-up of *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 and Balb/cA mice. *APMIS* 2003;111:514-522

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 2002年度医学SCI论文的高产机构

排名	单位	论文篇数	排名	单位	论文篇数
1	北京大学	108	11	中山大学	38
2	复旦大学	86	12	第四军医大学西京医院	37
3	中科院上海生命科学院	79	13	第二军医大学	33
4	浙江大学	61	14	中南大学	32
5	中山大学附1院	52	15	北京大学附1院	30
6	解放军总医院	50	15	沈阳药科大学	30
7	上海第二医科大学瑞金医院	46	15	四川大学	30
8	中国药科大学	44	18	复旦大学中山医院	29
9	第四军医大学	39	19	四川大学华西医院	28
9	华中科技大学同济医院	39	20	第一军医大学南方医院	26

中国科学技术信息研究所 2003-12-09 发布 2002 年度中国科技论文统计结果

# H pylori根除加中药疗胃煎剂对鼠慢性胃炎病变影响

姚希贤, 张琳, 王娜, 姚冬梅, 白文元, 冯丽英

姚希贤, 王娜, 姚冬梅, 白文元, 冯丽英, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000

张琳, 北京中医医院消化科 北京市 100010

姚希贤 男 1932-06-01 生, 河北省衡水县人, 汉族. 1955 年河北医学院医疗系本科毕业, 内科学教授, 消化内科博士生导师, 中西医结合高徒导师, 省管优秀专家, 全国百名优秀医生之一, 河北省消化病研究所所长, 省级重点实验室主任, 主要从事消化系统疾病研究, 发表论文 100 篇, 主编临床消化病学, 急性消化病学等专著 6 部.

项目负责人: 姚希贤, 050000, 河北省石家庄市和平西路 215 号, 河北医科大学第二医院消化内科. yaoxixian@163.com

电话: 0311-7222831

收稿日期: 2003-05-14 接受日期: 2003-08-16

## Effects of *H pylori* eradication with liaowei decoction on pathology of *H pylori*-associated chronic gastritis in rats

Xi-Xian Yao, Lin Zhang, Na Wang, Dong-Mei Yao, Wen-Yuan Bai, Li-Ying Feng

Xi-Xian Yao, Na Wang, Dong-Mei Yao, Wen-Yuan Bai, Li-Ying Feng, Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Lin Zhang, Department of Gastroenterology, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100010, China

Correspondence to: Dr. Xi-Xian Yao, Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. yaoxixian@163.com

Received: 2003-05-14 Accepted: 2003-08-16

## Abstract

**AIM:** To evaluate the effects of *H pylori* eradication with liaowei decoction on pathologic changes and COX-2 expression of *H pylori*-associated chronic gastritis in rats.

**METHODS:** A total of 80 grade-II male Wister rats weighing 80-100 g were given *H pylori* and MNNG to prepare *H pylori*-associated chronic gastritis model with 4 mice dead. Among them, 54 rats with *H pylori* serum antibody positive were randomly divided into 4 groups: *H pylori* eradication with liaowei decoction (14 rats); *H pylori* eradication with Maizilin (positive control, 14 rats); spontaneous recovery (negative control, 13 rats); and simple *H pylori* eradication therapy (13 rats). After treatment, both Gram staining of gastric antrum mucosal smear and rapid urease testing were made to detect the *H pylori* colonization of the gastric mucosa and to assess the histological indexes of gastric antrum mucosa. Immunohistochemical staining was also performed to detect COX-2 expression.

**RESULTS:** The colonization of gastric mucosa by *H pylori* was found in rats from spontaneous recovery group, as an indication of long-term continuous *H pylori* infection, while no colonization was found in rats from other groups. Pathological changes of gastric antrum mucosa included moderate gastric mucosal atrophy in rats from spontaneous recovery group (pathologic integration  $2.0 \pm 0.20$  points),

associated with moderate acute or chronic gastric mucosal inflammation (pathologic integrations were  $2.0 \pm 0.20$  points and  $1.90 \pm 0.39$  points, respectively). In comparison with spontaneous recovery group, treatment effectiveness in the group of *H pylori* eradication with liaowei decoction was remarkably different ( $P < 0.05$ ). The gastric mucosal atrophy in the combination group (pathologic integration  $1.25 \pm 0.44$  points) was less severe, while acute gastric mucosal inflammation (pathologic integration  $0.3 \pm 0.47$  points) was extincted, and chronic inflammation (pathologic integration  $1.05 \pm 0.22$  points) was less severe; For the group of *H pylori* eradication and "Maizilin", pathologic integration of gastric mucosal atrophy was  $2.0 \pm 0.43$  points. In comparison with spontaneous recovery group, there was no remarkable difference, however, acute inflammation was extincted and chronic inflammation was the same as before. Gastric mucosal atrophy and chronic inflammation were more severe in simple *H pylori* eradication group than those in spontaneous recovery group, while active inflammatory changes extincted. COX-2 expression of gastric antrum mucosa in the group of simple *H pylori* eradication, group of *H pylori* eradication with liaowei decoction, group of *H pylori* eradication and Maizilin as well as spontaneous recovery group were  $14 \pm 3.7\%$ ,  $10 \pm 3.8\%$ ,  $13 \pm 4.0\%$  and  $19 \pm 10.2\%$ , respectively. In comparison with spontaneous recovery group, COX-2 expression of the treatment groups were greatly decreased as an indication of remarkable difference ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** COX-2 expression and acute inflammation can be greatly decreased by applying *H pylori* eradication therapy in the treatment of *H pylori*-associated chronic gastritis, but the therapy cannot do much to chronic pathologic changes, especially to atrophic changes. Application of the combined therapy of *H pylori* eradication with "liaowei decoction" for 12 weeks will have better treatment effectiveness on chronic pathologic changes, especially atrophic changes.

Yao XX, Zhang L, Wang N, Yao DM, Bai WY, Feng LY. Effects of *H pylori* eradication with liaowei decoction on pathology of *H pylori*-associated chronic gastritis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(1):97-100

## 摘要

**目的:** 评价根除 *H pylori* 加疗胃煎剂对大鼠 *H pylori* 相关性慢性胃炎病变的影响. 同时观察治疗前后环氧合酶-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 表达的变化.

**方法:** 体质量 80-100 g 二级  $\delta$  Wister 大鼠 80 只, 采用 *H pylori* 及 MNNG 综合方法制备大鼠 *H pylori* 相关性慢性胃炎模型 76 只, 血清 *H pylori* 抗体阳性 54 只随机分为 4 组: *H pylori* 根除与疗胃煎剂组 (14 只)、*H pylori* 根除与“麦滋林”组 (阳性对照组) (14 只)、自然恢复组

(阴性对照组)(13只)、单纯 *H pylori* 根除组(13只). 治疗结束后,行胃窦黏膜涂片Gram染色和快速尿素酶试验,检测 *H pylori* 的定植情况,并对胃窦黏膜组织学各项指标进行评定;采用免疫组化染色方法,检测胃窦黏膜的 COX-2 的表达.

结果:自然恢复组大鼠均有 *H pylori* 定植,其他各组大鼠胃黏膜均未发现 *H pylori* 定植;自然恢复组的大鼠表现中度萎缩病变( $2.0 \pm 0.20$ 分),伴有中度急性、慢性炎症( $2.0 \pm 0.20$ 分、 $1.90 \pm 0.39$ 分);而 *H pylori* 根除联用疗胃煎剂组,与自然恢复组比较,萎缩病变( $1.25 \pm 0.44$ 分)轻度改善,伴急性炎症( $0.3 \pm 0.47$ 分)消退,慢性炎症( $1.05 \pm 0.22$ 分)轻度改善,差异显著( $P < 0.05$ ); *H pylori* 根除与麦滋林组胃窦黏膜层萎缩病理积分为  $2.0 \pm 0.43$ 分,较自然恢复组无明显差异,但急性炎症消退,慢性炎症无改善. 单纯 *H pylori* 根除组,与自然恢复组比较,萎缩病变和慢性炎症未见改善,但活动性炎症消退;单纯根除 *H pylori* 组、根除 *H pylori* 与联用疗胃煎剂组、*H pylori* 根除与麦滋林组、自然恢复组 COX-2 表达率分别为  $14.0 \pm 3.7\%$ 、 $10.0 \pm 3.8\%$ 、 $13.0 \pm 4.0\%$ 、 $19.0 \pm 10.2\%$ ,治疗组与自然恢复组比较,胃窦黏膜 COX-2 表达率明显下降,差异显著( $P < 0.05$ ).

结论:对 *H pylori* 相关性慢性胃炎,根除 *H pylori* 可明显降低 COX-2 表达,明显改善急性炎症,但对慢性病变尤其萎缩病变无明显影响. 根除 *H pylori* 的基础上应用疗胃煎剂治疗 12 wk 有较好的疗效.

姚希贤, 张琳, 王娜, 姚冬梅, 白文元, 冯丽英. *H pylori* 根除加中药疗胃煎剂对鼠慢性胃炎病变影响. 世界华人消化杂志 2004;12(1):97-100

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/97.asp>

## 0 引言

慢性萎缩性胃炎(CAG)为临床多发病,其重症不典型增生被公认为癌前病变,迄今对之尚乏有效治疗方法. *H pylori* 为慢性胃炎的重要病因,但根除 *H pylori* 对慢性胃炎病变有无治疗作用?对慢性胃炎的肠化、不典型增生等萎缩性病变有无影响尚乏定论. 我们采用 *H pylori* 及 N 甲基 N 硝基 N 亚硝基胍(MNNG, 胃癌诱导剂<sup>[1-2]</sup>)综合方法制备大鼠 *H pylori* 相关性慢性胃炎模型,对根除 *H pylori* 联用疗胃煎剂对慢性病变的治疗作用及根除 *H pylori* 后胃黏膜 COX-2 表达的情况进行观察.

## 1 材料和方法

1.1 材料 体质量 80-100 g 二级 ♂ Wister 大鼠 80 只,采用 *H pylori* 及 MNNG 综合方法制备大鼠 *H pylori* 相关性慢性胃炎模型,制模实验结束后,除去死亡的 4 只大鼠,检测存活大鼠 *H pylori* 血清抗体,阳性 54 只,随机分为 4 组: *H pylori* 根除与疗胃煎剂组(14 只),前 2 wk 采用传统三联疗法根除 *H pylori*,继之灌胃疗胃煎剂 12 wk. *H pylori* 根除与麦滋林组(阳性对照组)(14 只),前 2 wk 采

用传统三联疗法根除 *H pylori*,继之灌胃麦滋林 12 wk,自然恢复组(阴性对照组)(13 只),予蒸馏水灌胃,正常饮食 14 wk,单纯 *H pylori* 根除组(13 只),采用传统三联疗法根除 *H pylori*,持续 2 wk,之后予正常饮食 12 wk. 1.2 方法 根除 *H pylori* 药物:德诺 40 mg/kg,阿莫西林 166.7 mg/kg,甲硝唑 66.7 mg/kg,每天灌胃 1 次,疗程 2 wk;疗胃煎剂(以党参为君,补脾养胃,生津养血,健运中气. 白术、云苓益气健脾,丹参活血化瘀,改善胃部血液循环与供养情况,促进病变恢复,木香、川朴、砂仁行气、除满):50 mg/kg,疗程 12 wk;麦滋林:50 mg/kg,每天灌胃 1 次,疗程 12 wk. 实验结束时,采取颈椎脱位的方法处死动物后,取出鼠胃,沿大弯剪开胃腔,用生理盐水洗净,取一半胃黏膜组织做快速尿素酶实验,黏膜涂片 Gram 染色;取另一半胃黏膜组织,用 40 g/L 多聚甲醛固定 24 h 后,经石蜡切片、HE 染色后,分别进行病理组织学检测和免疫组化染色检测 COX-2 的表达. 观察动物的死亡情况、体质量、精神状态、活动情况、毛发光泽度及食欲. 处死动物后,取其胃窦黏膜进行快速尿素酶试验,并行胃窦黏膜涂片 Gram 染色检查,两项检查均阳性判定 *H pylori* 阳性.

1.2.1 胃黏膜病理组织学检查 参照 2000 年全国慢性胃炎研讨会制定的标准对胃窦黏膜组织学各项指标进行评定. 组织切片由专人采取盲法阅片. 对慢性炎症、活动性、萎缩和肠化等形态学变量分成无、轻度、中度和重度 4 级(或 0, +, ++, +++),其对应分值为 0, 1, 2, 3 分. 分级的具体方法: (1)慢性炎症 根据慢性炎症细胞密集程度和浸润深度分级,以前者为主. 正常:单个核细胞每高倍视野不超过 5 个,如数量略超正常而内镜无明显异常时,病理可诊断为无明显异常. 轻度:慢性炎症细胞较少并局限于黏膜浅层,不超过黏膜层的 1/3. 中度:慢性炎症细胞较密集,超过黏膜层的 1/3,达到 2/3. 重度:慢性炎症细胞密集,占据黏膜全层. 计算密度程度要避免淋巴滤泡及其周围的淋巴细胞区. (2)活动性慢性炎症背景上有中性粒细胞浸润. 轻度:黏膜固有层少数中性粒细胞浸润. 中度:中性粒细胞较多存在于黏膜层,并在表面上皮细胞间、小凹上皮细胞间或腺管上皮间可见. 重度:中性粒细胞较密集,或除中度所见外还见小凹脓肿. (3)萎缩指胃的固有腺体减少,幽门腺萎缩是幽门腺减少或由肠化腺体替代,胃底(体)腺萎缩是指胃底(体)腺假幽门腺化生、肠上皮化生或腺体本身减少. 萎缩程度以胃固有腺减少各 1/3 来计算. 轻度:固有腺体数减少不超过原有腺体的 1/3,大部分腺体仍保留. 中度:固有腺体数减少超过 1/3,但未超过 2/3. 残存腺体不规则分布. 重度:固有腺体数减少超过 2/3,仅残留少数腺体,甚至完全消失. 标本过浅未达到黏膜肌层的不可能诊断萎缩,要剔除. 胃窦部少数淋巴滤泡不算萎缩,但胃体黏膜层出现淋巴滤泡要考虑为萎缩. (4)肠腺化生 肠化部分占腺体和表面上皮总面积 1/3 以下的为轻度、1/3-2/3 的为中度,2/3 以上为重度.



1.2.2 免疫组化染色检测COX-2的表达 仅胃窦部的标本进行免疫组化检测, 采用链霉卵白素蛋白-过氧化物酶联结法(streptavidin-peroxidase conjugated method). COX-2 多克隆抗体购自美国 Stanta Cruz 公司, SP 免疫染色试剂盒购自北京中山生物技术公司. 石蜡切片(3-5  $\mu\text{m}$ )常规脱蜡、梯度水化后, 切片置 30 mL/L 过氧化氢孵育 5-10 min 清除内源性过氧化物酶活性. 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min. 置电炉煮沸进行抗原修复 15-20 min. 冷却室温后滴加封闭用血清 15 min, 倾去血清, 滴加 1:100 稀释 COX-2 多克隆抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜; PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, 滴加生物素化二抗, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, 滴加辣根酶标记链霉卵白素, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, DAB 显色 5 min, 自来水充分冲洗, 苏木精复染, 中性树脂封片. 以 PBS 替代一抗作为阴性对照, 用已知强阳性的结肠癌切片作为阳性对照, 对每个标本中胞质阳性的黏膜表面上皮和固有腺上皮进行计数, 以阳性细胞率即阳性细胞数占总细胞数的比例进行比较, 计数 10 个高倍视野细胞, 取其平均值.

统计学处理 采用成组设计, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 t 检验, 多个样本均数间两两均数比较, 采用方差分析和 q 检验, 当  $P < 0.05$  时有显著差异.

## 2 结果

自然恢复组一般情况差, 被毛松散蓬乱, 毛色偏黄无光泽, 两眼无神, 活动迟钝, 食量仍小, 形体瘦小, 多数大鼠有便溏和拉尾现象. H pylori 根除与疗胃煎剂组较自然恢复组改善, 食量较前增加, 体重渐回升, 粪便成型. 单纯 H pylori 根除组及 H pylori 根除与麦滋林组仅略改善. 自然恢复组大鼠均有 H pylori 定植, 提示 H pylori 长期持续感染. 其他各组大鼠胃黏膜均未发现 H pylori 定植, 提示 H pylori 已被根除.

2.1 病理变化 自然恢复组动物胃窦黏膜呈慢性胃炎改变. 胃窦黏膜色偏白, 未见血管显露, 少数大鼠有糜烂及溃疡. 其他各组未见糜烂及溃疡, 其他表现与自然恢复组相似. 自然恢复组: 胃窦黏膜固有层有较多淋巴细胞和中性粒细胞浸润, 腺体中度减少, 无肠化及不典型增生. 活动性炎症、慢性炎症、萎缩的病理积分分别为  $2.0 \pm 0.20$  分,  $1.90 \pm 0.39$  分,  $2.0 \pm 0.20$  分(表 1). H pylori 根除与疗胃煎剂组胃窦黏膜层几乎无中性粒细胞浸润, 故急性炎症消退, 较自然恢复组明显改善; 慢性炎症和萎缩病理积分分别为  $1.05 \pm 0.22$  分,  $1.25 \pm 0.44$  分, 较自然恢复组轻度改善( $P < 0.05$ ). H pylori 根除与麦滋林组胃窦黏膜层几乎无中性粒细胞浸润, 故急性炎症消退, 较自然恢复组明显改善; 慢性炎症病理积分为  $1.70 \pm 0.40$  分, 较自然恢复组略有改善, 但  $P > 0.05$ . 萎缩性病变, 在少数动物表现轻度改善, 但病理积分为  $2.0 \pm 0.43$  分, 较自然恢复组无明显差异. 单纯 H pylori 根除组胃窦黏膜基本无中性粒细胞浸润, 固有层较多量淋巴细胞浸润,

腺体中度减少. 提示除活动性炎症明显改善轻度改善外, 与自然恢复组比较萎缩和慢性炎症未见改善.

2.2 COX-2 免疫组化染色 治疗结束时, 各组的 COX-2 阳性细胞率如下: 单纯 H pylori 根除组为  $14.0 \pm 3.7\%$ ; H pylori 根除和应用疗胃煎剂组为  $10.0 \pm 3.8\%$ ; H pylori 根除与麦滋林组( $13.0 \pm 4.0\%$ ); 自然恢复组为  $19.0 \pm 10.2\%$ . 单纯 H pylori 根除组、H pylori 根除与疗胃煎剂组与自然恢复组比较, 胃黏膜表面上皮和固有腺上皮细胞胞质 COX-2 表达明显下降, 差异显著 ( $P < 0.05$ ).

表 1 胃窦黏膜病理组织学改变 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n(只)	活动性炎症(分)	慢性炎症(分)	萎缩(分)
自然恢复组	13	$2.0 \pm 0.20$	$1.90 \pm 0.39$	$2.0 \pm 0.20$
Hp 根除与疗胃煎剂	14	$0.30 \pm 0.47^a$	$1.05 \pm 0.22^a$	$1.25 \pm 0.44^a$
单纯 Hp 根除	13	$0.29 \pm 0.40^b$	$1.80 \pm 0.20^b$	$2.07 \pm 0.22^b$
H pylori 根除与麦滋林组	14	$0.30 \pm 0.48^a$	$1.70 \pm 0.40^b$	$2.0 \pm 0.43^b$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 自然恢复组比较; <sup>b</sup> $P > 0.05$  vs 自然恢复组比较.

## 3 讨论

根除 H pylori 可消除或明显改善 H pylori 相关性慢性胃炎急性活动性炎症, 此已为学者所共识. 但根除 H pylori 对慢性病变有无影响, 是否需要对其进行治疗, 以及如何治疗, 目前尚乏明确结论, 相关临床结果并不一致<sup>[3-10]</sup>. 多数学者认为 H pylori 相关性慢性胃炎的发生发展与 H pylori 密切相关, 但单纯根除 H pylori, 对治疗萎缩性病变无效<sup>[11-18]</sup>. 动物实验方面, 胡品津 et al<sup>[19]</sup>报道单纯使用 SS1 感染小鼠 12 mo, 造成轻度 CAG 之后根除 H pylori, 可明显消除黏膜的炎症反应, 降低细胞的高增生状态, 但萎缩病变并未消失. 本实验结果显示: 单纯根除 H pylori 后, 大鼠急性活动性炎症消失或明显改善, 慢性炎症无明显改善; H pylori 根除和应用疗胃煎剂急性炎症消退, 慢性炎症轻度改善; H pylori 根除与麦滋林组急性炎症消退, 慢性炎症略有改善, 后者与自然恢复组比较, 无显著性差异( $P > 0.05$ ). 同时本实验采用免疫组化的方法检测 COX-2 的表达变化, 发现 COX-2 表达率的下降与慢性活动性炎症改善一致. 其中自然恢复组 COX-2 表达率为  $(19.0 \pm 10.2)\%$ , 单纯根除 H pylori 组为  $(14.0 \pm 3.7)\%$ , H pylori 根除与麦滋林组  $(13.0 \pm 4.0)\%$ , 根除 H pylori 与疗胃煎剂组为  $10.0 \pm 3.8\%$ , 治疗组胃窦黏膜 COX-2 表达率较自然恢复组有明显下降. 实验结果与相关的临床研究结果相似, 提示 COX-2 的表达可能参与 H pylori 相关性慢性胃炎病变产生和演变过程<sup>[20-22]</sup>. 故根除 H pylori, 可改善慢性活动性炎症, 降低 COX-2 表达率. 但单纯根除 H pylori, 萎缩病变( $2.1 \pm 0.32$ )分较自然恢复组( $2.0 \pm 0.2$ )分并无明显变化.

Correa et al<sup>[23]</sup>追踪调查了 780 例具有正常胃黏膜或慢性浅表性胃炎的患者, 平均 5.1 a 重复 1 次胃镜检查,

有284例患者发展成萎缩性胃炎, 每年7.5%的转变率。根除 *H pylori* 后进行长达6 a 随访研究证实, 患者的萎缩性病变得到了改善。如能延长实验时间, 进行更深入的研究, 对回答单纯根除 *H pylori* 能否改善或逆转萎缩性病变更有意义。

近年来中医中药在治疗慢性胃炎方面显示了可喜的势头<sup>[24-30]</sup>。姚希贤 et al 报道采用健脾益气活血方剂治疗 *H pylori* 相关性慢性胃炎, 除能明显改善症状, 对慢性胃炎的萎缩性病变更有一定治疗作用。我们在根除 *H pylori* 后, 继续采用疗胃煎剂治疗慢性病变, 调节胃功能, 经治12 wk, 萎缩病变轻度改善, 病理积分较自然恢复组的(2.2 ± 0.2)分下降, 为(1.25 ± 0.44)分, 差异有显著性, 而 *H pylori* 根除与麦滋林组萎缩性病变更较自然恢复组并无明显改善。提示疗胃煎剂治疗 *H pylori* 相关性慢性胃炎具有良好的前景。

#### 4 参考文献

- 何文波, 高国林, 候姝, 宋刚. 大鼠慢性萎缩性胃炎时黏膜血管病变与胃癌的关系. 世界华人消化杂志 1999;7:130-131
- 陆为民, 单兆伟, 沈洪, 张健宁. 胃舒胶囊对大鼠慢性萎缩性胃炎癌前病变超微结构的影响. 世界华人消化杂志 1999;7:902-903
- Sepulveda AR. Improvement of gastric atrophy after cure of *Helicobacter pylori*. What we know, what we don't know, and why care? *J Clin Gastroenterol* 2003;36:382-384
- Schuster MJ. *Helicobacter pylori*. Update 2002. *Schweiz Rundsch Med Prax* 2002;91:2093-2099
- Vucelic B, Mesihovic R, Bratovic I, Vanis N, Gribajcevic M, Selak I. *Helicobacter pylori* infection and chronic gastritis as extra-esophageal factors in gastroesophageal reflux disease. *Med Arh* 2003;57(1 Suppl 1):39-44
- Han SU, Kim YB, Joo HJ, Hahm KB, Lee WH, Cho YK, Kim DY, Kim MW. *Helicobacter pylori* infection promotes gastric carcinogenesis in a mice model. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:253-261
- Hahm KB, Song YJ, Oh TY, Lee JS, Surh YJ, Kim YB, Yoo BM, Kim JH, Han SU, Nahm KT, Kim MW, Kim DY, Cho SW. Chemoprevention of *Helicobacter pylori*-associated gastric carcinogenesis in a mouse model: is it possible? *J Biochem Mol Biol* 2003;36:82-94
- Tian SF, Xiong YY, Yu SP, Lan J. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and expressions of tumor suppressor genes in gastric carcinoma and related lesions. *Ai Zheng* 2002;21:970-973
- Zhuang X, Lin S, Zheng J, Wang L, Sun G, Li Y. The prognostic research of expression and relationship between *Helicobacter pylori* of c-met oncogene correlation with gastric mucosal proliferation. *Zhonghua Neike Zazhi* 2001;40:381-384
- Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, Miyamoto M, Tanaka S, Yoshihara M, Sumii K, Shimamoto F, Kajiyama G. B-cell monoclonality in *Helicobacter pylori*-associated chronic atrophic gastritis. *Virchows Arch* 2001;438:232-237
- Santacroce L, Bufo P, Latorre V, Losacco T. Role of mast cells in the physiopathology of gastric lesions caused by *Helicobacter pylori*. *Chir Ital* 2000;52:527-531
- Testino G, Cornaggia M, Testino R, Valentini M. The physiopathological aspects of chronic gastritis, *Helicobacter pylori* and precancerous gastric changes. *Recenti Prog Med* 2000;91:186-190
- Li S, Lu AP, Zhang L, Li YD. Anti-*Helicobacter pylori* immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody responses and the value of clinical presentations in diagnosis of *H pylori* infection in patients with precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2003;9:755-758
- Yamada T, Miwa H, Fujino T, Hirai S, Yokoyama T, Sato N. Improvement of gastric atrophy after *Helicobacter pylori* eradication therapy. *J Clin Gastroenterol* 2003;36:405-410
- Annibale B, Di Giulio E, Caruana P, Lahner E, Capurso G, Bordini C, Delle Fave G. The long-term effects of cure of *Helicobacter pylori* infection on patients with atrophic body gastritis. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1723-1731
- Ito M, Haruma K, Kamada T, Mihara M, Kim S, Kitadai Y, Sumii M, Tanaka S, Yoshihara M, Chayama K. *Helicobacter pylori* eradication therapy improves atrophic gastritis and intestinal metaplasia: a 5-year prospective study of patients with atrophic gastritis. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1449-1456
- Kokkola A, Sipponen P, Rautelin H, Harkonen M, Kosunen TU, Haapiainen R, Puolakkainen P. The effect of *Helicobacter pylori* eradication on the natural course of atrophic gastritis with dysplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:515-520
- 姚希贤, 姚金锋, 崔东来, 郭昱, 白文元. 根除 *H pylori* 与疗胃煎剂对 *H pylori* 相关治疗作用. 世界华人消化杂志 2000;8:741-744
- 胡品津, 曾志荣, 林汉良, 陈昱湖, 陈为, 彭晓忠. 幽门螺杆菌的根除与萎缩性胃炎形成和逆转的动物实验研究. 中华消化杂志 2000;20:155-158
- Kimura A, Tsuji S, Tsujii M, Sawaoka H, Iijima H, Kawai N, Yasumaru M, Kakiuchi Y, Okuda Y, Ali Z, Nishimura Y, Sasaki Y, Kawano S, Hori M. Expression of cyclooxygenase-2 and nitrotyrosine in human gastric mucosa before and after *Helicobacter pylori* eradication. *Prostag Leukot Essent Fatty Acids* 2000;63:315-322
- 陆红, 陈晓宇, 刘文忠, 彭延申, 萧树东. 幽门螺杆菌感染对胃黏膜环氧合酶-2 表达的影响. 中华消化杂志 2001;2:287-289
- 邵恒骏, 白剑峰, 彭延申, 孙谷, 赵翰林, 缪磊, 吕秀珍, 赵志泉, 萧树东. 幽门螺杆菌感染胃黏膜病变基因表达和细胞生物学行为. 中华消化杂志 2001;21:18-21
- Correa P, Fontham ET, Bravo JC, Bravo LE, Ruiz B, Zarama G, Realpe JL, Malcom GT, Li D, Johnson WD, Mera R. Chemoprevention of gastric dysplasia: randomized controlled trial of antioxidant supplements and anti-*Helicobacter pylori* therapy. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1881-1888
- 危北海, 张占海, 杨丽彩, 刘晋生, 赵敏, 赵荣来, 李乾构. 胃安素治疗慢性萎缩性胃炎的临床与实验研究. 华人消化杂志 1998;6:114-117
- 姚金锋, 姚希贤, 郝桂敏, 宫心鹏, 张新暖. “疗胃煎剂”胃黏膜保护作用的实验研究. 中国中西医结合脾胃杂志 2000;8:330-332
- 陆为民, 单兆伟, 沈洪, 吴静, 朱云华, 朱长乐. 胃舒胶囊防治萎缩性胃炎癌前病变的实验研究. 华人消化杂志 1998;6:897-898
- 王丙信, 李进根, 杨同占, 姚希贤. 中西医结合治疗幽门螺杆菌相关胃炎81例. 中国中西医结合脾胃杂志 1998;6:215-216
- 陈飞松, 施波, 车建途, 屈志伟, 任蜀兵, 刘晋生, 徐春军, 张晓辉, 赵德骥, 危北海. 芪龙方防治大鼠胃癌前疾病的作用. 中国中西医结合脾胃杂志 1999;7:68-71
- 姚希贤, 崔东来. 幽门螺杆菌感染与慢性胃炎. 医师进修杂志 1999;22:9-10
- 王娜, 姚希贤, 张琳, 白文元, 冯丽英. 根除 *H pylori* 后应用灭Hp煎剂对慢性胃炎病变的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:558-561

# 原代猪肝细胞 PERV 检测及其意义

郭海涛, 王英杰, 刘鸿凌, 王海慧, 刘俊, 黄艳萍, 王宇明

郭海涛, 王英杰, 刘鸿凌, 刘俊, 黄艳萍, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038  
王海慧, 中国人民解放军第三军医大学西南医院内分泌科 重庆市 400038  
郭海涛, 男, 1976-03-06 生, 江苏省阜宁人, 汉族. 感染病学硕士, 住院医师, 主要从事生物人工肝细胞材料方面研究.  
国家自然科学基金资助项目 No.30027001  
项目负责人: 王英杰, 400038, 重庆市沙坪坝高滩岩, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. wangyj103@263.net  
电话: 023-68754289  
收稿日期: 2003-03-14 接受日期: 2003-03-28

## Detection and significance of PERV in primary porcine hepatocytes

Hai-Tao Guo, Ying-Jie Wang, Hong-Ling Liu, Hai-Hui Wang, Jun Liu, Yan-Ping Huang, Yu-Ming Wang

Hai-Tao Guo, Ying-Jie Wang, Hong-Ling Liu, Jun Liu, Yan-Ping Huang, Yu-Ming Wang, Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Hai-Hui Wang, Department of Endocrinology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Supported by the National Natural Scientific Foundation of China, No. 30027001  
Correspondence to: Ying-Jie Wang, Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. wangyj103@263.net  
Received: 2003-03-14 Accepted: 2003-03-28

## Abstract

AIM: To investigate the significance of laboratory detection for PERV in primary porcine hepatocytes.

METHODS: Porcine hepatocytes was isolated and cultured with a two-stage perfusion method. Polymerase chain reaction (PCR) were used to detect PERV previrus sequences and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assays were used to detect PERV RNA sequences by using specific primers in primary porcine hepatocytes and culture supernate, controlled with no RT-PCR.

RESULTS: All these PCR assays gave positive results in tissue and serum samples from 2 HCV patients, 1 rabbit and 1 rat. Observation showed the persistent releasing of PERV in the culture supernate in different time points without the stimulation of mitogen by the established method and could last till cell death.

CONCLUSION: The method is rapid, cheap and safe, and it will be helpful to the further study of PERV infection and biosafety. The releasing of PERVs in the culture model demonstrates the existence of PERV security in the bioartificial liver support system.

Guo HT, Wang YJ, Liu HL, Wang HH, Liu J, Huang YP, Wang YM. Detection and significance of PERV in primary porcine hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):101-104

## 摘要

目的: 探讨猪肝细胞内源性逆转录病毒(PERV)检测方法及其意义。

方法: 采用体外二步灌注法获取猪肝细胞, 使用特异性引物对其前病毒序列进行观察; 以未逆转录 PCR 为对照, 采用 RT-PCR 方法检测原代猪肝细胞 PERV 携带及释放情况, 并用套式 RT-PCR 对扩增产物进行鉴定。

结果: 原代猪肝细胞基因组中可检测到 PERV 前病毒序列, 肝细胞中亦可检测到特异性的 PERV RNA 序列. 在缺乏有丝分裂原刺激的情况下, 猪肝细胞普通培养的不同时段均可检测到病毒释放, 并可持续至细胞死亡。

结论: 中国实验小型猪肝细胞携带 PERV 病毒序列, 猪肝细胞普通培养时可释放该病毒, 其感染性及生物安全性尚需进一步研究。

郭海涛, 王英杰, 刘鸿凌, 王海慧, 刘俊, 黄艳萍, 王宇明. 原代猪肝细胞 PERV 检测及其意义. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):101-104  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/101.asp>

## 0 引言

由于同种细胞来源有限, 且肝癌细胞株具有潜在危险性, 猪器官、组织和细胞逐渐成为异种移植使用较多的生物材料之一. 包括体外生物人工肝、肝细胞移植及肝移植的广义生物人工肝对终末期肝病患者的支持作用已经得到了国内外学者的共识, 其中, 以培养猪肝细胞为基础的生物人工肝成为研究热点之一. 采用猪或转基因猪肝细胞已成为生物人工肝的主要细胞来源, 具有良好的应用前景<sup>[1-7]</sup>. 但自报道猪内源性逆转录病毒 (porcine endogenous retrovirus, PERV) 感染体外培养人细胞来<sup>[8-12]</sup>, 跨种族间感染越来越引起人们的重视. 为检测原代培养猪肝细胞 PERV 携带以及病毒释放情况, 我们选用了 PERV 特异性引物进行 PCR 及 RT-PCR 检测, 为进一步研究 PERV 感染及其安全性研究奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康 1-7 日龄中国实验型小型猪由第三军医大学动物所提供; Collagenase IV, DMSO, 台盼蓝等由 Sigma 公司提供; 离心管为 Nucleon 公司产品; 胎牛血清 (FBS)、DMEM 培养液等购于 Gibco 公司; 参照 PERV RNA gag 区的序列合成 2 对引物, 由上海生工合成, 上游引物序列 P1: 5' -GCGACCCACGCAGTTGCATA-3';

下游引物序列 P2: 5' -CAGTTCCTTGCCAGTGTCTT-3', 目的片段为 662 bp. 套式 PCR 上游引物序列为 P3: 5' -TGATCTAGTGAGAGAGGCAGAC-3'; 下游引物序列 P4: 5' -CGCACACTGGTCCTTGTCG-3', 扩增目的片段为 262 bp. 加样缓冲液购自 FMC 公司(美国), PCR Markers 购自华美生物工程公司; 扩增仪为 iCyclerPCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); Protanase K, DEPC, Taq 酶, 10 × PCR Buffer 和 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司, 10 mmol/L dNTP 购自 Sigma 公司, Trizol 试剂购自 Roche 公司, GET DOC2000 型凝胶成像仪购自 Bio Rad 公司(美国).

**1.2 方法** 常规消毒后采用改良 Seglen 体外二步胶原酶灌注法分离肝细胞, 双层消毒纱布过滤, 然后 50 g × 3 min 离心 3 次, 获取肝细胞<sup>[13-20]</sup>. 从获取猪肝细胞中提取基因组 DNA, 8 mL 消化缓冲液重悬, 50 °C 温育 12-16 h, 等体积酚/氯仿/异戊醇, 1 700 g 离心 10 min, 取上清, 加入 1/2 体积 7.5 mol/L 乙酸铵和 2 体积无水乙醇, 1 700 g 离心 2 min, 700 mL/L 乙醇洗涤制成 PCR 模板. 分别于培养第 1 d、3 d、5 d、7 d、9 d 留取 1 mL 培养上清, 200 g 离心 10 min 以去除脱落细胞, 3 500 g 离心 10 min, 10 000 g 离心 30 min 以去除细胞碎片, 按 Trizol 试剂操作说明提取血清及培养上清总 RNA. 略作改动, 取血清 50 μL, 加入 150 μL Trizol 试剂, 震荡混匀, 静置后加入氯仿 60 μL, 离心后取上清液 50 μL 加入等体积异丙醇, 静置离心去上清并加入 750 mL/L 乙醇 450 μL, 洗涤、离心、干燥、沉淀作逆转录. PCR 扩增 100 μL 反应体系中含 0.5 μmol/L 引物, 200 μmol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 μL 模板, 扩增条件: 95 °C, 10 min; 95 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 1 min; 72 °C, 1 min; 共 35 个循环. RT-PCR 扩增按 Promga 公司试剂盒进行, 稍作变动. 提高镁离子浓度为 1.5 mmol/L, 逆转录温度不变, 以未行逆转录 PCR 作对照. 产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后于凝胶成像仪上拍照. 参照 DNA Marker, 在 662 bp 处出现特异性扩增核酸带为阳性. 使用套式 PCR 鉴定扩增产物, 取扩增产物 5 μL, 加入内循环引物按上述条件进行再次扩增, 在 262 bp 处出现特异性扩增核酸带为阳性.

## 2 结果

**2.1** 在 6 例中国实验香猪肝脏标本中均可检测出 PERV 前病毒序列, 阳性率为 100%, 而在兔、鼠、正常人及 HCV 感染患者肝脏中均未检测出其前病毒序列(图 1). 在中国实验香猪血清标本中均可检测出 PERV RNA 序列, 而在正常人、HBV、HCV 感染患者血清以及其他动物血清中均未检测出其病毒序列(图 2).

**2.2** 在原代猪肝细胞普通培养的早期, 未检测到 PERV RNA 序列, 在培养 3-5 d 时, 上清中可检测到 262 bp 的扩增产物, 并可持续至细胞死亡(图 3).

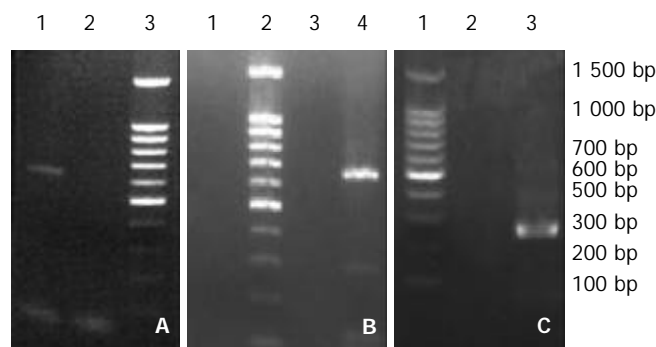


图 1 原代猪肝细胞前病毒 PCR 检测. 图 A: 1: 猪肝细胞; 2: 兔肝细胞; 3: Marker. B: 1: 正常人肝组织; 2: Marker; 3: HCV 阳性肝组织; 4: 猪肝细胞 PCR. C: 1: Marker; 2: 阴性对照; 3: 猪肝细胞.

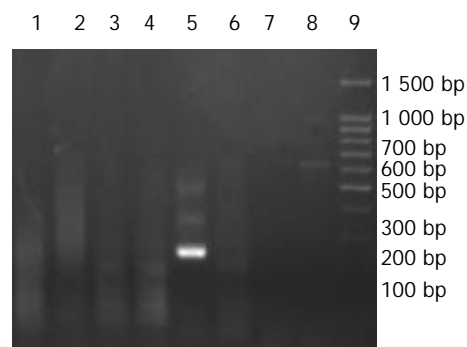


图 2 中国实验小型猪血清 PERV 检测. 1: 正常成人; 2: HBV 阳性; 3: HCV 阳性; 4: 兔; 5: 猪套式 PCR 产物; 6: HCV 阳性; 7: 猪未 RT 的 PCR; 8: 猪 RT-PCR; 9: Marker.

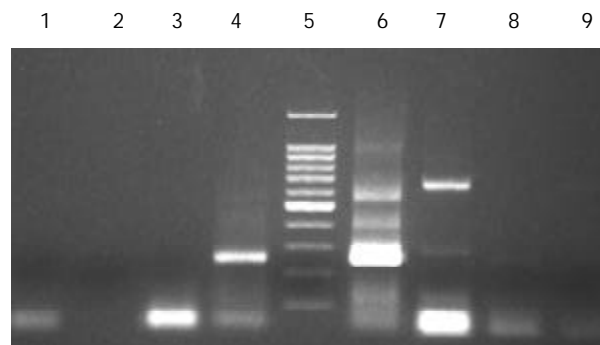


图 3 普通培养上清 PERV 检测. 1: day 1 未 RT 的 PCR; 2: day 1 RT-PCR; 3: day 3 RT-PCR; 4: day 3 套式 PCR; 5: Marker; 6: day 5 RT-PCR; 7: day 7 RT-PCR; 8: day 9 RT-PCR; 9: day 9 未 RT 的 PCR.

## 3 讨论

近年来的研究显示, 以培养猪肝细胞为生物材料的广义生物人工肝系统可为急性肝衰竭患者提供可靠的过渡支持治疗, 但自报道 PERV 感染体外培养人细胞系<sup>[8]</sup>, 并建立该病毒感染 SCID 鼠的动物模型以来<sup>[21-22]</sup>, 当猪的细胞、组织或器官植入处于高度免疫抑制状态(如: 肝衰竭或肝移植)患者体内时, 是否会突破种间屏障而造成感染, 因此, PERV 跨种族间感染及异种移植的生物安全性越来越受到重视<sup>[23-31]</sup>.

当前, 在对猪源性细胞材料进行病毒安全性评估的诸多研究中, 多采用猪 PK-15 细胞系作为 PERV 来源细胞. 要全面、准确地了解中国实验小型猪 PERV

携带情况, 不仅需要可靠、特异的 PERV 检测方法, 同时还需要对病毒释放情况进行观察. 本研究采用体外两步灌流法获取中国实验小型猪肝细胞, 选用特异性引物, 对原代细胞、血清及培养上清进行了 PERV 检测. 结果发现, 中国实验小型猪原代细胞均携带有 PERV 前病毒序列, 血清及培养上清中亦可检测到该病毒释放, 且培养上清中所检测到的病毒属新产生病毒, 不是血清残留或是脱落细胞所致, 其理由在于: (1) 体外分离获取的猪肝细胞经 3-4 次洗涤留取的最后一次洗液, 经 RT-PCR 检测证实为阴性; (2) 根据 Specke et al 所使用的检测方法, 基本可以排除脱落细胞对实验结果造成的干扰. (3) 对培养第 3 d、5 d、7 d 培养上清的检测均得到相同的结果, 也对此作了佐证. 在培养的初期, 病毒释放量较少; 培养中后期, 病毒释放量比较恒定, 并可持续至细胞死亡. 据此可初步认为, 中国实验小型猪肝细胞能够作为 PERV 来源细胞, 应对其进行生物安全性评估, 此外, 还需对病毒分型、病毒复制的动态定量分析等工作进行深入研究.

免疫抑制剂的使用、病毒重叠感染以及细胞毒疗法等诸多因素均可增加逆转录病毒被动激活的可能性, 虽然在对使用胎猪神经细胞治疗 Parkinson's 病、移植猪胰岛细胞治疗糖尿病以及使用猪肾进行透析治疗患者的实验研究中, 均未发现 PERV 感染的直接证据, 但 Van der Laan et al<sup>[21]</sup>将猪的胰岛细胞移植入 SCID 鼠的肾囊下, 使用定量 RT-PCR 方法检测到 PERV 特异性 mRAN 的存在, 证实了 PERV 在体内能感染 SCID 鼠, 再次表明异种移植存在病原安全性问题. 正当猪源性生物材料应用逐渐增多<sup>[32-38]</sup>, 并取得一定临床疗效之时, 对异源性生物材料的潜在感染性问题应引起足够的重视.

猪肝细胞被公认为是目前生物人工肝较好的细胞材料之一, 由于暂无更好的细胞来源, 猪肝细胞在今后一段时期内仍会继续使用, 故需进一步建立和完善生物人工肝病毒安全性的评估系统. 随着对 PERV 的分子生物学以及免疫学特性研究的不断深入, 对其转录、翻译及感染机制将会更加清楚, 从而逐步完善异种移植安全性的评估体系, 进而推动猪源性生物材料临床应用的广泛开展.

#### 4 参考文献

- Secheser A, Osorio J, Freise C, Osorio RW. Artificial liver support devices for fulminant liver failure. *Clin Liver Dis* 2001;5: 415-430
- 李俊刚, 陈耀凯. 生物人工肝细胞材料研究进展. *世界华人消化杂志* 2002;10:699-701
- Tsiaooussis J, Newsome PN, Nelson LJ, Hayes PC, Plevris JN. Which hepatocyte will it be? Hepatocyte choice for Bioartificial liver support systems. *Liver Transplantation* 2001;7:2-10
- Boudjema K, Bachellier P, Wolf P, Tempe JD, Jaeck D. Auxiliary liver transplantation and bioartificial bridging procedures in treatment of acute liver failure. *World J Surg* 2002;26:264-274
- Eguchi S, Kawazoe Y, Sugiyama N, Kawashita Y, Fujioka H, Furui J, Sato M, Ishii T, Kanematsu T. Effects of recombinant

- human hepatocyte growth factor on the proliferation and function of porcine hepatocytes. *ASAIO J* 2000;46:56-59
- Bain VG, Montero JL, de La Mata M. Bioartificial liver support. *Can J Gastroenterol* 2001;15:313-318
- Chen Z, Ding Y, Zhang H. Morphology, viability and functions of suckling pig hepatocytes cultured in serum-free medium at high density. *Dig Surg* 2002;19:184-191
- Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nature Med* 1997;3:282-286
- Weiss RA. Xenografts and retroviruses. *Science* 1999;285:1221-1222
- Birmingham K. FDA subcommittee finds no evidence of PERV transmission. *Nature Med* 1999;5:855
- Tacke SJ, Kurth R, Denner J. Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation? *Virology* 2000;268:87-93
- Akiyoshi DE, Denaro M, Zhu H, Greenstein JL, Banerjee P, Fishman JA. Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J Virology* 1998;72: 4503-4507
- 王英杰, 刘国栋, 刘俊, 李梦东. 大量分离乳猪肝细胞的方法. *世界华人消化杂志* 1999;7:661-662
- 陈钟, 丁义涛, 张鹤云. 无血清培养基培养乳猪肝细胞的效果. *世界华人消化杂志* 2002;10:320-323
- 刘俊, 王英杰, 王宇明, 刘国栋. 分离人肝细胞的超低温保存. *第三军医大学学报* 2001;23:487-488
- Morsiani E, Brogli M, Galavotti D, Bellini T, Ricci D, Pazzi P, Puviani AC. Long-term expression of highly differentiated functions by isolated porcine hepatocytes perfused in a radial-flow bioreactor. *Artificial Organs* 2001;25:740-748
- Chen Z, Ding Y, Zhang H. Cryopreservation of suckling pig hepatocytes. *Annals Clin Laborat Sci* 2001;31: 391-398
- Benoist S, Sarkis R, Chafai N, Barbu V, Honiger J, Lakehal F, Becquemont L, Baudrimont M, Capeau J, Housset C, Nordlinger B. Survival and differentiation of porcine hepatocytes encapsulated by semiautomatic device and allotransplanted in large number without immunosuppression. *J Hepatol* 2001;35:208-216
- 陈钟, 丁义涛, 张鹤云. 乳猪肝细胞的低温保存. *世界华人消化杂志* 2002;10:173-176
- Unger JK, Catapano G, Horn NA, Schroers A, Gerlach JC, Rossaint R. Comparative analysis of metabolism of medium- and plasma perfused primary pig hepatocytes cultured around a 3-D membrane network. *Int J Artif Organs* 2000;23: 104-110
- Van der Laan LJ, Lockey C, Griffeth BC, Frasier FS, Wilson CA, Onions DE, Hering BJ, Long Z, Otto E, Torbett BE, Salomon DR. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 2000;407: 90-94
- Deng YM, Tuch BE, Rawlinson WD. Transmission of porcine endogenous retroviruses in severe combined immunodeficient mice xenotransplanted with fetal porcine pancreatic cells. *Transplantation* 2000;70:1010-1016
- Switzer WM, Shanmugan V, Chapman L, Heneine W. Polymerase chain reaction assays for the diagnosis of infection with the porcine endogenous retrovirus and the detection of pig cells in human and nonhuman recipients of pig xenografts. *Transplantation* 1999;68:183-188
- Blusch JH, Pjatiencie C, Matin U. Pig endogenous retroviruses and xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2002;9:242-251
- Tucker A, Belcher C, Moloo B, Bell J, Mazzulli T, Humar A, Hughes A, McArdle P, Talbot A. The production of transgenic pigs for potential use in clinical xenotransplantation: microbiological evaluation. *Xenotransplantation* 2002;9:191-202
- Kuddus R, Patzer JF 2nd, Lopez R, Mazariegos GV, Meighen B, Kramer DJ, Rao AS. Clinical and laboratory evaluation of the safety of a bioartificial liver assist device for potential transmission of porcine endogenous retrovirus. *Transplantation* 2002;73:420-429

- 27 Clemenceau B, Jegou D, Martignat L, Sai P. Microchimerism and transmission of porcine endogenous retrovirus from a pig cell line or specific pathogen-free pig islets to mouse tissues and human cells during xenografts in nude mice. *Diabetologia* 2002;45:4-23
- 28 Specke V, Schuurman HJ, Plesker R, Coulbaly C, Ozel M, Langford G, Kurth R, Denner J. Virus safety in xenotransplantation: first exploratory in vivo studies in small laboratory animals and non-human primates. *Transplant Immunol* 2002;9:281-288
- 29 Bartosch B, Weiss RA, Takeuchi Y. PCR-based cloning and immunocytological titration of infectious porcine endogenous retrovirus subgroup A and B. *J General Virol* 2002;83:2231-2240
- 30 Argaw T, Ritzhaupt A, Wilson CA. Development of a real time quantitative PCR assay for detection of porcine endogenous retrovirus. *J Virol Meth* 2002;106:97-106
- 31 王宇明. 重视我国生物人工肝的研究与开发. 中华传染病杂志 2001;12:1-2
- 32 杨继震. 生物人工肝的研究现状. 世界华人消化杂志 1999;7:185-187
- 33 徐小平, 高毅, 杨继震. 人工肝生物材料人肝细胞系 CL-1 的微载体培养. 世界华人消化杂志 1999;7:197-199
- 34 向德栋, 王英杰, 王宇明. 人工肝生物反应器研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:598-600
- 35 陈耀凯, 王宇明. 体外生物人工肝支持系统的疗效. 世界华人消化杂志 2002;10:234-236
- 36 胡还章, 徐小平, 高毅, 杨继震. 生物人工肝治疗猪实验性急性肝衰. 世界华人消化杂志 2001;9:139-143
- 37 薛国柱, 刘冰艳, 高毅, 杨继震, 黄祖汉. 体外培养肝细胞合成微量人清蛋白测定方法. 世界华人消化杂志 2000;8:473-474
- 38 胡还章, 徐小平, 高毅, 杨继震. 猪急性肝衰模型的建立. 世界华人消化杂志 2001;9:144-148

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 国科技论文产出世界第五 医药卫生期刊竞争力强劲

健康报 记者张荔子 2003-12-10 报到: 这是一连串枯燥的数字, 却是大量科研人员辛勤一年的收获. 12月9日, 中国科学技术信息研究所在京发布的2002年度中国科技论文统计结果显示, 我国科技论文产出由2001年全世界第六位上升为第五位, 在世界论文总数中首次超过5%. 论文数据统计取自3种在国际上颇具影响的检索工具: 《科学引文索引》(SCI)、《工程索引》(EI)和《科学技术会议录索引》(ISTP). 2002年我国科技论文产出比2001年增长19.9%, 达77395篇, 占世界论文总数的5.37%. 排在前四位的国家依次是美国、日本、英国和德国. 我国国际论文被引用数和被引用次数也分别增长31.6%和33.3%, 其中临床医学国内论文数量和被引用次数居各学科第一, 基础医学论文在国内被引用次数排名第四. 临床医学和基础医学论文较以前都显示出更多的国际合作. 分类统计还排列出高等院校、科研机构、医疗机构各类机构论文产出和被引用情况前20位, 其中解放军总医院连续3年获国内科技论文被引用数量全国医疗机构第一名, 第四军医大学西京医院连续3年获国内科技论文数量全国医疗机构第一. 10位国际论文高产作者和高引用作者中有3位是来自上海第二医科大学的沈志祥、陈国强和牛超, 他们因在《血液》发表的论文被广泛引用而分别名列第三、六、九. 共有387种医药卫生类期刊进入今年的影响因子分类排序, 其中影响因子超过1的期刊有12种, 除《世界华人消化杂志》和《世界胃肠病学杂志》外, 其余10种均为“中华牌”期刊. 此外, 刚选出的第二届中国百种杰出学术期刊中, 19种医药卫生类期刊及其主编榜上有名. 纵观2002年中国科技论文各项统计, 可以看到中国科技论文数量 and 影响力水平继续保持上升趋势, 但中国与世界科技强国还有很大差距. 据《国际竞争力度报告》评价, 中国科技竞争力在49个被评价的国家和地区中处于中等偏下的水平. 据SCI统计, 中国论文平均被引用率低于世界平均水平.



# 高氧诱导慢性肺疾病早产鼠肝肠组织的自由基变化

富建华, 薛辛东

富建华, 薛辛东, 中国医科大学附属第二医院儿科 辽宁省沈阳市 110004  
富建华, 女, 1965-11-12 生, 辽宁抚顺人, 满族. 1989 年中国医科大学本科毕业, 1999 年中国医科大学硕士研究生毕业, 现博士在读, 讲师, 主要从事新生儿肺损伤的基础研究.

辽宁省自然科学基金资助项目, No. 20022071

项目负责人: 薛辛东, 110004, 沈阳市和平区三好街 36 号, 中国医科大学附属第二医院儿科. xdxue@163.com

电话: 024-83955509 传真: 024-83955509

收稿日期: 2003-05-10 接受日期: 2003-06-02

## Changes of free radical of liver and intestine in premature rat with hyperoxia-induced chronic lung disease

Jian-Hua Fu, Xin-Dong Xue

Jian-Hua Fu, Xin-Dong Xue, Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 20022071

Correspondence to: Dr Xin-Dong Xue, Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital, China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. xdxue@163.com

Received: 2003-05-10 Accepted: 2003-06-02

## Abstract

AIM: To investigate dynamic changes of free radical of liver and intestine in premature infant with hyperoxia-induced chronic lung disease (CLD).

METHODS: Superoxide dismutase (SOD) activity, concentration of malondialdehyde (MDA) in the liver, intestine and lung specimen on days 1, 3, 7, 14 and 21 in 40 premature rat with hyperoxia-induced CLD and 40 control premature rats were assayed with double wavelength scanning by spectrophotometer.

RESULTS: In model group, level of MDA in the liver and intestine was increased on day 14 ( $122 \pm 9 \mu\text{mol/g}$  vs  $68 \pm 7 \mu\text{mol/g}$ ,  $117 \pm 9 \mu\text{mol/g}$  vs  $68 \pm 9 \mu\text{mol/g}$ ,  $P < 0.01$ ), and then was decreased but still maintained at a higher level than that in control group at day 21 ( $P < 0.05$ ). Level of MDA in the lung was increased on day 3, and reached a peak level on day 7 ( $94 \pm 12 \mu\text{mol/g}$  vs  $24 \pm 5 \mu\text{mol/g}$ ,  $P < 0.001$ ), and still maintained at a higher level than that in control group at day 21 ( $P < 0.01$ ), but there was no significant difference in SOD activity among any groups ( $P > 0.05$ ).

CONCLUSION: Damage of free radicals in the liver and intestine can be induced by CLD in premature infant, but the time of occurrence is very delayed in the lung.

Fu JH, Xue XD. Changes of free radical of liver and intestine in premature rat with hyperoxia-induced chronic lung disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(1):105-107

## 摘要

目的: 探讨高氧致早产鼠慢性肺疾病(CLD)发生中肝肠组织的自由基变化.

方法: 采用高浓度氧致早产鼠 CLD 模型为研究对象, 应用分光光度计比色法动态测定肝及肠组织超氧化物歧化酶(SOD)活性及脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的含量变化, 并同步观察肺组织上述指标的改变.

结果: 实验组 MDA 水平, 肝及肠组织 7 d 内无差异, 14 d 明显高于对照组(分别为  $122 \pm 9 \mu\text{mol/g}$  vs  $68 \pm 7 \mu\text{mol/g}$ ,  $117 \pm 9 \mu\text{mol/g}$  vs  $68 \pm 9 \mu\text{mol/g}$ ,  $P < 0.01$ ), 21 d 仍高于正常水平( $P < 0.05$ ); 而肺组织早期即明显升高, 7 d 达高峰( $94 \pm 12 \mu\text{mol/g}$  vs  $24 \pm 5 \mu\text{mol/g}$ ,  $P < 0.001$ ), 持续 1 wk 后逐渐下降, 21 d 时仍高于正常水平( $P < 0.01$ ). 两组肺、肝及肠组织 SOD 的活性均无差异( $P > 0.05$ );

结论: 高氧肺损伤时, 肝及肠组织同样发生自由基损伤, 但其发生时间明显滞后于肺组织.

富建华, 薛辛东. 高氧诱导慢性肺疾病早产鼠肝肠组织的自由基变化. 世界华人消化杂志 2004;12(1):105-107

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/105.asp>

## 0 引言

近年来, 随着早产极低体质量儿抢救存活率的提高, 因吸入高浓度氧而导致早产儿慢性肺疾病(chronic lung disease, CLD)的发生率也逐渐上升. 虽 CLD 的发生机制尚不清楚, 但肺部氧化应激反应而介导肺组织损伤的理论已被公认, 并成为影响 CLD 预后的关键因素之一. 而源于高氧肺损伤的 CLD 是否可启动其他器官的自由基损伤, 目前尚未见报道. 我们以高氧诱导 CLD 的早产鼠为研究对象, 探讨高氧致 CLD 早产儿肝、肠组织自由基变化.

## 1 材料和方法

1.1 材料 将孕 21 d 的 SD 大鼠(由中国医科大学实验动物部提供)行剖宫产, 新生的早产鼠(足月孕 22-23 d), 依据吸氧浓度( $\text{FiO}_2$ ), 随机分为实验组( $\text{FiO}_2$  0.90)和对照组( $\text{FiO}_2$  0.21). 每组均为 40 只. 实验组将早产的 SD 大鼠生后即置于氧箱中, 持续输入氧气, 维持  $\text{FiO}_2 > 0.90$  (用测氧仪监测),  $\text{CO}_2$  浓度  $< 0.5\%$  (用钠石灰吸收  $\text{CO}_2$ ), 温度 25-27  $^{\circ}\text{C}$ , 湿度 50-70%, 每天定时开箱 1 h,

添加水、饲料及更换垫料,并与对照组交换母鼠以避免因氧中毒致喂养能力下降<sup>[1-3]</sup>;对照组 FiO<sub>2</sub> 为 0.21(空气),具体方法及实验控制因素同实验组。

1.2 方法 每组分别于实验的 1 d, 3 d, 7 d, 14 d, 21 d 随机处死 8 只后,分离肺、肝肠组织。分别用预冷的生理盐水洗净残血,吸干水分,称 1 g 湿质量组织煎碎,于冰盒内超声粉碎匀浆,制成 100 g/L 的组织匀浆,低温离心后取上清液,分别按照 SOD 和 MDA 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所提供)要求,应用紫外/可见分光光度计(法国 500-P 型),测定 SOD 活性及 MDA 含量。

统计学处理 应用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学处理,所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 Dunnett t 检验。

## 2 结果

2.1 肝组织 SOD 活性和 MDA 含量 随吸氧时间的延长,两组肝组织 SOD 的活性无差异( $P > 0.05$ );而 MDA 的含量,吸入高氧 7 d 时,虽有所增高,但与对照组比较无差异( $P > 0.05$ ),14 d 明显高于对照组( $P < 0.01$ ),21 d 时虽有下降,但仍高于对照组( $P < 0.05$ ,表 1)。

表 1 肝组织 SOD 活性和 MDA 含量的动态变化( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

吸氧时间(d)	SOD(kNU/g)		MDA( $\mu\text{mol/L}$ )	
	实验组	对照组	实验组	对照组
1	157 $\pm$ 13	155 $\pm$ 24	55 $\pm$ 6	56 $\pm$ 5
3	176 $\pm$ 13	171 $\pm$ 11	65 $\pm$ 10	62 $\pm$ 3
7	169 $\pm$ 15	160 $\pm$ 14	69 $\pm$ 18	64 $\pm$ 7
14	178 $\pm$ 18	173 $\pm$ 26	122 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	68 $\pm$ 7
21	183 $\pm$ 31	182 $\pm$ 15	97 $\pm$ 8 <sup>b</sup>	63 $\pm$ 5

<sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。

2.2 肠组织 SOD 活性和 MDA 含量 随吸氧时间的延长,两组肠组织 SOD 的活性无差异( $P > 0.05$ );而 MDA 的含量,吸入高氧 14 d 时,高于对照组( $P < 0.01$ ),21 d 时虽有下降,但仍高于对照组( $P < 0.05$ ,表 2)。

表 2 肠组织 SOD 活性和 MDA 含量的动态变化( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

吸氧时间(d)	SOD(kNU/g)		MDA( $\mu\text{mol/L}$ )	
	实验组	对照组	实验组	对照组
1	133 $\pm$ 21	131 $\pm$ 18	67 $\pm$ 7	66 $\pm$ 9
3	125 $\pm$ 22	122 $\pm$ 15	65 $\pm$ 13	62 $\pm$ 10
7	129 $\pm$ 17	127 $\pm$ 23	70 $\pm$ 16	64 $\pm$ 6
14	127 $\pm$ 30	127 $\pm$ 21	117 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	68 $\pm$ 9
21	133 $\pm$ 21	132 $\pm$ 11	81 $\pm$ 11 <sup>b</sup>	63 $\pm$ 8

<sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。

2.3 肺组织 SOD 活性和 MDA 含量 随吸氧时间的延

长,实验组肺组织 SOD 的活性虽有逐渐增高的趋势,但与对照组比较无差异( $P > 0.05$ );而 MDA 的含量,吸入高氧 3 d 即明显高于对照组( $P < 0.01$ ),7 d 达高峰( $P < 0.001$ ),并持续至 14 d,21 d 时虽有下降,但仍高于对照组( $P < 0.01$ ,表 3)。

表 3 肺组织 SOD 活性和 MDA 含量的动态变化( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

吸氧时间(d)	SOD(kNU/g)		MDA( $\mu\text{mol/L}$ )	
	实验组	对照组	实验组	对照组
1	27 $\pm$ 3	28 $\pm$ 5	33 $\pm$ 13	26 $\pm$ 5
3	30 $\pm$ 3	29 $\pm$ 3	55 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	22 $\pm$ 4
7	69 $\pm$ 9	70 $\pm$ 11	94 $\pm$ 12 <sup>a</sup>	24 $\pm$ 5
14	74 $\pm$ 11	72 $\pm$ 6	86 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	24 $\pm$ 3
21	84 $\pm$ 7	82 $\pm$ 6	48 $\pm$ 7 <sup>b</sup>	24 $\pm$ 6

<sup>a</sup> $P < 0.001$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。

## 3 讨论

近年来,有关氧自由基及其介导的脂质过氧化反应在组织损伤中的作用倍受关注,并把组织 SOD 活性下降及 MDA 含量增高作为评价氧自由基损伤组织程度的重要指标<sup>[4-6]</sup>。大量的临床及动物实验已证实,新生儿缺氧、缺血可引起肝、肠组织的自由基损伤,而吸入高浓度氧后,除局部的肺组织病变外,能否引起其他器官(如肝、肠组织)的自由基损伤至今尚未见报道。

虽高氧致早产儿 CLD 的发生机制尚未清楚,但肺部氧化应激反应的程度已成为影响 CLD 发生及其预后的重要因素之一。有研究表明<sup>[5-11]</sup>,AOE 功能不足的早产儿,若长时间暴露于高氧环境中,氧自由基和活性氧(ROS)在肺组织内大量生成,超过抗氧化系统的清除能力,即氧化/抗氧化失衡,ROS 可通过损伤肺组织细胞的 DNA、脂质、蛋白质及糖类大分子等化合物,引起氧化应激性肺损伤;还发现最终发展成 CLD 的早产儿,生后最初几天内,其支气管肺泡灌洗液(BALF)中 MDA 的水平明显增高。我们的结果亦证实,吸高氧后, SOD 的活性与对照组无差异,而 MDA 水平早期即明显升高,7 d 达高峰,持续 1 wk 后逐渐下降,21 d 时仍高于正常水平,与上述报道相类似。在此基础上,我们观察了肝、肠组织的氧化应激状态,并发现 SOD 的活性与对照组无差异,而 MDA 水平,吸高氧后 7 d 内仍无明显变化,14 d 时却明显增高,21 d 虽有下降趋势,但还高于正常水平,该结果提示,高氧肺损伤时,肝、肠组织同样存在自由基损伤,但其发生时间明显滞后于肺组织,与文献报道衰老大鼠急性肺损伤诱导肝功能受损的研究结果相类似<sup>[12]</sup>。高氧肺损伤时,肝、肠组织自由基损伤的原因何在,目前还不清楚,推测可能与下列因素有关<sup>[13-17]</sup>:(1)肺部的氧化应激反应,MDA 大量生成并释放入血,继而引发肝、肠组织的自由基损伤;(2)高氧可促发肺部炎症反应,IL-6、IL-8 及 TNF- $\alpha$

等细胞因子释放入血, 并激活 PMN, 通过呼吸暴发、脱颗粒、释放氧自由基而损伤肝、肠组织; (3)高氧肺损伤后, 肺组织通气或换气功能障碍而导致低氧血症, 肝、肠组织可因供氧不足而发生自由基损伤. 上述的一种或多种因素相互作用, 从而介导肝、肠组织的自由基损伤. 但肝、肠组织的自由基损伤是否引起组织的病理生理变化, 尚需进一步深入研究.

总之, 吸入高浓度氧后, 肺组织首先发生氧化应激性反应, 而滞后的肝、肠组织的自由基变化使我们意识到: 源于吸入高氧而致的早产儿 CLD 是否可启动多器官的功能障碍? 如证实该假设, 对阐明 CLD 的发生机制、新防治措施的提出及降低早产儿 CLD 的发生率和致残率均具有重要临床意义和社会价值.

#### 4 参考文献

- 1 许峰, 霍泰辉, 翁颂铭, 杨默, 殷爱珍. 高浓度氧对早产鼠肺一氧化氮合酶基因表达的影响. *中华儿科杂志* 2002;40:37-39
- 2 容志惠, 常立文, 张谦慎. 维甲酸对新生大鼠高氧肺损伤的保护作用. *中华儿科杂志* 2003;41:299-230
- 3 Xu F, Fok TF, Yin J. Hyperoxia-induced lung injury in premature rat: description of a suitable model for the study of lung disease in newborns. *Chin Med J* 1998;111:619-624
- 4 宋薇薇, 富建华. 子宫内缺血缺氧及再灌注中胎鼠脑组织内质网及线粒体 ATP 酶的动态变化. *中华妇产科杂志* 2002;37:146-149
- 5 富建华, 薛辛东. 高浓度氧诱导早产儿肺损伤的研究现状. *中国当代儿科杂志* 2003;5:78-81
- 6 Saugstad OD. Chronic lung disease: oxygen dogma revisited. *Acta Paediatr* 2001;90:113-115
- 7 Saugstad OD. Bronchopulmonary dysplasia-oxidative stress and antioxidants. *Semin Neonatol* 2003;8:39-49
- 8 The STOP-ROP Multicenter Study Group. Supplemental therapeutic oxygen for prethreshold retinopathy of prematurity (STOP-ROP), a randomized, controlled trial: primary outcomes. *Pediatrics* 2000;105:295-310
- 9 Davis JM, Richter SE, Biswas S. Long-term follow-up of premature infants treated with prophylactic, intratracheal recombinant human CuZn superoxide dismutase. *J Perinatol* 2000;20:213-216
- 10 Buss IH, Darlow BA, Winterbourn CC. Elevated lipid carbonyls and lipid peroxidation products correlating with myeloperoxidase in tracheal aspirates from premature infants. *Pediatr Res* 2000;47:640-645
- 11 Winterbourn CC, Chan T, Buss IH, Inder TE, Mogridge N, Darlow BA. Protein carbonyls and lipid peroxidation products as oxidation markers in preterm infant plasma: associations with chronic lung disease and retinopathy and effects of selenium supplementation. *Pediatr Res* 2000;48:84-90
- 12 杜烨玮, 张健, 孙仁宇, 王士雯. 衰老大鼠急性肺损伤诱导肝功能受损的研究. *中华结核和呼吸杂志* 2002;25:744-747
- 13 张晓慧, 常立文. 促炎因子与高氧肺损伤. *国外医学儿科学分册* 2001;28:141-143
- 14 Allen GL, Menendez IY, Ryan MA, Mazor RL, Wispe JR. Hyperoxia synergistically increases TNF-alpha-induced interleukin-8 gene expression in A549 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278:L253-260
- 15 Lindsay L, Oliver SJ, Freeman SL, Josien R, Krauss A, Kaplan G. Modulation of hyperoxia-induced TNF-alpha expression in the newborn rat lung by thalidomide and dexamethasone. *Inflammation* 2000;24:347-356
- 16 Li YX, Oliver SJ, Freeman SL. Ureaplasma urealyticum-induced production of proinflammatory cytokines by macrophages. *Pediatr Res* 2000;48:114-119
- 17 Jonsson B, Li YH, Noack G. Downregulatory cytokines in tracheobronchial aspirate fluid from infant with chronic lung disease of prematurity. *Acta Paediatr* 2000;89:1375-1380

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 2002 年度总被引频次较高的 20 种期刊

排名	单位	总被引频次	排名	单位	总被引频次
1	世界华人消化杂志	4151	11	中国实用外科杂志	2044
2	科学通报	3321	12	第四军医大学学报	2025
3	植物学报	2927	13	中国中西医结合杂志	2003
4	物理学报	2870	14	中华医学杂志	2002
5	高等学校化学学报	2707	15	中草药	1999
6	中华外科杂志	2653	16	中国临床康复	1984
7	中华骨科杂志	2463	17	中华内科杂志	1902
8	分析化学	2268	18	中华儿科杂志	1863
9	生态学报	2257	19	中华妇产科杂志	1838
10	中华放射学杂志	2241	20	中华结核和呼吸杂志	1812

中国科学技术信息研究所 2003-12-09 发布 2002 年度中国科技论文统计结果

# 阿魏酸钠抗大鼠乙酸性结肠炎损伤的作用

刘少平, 董卫国, 罗和生, 余保平, 于皆平

刘少平, 董卫国, 罗和生, 余保平, 于皆平, 武汉大学人民医院消化内科  
湖北省武汉市 430060  
刘少平, 男, 1973-11-08 生, 湖北省黄石市人, 汉族, 武汉大学人民医院消化内科硕士研究生, 主要从事炎症性肠病的防治研究.  
湖北省科技攻关项目, No. 2001AA308B  
项目负责人: 董卫国, 430060, 湖北省武汉市解放路 238 号, 武汉大学人民医院消化内科. dongwg@public.wh.hb.cn  
电话: 02788041919-6448  
收稿日期: 2003-04-07 接受日期: 2003-05-17

## Protective effects of sodium ferulate on injury in acetic acid-induced rat colitis

Shao-Ping Liu, Wei-Guo Dong, He-Sheng Luo, Bao-Ping Yu, Jie-Ping Yu

Shao-Ping Liu, Wei-Guo Dong, He-Sheng Luo, Bao-Ping Yu, Jie-Ping Yu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, 238 Jiefang Road, Wuhan 430060, Hubei Province, China  
Correspondence to: Wei-Guo Dong, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, 238 Jiefang Road, Wuhan 430060, Hubei Province, China. dongwg@public.wh.hb.cn  
Received: 2003-04-07 Accepted: 2003-05-17

## Abstract

**AIM:** To study the effects of sodium ferulate on acetic acid-induced rat colitis and its mechanism.

**METHODS:** The colitis model of rats was produced by intracolonic enema with acetic acid. The experiment animals were divided into 5 groups: normal group, model group, SF groups (200 mg/kg, 400 mg/kg, 800 mg/kg), and treated intracolonic with saline and SF respectively once per day for 7 days. At the end of the experiment, the colon mucosa damage index (CMDI) and the occult blood test (OBT) were evaluated. The contents of MDA, NO, PGE<sub>2</sub>, and TXB<sub>2</sub>, the activities of myeloperoxidase (MPO) and SOD, the expression of COX-2 and NF-κBp65 in the rat colon were detected. Platelet agglutinability was also measured.

**RESULTS:** The extents of CMDI and OBT, the contents of MDA, NO, PGE<sub>2</sub> and TXB<sub>2</sub>, the activity of MPO, the expression of COX-2 and NF-κBp65 in the colon and the platelet agglutinability in the model group were higher than those in normal group, while the activity of SOD was lower than that in normal group. SF could alleviate the CMDI and OBT, and ameliorate the abnormality of these detected indexes in a dose-dependent manner.

**CONCLUSION:** Treatment with SF intracolonic can relieve the inflammation reaction, attenuate the colon mucosal damage in the rat colitis through resisting oxidative stress, restraining arachidonic acid metabolism, platelet activation and the expression of NF-κB.

Liu SP, Dong WG, Luo HS, Yu BP, Yu JP. Protective effects of sodium ferulate on injury in acetic acid-induced rat colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):108-111

## 摘要

**目的:** 研究SF对大鼠乙酸性结肠炎的作用及其机制。

**方法:** 利用乙酸灌肠制备大鼠结肠炎模型。实验设正常对照组, 模型对照组, SF 给药组(200 mg/kg, 400 mg/kg, 800 mg/kg), 每天灌肠给药 1 次, 用药 7 d。实验结束后评价大鼠结肠黏膜损伤指数(CMDI)与粪便隐血实验(OBT)、检测结肠组织 MDA, NO, PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> 含量; MPO, SOD 活性; COX-2, NF-κBp65 表达水平及血小板聚集率。

**结果:** 模型组大鼠 CMDI, OBT 评分显著增加; MDA, NO, PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> 含量, MPO 活性, COX-2 与 NF-κBp65 表达水平及血小板聚集率显著升高; 而 SOD 活性显著降低。SF 灌肠改善模型组大鼠 CMDI, OBT 评分; 使结肠组织 MDA, NO, PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> 含量, MPO 活性, 血小板聚集率不同程度降低, SOD 活性升高, 同时下调 COX-2 与 NF-κBp65 的过度表达。SF 用药呈一定量效关系。

**结论:** SF 通过抗氧化, 抑制血小板活化、花生四烯酸代谢及 NF-κB 表达, 缓解大鼠乙酸性结肠炎炎症反应, 减轻结肠黏膜损伤。

刘少平, 董卫国, 罗和生, 余保平, 于皆平. 阿魏酸钠抗大鼠乙酸性结肠炎损伤的作用. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):108-111  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/108.asp>

## 0 引言

阿魏酸钠(sodium ferulate, SF)是传统中药当归的主要药性成分之一, 具有抑制花生四烯酸(AA)代谢、拮抗组胺、降低血管通透性、清除自由基、抑制脂质过氧化、改善血液循环、抑制血小板聚集活化及血栓形成、抑制巨噬细胞活化等广泛药理作用<sup>[1-5]</sup>。炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)中花生四烯酸代谢紊乱、氧自由基损伤、血小板活化、微循环障碍等均是重要的致病环节<sup>[6-10]</sup>。为探讨 SF 是否通过作用于以上环节对 IBD 产生抗炎、抗损伤保护作用及其机制, 我们在建立大鼠乙酸性结肠炎模型的基础上灌肠给药, 观察 SF 对其氧自由基水平、血小板活化、花生四烯酸代谢及 NF-κB 表达的影响, 并评价结肠损伤程度。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康 Sprague-Dawley 大鼠, ♀ ♂ 兼用, 体重(250 ± 30 g), 由湖北预防医学科学院实验动物中心提供; SF(注射用当归素)由武汉大学中南医院制药厂

生产, 批号 2011219; 分析纯乙酸, 武汉生化试剂厂产品; SOD、MDA、NO、MPO 检测试剂盒均购于南京建成生物研究所; PGE<sub>2</sub>、TXB<sub>2</sub> 放免试剂盒由解放军总院科技开发中心放免研究所提供; COX-2 兔 IgG 多抗、NF-κBp65 兔 IgG 多抗及 S-P 免疫组化试剂盒均由北京中山生物技术有限公司提供, 余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法 参照文献[11]制备动物模型, 乙醚麻醉固定大鼠, 橡胶输液管由肛门轻缓插入结肠内约 8 cm, 推入 8 mL/L 乙酸 2 mL, 作用 20 s 后, 立即注入生理盐水 5 mL, 冲洗 2 次。实验设正常对照组、模型对照组、SF 给药组(200 mg/kg, 400 mg/kg, 800 mg/kg), 每组 8 只, 均灌肠给药, 每日 1 次, 给药时间从制备模型后 24 h 开始, 用药 7 d。正常对照组及模型对照组均给予等量生理盐水灌肠。实验完成后用 OB 试纸检测粪便隐血实验(OBT), 显色评分标准按 OB 试纸说明进行; 大鼠摘眼球取血 2 mL, 肝素抗凝, 2 h 内采用 SH-93 型智能血液凝聚仪(上海生化仪器厂产品)检测血小板聚集率; 处死动物评价结肠黏膜损伤指数(CMDI), 评分标准为: 0 = 无损伤; 1 = 轻度充血、水肿, 表面光滑, 无糜烂或溃疡; 2 = 充血水肿, 黏膜粗糙呈颗粒状, 有糜烂或肠粘连; 3 = 高度充血水肿, 黏膜表面有坏死及溃疡形成, 溃疡最大纵径小于 1 cm, 肠壁增厚或表面有坏死及炎症; 4 = 在 3 分基础上溃疡最大纵径大于 1 cm, 或全肠壁坏死。在距肛门 7-9 cm 处取适量结肠新鲜标本, 快速置于液氮中速冻, 供检测 SOD、MDA、NO、MPO、PGE<sub>2</sub>、TXB<sub>2</sub>, 检测操作按相应试剂盒说明进行; 另取结肠组织约 10 mg 制成石蜡切片, COX-2 与 NF-κBp65 免疫组化检测步骤严格按试剂盒说明进行, 均以非免疫性山羊血清封闭非特异性抗原, 一抗分别为 1:120, 1:200 的 COX-2 与 NF-κBp65 兔 IgG 多抗, 二抗均为生物素化羊抗兔 IgG 工作液, 以 PBS 代替一抗做阴性对照, 以细胞核蓝色为阴性, 胞质内或核膜上呈棕黄色为阳性。每张切片选取 10 个 400 倍视野, 采用全自动图像分析仪与 HPIAS-2000 图像分析软件, 分别扫描记录阳性细胞的吸光度 A 值, 取其平均值, 作为此切片 COX-2, NF-κBp65 的相对含量。

统计学处理 所有数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 采用 SPSS 医学统计软件处理, 两组间均数差异的比较采用 t 检验。

## 2 结果

2.1 结肠组织损伤和炎症反应程度 模型组大鼠反映结肠损伤与炎症反应程度的指标 CMDI、OBT 与 MPO 活性显著升高( $P < 0.01$ ), SF 灌肠剂量依赖性使三者降低, 中、大剂量组三者变化有显著性差异( $P < 0.05$ , 或  $P < 0.01$ , 表 1); 结肠标本 HE 染色显示, 模型组黏膜充血水肿, 溃疡形成, 大量炎性细胞浸润, 腺体中杯状细胞显著减少而大剂量 SF 用药组以上病理组织表现明显缓解(图 1), 这些表明 SF 对大鼠乙酸性结肠炎具有

明显抗炎、抗损伤作用。

2.2 结肠组织氧自由基水平与血小板功能 模型组大鼠 NO 与 OFR 代谢的主要产物 MDA 含量及血小板聚集率显著升高( $P < 0.01$ ), 清除 OFR 的主要酶 SOD 活性显著降低( $P < 0.01$ ), SF 灌肠使 MDA, NO 含量及血小板聚集降低, SOD 活性升高, 呈现一定量效关系, 中、大剂量组各指标变化均有显著性差异( $P < 0.05$ , 或  $P < 0.01$ , 表 2)。

2.3 结肠组织花生四烯酸代谢与 NF-κB p65 表达 模型组大鼠 PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> 含量及 COX-2, NF-κBp65 表达均显著升高( $P < 0.01$ ), SF 灌肠剂量依赖性降低前二者的含量, 下调 COX-2, NF-κBp65 的表达水平, 用药各组各指标变化均有显著性差异( $P < 0.05$ , 或  $P < 0.01$ , 见表 3, 图 2, 3)。

表 1 大鼠 CMDI, OBT 及结肠组织 MPO 活性 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

分组	剂量(mg/kg)	CMDI	OBT	MPO(nkat/g)
正常对照	-	0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	413 ± 192 <sup>b</sup>
模型对照	-	2.9 ± 0.6	3.8 ± 0.8	1 635 ± 448
SF	200	2.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	3.0 ± 0.9	1 325 ± 640
	400	1.8 ± 0.8 <sup>b</sup>	1.9 ± 0.8 <sup>a</sup>	1 064 ± 508 <sup>a</sup>
	800	1.6 ± 0.9 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.7 <sup>b</sup>	603 ± 237 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs 模型对照组。

表 2 大鼠结肠组织氧化指标及血小板聚集率 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

分组	剂量 (mg/kg)	SOD (μkat/g)	MDA (nmol/g)	NO (nmol/g)	血小板聚集率(%)	
					1 min	最大
正常对照	-	602 ± 32 <sup>b</sup>	9.2 ± 3.8 <sup>b</sup>	176 ± 45 <sup>b</sup>	15.7 ± 5.4 <sup>b</sup>	32.8 ± 6.1 <sup>b</sup>
模型对照	-	472 ± 20	57.5 ± 12.4	331 ± 92	43.2 ± 7.5	51.3 ± 6.8
SF	200	527 ± 64 <sup>a</sup>	43.3 ± 13.5 <sup>a</sup>	256 ± 54	37.1 ± 7.8	46.2 ± 5.4
	400	536 ± 71 <sup>a</sup>	41.8 ± 10.6 <sup>a</sup>	247 ± 42 <sup>a</sup>	35.5 ± 4.9 <sup>a</sup>	43.8 ± 4.6 <sup>a</sup>
	800	554 ± 62 <sup>b</sup>	37.3 ± 8.6 <sup>b</sup>	216 ± 33 <sup>b</sup>	30.6 ± 5.2 <sup>b</sup>	40.6 ± 4.8 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs 模型对照组。

表 3 大鼠结肠组织 PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> 含量及 COX-2, NF-κB 表达 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

分组	剂量 (mg/kg)	PGE <sub>2</sub> (ng/g)	TXB <sub>2</sub> (ng/g)	COX-2 (A)	NF-κBp65 (A)
正常对照	-	43 ± 33 <sup>b</sup>	9 ± 4 <sup>b</sup>	0.042 ± 0.013 <sup>b</sup>	0.039 ± 0.012 <sup>b</sup>
模型对照	-	186 ± 96	34 ± 14	0.296 ± 0.028	0.314 ± 0.026
SF	200	91 ± 52 <sup>a</sup>	23 ± 12	0.147 ± 0.021 <sup>b</sup>	0.279 ± 0.022 <sup>a</sup>
	400	77 ± 27 <sup>b</sup>	18 ± 15 <sup>a</sup>	0.064 ± 0.018 <sup>b</sup>	0.215 ± 0.019 <sup>b</sup>
	800	58 ± 24 <sup>b</sup>	16 ± 9 <sup>b</sup>	0.056 ± 0.014 <sup>b</sup>	0.189 ± 0.016 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs 模型对照组。



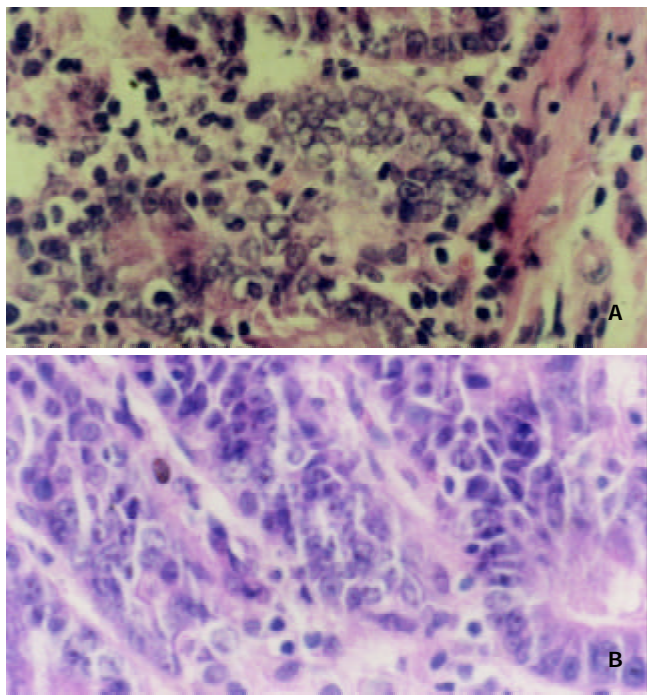


图1 大鼠结肠组织病理表现 HE  $\times 400$ . A: 模型组; B: 大剂量 SF 组.

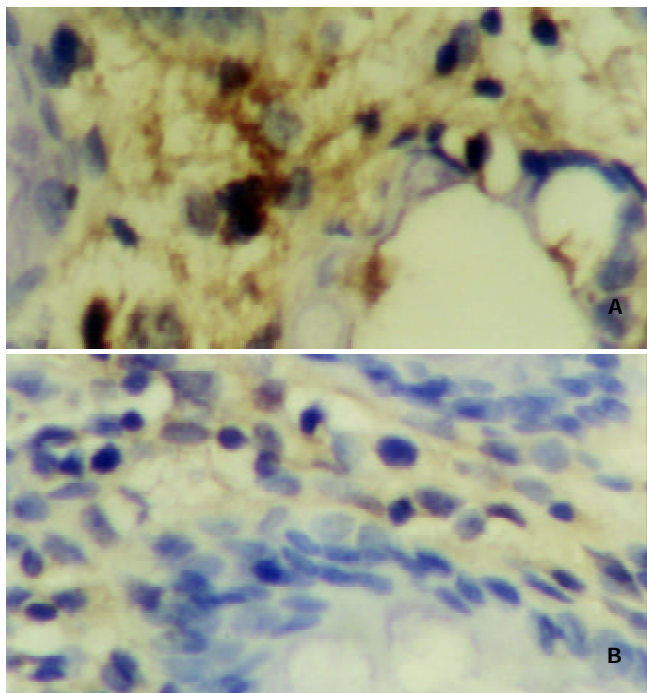


图2 COX-2 在大鼠结肠组织表达 S-P  $\times 400$ . A: 模型组; B: 大剂量 SF 组.

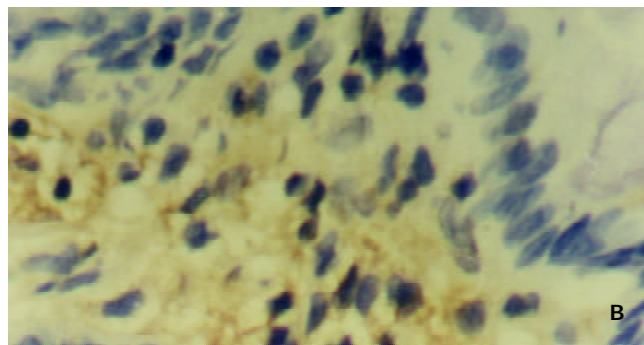
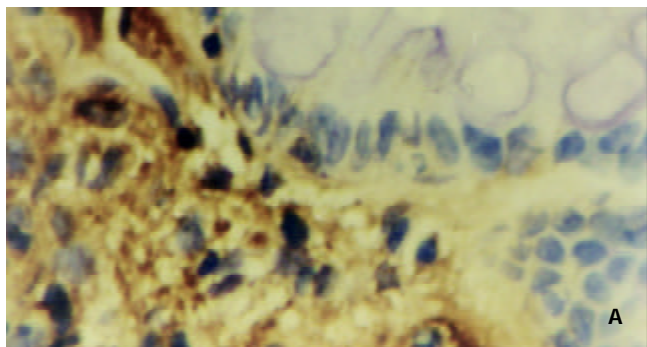


图3 NF- $\kappa$ Bp65 在大鼠结肠组织表达 S-P  $\times 400$ . A: 模型组; B: 大剂量 SF 组.

### 3 讨论

乙酸诱导大鼠结肠炎的主要机制与结肠黏膜化学损伤、血管通透性增加、炎症递质激活、溶解纤维蛋白活性增加及凝血机制受干扰相关. 这种大鼠结肠炎模型因其发病机制和病理表现与人类 IBD 相似而常用于 IBD 治疗药物的筛选与评价<sup>[11-12]</sup>. IBD 肠黏膜中氧自由基 (OFR) 水平明显升高, 抗氧化系统存在缺陷, 大量 OFR 对自身组织产生攻击作用, 且可激活炎症递质, 加重炎症反应<sup>[13-16]</sup>. 弱氧自由基 NO 不仅趋化中性粒细胞和单核细胞, 且可与炎症细胞产生的超氧阴离子反应生成具有高度细胞毒性的过氧亚硝酸盐, 破坏细胞结构与功能; 过量的 NO 还可使血管扩张, 通透性增加, 有助于炎症的始动与发展<sup>[17-18]</sup>. 本研究显示模型组大鼠氧自由基大量生成, SF 灌肠用药明显降低其结肠组织 MDA、NO 含量, 升高 SOD 活性, 表现出较强的抗 OFR 损伤致炎作用.

IBD 患者血小板处于激活状态, 直接参与 IBD 致病过程. 活化的血小板不仅促进血小板栓塞性疾病发生与肠系膜血管多灶性微梗死形成, 还可释放多种炎症递质, 如血小板活化因子、血栓素等, 亦能产生氧自由基<sup>[19-22]</sup>. 血小板聚集率升高是血小板激活化的代表性指标<sup>[23]</sup>. 本研究显示模型组大鼠血小板明显处于活化状态, SF 灌肠用药降低血小板聚集率, 表明其可通过抑制血小板活化, 减轻模型组大鼠炎症反应, 同时改善微循环. AA 代谢异常是 IBD 致病的重要环节<sup>[7, 24]</sup>. 作为 AA 代谢生成重要炎症递质  $PGE_2$ ,  $TXB_2$  的主要限速酶 COX-2 在 IBD 肠组织中迅速大量增加, 合成大量病理性  $PGE_2$ ,  $TXB_2$ .  $TXB_2$  亦是强烈的血管收缩剂, 其含量增加可导致组织循环障碍, 进一步加重炎症反应, 抑制 AA 代谢可明显缓解 IBD 炎症程度<sup>[25-26]</sup>. 本研究中模型组大鼠结肠组织 COX-2 表达显著升高, AA 代谢过度,  $PGE_2$ 、 $TXB_2$  显著增加, SF 灌肠用药明显减少二者含量, 有效缓解炎症反应, 机制可能为 SF 显著下调了 COX-2 过度表达, 从而抑制 AA 代谢.

本研究进一步显示, SF 的抗炎损伤作用可能与影响 NF- $\kappa$ B 表达相关. 大量研究表明 NF- $\kappa$ B 在 IBD 炎症反应中占有核心地位, 其激活表达可促进多种炎性



因子、趋化因子、黏附分子的生成, 亦可启动分别是合成 NO 与 PGE<sub>2</sub> 的重要限速酶 iNOS, COX-2 的过度表达; NF- $\kappa$ B 还可直接活化 TNF 受体相关基因 (TRAF1, TRAF2)、Bcl-2 同源体 (A1/Bfl-1, IEX-1L) 等抗细胞凋亡基因, 抑制 IBD 中多种炎症细胞的凋亡, 导致其功能周期延长, 加重组织炎症损伤. 抑制 NF- $\kappa$ B 可成为治疗 IBD 的有效靶点<sup>[27-34]</sup>. NF- $\kappa$ B 家族成员中, p65 亚单位是含有活性转录区域的主要促炎亚单位, 其活化与氧化剂、细胞内 Ca<sup>2+</sup> 水平升高密切相关<sup>[32, 35-36]</sup>. 本研究中模型组大鼠 NF- $\kappa$ Bp65 表达显著增加, 可能是结肠组织中大量生成的 OFR 对其产生激活作用, 进而上调 iNOS、COX-2 表达, 促进 NO 生成与 AA 代谢. SF 灌肠明显抑制 NF- $\kappa$ Bp65 过度表达, 削弱其多途径致炎损伤作用, 有效缓解炎症反应. SF 抑制 NF- $\kappa$ B 的分子机制可能为 SF 具有浓度依赖性 Ca<sup>2+</sup> 通道阻滞作用, 可抑制细胞 Ca<sup>2+</sup> 内流, 降低胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度, 呈现 NF- $\kappa$ B 活化抑制作用; SF 亦可能通过其较强抗氧化与直接清除羟自由基作用, 抑制氧自由基对 NF- $\kappa$ B 的激活<sup>[1-2, 35]</sup>.

#### 4 参考文献

- Kikuzaki H, Hisamoto M, Hirose K, Akiyama K, Taniguchi H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J Agric Food Chem* 2002;50:2161-2168
- Zhang ZH, Yu SZ, Li GS, Zhao BL. Influence of sodium ferulate on human neutrophil-derived oxygen metabolites. *Chin Pharmacol Bull* 2001;17:515-517
- Zhou JY, Fan Y, Han ZF, Wu DZ, Hu ZB. Influence of ferulic acid sodium on the enhance of endothelial permeability induced by histamine. *Chin Pharmacol Bull* 2000;16:664-666
- Liu SP, Dong WD, Wu DF, Luo HS, Yu JP, Mei Q. Effects of sodium ferulate on nitric oxide synthase and cyclooxygenase in colon of colitis rats. *Chin Pharmacol Bull* 2003;19:571-574
- Xie L, Yang LH, Li XH. Research on the pharmacologic effects of Angelica Sinensis. *Res Traditional Chin Med* 2000;16:56-58
- Jiang XL, Quan QZ, Liu T, Dong XC. Recent advances in research of ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:216-218
- Xia B. Etiology and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:245-250
- Xu G, Tian KL, Liu GP, Zhong XJ, Tang SL, Sun YP. Clinical significance of plasma D-dimer and von Willebrand factor levels in patients with ulcer colitis. *World J Gastroenterol* 2002;8:575-576
- Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001;7:175-184
- Jiang XL, Quan QZ, Wan ZK. Diagnosis, typing and therapy of ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:332-334
- Mei Q, Yu JP, Xu JM, Xiang L. The effects of melatonin on the immunological function of colitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:193-196
- Li L, Wang ZL, Ke JT, Zhang M, Shao JF, Zhong CN. Select animal models for experimental colitis model. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:584-585
- D'Odorico A, Bortolan S, Cardin R, D'Inca R, Martines D, Ferronato A, Sturniolo GC. Reduced plasma antioxidant concentrations and increased oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:1289-1294
- Kriegelstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Salter JW, Russell JM, Schuermann G, Grisham MB, Ross CR, Granger DN. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J Exp Med* 2001;194:1207-1218
- Huycke MM, Abrams V, Moore DR. Enterococcus faecalis produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DAN. *Carcinogenesis* 2002;23:529-536
- Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, Grisham MB. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 2002;33:311-322
- Bai AP, Shen ZX, Yu JP, Yu BP, Luo Y. Nitric oxide and the acute injury in colitis model. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:900-901
- Zhang K, Deng CS, Zhu YQ, Yang YP, Zhang YM. Significance of nuclear factor- $\kappa$ B, cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human ulcerative colitis tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:575-578
- Suzuki K, Sugimura K, Hasegawa K, Yoshida K, Suzuki A, Ishizuka K, Ohtsuka K, Honma T, Narisawa R, Asakura H. Activated platelets in ulcerative colitis enhance the production of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:1301-1306
- Kapsoritakis AN, Koukourakis MI, Sfiridaki A, Potamianos SP, Kosmadaki MG, Koutroubakis IE, Kouroumalis EA. Mean platelet volume: a useful marker of inflammatory bowel disease activity. *Am J Gastroenterol* 2001;96:776-781
- Cui HF, Jiang XL. Treatment of corticosteroid-resistant ulcerative colitis with oral low molecular weight heparin. *World J Gastroenterol* 1999;5:448-450
- Carty E, MacEay M, Rampton DS. Inhibition of platelet activation by 5-aminosalicylic acid in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:1169-1179
- Carty E, Macey M, McCartney SA, Rampton DS. Ridogrel, a dual thromboxane synthase inhibitor and receptor antagonist: anti-inflammatory profile in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:807-817
- Gil A. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomed Pharmacother* 2002;56:388-396
- McCowen KC, Ling PR, Bistrian BR. Arachidonic acid concentrations in patients with Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1008-1015
- Carty E, De Brabander M, Feakins RM, Rampton DS. Measurement of in vivo rectal mucosal cytokine and eicosanoid production in ulcerative colitis using filter paper. *Gut* 2000;46:487-492
- Dijkstra G, Moshage H, Jansen PL. Blockade of NF-kappaB activation and donation of nitric oxide: new treatment options in inflammatory bowel disease? *Scand J Gastroenterol Suppl* 2002;236:37-41
- Li JH, Yu JP, He XF, Xu XM. Expression of NF- $\kappa$ B in rats with TNBS-induced ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:214-218
- Potoka DA, Upperman JS, Nadler EP, Wong CT, Zhou X, Zhang XR, Ford HR. NF-kappaB inhibition enhances peroxynitrite-induced enterocyte apoptosis. *J Surg Res* 2002;106:7-14
- Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2001;107:135-142
- Jobin C, Sartor RB. NF-kappaB signaling proteins as therapeutic targets for inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:206-213
- Yamamoto Y, Gaynor RB. Role of the NF-kappaB pathway in the pathogenesis of human disease states. *Curr Mol Med* 2001;58:287-296
- Karmeli F, Cohen P, Rachmilewitz D. Cyclo-oxygenase-2 inhibitors ameliorate the severity of experimental colitis in rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:223-231
- Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res* 2001;481:243-268
- Reifen R, Nur T, Ghebermeskel K, Zaiger G, Urizky R, Pines M. Vitamin A deficiency exacerbates inflammation in a rat model of colitis through activation of nuclear factor-kappaB and collagen formation. *J Nutr* 2002;132:2743-2747
- Liu SQ, Yu JP, Luo HS, Ran ZX. Effects of Ginkgo biloba extract on expression of NF- $\kappa$ B in rat liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:922-926

# 便秘型肠易激综合征新概念模型的建立

彭丽华, 杨云生, 孙 刚, 王巍峰

彭丽华, 杨云生, 孙刚, 王巍峰, 中国人民解放军总医院消化内科  
北京市 100853  
彭丽华, 女, 1972 年生, 北京市人, 汉族, 学士, 主治医师, 主要从事消化系统疾病的临床工作和胃肠功能性及动力疾病的研究。  
项目负责人: 杨云生, 100853, 北京市复兴路 28 号, 中国人民解放军总医院消化内科. sunny888@medmail.com.cn  
电话: 010-66939747  
收稿日期: 2003-06-21 接受日期: 2003-08-18

## A new model of constipation-predominant irritable bowel syndrome in rats

Li-Hua Peng, Yun-Sheng Yang, Gang Sun, Wei-Feng Wang

Li-Hua Peng, Yun-Sheng Yang, Gang Sun, Wei-Feng Wang, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China  
Correspondence to: Yun-Sheng Yang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China.  
sunny888@medmail.com.cn  
Received: 2003-06-21 Accepted: 2003-08-18

### Abstract

**AIM:** To set up a new model of constipation-predominant irritable bowel syndrome (C-IBS) in rats and to study the possible pathogenesis of IBS.

**METHODS:** Wistar rats of postnatal four weeks were divided into three groups: group A (stomach irritation with 0-4 °C cool water), group B (stomach irritation with room temperature water) and group C (control group). Both of rats in groups A and B received stomach irritation daily for fourteen days. In these fourteen days, the feces of rats in three groups were collected and the feces granules were counted, moisture contents of the feces were calculated daily during 0 to 3 hours and 3 to 24 hours, respectively. After suspending the irritation of cool water, the granules and moisture contents of feces in corresponding periods were observed for the following fourteen days continuously in order to evaluate the degree of constipation. Then perception thresholds and the number of abdominal withdrawal reflexes (AWR) were recorded during rectal balloon distention in order to evaluate bowel sensitivity. The ileocecal junction and colon samples were stained by haematoxylin-eosin (HE) for routine pathologic examination and the improved toluidine blue method for mast cells, respectively. The expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT) on bowel was showed by immunohistochemical staining, and analyzed semi-quantitatively by computer color image analyzer.

**RESULTS:** The granules and moisture contents of feces during 0 to 3 hours after cool water irritation were significantly higher in group A than in groups B and C ( $P < 0.05$ ), but the differences disappeared after suspending irritation ( $P > 0.05$ ). The granules and moisture contents of feces during 3 to 24 hours after cool water irritation were significantly lower in group A than in groups B and C ( $P < 0.05$ ).

After suspending stomach irritation with cool water, the tendency lasted at least for fourteen days. The perception threshold of group A was slightly higher than that of group C during rectal balloon distention, but there was no significant difference ( $P > 0.05$ ). The number of AWR to the lower balloon content (1.0 mL) was much lower in group A than in group C ( $P < 0.05$ ), but the AWR to the balloon distention at 1.5ml and 2.0ml were similar between these two groups. In group A, the number of mast cells (MCs) in the ileocecal junction and colon were significantly higher than those of group C ( $P < 0.05$ ), and the areas of 5-HT positive cells were markedly higher than those of group C ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The model of C-IBS induced by stomach irritation with cool water is stable for constipation and characterized by decreased bowel sensitivity, increased MCs and 5-HT immunoreactive positive cells, which satisfactorily imitates the bowel features of C-IBS patients and shows a new concept model for IBS.

Peng LH, Yang YS, Sun G, Wang WF. A new model of constipation-predominant irritable bowel syndrome in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):112-116

### 摘要

**目的:** 以肠易激综合征(IBS)模型新概念建立一种便秘型IBS大鼠模型, 为 IBS 的研究提供新的条件。

**方法:** 出生后 4 wk Wistar 大鼠, 随机分为冰水灌胃组、常温水灌胃组及正常对照组。前两组每日分别给予冰水及常温水灌胃 14 d, 观察灌胃期间三组大鼠灌胃后 3 h 内和 3-24 h 间的大便粒数及含水量变化, 停止灌胃后继续观察 14 d 对应时间段的大便粒数及含水量变化以评价其便秘。28 d 观察结束后给予直肠内球囊扩张, 测定引起腹部收缩反射的最小容量阈值及直肠内球囊不同容量扩张时腹部收缩反射的次数, 评价其肠道对扩张刺激的敏感性。各组动物回盲部及结肠肥大细胞(MC)研究应用甲苯胺蓝染色、计数。5-羟色胺(5-HT)在肠道的表达应用免疫组织化学染色及彩色病理图像分析系统进行半定量分析。

**结果:** 冰水灌胃组大鼠灌胃后 3h 内大便粒数及含水量较常温水灌胃组和正常对照组明显增加( $P < 0.05$ ); 停止灌胃后三组大鼠对应时间段 3h 内大便粒数及含水量无明显差异( $P > 0.05$ )。冰水灌胃组前 14 d 灌胃后 3-24 h 间的大便粒数及含水量均较常温水灌胃组和正常对照组明显减少( $P < 0.05$ ); 停止灌胃后, 此趋势继续保持至第 28 d 实验结束。直肠内球囊扩张时, 冰水灌胃组引起腹部收缩的最小容量阈值略高于正常对照组, 但统计学比较无明显差异( $P > 0.05$ )。直肠球囊体积 1.0 mL 低容量扩张时冰水灌胃组 3 min 内腹部收缩反

射次数明显低于正常对照组( $P < 0.05$ ); 球囊体积 1.5 mL, 2.0 mL 大容量扩张时两组无明显差异( $P > 0.05$ ). 冰水灌胃组回盲部和结肠 MC 计数均明显高于正常对照组( $P < 0.05$ ). 冰水灌胃组回盲部、结肠黏膜层 5-HT 阳性细胞的面积均明显高于正常对照组( $P < 0.05$ ).

结论: 采用冰水灌胃法建立了大鼠便秘模型, 该模型具有肠道敏感性降低、回盲部及结肠 MC 增多、5-HT 阳性内分泌细胞增多, 较好地模拟了人的 C-IBS 特征, 显示了 IBS 动物模型的新概念.

彭丽华, 杨云生, 孙刚, 王巍峰. 便秘型肠易激综合征新概念模型的建立. 世界华人消化杂志 2004;12(1):112-116

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/112.asp>

## 0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是以腹痛或腹部不适伴大便异常为特征的一种功能性肠病<sup>[1-6]</sup>, 尽管近年的一些研究发现 IBS 患者可能存在肠道肥大细胞(mast cell, MC)数目及活性的改变, 血中 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、胃动素等胃肠激素、淋巴细胞以及肠道内分泌细胞等的变化, 但目前一般认为 IBS 尚缺乏确切的形态学和生化指标的异常<sup>[7-14]</sup>. 由于 IBS 被认为是一种功能性疾病, 要研究其功能异常的物质基础如肠道或神经系统的组织或细胞等均十分困难, 严重阻碍了对其发病机制的研究和认识. 因此, 建立恰当的 IBS 动物模型对于研究其发病机制具有十分重要的意义. 我们模拟人 IBS 危险因素-冷水饮用, 用冰水灌胃法诱导大鼠便秘, 并评价其肠道敏感性改变、肠道 MC 及 5-HT 阳性内分泌细胞的变化, 旨在建立一种较为理想的具备 IBS 模型新概念的 C-IBS 大鼠模型.

## 1 材料和方法

1.1 材料 AY220 型托盘电子分析天平, 日本岛津制作所制作. Olympus CX40 光学显微镜, 日本奥林巴斯公司制作. 8F 导尿管, 导管直径 2 mm, 球囊最大容量 3 mL, 最大直径 2 cm, 用作直肠内球囊扩张导管, 德国 Braun 公司制作. 直径 6 cm 鼠固定器, 日本 ICM 株式会社制作. 兔抗人 5-HT 多克隆抗体, 生物素标记羊抗兔 IgG, SABC 免疫组化试剂盒及 DAB 显色剂均购自北京中山生物技术有限公司. 出生 4 wk 的 ♂ Wistar 大鼠 30 只, 质量 120-150 g, 军事医学科学院实验动物中心提供.

1.2 方法 30 只大鼠随机分为 3 组, A 组 10 只, 为冰水灌胃组, 给予冰水(0-4 °C 生理盐水) 2 mL/只, 1 次/d 灌胃, 共 14 d; B 组 10 只, 为常温水灌胃组, 给予常温水(26-28 °C 生理盐水) 2 mL/只, 1 次/d 灌胃, 共 14 d; C 组 10 只, 为正常对照组, 不灌胃, 正常饲食、饮水. A、B 两组除灌胃外也给予正常饲食、饮水. 每只大鼠分笼独立饲养, 为消除生物节律的影响, 均于上午 08:00 开始灌胃. 停止灌胃后各组继续正常饲食、饮

水, 观察 14 d, 至第 28 d 实验结束. 分别收集灌胃 14 d 期间 3 组每只大鼠灌胃后 3 h 内及 3-24 h 间的大便, 计大便粒数, 电子天平称湿质量, 微波烘烤 8 min 后称干质量, 计算大便含水量百分比. 含水量百分比=(湿质量-干质量)/湿质量  $\times 100\%$ . 停止灌胃后各组继续观察 14 d, 同样方法测定对应时间段每只大鼠大便粒数及含水量百分比(以下简称含水量)至第 28 d 实验结束, 以评价其便秘.

1.2.1 肠道敏感性测定 灌胃停止后 14 d, 3 组大鼠分别于清醒状态下放入鼠固定器内, 限制大鼠的各向活动, 但可观察到腹部收缩反射. 将 Braun 8F 导尿管外涂石蜡油后经肛门插入, 气囊末端距肛门 1 cm. 用 4 号手术缝线在导尿管平肛门外缘水平打结固定于鼠尾, 相隔 2 cm 处同样方法固定. 15 min 后大鼠适应环境呈安静状态, 经导尿管外口向球囊内注入常温水(26-28 °C 生理盐水) 扩张. 记录引起大鼠腹部收缩反射的最小注水量为最小容量阈值. 重复扩张 3 次, 每次间隔 15 min, 以 3 次扩张测得的最小容量阈值的均值为该鼠直肠扩张引起腹部收缩反射的最小容量阈值. 测定阈值后第 2 d, 分别测定注水量为 1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL 时 3 min 内大鼠腹部收缩反射的次数, 每次间隔 30 min. 用引起大鼠腹部收缩反射的最小容量阈值和直肠内球囊不同容量扩张时 3 min 内大鼠腹部收缩反射的次数评价大鼠对直肠内扩张刺激的敏感性.

1.2.2 组织形态学检查及 MC 计数 3 组大鼠直肠内球囊扩张结束 1 h 后, 给予大鼠腹腔内注射 200 g/L 乌拉坦 2 mL/只处死动物, 剖腹分离各组大鼠的回盲部及结肠, 立即用生理盐水冲洗, 分别取动物的回盲部、距肛门 3 cm 处的结肠各 0.5 cm, 40 g/L 甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, 苏木素-伊红(haematoxylin-eosin, HE)染色, Olympus CX40 光学显微镜下观察各组大鼠胃、回盲部及结肠组织学表现. 石蜡标本连续切片, 片厚 2  $\mu\text{m}$ , 隔 5 张取 1 张, 每例每部位取 2 张, 采用甲苯胺蓝改良染色法(toluidine blue improved method, TBI)行 MC 染色. 每例切片随机选择 2 个视野, 应用放大倍数  $\times 100$  观察各组动物回盲部及结肠 MC 数目, 取其均数.

1.2.3 5-HT 在肠道的表达 取 3 组大鼠回盲部及结肠石蜡标本连续切片, 片厚 2  $\mu\text{m}$ , 隔 5 张取 1 张. 每例每部位取 2 张. 裱于经 APES 防脱片剂处理的载玻片上, 置烤箱 56 °C 60 min 以使切片紧密黏附. 应用 1:100 稀释的兔抗 5-HT 抗体, 按 ABC 免疫组化法进行标记, 操作步骤按试剂说明. DAB 室温显色 5-10 min, 镜下控制反应时间. 以着棕色者为染色阳性. 应用计算机病理图像分析系统对 5-HT 免疫染色阳性细胞的面积(阳性染色部位像素数总和)进行半定量分析.

统计学处理 计数资料用  $\bar{x} \pm s$  描述, 组间变量比较用单因素方差分析及带有一个重复测量的单因素方差分析, 设  $P < 0.05$  为差异显著.

## 2 结果

大鼠灌胃后3 h内大便增加,大便明显变软,变稀,部分大鼠可出现糊状便。经含有重复测量的单因素方差分析,结果显示,前14 d灌胃期间,冰水灌胃组大鼠灌胃后3 h内大便粒数和含水量均明显多于常温水灌胃组和正常对照组( $P < 0.05$ )。15-28 d停止灌胃期间,冰水灌胃组大鼠对应时间段3 h内大便粒数和含水量无显著差异( $P > 0.05$ )。前14 d灌胃期间,冰水灌胃组灌胃后3-24 h间的大便粒数由 $49.4 \pm 7.5$ 粒降至 $39.9 \pm 6.2$ 粒, (常温水灌胃组由 $48.9 \pm 6.5$ 粒降至 $41.4 \pm 7.6$ 粒,正常对照组由 $49.5 \pm 7.2$ 粒升至 $50.8 \pm 8.7$ 粒)。第28 d实验结束时3组大鼠对应时间段3-24 h间的大便粒数分别为冰水灌胃组 $42.9 \pm 6.7$ 粒,常温水灌胃组 $43.9 \pm 7.9$ 粒和正常对照组 $49.5 \pm 5.8$ 粒。经含有重复测量的单因素方差分析,冰水灌胃组前14 d灌胃后3-24 h间的大便粒数及15-28 d停止灌胃后对应时间段3-24 h间的大便粒数均较常温水灌胃组和正常对照组明显减少( $P < 0.05$ );以28 d期间作为总体进行比较,3组大鼠3-24 h间的大便粒数存在显著差异,冰水灌胃组3-24 h间的大便粒数明显少于常温水灌胃组和正常对照组( $P < 0.05$ ),见图1。大鼠灌胃后3-24 h间的大便逐渐由灌胃后3 h内的糊状便、软便转为较干燥的成形便;随实验天数的增加,伴随大便粒数逐渐减少的同时出现大便性状逐渐干硬。前14 d灌胃期间,冰水灌胃组大鼠灌胃后3-24 h间的大便含水量由 $45.2 \pm 5.8\%$ 降至 $40.3 \pm 6.5\%$  (常温水灌胃组由 $43.0 \pm 6.5\%$ 升至 $44.7 \pm 6.4\%$ ,正常对照组由 $46.2 \pm 8.0\%$ 降至 $42.5 \pm 9.4\%$ )。第28 d实验结束时3组大鼠对应时间段3-24 h间的大便含水量分别为冰水灌胃组 $39.9 \pm 6.5\%$ ,常温水灌胃组 $46.6 \pm 4.4\%$ 和正常对照组 $47.1 \pm 8.6\%$ 。经含有重复测量的单因素方差分析,冰水灌胃组大鼠灌胃后3-24 h间的大便含水量及停止灌胃后对应时间段3-24 h间的大便含水量均较常温水灌胃组和正常对照组明显减少( $P < 0.05$ );以28 d期间作为总体进行比较,3组大鼠3-24 h间的大便含水量存在显著差异,冰水灌胃组3-24 h间的大便含水量明显少于常温水灌胃组和正常对照组( $P < 0.05$ ),图2。

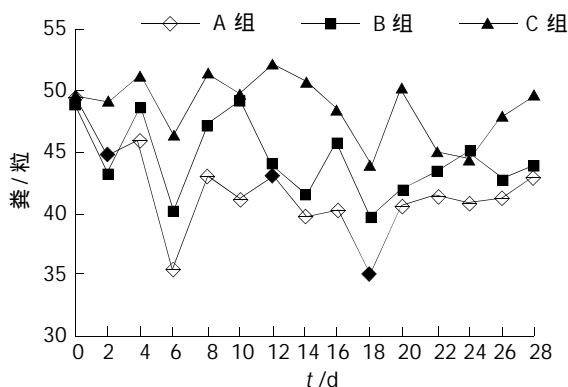


图1 大鼠3-24 h间的大便粒数变化趋势。

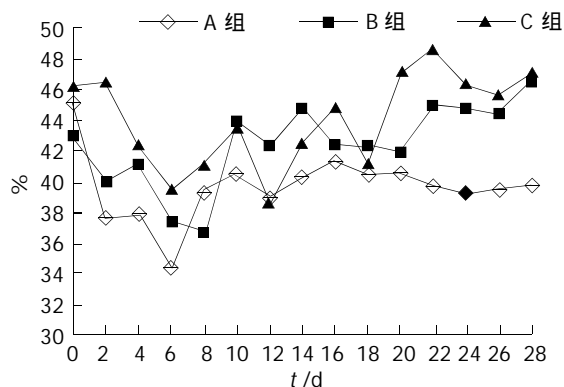


图2 大鼠3-24 h间的大便含水量变化趋势。

2.1 大鼠肠道敏感性 冰水灌胃组直肠扩张引起腹部收缩的最小容量阈值为 $0.59 \pm 0.09$  mL,常温水灌胃组为 $0.54 \pm 0.07$  mL,正常对照组为 $0.57 \pm 0.13$  mL。冰水灌胃组略高于正常对照组和常温水灌胃组,但统计学比较3组无明显差异( $P > 0.05$ )。3组大鼠直肠内球囊1.0 mL低容量扩张时,3 min内腹部收缩反射次数存在显著差异( $P < 0.05$ );冰水灌胃组3 min内腹部收缩反射次数为 $10.3 \pm 3.3$ 次,明显低于正常对照组的 $18.3 \pm 5.5$ 次( $P < 0.05$ ),表1;常温水灌胃组与正常对照组无明显差异( $P > 0.05$ )。直肠球囊体积1.5 mL、2.0 mL高容量扩张时,3组大鼠3 min内腹部收缩反射次数无明显差异( $P > 0.05$ )。

表1 直肠内球囊不同容量扩张时大鼠腹部收缩反射次数( $\bar{x} \pm s$ )

分组	1.0 mL	1.5 mL	2.0 mL
冰水灌胃组	$10.3 \pm 3.3^a$	$18.8 \pm 7.3$	$25.1 \pm 6.5$
常温水灌胃组	$13.9 \pm 3.7$	$18.7 \pm 6.2$	$22.9 \pm 5.5$
正常对照组	$18.3 \pm 5.5$	$23.1 \pm 11.0$	$29.3 \pm 12.9$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 正常对照组。

表2 回盲部及结肠黏膜层5-HT阳性细胞的面积( $\bar{x} \pm s$ )

分组	回盲部	结肠
冰水灌胃组	$695\ 230 \pm 99\ 970^a$	$803\ 289 \pm 234\ 897^a$
常温水灌胃组	$453\ 060 \pm 148\ 103$	$556\ 315 \pm 178\ 836$
正常对照组	$284\ 751 \pm 107\ 230$	$436\ 037 \pm 202\ 346$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 正常对照组。

2.2 胃肠道组织学和MC计数 3组大鼠胃、回盲部及结肠均未见异常病理改变。冰水灌胃组回盲部及结肠MC计数分别为 $12.6 \pm 4.8$ /视野和 $10.2 \pm 3.0$ /视野,较常温水灌胃组( $9.2 \pm 3.2$ /视野,  $7.4 \pm 2.8$ /视野)及正常对照组( $7.9 \pm 3.4$ /视野,  $5.0 \pm 2.1$ /视野)均明显增多( $P < 0.05$ )。2.3 大鼠回盲部及结肠黏膜5-HT的表达 5-HT阳性细胞在正常大鼠回盲部及结肠黏膜层分布广泛,黏膜上皮细胞、固有层腺体均可见阳性反应,着色部位均在



胞质(图3). 冰水灌胃组大鼠 5-HT 的表达部位与正常大鼠一致, 但 5-HT 阳性细胞面积(即细胞数目)明显增多(图4). 3 组大鼠回盲部及结肠黏膜层 5-HT 阳性细胞面积的比较见表 2. 3 组大鼠回盲部及结肠黏膜层 5-HT 阳性细胞面积均存在显著差异( $P < 0.05$ ); 冰水灌胃组回盲部、结肠黏膜层 5-HT 阳性细胞面积显著高于常温水灌胃组及正常对照组( $P < 0.05$ ).

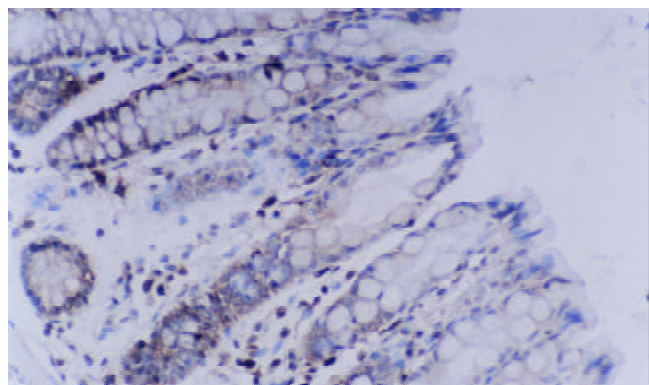


图3 5-HT 在正常大鼠肠道黏膜层的表达( $\times 200$ ).

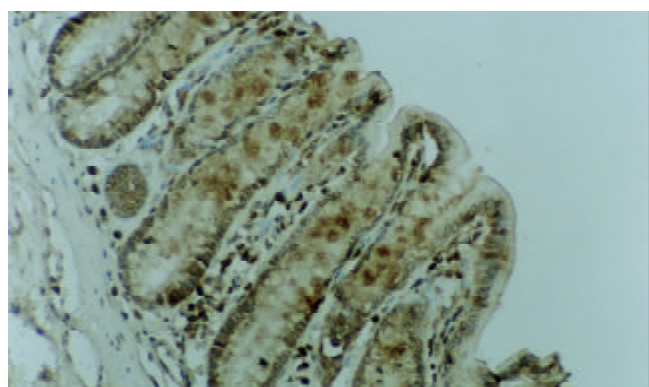


图4 5-HT 在 IBS 模型大鼠肠道黏膜层的表达( $\times 200$ ).

### 3 讨论

IBS 的发病机制目前认为有运动异常机制、内脏过敏机制、脑-肠相互作用机制, 以及近年来提出的神经-免疫-内分泌网络调控机制等. 由于 IBS 被认为是一种功能性肠病, 要研究其肠道或神经系统的生理生化或细胞的异常等均十分困难, 因此 IBS 发病机制的研究一直未取得显著的进展. 我们应用人类 IBS 比较公认的一种危险因素-冷饮刺激, 用冰水灌胃法诱导大鼠 IBS 模型. 实验发现, 经过 14 d 的冰水灌胃刺激能够诱发大鼠的大便粒数和含水量减少, 类似于便秘型 IBS 的肠道运动异常, 并且此趋势在停止灌胃刺激后仍能持续存在, 保持稳定. 实验中我们发现常温水灌胃组也能出现一定程度的肠道运动异常, 可能是反复抓取及灌胃动作的刺激诱发的应激反应, 这也从一个侧面说明 IBS 的诱因是多方面的, 精神心理因素也在其中起一定作用. 但冰水灌胃组与常温水灌胃组的比较显示, 冰水灌胃建立的模型比常温水灌胃更显著、稳定, 表现为肠

道运动异常持续的时间更长, 与正常对照组的差异更明显, 提示冷饮危险因素中温度是引起肠道运动异常的关键因子. 实验中我们还发现, 灌胃后 3 h 内的大便粒数及含水量增加, 而灌胃后 3-24 h 间的大便粒数及含水量减少; 停止灌胃后, 对应的 3 h 内大便粒数及含水量的差异消失, 而对应的 3-24 h 间的大便粒数及含水量减少趋势依然存在. 这一现象产生的原因可能是灌胃后 3 h 内的大便粒数及含水量反映的是大鼠对急性刺激的一种反应, 在停止急性刺激后, 这种反应消失; 而灌胃后 3-24 h 的大便粒数及含水量反映的才是冰水灌胃这一因素反复、慢性刺激对肠道运动产生的影响, 这种影响具有稳定的后续效应. 国外有文献报告急性、慢性刺激对大鼠直肠敏感性的影响也是不同的, 提示急性、慢性刺激对肠道运动和感觉的作用机制可能存在差异<sup>[15]</sup>. 桂先勇 et al<sup>[16]</sup>发现持续 6 h 的寒冷束缚应激期间及应激后大便粒数明显减少, 而含水量却明显增加, 且这一现象在解除应激后 60 h 仍未恢复, 提示持续一定时间和一定强度的应激可导致结肠动力持续异常, 且具有后续效应. 我们的实验较上述实验延长了刺激时间和停止刺激后的观察时间, 观察了冰水灌胃 14 d 期间及停止灌胃后 14 d 期间大鼠的大便粒数及含水量变化, 较以往的研究更确切地反映出动物在反复接受冷刺激时对肠道运动的持续影响和远期效应. 这种效应表现为类似于 C-IBS 的肠道运动异常, 而非单次冷刺激引起的类似 D-IBS 的肠道运动异常. 以往的 IBS 动物模型如束缚应激模型、旋毛虫感染模型<sup>[17]</sup>等多为 D-IBS 的模型, 对于 C-IBS 的动物模型少见报道. 我们用冰水灌胃法成功地诱导了大鼠大便粒数和含水量的减少, 并且这种趋势能稳定存在至少 14 d, 这种现象类似于 C-IBS 的肠道运动异常. 该模型为 C-IBS 的研究提供了新的条件.

在肠道敏感性或内脏敏感性的研究中, 人们多采用直肠内球囊定量扩张的方法评价其敏感性变化. 对于 C-IBS 患者的内脏敏感性报道不一, 有报告认为 C-IBS 患者的初始感觉阈值、疼痛阈值、排便阈值高于正常人, 即 C-IBS 患者内脏敏感性降低, 但也有学者认为 C-IBS 患者存在内脏高敏感<sup>[18-26]</sup>. 我们发现冰水灌胃后的大鼠引起腹部收缩反射的最小容量阈值有增高趋势, 在低容量(1.0 mL)扩张时冰水灌胃组腹部收缩反射次数明显少于正常对照组, 提示冰水灌胃组大鼠存在对直肠内球囊扩张刺激的敏感性降低; 而在高容量时其内脏敏感性与正常对照组无明显差异, 是否因为冰水灌胃组大鼠存在内脏感觉异常, 但直肠平滑肌对于球囊扩张刺激的牵张反应是不同的. IBS 患者对于直肠球囊扩张刺激以外的不同种刺激的敏感性是否也存在差异尚不清楚.

近年来, 一些研究发现 IBS 患者肠道 MC 增多. 1993 年 Weston et al<sup>[27]</sup>首先报道 IBS 患者回肠末端 MC 明显增多, 推测 MC 与 IBS 的内脏感觉异常有关. 国内杨云生 et al<sup>[28]</sup>、

李兆申 et al<sup>[29]</sup>也相继报道IBS患者回盲部MC增多, MC与无髓神经纤维密切相邻, 并进一步发现肠道浆细胞数目增多. 另外, Monica et al<sup>[30]</sup>还报道IBS患者乙状结肠黏膜中5-HT阳性细胞明显增多. 人体90%的5-HT来源于胃肠道, 主要由胃肠道腺腔基底部的神经内分泌细胞合成、分泌并重摄取. 研究证实, 各种刺激如肠腔内压力增加、迷走神经刺激、过敏反应、十二指肠酸化、暴露于去甲肾上腺素、乙酰胆碱和多种化学物质, 均可促使神经内分泌细胞释放5-HT, 与其受体结合, 传递信号给肠肌间神经丛, 调节肠道的蠕动反射. 因此, 本研究用5-HT阳性细胞数目代表肠道内分泌细胞的数目. 结合最新的研究进展, 国际上一些学者提出理想的IBS动物模型的新概念应反映肠道运动、敏感性改变, 肠道MC变化, 甚至肠道内分泌细胞的变化. 本研究建立的大鼠C-IBS模型不仅表现有肠道运动、敏感性改变, 而且存在回盲部、结肠MC及5-HT阳性细胞明显增多, 反映了IBS动物模型的新概念. 该模型的建立为今后深入研究IBS的发病机制等提供了新的基础或条件.

#### 4 参考文献

- 1 詹丽杏, 李兆申. 肠易激综合征的诊断与治疗. 世界华人消化杂志 2001;9:1177-1179
- 2 许小幸, 李定国, 宋光辉, 周惠清, 刘清华. 肠易激综合征402例发病时间分布及症状特征. 世界华人消化杂志 2003;11:1234-1236
- 3 陈仕珠. 肠易激综合征发病机制研究进展. 华人消化杂志 1998;6:1094-1096
- 4 李红梅, 梁浩. 肠易激综合征的研究进展. 华人消化杂志 1998;6:168-169
- 5 Wood JD. Neuropathophysiology of irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2002;35(1 Suppl):S11-22
- 6 Somers SC, Lembo A. Irritable bowel syndrome: evaluation and treatment. *Gastroenterol Clin North Am* 2003;32:507-529
- 7 Dong WZ, Li ZS, Zou DW, Xu GM, Zou XP, Zhu AY, Yin N, Gong YF. The changes of mucosal mast cells and substance P in patients with irritable bowel syndrome. *Zhonghua Neike Zazhi* 2003;42:611-614
- 8 Chadwick VS, Chen W, Shu D, Paulus B, Bethwaite P, Tie A, Wilson I. Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002;122:1778-1783
- 9 詹丽杏, 许国铭, 李兆申, 邹多武, 满晓华, 邹晓平, 尹宁, 朱爱勇. 肠易激综合征患者活动期和缓解期血浆5-HT、5-HIAA的变化. 第二军医大学学报 2003;24:152-154
- 10 张川, 李定国, 王彝康, 陆汉明. 肠易激综合征患者一氧化氮和5-羟色胺含量的改变. 世界华人消化杂志 1999;7:640-641
- 11 令狐恩强, 杨云生. 肠易激综合征患者外周血T淋巴细胞亚群分析. 中华消化杂志 2002;22:423-425
- 12 Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M, Neal KR. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute Campylobacter enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 2000;47:804-811
- 13 Pata C, Erdal ME, Derici E, Yazar A, Kanik A, Ulu O. Serotonin transporter gene polymorphism in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1780-1784
- 14 Yuan YZ, Tao RJ, Xu B, Sun J, Chen KM, Miao F, Zhang ZW, Xu JY. Functional brain imaging in irritable bowel syndrome with rectal balloon-distention by using fMRI. *World J Gastroenterol* 2003;9:1356-1360
- 15 Bradesi S, Eutamene H, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Bueno L. Acute and chronic stress differently affect visceral sensitivity to rectal distension in female rats. *Neurogastroenterol Motil* 2002;14:75-82
- 16 桂先勇, 潘国宗, 柯美云. 寒冷-束缚应激对大鼠结肠运动的后续效应. 中华消化杂志 1997;17:94-96
- 17 Torrents D, Torres R, De Mora F, Vergara P. Antinerve growth factor treatment prevents intestinal dysmotility in *Trichinella spiralis*-infected rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:659-665
- 18 肖文斌, 刘玉兰, 赵丽莉. 腹泻型、便秘型肠易激综合征和功能性便秘患者的直肠感觉阈值比较. 世界华人消化杂志 2002;10:1291-1294
- 19 Dickhaus B, Mayer EA, Firooz N, Stains J, Conde F, Olivas TI, Fass R, Chang L, Mayer M, Naliboff BD. Irritable bowel syndrome patients show enhanced modulation of visceral perception by auditory stress. *Am J Gastroenterol* 2003;98:135-143
- 20 Bouin M, Plourde V, Boivin M, Riberdy M, Lupien F, Laganier M, Verrier P, Poitras P. Rectal distention testing in patients with irritable bowel syndrome: sensitivity, specificity, and predictive values of pain sensory thresholds. *Gastroenterology* 2002;122:1771-1777
- 21 Malcolm A, Phillips SF, Kellow JE, Cousins MJ. Direct clinical evidence for spinal hyperalgesia in a patient with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2427-2431
- 22 李延青, 王梅艳, 吕国苹, 顾晓萌, 左秀丽, 郭玉婷, 张海燕, 李君曼, 赵宪邨. 腹部冷刺激对肠易激综合征患者内脏感觉阈值的影响. 胃肠病和肝病杂志 2002;11:339-341
- 23 詹丽杏, 邹多武, 许国铭, 李兆申, 尹宁, 张梅琴. 功能性便秘和便秘型肠易激综合征的结肠运输试验及直肠感觉阈值比较. 中华消化杂志 2002;22:19-21
- 24 王锦萍, 叶玉津, 胡品津, 林金坤. 腹泻型肠易激综合征直肠敏感性和心理健康状况的调查. 新医学 1999;30:729-730
- 25 刘清英, 刘静. 肠易激综合征患者肛门直肠感觉阈值和动力学的改变. 山东医药 2003;43:4-5
- 26 Ragnarsson G, Hallbook O, Bodemar G. Abdominal symptoms and anorectal function in health and irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:833-842
- 27 Weston AP, Biddle WL, Bhatia PS, Miner PB Jr. Terminal ileal mucosal mast cells in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 1993;38:1590-1595
- 28 杨云生, 周殿元, 张万岱, 张振书, 宋于刚. 肠易激综合征回盲部MC的研究. 中华内科杂志 1997;36:231-233
- 29 李兆申, 董文珠, 邹多武, 邹晓平, 张文俊. 肠易激综合征黏膜肥大细胞的实验研究. 解放军医学杂志 2002;27:628-630
- 30 Monica B, Carole N, Roger F. A comparison of 5-hydroxytryptamine staining in enterochromaffin cells between irritable bowel syndrome and other gastrointestinal disorders. *Gut* 2000; 47(Suppl III):A210



# 乙酰胆碱酯酶基因重组腺病毒的构建及其对猫食管平滑肌细胞的影响

徐恩斌, 张忠兵, 谢渭芬, 宁守斌, 林 勇, 蔡洪培

徐恩斌, 张忠兵, 谢渭芬, 宁守斌, 林勇, 蔡洪培, 中国人民解放军第二军医大学长征医院消化内科 上海市 200003  
徐恩斌, 男, 1968-11-29, 山东省汶上县人, 汉族. 现为第二军医大学长征医院博士生.  
项目负责人: 张忠兵, 200003, 上海市凤阳路 415 号, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科. zhongbingz@yahoo.com.cn  
电话: 021-63610109-73254  
收稿日期: 2003-05-14 接受日期: 2003-06-02

## Construction of recombinant adenoviruses carrying AChE<sub>T</sub> and its effect on smooth muscle cells

En-Bin Xu, Zhong-Bing Zhang, Wei-Fen Xie, Shou-Bin Ning, Yong Lin, Hong-Pei Cai

En-Bin Xu, Zhong-Bing Zhang, Wei-Fen Xie, Shou-Bin Ning, Yong Lin, Hong-Pei Cai, Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China  
Correspondence to: Zhong-Bing Zhang, Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China. zhongbingz@yahoo.com.cn  
Received: 2003-05-14 Accepted: 2003-06-02

## Abstract

**AIM:** To construct the replication-deficient recombinant adenoviruses-AdAChE<sub>T</sub> inserted both cat acetylcholinesterase (AChE<sub>T</sub>) and green fluorescent protein (GFP) cDNA driven by CMV promoter using homologous recombination in bacteria provided by AdEasy system and to investigate the effect of AChE<sub>T</sub> on cat smooth muscle cells.

**METHODS:** The AChE<sub>T</sub> cDNA was obtained from the plasmids-pEFbos/AChE<sub>T</sub> by digestion, and the shuttle plasmid-pAdTrack-CMV-AChE<sub>T</sub> in which the AChE<sub>T</sub> cDNA was inserted into the downstream of CMV promoter was established by ligation. Then the linearized shuttle plasmid was co-transformed into bacteria with backbone vector AdEasy-1 to obtain the recombinant adenoviral plasmids-pAd AChE<sub>T</sub> by homologous recombination. After packed in 293 cells, the recombinant adenoviruses-Ad AChE<sub>T</sub> were generated. The expression of AChE<sub>T</sub> in cat smooth muscle cell was detected by RT-PCR and total AChE activity was determined.

**RESULTS:** The recombinant plasmid pAdAChE<sub>T</sub> was established by homologous recombination and confirmed by restriction endonuclease digestion and sequencing. GFP expression could be observed on the third day after packing of the linearized pAdAChE<sub>T</sub> in 293 cells and  $4 \times 10^{10}$  efu/mL titer of Ad AChE<sub>T</sub> was obtained by CsCl gradient purification. When the cat smooth cells were infected by the viruses for 3 days, expression of AChE<sub>T</sub> and AChE activity in smooth cells increased significantly.

**CONCLUSION:** AChE<sub>T</sub> can be simply and rapidly generated by using the AdEasy system. The infection of cat smooth muscle cells by Ad AChE<sub>T</sub> can result in the high expression of AChE<sub>T</sub>. Ad AChE<sub>T</sub> may serve as a new tool for gene therapy of achalasia.

Xu EB, Zhang ZB, Xie WF, Ning SB, Lin Y, Cai HP. Construction of recombinant adenoviruses carrying AChE<sub>T</sub> and its effect on smooth muscle cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(1):117-120

## 摘要

**目的:** 利用 AdEasy 系统构建乙酰胆碱酯酶催化亚单位(AChE<sub>T</sub>)重组腺病毒(AdAChE<sub>T</sub>), 并观察其对平滑肌细胞细胞的影响。

**方法:** 将质粒 pEFbos/AChE<sub>T</sub> 扩增、酶切获得 AChE<sub>T</sub> cDNA 片段插入腺病毒穿梭载体质粒 pAdTrack-CMV 的巨细胞病毒(CMV)启动子下游, 构建重组穿梭载体 pAdTrack-CMV-AChE<sub>T</sub>, 线性化后与骨架载体 AdEasy-1 在细菌 BJ5183 内同源重组得到腺病毒质粒 pAd AChE<sub>T</sub>, 经 293 细胞包装后得到复制缺陷型重组腺病毒 Ad AChE<sub>T</sub>; 将 Ad AChE<sub>T</sub> 体外感染猫平滑肌细胞, 以 RT-PCR 检测 AChE<sub>T</sub> 在平滑肌细胞的表达; 同时测定胆碱酯酶活力。

**结果:** 连接、重组后通过酶切和测序法筛选出 pAd AChE<sub>T</sub>; 经 293 细胞包装, 3 d 后观察到绿色荧光蛋白(GFP)明显表达, 氯化铯梯度离心纯化最终获得约  $4 \times 10^{10}$  efu/L 滴度的重组病毒; Ad AChE<sub>T</sub> 体外感染平滑肌细胞 3 d 后, AChE<sub>T</sub> 表达明显增加, 乙酰胆碱酯酶活力较 Ad GFP 感染组和阴性对照组明显增加 ( $0.546 \pm 0.048$  vs  $0.495 \pm 0.039$ ,  $0.546 \pm 0.048$  vs  $0.501 \pm 0.037$ ) ( $P < 0.01$ )。

**结论:** 利用新型腺病毒载体 AdEasy 系统可在短期内制备同时表达 GFP 和 AChE<sub>T</sub> 的重组腺病毒 Ad AChE<sub>T</sub>; Ad AChE<sub>T</sub> 体外感染平滑肌细胞可显著提高 AChE<sub>T</sub> 的表达, 这将为基因治疗贲门失弛缓症提供新的手段。

徐恩斌, 张忠兵, 谢渭芬, 宁守斌, 林勇, 蔡洪培. 乙酰胆碱酯酶基因重组腺病毒的构建及其对猫食管平滑肌细胞的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(1): 117-120

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/117.asp>

## 0 引言

贲门失弛缓症是一种食管运动障碍性疾病, 以食管缺

乏蠕动和食管下括约肌(lower esophageal sphincter, LES)松弛不良为特征。LES 松弛是 VIP 和 NO 共同作用的结果<sup>[1-3]</sup>, LES 收缩和张力升高是由外源性胆碱能神经控制的<sup>[4-6]</sup>; 而乙酰胆碱的酶解是主要由乙酰胆碱酯酶参与完成。复制缺陷型重组腺病毒(replication-deficient recombinant adenovirus)是目前基因治疗最常用的载体之一, He TC<sup>[7-8]</sup>建立了 AdEasy 系统, 我们利用 AdEasy 系统构建了外源插入乙酰胆碱酯酶催化亚单位(acetylcholinesterase, AChE<sub>T</sub>)AChE<sub>T</sub> cDNA 片段的复制缺陷性腺病毒 Ad AChE<sub>T</sub>, 并观察 Ad AChE<sub>T</sub> 在猫食管平滑肌细胞中的表达, 为贲门失弛缓症基因治疗提供新的手段。

## 1 材料和方法

1.1 材料 AdEasy 系统: 穿梭质粒 pAdTrack-CMV, 骨架质粒 pAdEasy-1, 仅插入 GFP 的对照重组腺病毒质粒 pAdGFP, 大肠杆菌 BJ5183 由 He TC 博士惠赠<sup>[8]</sup>; AChE<sub>T</sub> 表达质粒 pEFbos/AChE<sub>T</sub> 由 Legay 教授(The Journal of Neuroscience, 1999;19: 8252-8259)惠赠; 293 细胞购自中科院细胞所, 传代数不超过 50 代; E. coli JM109, DH5 $\alpha$  购自华舜公司; 5, 5-二巯基-3-硝基苯甲酸(DTNB), 由中科院生化所提供。

1.2 方法 将 E. coli JM109 和 BJ5183 置于 37 °C 生长至 A<sub>550</sub> 约为 0.8 时, 收集细菌, 分别用 100 mL/L 的冷甘油洗 2 次, 500 倍浓缩后以 20  $\mu$ L/管分装, 置 -80 °C 冰箱保存。取含 AChE<sub>T</sub> cDNA 的质粒 pEFbos/AChE<sub>T</sub> 2  $\mu$ L 用氯化钙法转化感受态菌 JM109, 选择阳性克隆, 用 DNA 抽提纯化试剂盒(Qiagen)抽提、纯化质粒, 并作酶切鉴定。将扩增后的 pEFbos/AChE<sub>T</sub> 5  $\mu$ g 用 Xba I, Hind III (NEB)酶切后, 于 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳。将 AChE<sub>T</sub> cDNA 片段割胶, 凝胶抽取试剂盒(Qiagen)纯化, 并委托上海联合基因科技集团有限公司测序。将回收的 AChE<sub>T</sub> cDNA 片段与质粒 pAdTrack-CMV 分别用限制性内切酶 Xba I, Hind III(NEB)酶切后, 14 °C 连接过夜。取 5  $\mu$ L 连接物氯化钙法转化感受态菌 JM109。小抽质粒并作酶切鉴定, 筛选已携带 AChE<sub>T</sub> cDNA 片段的穿梭质粒 pAdTrack-CMV-AChE<sub>T</sub>, 并委托上海联合基因科技集团有限公司自动测序。将测序正确的穿梭质粒 pAdTrack-CMV-AChE<sub>T</sub> 抽提、纯化, 取 1  $\mu$ g 先后用限制性内切酶 Pme I (NEB)酶切线性化、CIP(NEB)去磷酸化后用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(Qiagen)回收。取 0.4  $\mu$ g 线性化质粒与 0.1  $\mu$ g 超螺旋 pAd Easy-1 质粒在电压 2 500V, 电容 25  $\mu$ FD, 电阻 200 Ohms 条件下电穿孔共转化 BJ5183 感受态细菌。37 °C 摇床孵育 30 min, 卡那霉素 LB 培养基平板涂板, 于 37 °C 培养 24 h 后挑选 20 个最小克隆, 小抽质粒并作酶切鉴定。选择重组腺病毒质粒 pAd AChE<sub>T</sub>, 氯化钙法转化感受态菌 JM109 大量扩增。

1.2.1 包装腺病毒 Ad AChE<sub>T</sub> 和对照病毒 AdGFP 将 293 细胞以  $2 \times 10^6$ /孔接种于 60 mm 培养皿, 24 h 后细胞密度生长至 60-80% 时, 将 10  $\mu$ g pAd AChE<sub>T</sub> 用限制性

内切酶 Pac I (NEB)酶切回收后, 取 4  $\mu$ g 线性化的 pAd AChE<sub>T</sub> 以脂质体-DNA 复合物的形式加入 293 细胞中, 24 h 后更换含 100 mL/L 小牛血清(HighClone)的新鲜培养液, 3 d 后通过荧光显微镜观察 GFP 的表达。7 d 后收集 293 细胞, 于液氮和 37 °C 水浴中反复冻融 4 次, 以 3 mL/皿病毒上清再次感染 293 细胞进行扩增, 5 d 后收集细胞, 1 500 r/min 离心 7 min, 小心弃上清, 以 2 mL PBS/皿重悬, 反复冻融 4 次; 重复感染、收集步骤, 将最终收集的 PBS 重悬病毒上清用氯化铯(CsCl)梯度离心纯化。以同样方法在 293 细胞内包装对照病毒 AdGFP, 并作 CsCl 梯度离心。将 293 细胞以  $5 \times 10^5$ /孔接种于六孔板(Nunc), 于次日待细胞生长约 90% 后, 将病毒上清倍比稀释分别感染细胞, 72 h 后荧光显微镜下计算表达 GFP 细胞个数, 测定 Ad AChE<sub>T</sub> 和 AdGFP 滴度(表达形成单位/升, efu/L)。

1.2.2 检测 Ad AChE<sub>T</sub> 在猫平滑肌细胞中的表达 原代猫平滑肌细胞的分离按 Bitar et al (Am J Physiol, 1982; 242: G400-G407)报道的方法加以修改。原代培养的平滑肌细胞以  $5 \times 10^5$ /皿接种于 60 mm 培养皿, 将病毒以 MOI 10-20 感染细胞, 3 d 后观察 GFP 表达; 以 Trizol 试剂盒(Qibco)抽提总 RNA 后, 逆转录反应 1 h, 取 2  $\mu$ L 逆转录产物为模板进行 PCR 扩增, 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后测定 AChE<sub>T</sub> 表达。乙酰胆碱酯酶活力采用微量 DTNB 法测定。应用 UV-754 型分光光度计于 414 nm 处测吸光度值(A 值), 以实验管 A 值减去对照管 A 值来表示酶反应速度。

统计学处理 所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异应用 t 检验。

## 2 结果

将 pAdTrack-CMV 经 Xba I、Hind III 酶切后与割胶回收获得的 AChE<sub>T</sub> cDNA 片段连接, 获得质粒 pAdTrack-CMV-AChE<sub>T</sub>, 酶切鉴定获得 9.335 kb 的载体片段和 2.161 kb 大小 AChE<sub>T</sub> cDNA 片段(图 1), 测序并作同源分析。

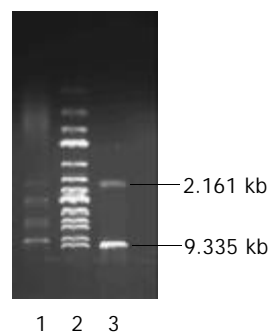


图 1 重组产物 pAd AChE<sub>T</sub> 酶切鉴定。1: pAd AChE<sub>T</sub> + Xba I、Hind III; 2: 1 kb Marker; 3: pAdTrack-CMV-AChE<sub>T</sub> + Xba I、Hind III。

2.1 制备腺病毒 Ad AChE<sub>T</sub> 将 Pme I 酶切线性化的 pAdTrack-CMV-AChE<sub>T</sub> 与 pAdEasy-1 质粒共转化 BJ5183 感受态细菌, 筛选获得 pAd AChE<sub>T</sub>, Pac I 酶

切获得约 30 kb 大小的腺病毒基因组片段和 3.0 kb 或 4.5 kb 的 ori 及卡那霉素抗性编码基因片段(图 2)。Pac I 酶切线性化的 pAd AChE<sub>T</sub> 转染 293 细胞 3d 后, 荧光显微镜下见约 10% 的细胞表达 GFP, 7 d 后可见大量 GFP 表达(图 3)。反复感染、冻融 293 细胞, CsCl 梯度离心纯化后测定 Ad AChE<sub>T</sub> 滴度约为  $4 \times 10^{13}$  efu/L。以同样方法获得对照病毒 AdGFP, 滴度约为  $3 \times 10^{13}$  efu/L。

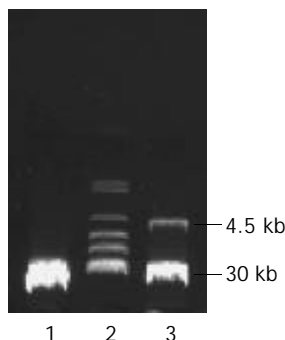


图2 Pac I 酶切重组产物 pAd AChE<sub>T</sub>。1: pAd Easy-1 + Pac I ; 2:10 kb Marker; 3: pAd AChE<sub>T</sub> + Pac I。

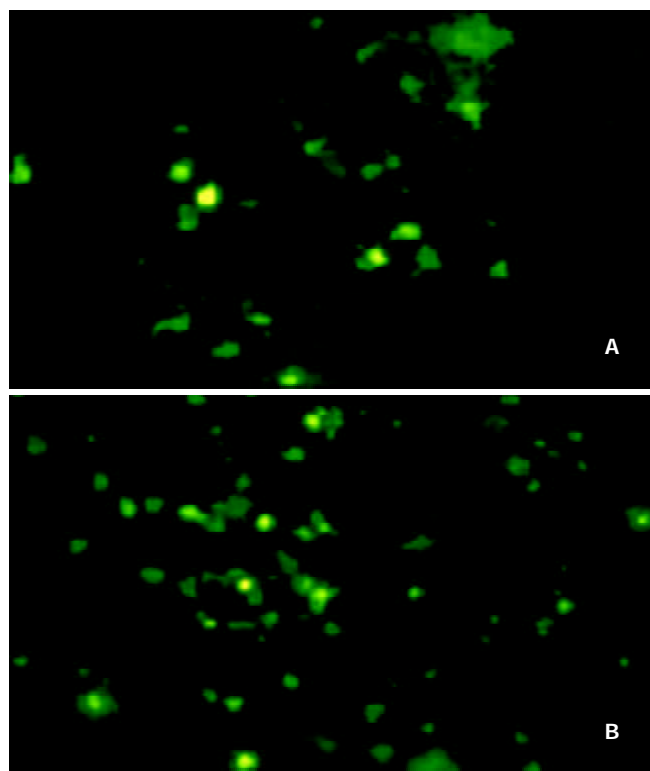


图3 pAd AChE<sub>T</sub> 转染 293 细胞 3 d(A)及 7 d(B)绿色荧光蛋白表达。

**2.2 Ad AChE<sub>T</sub> 在原代培养人平滑肌细胞中的表达** Ad AChE<sub>T</sub> 感染原代培养的猫平滑肌细胞 3d 后, 荧光显微镜下可见 GFP 表达。RT-PCR 检测 Ad AChE<sub>T</sub> 在平滑肌细胞中表达明显增强(图4)。Ad AChE<sub>T</sub> 感染的平滑肌细胞的乙酰胆碱酯酶活力(A:  $0.546 \pm 0.048$ )明显高于 Ad GFP 感染组(A:  $0.495 \pm 0.039$ ) ( $P < 0.01$ )和阴性对照组(A:  $0.501 \pm 0.037$ ) ( $P < 0.01$ ), 而 Ad GFP 感染组与阴性对照组比较无显著差异( $P > 0.05$ )。

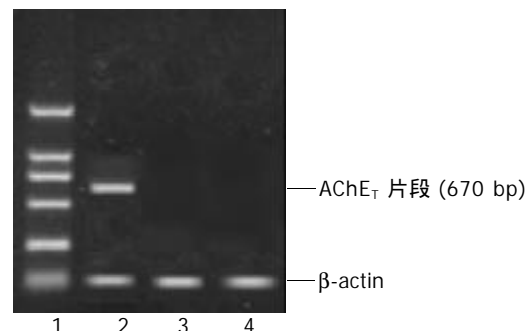


图4 RT-PCR 法检测 Ad AChE<sub>T</sub> 在平滑肌中的表达。1: 100 bp Marker; 2: Ad AChE<sub>T</sub> 感染; 3: Ad GFP 感染; 4: 阴性对照。

### 3 讨论

重组腺病毒在一些疾病基因治疗中有着很好的治疗效果和应用前景<sup>[9-22]</sup>。腺病毒不仅能够高效感染多种增生细胞, 而且也能感染静息哺乳类细胞, 且不与细胞的基因组发生整合, 不引起基因突变, 可以携带较大片段的外源基因, 是一种比较理想的用于基因治疗的表达载体<sup>[12, 15, 22-23]</sup>。乙酰胆碱酯酶是胆碱能突触的必需成分, 他通过快速地水解乙酰胆碱精密地控制胆碱能神经递质<sup>[24-28]</sup>。在电鳗和哺乳动物, 他可产生多种类型的亚型, AChE<sub>T</sub> 是其主要亚型之一, AChE<sub>T</sub> 是存在于脊椎动物的胆碱酯酶中的惟一的催化亚单位, 主要在大脑和肌肉中发挥作用<sup>[29-31]</sup>。将 AChE<sub>T</sub> cDNA 转入 COS 细胞, 可产生 AChE 的 G<sub>1</sub> 型单体和 G<sub>4</sub> 型四聚体, 其中 G<sub>4</sub> 分子在细胞表面表达<sup>[32]</sup>。平滑肌细胞是组成胃肠道最重要的组织细胞之一, 是引起胃肠运动的效应细胞, 平滑肌膜上的毒蕈碱受体与胆碱能神经元释放的乙酰胆碱结合后引起平滑肌收缩。抑制平滑肌收缩是治疗贲门失弛缓症、先天性巨结肠等疾病的方法之一, 其中构建携带 AChE<sub>T</sub> 基因的重组腺病毒转染至平滑肌细胞表达, 进而提高乙酰胆碱的酶解效率, 是调控平滑肌收缩的主要方案之一。

为构建外源插入 AChE<sub>T</sub> cDNA 片段的复制缺陷性腺病毒并应用于贲门失弛缓症的基因治疗, 我们利用细菌内同源重组机制构建腺病毒质粒的 AdEasy 系统。首先通过体外连接构建插入 AChE<sub>T</sub> cDNA 片段的穿梭质粒 pAdTrack-CMV- AChE<sub>T</sub>。通过 Pme I 酶切线性化后, 将线性的 pAdTrack-CMV- AChE<sub>T</sub> 质粒左臂和右臂的同源区分别与骨架载体 pAdEasy-1 上的腺病毒基因组在大肠杆菌内进行同源重组, 同时利用抗生素筛选, 2 wk 内即可得到重组腺病毒质粒 pAd AChE<sub>T</sub>。通过 Pac I 内切酶线性化, 去除质粒上的 ori 和卡那霉素抗性编码基因, 并暴露其 ITR 序列后, 直接转染至 293 细胞内包装便得到了所需的重组腺病毒 Ad AChE<sub>T</sub>。由于在同源重组时整合了 GFP, 可在包装和扩增的同时直接观察转染和感染的效率, 大大缩短了基因治疗的构建和鉴定过程, 克服了传统方法步骤周期长, 效率低的缺点<sup>[33-34]</sup>。

为进一步将新构建的 Ad AChE<sub>T</sub> 应用于贲门失弛缓症的基因治疗, 我们将一定滴度的 Ad AChE<sub>T</sub> 体外感染

原代培养的猫平滑肌细胞. RT-PCR 和乙酰胆碱酯酶活力检测结果提示, Ad AChE<sub>T</sub> 的表达不仅稳定高效, 同时大量瞬时表达 AChE<sub>T</sub> 的平滑肌细胞乙酰胆碱酯酶活力增高, 从而可提高乙酰胆碱的分解, 抑制机体平滑肌的收缩.

#### 4 参考文献

- Vittoria A, Costagliola A, Carrese E, Mayer B, Cecio A. Nitric oxide-containing neurons in the bovine gut, with special reference to their relationship with VIP and galanin. *Arch Histol Cytol* 2000;63:357-368
- Rumessen JJ, de Kerchove d'Exaerde A, Mignon S, Bernex F, Timmermans JP, Schiffmann SN, Panthier JJ, Vanderwinden JM. Interstitial cells of Cajal in the striated musculature of the mouse esophagus. *Cell Tissue Res* 2001;306:1-14
- Kurjak M, Fritsch R, Saur D, Schusdziarra V, Allescher HD. Functional coupling between nitric oxide synthesis and VIP release within enteric nerve terminals of the rat: involvement of protein kinase G and phosphodiesterase 5. *J Physiol* 2001; 534(Pt 3):827-36
- Cao Y, Xie P, Xing Y. Role of endogenous cholinergic nerve in esophageal dysmotility with reflux esophagitis. *Zhonghua Neike Zazhi* 2001;40:670-672
- Xie P, Medda B, Ren J, Mustin E, Shaker R, Koch TR. Choline acetyltransferase activity parallels the pressure gradient in the feline pharyngo-esophageal region. *Auton Neurosci* 2001; 89:125-127
- Nguyen VT, Hall LL, Gallacher G, Ndoye A, Jolkovsky DL, Webber RJ, Buchli R, Grando SA. Choline acetyltransferase, acetylcholinesterase, and nicotinic acetylcholine receptors of human gingival and esophageal epithelia. *J Dent Res* 2000;79:939-949
- Breyer B, Jiang W, Cheng H, Zhou L, Paul R, Feng T, He TC. Adenoviral vector-mediated gene transfer for human gene therapy. *Curr Gene Ther* 2001;1:149-162
- Paul R, Haydon RC, Cheng H, Ishikawa A, Nenadovich N, Jiang W, Zhou L, Breyer B, Feng T, Gupta P, He TC, Phillips FM. Potential use of sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease. *Spine* 2003;28:755-763
- Takeda T, Inaba H, Yamazaki M, Kyo S, Miyamoto T, Suzuki S, Ehara T, Kakizawa T, Hara M, DeGroot LJ, Hashizume K. Tumor-specific gene therapy for undifferentiated thyroid carcinoma utilizing the telomerase reverse transcriptase promoter. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3531-3538
- Gao H, Wang J, Zhang W, Jiang Y, Niu D, Wang X. Recombinant adenovirus carrying glial cell line-derived neurotrophic factor gene protect midbrain dopaminergic neurons in mice. *Beijing Daxue Xuebao* 2003;35:256-260
- Siemens DR, Crist S, Austin JC, Tartaglia J, Ratliff TL. Comparison of viral vectors: gene transfer efficiency and tissue specificity in a bladder cancer model. *J Urol* 2003;170:979-984
- Appleby CE, Kingston PA, David A, Gerdes CA, Umana P, Castro MG, Lowenstein PR, Heagerty AM. A novel combination of promoter and enhancers increases transgene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and coronary arteries in vivo after adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther* 2003;10:1616-1622
- Gao JQ, Tsuda Y, Katayama K, Nakayama T, Hatanaka Y, Tani Y, Mizuguchi H, Hayakawa T, Yoshie O, Tsutsumi Y, Mayumi T, Nakagawa S. Antitumor effect by interleukin-11 receptor alpha-locus chemokine/CCL27, introduced into tumor cells through a recombinant adenovirus vector. *Cancer Res* 2003;63:4420-4425
- Li H, Tang QY, Zhang Y, Wang SH, Guo CY. Development of a canine adenovirus type 1 vaccine strain E3-deleted based expression vector. *Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao* 2001;23:40-44
- Dong X, Hu JY, Xie TH, Sun MS, Dai CB, Ma YB. Construction of a recombinant human adenovirus expressing the ORF2 antigen of HEV and immunization of mice by mucosal system. *Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao* 2003;25:324-328
- Xu ZQ, Su CB, Chen SS, Ren ZY, Di X, Ma WB. Gene therapy of rat prolactinomas mediated by adenoviral vectors with rat tyrosine hydroxylase gene. *Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao* 2003;25:185-189
- Mukogawa T, Koyama F, Tachibana M, Takayanagi A, Shimizu N, Fujii H, Ueno M, Matsumoto H, Takeuchi T, Nakajima Y. Adenovirus-mediated gene transduction of truncated IkappaBalpha enhances radiosensitivity in human colon cancer cells. *Cancer Sci* 2003;94:745-750
- Sun M, Zan Y, Ma Y, Zhang G, Du Q, Dai C. Expression and glycosylation of rotavirus strain SA11 VP4 protein in a recombinant adenovirus. *Chin Med Sci J* 2001;16:129-134
- Tsutsui T, Koide H, Fukahori H, Isoda K, Higashiyama S, Maeda I, Tashiro F, Yamato E, Miyazaki J, Yodoi J, Kawase M, Yagi K. Adenoviral transfection of hepatocytes with the thioredoxin gene confers protection against apoptosis and necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;307:765-770
- Conget PA, Minguell JJ. Adenoviral-mediated gene transfer into ex vivo expanded human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Exp Hematol* 2000;28:382-390
- Fujino M, Adachi K, Kawasaki M, Kitazawa Y, Funeshima N, Okuyama T, Kimura H, Li XK. Prolonged survival of rat liver allograft with adenoviral gene transfection of human immunodeficiency virus type 1 nef. *Liver Transpl* 2003;9:805-813
- Chen SL, Zhang BR, Mei J, Xu ZY, Zhu JL, Cai KH, Huang SD, Liu YL. Induction of angiogenesis in ischemic myocardium by adenovirus mediated angiopoietin-1 gene transfer, an experimental study. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2003;83:637-640
- Davis AR, Wivel NA, Palladino JL, Tao L, Wilson JM. Construction of adenoviral vectors. *Mol Biotechnol* 2001;18:63-70
- Breyer B, Jiang W, Cheng H, Zhou L, Paul R, Feng T, He TC. Adenoviral vector-mediated gene transfer for human gene therapy. *Curr Gene Ther* 2001;1:149-162
- Minic J, Chatonnet A, Krejci E, Molgo J. Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase activity and quantal transmitter release at normal and acetylcholinesterase knockout mouse neuromuscular junctions. *Br J Pharmacol* 2003;138:177-187
- Mense S, Simons DG, Hoheisel U, Quenzer B. Lesions of rat skeletal muscle after local block of acetylcholinesterase and neuromuscular stimulation. *J Appl Physiol* 2003;94:2494-2501
- Deprez P, Inestrosa NC, Krejci E. Two different heparin-binding domains in the triple-helical domain of ColQ, the collagen tail subunit of synaptic acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 2003; 278:23233-23242
- Steen MS, Froehner SC. Perle Can fix your muscle AChEs. *Trends Neurosci* 2003;26:241-242
- Morel N, Leroy J, Ayon A, Massoulié J, Bon S. Acetylcholinesterase H and T dimers are associated through the same contact. *J Biol Chem* 2001;276:37379-37389
- Massoulié J. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals* 2002;11:130-143
- Perrier AL, Massoulié J, Krejci E. PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron* 2002;33:275-285
- Ohno K, Engel AG, Brengman JM, Shen XM, Heidenreich F, Vincent A, Milone M, Tan E, Demirci M, Walsh P, Nakano S, Akiguchi I. The spectrum of mutations causing end-plate acetylcholinesterase deficiency. *Ann Neurol* 2000;47:162-170
- 林勇, 陈伟忠, 谢渭芬, 张忠兵. 重组缺陷性腺病毒基因治疗肝纤维化的研究与应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:321-325
- 宁守斌, 张忠兵, 沈茜, 谢渭芬, 杨秀疆, 赵新, 信栓力. 胃肠道平滑肌细胞作为 eNOS 基因转移靶细胞的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:986-989

# 食管癌淋巴结微转移的诊断及预后的前瞻性研究

王 洲, 刘相燕, 刘凡英, 陈景寒

王洲, 刘相燕, 刘凡英, 陈景寒, 山东省立医院胸外科 山东省济南市 250021  
王洲, 男, 1962-02-26 生, 河北省曲周县人, 汉族. 2001 年中国医科大学胸外科博士, 现山东大学临床医学院山东省立医院临床博士后流动站研究, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事肺癌和食管癌淋巴结转移的基础及临床研究.  
项目负责人: 王洲, 250021, 山东省济南市, 山东省立医院胸外科.  
wz620226@hotmail.com  
电话: 0531-7938911-2387  
收稿日期: 2003-06-17 接受日期: 2003-08-18

## Lymph node micrometastasis in patients with esophageal cancer: diagnosis and a prospective study of impact on prognosis

Zhou Wang, Xiang-Yan Liu, Fan-Ying Liu, Jin-Han Chen

Zhou Wang, Xiang-Yan Liu, Fan-Ying Liu, Jin-Han Chen, Department of Thoracic Surgery, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, Shandong Province, China  
Correspondence to: Dr. Zhou Wang, Department of Thoracic Surgery, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, Shandong Province, China.  
wz620226@hotmail.com  
Received: 2003-06-17 Accepted: 2003-08-18

## Abstract

**AIM:** To investigate genetically diagnostic method of lymph node micrometastasis in patients with esophageal cancer and to evaluate its prognostic significance

**METHODS:** Using assays of reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), three hundred and sixty-six regional lymph nodes obtained from sixty-three patients with squamous cell cancer of the esophagus without invasion confirmed by routine histopathologic analysis (pN<sub>0</sub>) were studied to further detect mRNA for Mucin1 (myc1) gene and determine micrometastasis. All the patients were followed up. Survival difference was compared by  $\chi^2$  test. Logistic regressive analysis was performed to determined independent prognostic factors.

**RESULTS:** Specificity of genetic diagnosis for lymph node micrometastasis was 100% (30/30); Sensitivity of genetic diagnosis for lymph node micrometastasis was 97% (27/30). myc1 mRNA was identified in thirty lymph nodes (8.2%) from twenty-two patients (34.9%). Lymph node micrometastasis was diagnosed in these patients. Survival rate at 3-year in patients with nodal micrometastasis (54.5%) was lower than that in patients without nodal micrometastasis (80.5%) ( $P < 0.01$ ). In logistic analysis nodal micrometastasis ( $P < 0.05$ , OR=3.71) and T<sub>3</sub> tumor ( $P < 0.05$ , OR=7.17) were independent prognostic factors.

**CONCLUSION:** Nodal micrometastasis can be genetically diagnosed by the detection of expression of myc1 mRNA in lymph node of patients with pN<sub>0</sub> esophageal carcinoma; Poorer prognosis after radical surgery in the patients may

be correlated with nodal micrometastasis.

Wang Z, Liu XY, Liu FY, Chen JH. Lymph node micrometastasis in patients with esophageal cancer: diagnosis and a prospective study of impact on prognosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(1):121-124

## 摘要

**目的:** 探索食管癌淋巴结微转移的基因诊断方法并评价其预后意义.

**方法:** 应用逆转录聚合酶链式反应法(RT-PCR), 对 63 例食管鳞癌患者手术后病理诊断阴性的区域淋巴结(pN<sub>0</sub>)进行进步研究, 检测其 Mucin1 (myc1) 基因 mRNA 表达, 对淋巴结微转移进行基因诊断. 对患者随访, 应用  $\chi^2$  检验比较患者的生存差别; 采用 Logistic 多因素回归分析, 判定独立的预后因素.

**结果:** 淋巴结微转移基因诊断的特异度为 100%(30/30); 淋巴结微转移基因诊断的灵敏度为 90%(27/30). 366 枚 pN<sub>0</sub> 淋巴结中, 22 例患者 (34.9%) 的 30 枚淋巴结 (8.2%) 检测到 myc1 基因 mRNA 的表达, 诊断为淋巴结微转移. 淋巴结微转移者 3a 生存率为 54.5%(12/22), 无转移者 3a 生存率为 80.5%(33/41), 两组相比较差别显著 ( $P < 0.01$ ). 多因素回归分析结果显示, T<sub>3</sub> 肿瘤 ( $P < 0.05$ , OR=7.17) 淋巴结微转移 ( $P < 0.05$ , OR=3.71) 是独立的预后因素.

**结论:** 应用 RT-PCR 法检测食管癌区域淋巴结中 myc1 基因 mRNA 的表达, 可以诊断淋巴结微转移; 淋巴结微转移与 pN<sub>0</sub> 患者预后不良有关.

王洲, 刘相燕, 刘凡英, 陈景寒. 食管癌淋巴结微转移的诊断及预后的前瞻性研究. 世界华人消化杂志 2004;12(1):121-124

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/121.asp>

## 0 引言

食管癌在我国常见<sup>[1-4]</sup>. 区域淋巴结转移 (N<sub>+</sub>) 是食管癌重要的不利预后因素, 手术后 5a 生存率约 10%, 多数患者死于手术后肿瘤转移复发; 无淋巴结转移 (N<sub>0</sub>) 的食管癌患者, 根治切除后 5a 生存率可达 70%, 但也仍有部分患者发生肿瘤的早期转移复发<sup>[5-8]</sup>. N<sub>0</sub> 食管癌患者 (I - II<sub>A</sub> 期), 手术后肿瘤的早期转移复发可能与常规病理检查漏诊的淋巴结微转移有关<sup>[9-11]</sup>. 粘蛋白 1 (Mucin1, myc1) 基因是上皮组织特异性标志物, 在上皮组织及起源于上皮组织的恶性肿瘤中有广泛表达, 但是正常淋巴结中无该基因的表达<sup>[12-15, 18]</sup>, 如果在食管癌患者的

区域淋巴结中检测到 MUC1 基因的表达, 就可以诊断为淋巴结转移癌<sup>[12]</sup>. 我们应用逆转录聚合酶链反应法 (RT-PCR), 检测病理阴性的食管癌区域淋巴结中 myc1 基因 mRNA 的表达, 诊断食管癌淋巴结微转移并对其预后意义进行探讨.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院胸外科 1999-01/2000-01 根治切除后病理诊断为无淋巴结转移(pN<sub>0</sub>)的食管鳞癌患者 63 例, 男 48 例, 女 15 例, 年龄 47-71(平均 58 ± 5 岁)(表 1). TNM 分期依照 AJCC1997 年标准<sup>[5]</sup>. 食管癌根治性切除采用 Ivor-Lewis 术式, 即右胸及上腹部切口, 食管大部切除. 依照食管癌淋巴结分布图<sup>[5]</sup>清扫区域淋巴结, 右胸顶部食管-胃吻合器(美国强生公司)机械法吻合. 本组病例手术后病理检查食管上、下断端无残留癌. 共清扫区域淋巴结 366 枚, 将摘除之淋巴结沿长轴切开, 标号后随机选取一半送常规病理检查, 另一半用锡箔纸包裹后浸入液氮中 1 min 速冻, 然后置于 -80 °C 冰箱内保存, 用于 RT-PCR. 对照组淋巴结取自本科同期手术治疗的食管疾病患者, 其中阴性对照组为食管良性病变的食管旁淋巴结 30 枚, 阳性对照组为食管鳞癌术后病理诊断淋巴结转移癌的区域淋巴结 15 枚, 癌组织标本 15 个. 本组患者无严重的围手术期并发症, 手术后对患者随访 3 a, 随访率 100%, 本组病例未经手术后辅助放、化疗. 每年对患者至少进行两次复查, 监测有否手术后肿瘤复发或转移. 复查包括全面体检、上消化道造影检查、胸部 CT 扫描、腹部超声检查, 必要时纤维食管镜检查. 记录肿瘤复发或转移的部位和时间, 死于肿瘤复发或转移的患者纳入预后分析中.

表 1 入选病例临床资料一览表

临床特征	n	3 a 生存(%)
性别		
男	43	31 (72.1)
女	20	14 (70)
肿瘤位置		
胸下段	25	19 (76)
胸中段	38	34 (89.5)
病变长度		
<3 cm	8	7 (12.8)
3-5 cm	23	17 (73.9)
>5 cm	32	21 (65.6)
TNM 分期		
I (T <sub>1</sub> )	11	9 (81.8)
II <sub>A</sub> (T <sub>2</sub> )	35	29 (82.9)
II <sub>A</sub> (T <sub>3</sub> )	17	7 (41.2)

**1.2 方法** 淋巴结微转移的诊断方法参照相关的报道<sup>[12, 13]</sup>. 按 Trizol 试剂(GIBCOBRL 公司)说明书, 提取每枚淋巴

结标本的总 RNA; 使用 RT-PCR 试剂盒(Takara shuzo 公司), 按操作说明将其反转录成 cDNA, 然后在下列条件下进行 PCR: 94 °C 2 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 共 30 次循环; PCR 产物电泳, 应用数码凝胶图像分析系统记录结果, 在 287 bp 处显带者为 myc1 基因 mRNA 阳性(选用的 myc1 基因上、下游引物可以扩增 287 bp 的 cDNA 片段), 诊断为淋巴结微转移. PCR 阳性产物提纯, 由宝生物工程(大连)有限公司完成 cDNA 测序.

统计学处理 应用  $\chi^2$  检验比较有、无淋巴结微转移患者的生存差别, P < 0.05 为有显著差别; 应用 SPSS10.0 软件进行 Logistic 多因素回归分析, 判定独立的预后因素.

## 2 结果

**2.1 基因诊断的灵敏度和特异度** 阳性对照组的 15 枚淋巴结中, 12 枚检测到了 myc1 基因 mRNA 的表达. 15 个癌组织标本均为 myc1 基因 mRNA 阳性. 对 myc1 基因 mRNA 阳性电泳标本测序, 结果显示该 287 bp 的 cDNA 片段与人类 MUC1 基因 100% 同源. 阴性对照组的 30 枚淋巴结均无 myc1 基因 mRNA 的表达. 以病理诊断作为“金标准”, 基因诊断的灵敏度为 90%(27/30), 特异度为 100%(30/30). 基因诊断的特异度高表明, 对 myc1 基因 mRNA 阳性淋巴结, 提示有淋巴结转移癌存在.

**2.2 淋巴结微转移与预后的关系** 实验组 63 例患者的 366 枚淋巴结中, 22 例患者(34.9%)的 30 枚淋巴结(8.2%)检测到 myc1 基因 mRNA 的表达, 诊断为淋巴结微转移. 根据基因诊断分期, 这些患者的 TNM 分期由 I - II<sub>A</sub> 期上调为 II<sub>B</sub> - III 期. PCR 产物凝胶电泳照片见图 1, myc1 基因 mRNA 阳性患者临床资料见表 2.

表 2 myc1 基因 mRNA 阳性患者临床资料

编号	肿瘤位置	pTNM 分期	阳性淋巴结站 <sup>a</sup>	基因再分期	预后
1	胸下段	I (T <sub>1</sub> )	8M	II <sub>B</sub>	健在
2	胸下段	I (T <sub>1</sub> )	8L	II <sub>B</sub>	健在
3	胸下段	I (T <sub>1</sub> )	8M	II <sub>B</sub>	健在
4	胸下段	I (T <sub>1</sub> )	8M, 17	II <sub>B</sub>	死亡
5	胸中段	II <sub>A</sub> (T <sub>2</sub> )	8L (2 枚)	II <sub>B</sub>	死亡
6	胸中段	II <sub>A</sub> (T <sub>2</sub> )	8M, 8L	II <sub>B</sub>	死亡
7	胸中段	II <sub>A</sub> (T <sub>2</sub> )	8L	II <sub>B</sub>	健在
8	胸下段	II <sub>A</sub> (T <sub>2</sub> )	8M	II <sub>B</sub>	死亡
9	胸中段	II <sub>A</sub> (T <sub>2</sub> )	8L	II <sub>B</sub>	死亡
10	胸中段	II <sub>A</sub> (T <sub>2</sub> )	8M	II <sub>B</sub>	死亡
11	胸中段	II <sub>A</sub> (T <sub>2</sub> )	8M, 8L	II <sub>B</sub>	健在
12	胸中段	II <sub>A</sub> (T <sub>2</sub> )	8L	II <sub>B</sub>	死亡
13	胸中段	II <sub>A</sub> (T <sub>2</sub> )	8L	II <sub>B</sub>	健在
14	胸中段	II <sub>A</sub> (T <sub>2</sub> )	8L	II <sub>B</sub>	健在
15	胸下段	II <sub>A</sub> (T <sub>2</sub> )	8L, 17(2 枚)	II <sub>B</sub>	健在
16	胸中段	II <sub>A</sub> (T <sub>3</sub> )	8L	III	死亡
17	胸中段	II <sub>A</sub> (T <sub>3</sub> )	8M, 7	III	健在
18	胸下段	II <sub>A</sub> (T <sub>3</sub> )	8M	III	健在
19	胸中段	II <sub>A</sub> (T <sub>3</sub> )	17	III	健在
20	胸中段	II <sub>A</sub> (T <sub>3</sub> )	8M	III	健在
21	胸下段	II <sub>A</sub> (T <sub>3</sub> )	8M(2 枚)	III	死亡
22	胸中段	II <sub>A</sub> (T <sub>3</sub> )	8M	III	死亡

<sup>a</sup> 依照 Korst 修订的食管癌淋巴结分布图<sup>[1]</sup>: 8M 胸中段食管旁淋巴结; 8L 胸下段食管旁淋巴结; 7 隆凸下淋巴结; 17 胃左动脉旁淋巴结.



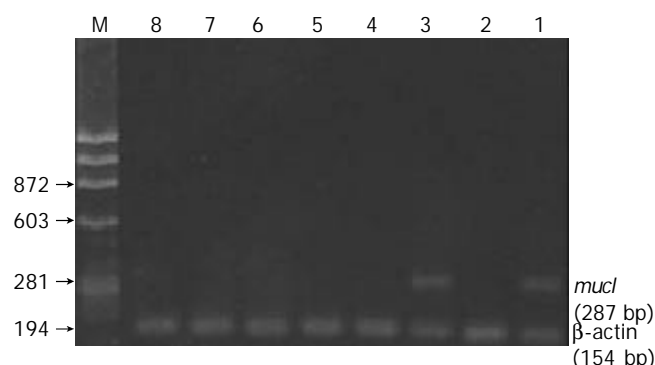


图1 PCR产物凝胶电泳图. 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3-8: 区域淋巴结(3 myc1 阳性); M: 分子标准(bp).

手术后3 a随访期内, 63患者中有22例发生肿瘤复发或转移(34.9%), 其中的18例患者随访终结时死亡, 3 a生存率为71.4%. 18例的死亡患者中, 淋巴结微转移者占10例, 无微转移者占8例. 有淋巴结微转移患者的3 a生存率为54.5%(12/22), 无转移者3 a生存率为80.5%(33/41), 两组相比较差别非常显著( $\chi^2 = 4.72$ ,  $P < 0.01$ ). 对年龄(连续变量)、性别、肿瘤位置、病变长度、肿瘤T分期及有无淋巴结微转移进行Logistic多因素回归分析(表3), 结果显示肿瘤的T分期和淋巴结微转移是pN<sub>0</sub>食管鳞癌患者独立的预后因素( $P < 0.05$ ), 患者的3 a死亡率随T分期增加和淋巴结隐性微转移的发生而增高. T<sub>3</sub>患者死亡的概率是T<sub>1</sub>患者的7.1倍(OR=7.175); 淋巴结隐性微转移患者死亡的概率是无转移患者的3.7倍(OR=3.716).

表3 Logistic多因素回归分析结果

预后因素	回归系数	S.E.	Wald统计量	P值	OR值	95%CI
肿瘤T分期: T <sub>3</sub> vs T <sub>1</sub>	1.971	0.970	4.130	0.042	7.175	1.073-47.990
淋巴结微转移: 有 vs 无	1.313	0.648	4.102	0.043	3.716	1.043-13.234

S.E. 标准误; OR 优势比; CI 可信区间.

### 3 讨论

pN<sub>0</sub>(I - II<sub>A</sub>期)食管癌患者, 虽然病变比较局限、无淋巴结转移, 但是手术切除后, 也仍然有部分患者发生肿瘤转移、复发. Raja et al<sup>[9]</sup>研究发现, pN<sub>0</sub>食管癌患者根治性切除手术后, 肿瘤的转移、复发率可高达30-50%. 目前, HE染色常规病理检查是诊断淋巴结转移癌的标准方法, 临床通常仅对淋巴结标本的一张或几张切片进行病理检查, 这种做法对淋巴结微小转移病灶的漏诊高达20%<sup>[16]</sup>. 常规病理检查漏诊的微小转移病灶称为淋巴结微转移<sup>[17]</sup>, 淋巴结微转移导致了TNM分期的低估. 许多研究认为, pN<sub>0</sub>食管癌患者根治性切除手术后, 肿瘤的早期转移、复发可能与淋巴结微转移有关<sup>[9-11]</sup>. 淋巴结标本连续切片及免疫组化检查可降低淋巴结微转移的漏诊率<sup>[17-18]</sup>, 提高TNM分期的准确性. 但是, 对淋巴结进行连续切片病理检查, 工作烦琐、费时、

费力, 一般情况下在日常工作中不能常规应用. 近年来, 有一些应用分子生物学技术诊断淋巴结微转移的研究报道, 与连续切片和免疫组化方法相比较, 具有更高的灵敏度<sup>[9-10, 17]</sup>.

myc1基因是一种上皮组织特异性标志物, 位于染色体1q21-24, 编码上皮组织细胞膜上粘蛋白的核心蛋白, 起源于胚胎前肠的大部分胃肠道组织和食管鳞状上皮, 均有myc1基因的表达, 但正常的淋巴结组织中则无该基因的表达<sup>[12-13, 15, 18]</sup>. 起源于鳞状上皮的食管鳞癌亦保留myc1基因的表达<sup>[14]</sup>, 如果在食管癌患者的区域淋巴结中检测到myc1基因的表达, 就可以诊断为淋巴结转移癌<sup>[12]</sup>. Salerno et al<sup>[18]</sup>应用RT-PCR方法检测myc1基因mRNA表达, 诊断非小细胞肺癌淋巴结微转移, 显示出该方法具有较高的灵敏度, 10<sup>7</sup>个细胞中混有1个myc1基因阳性细胞即可检测到myc1基因mRNA的表达.

我们通过对照组的myc1基因mRNA检测, 显示了该方法诊断食管癌淋巴结转移有较高的特异度, 30枚阴性对照淋巴结中均无myc1基因mRNA的表达, 这表明对myc1基因mRNA阳性淋巴结, 临床上可以诊断为淋巴结转移癌. 但是, 在以病理结果作为“金标准”时, 诊断灵敏度不理想, 阳性对照组标本在中, 3个淋巴结标本未能检测到myc1基因mRNA的表达. 分析其原因可能与取材方法有关. 因为由于病理检查的要求, 实验只能对淋巴结部分取材, 进行RT-PCR检查, 由于转移病灶较小, 检测的半枚淋巴结中可能并未包括转移癌病灶在内. 本组中有22例患者的30枚淋巴结检测到myc1基因mRNA的表达, 诊断为淋巴结微转移, 这些患者的TNM分期由I - II<sub>A</sub>期上调为II<sub>B</sub> ~ III期. 随访统计结果表明, 有淋巴结微转移者3 a生存率低于无转移的患者. 本组病例均为T<sub>3</sub>以内的患者, 肿瘤未侵及其他器官, 施行了肿瘤及胸部食管大部切除、胸及腹部淋巴结清扫, 手术后病理检查上、下断端无残留癌, 基本达到了根治切除的目标; 而且, 为了排除其他与预后相关的混杂因素对统计分析的影响, 例如手术方式、手术后的辅助治疗等, 增加可比性, 我们采用前瞻性研究来控制混杂因素, 减少了偏倚, 研究结果更具客观性. Logistic多因素回归分析结果亦显示, 淋巴结微转移是独立的预后因素, 淋巴结微转移患者死亡的概率是无转移患者的3.7倍. 因此, 我们初步认为, 根治切除后的pN<sub>0</sub>食管癌, 患者预后不良与淋巴结微转移有关. 我们同意Hosch et al<sup>[11]</sup>的观点, 淋巴结微转移是食管癌独立预后因素, 建议食管癌TNM分期系统中要包括淋巴结微转移这一要素.

### 4 参考文献

- 王学勤, 韩兴鹏. 食管癌的外科治疗. 世界华人消化杂志 2000;8: 1023-1024
- He YT, Hou J, Qiao CY, Chen ZF, Song GH, Li SS, Meng FS, Jin HX, Chen C. An analysis of esophageal cancer incidence in

- Cixian county from 1974 to 1996. *World J Gastroenterol* 2003; 9:209-213
- 3 王苑本, 余国行, 高友芝. 食管癌的治疗方法和实施原则. 世界华人消化杂志 2000;8:1021-1023
  - 4 吕宗舜, 黄象谦. 食管癌的诊断进展. 世界华人消化杂志 2000;8: 1017-1019
  - 5 Korst RJ, Rusch VW, Venkatraman E, Bains MS, Burt ME, Downey RJ, Ginsberg RJ. Proposed revision of the staging classification for esophageal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:660-670
  - 6 Visbal AL, Allen MS, Miller DL, Deschamps C, Trastek VF, Pairplero PC. Ivor Lewis esophagogastrrectomy for esophageal cancer. *Ann Thorac Surg* 2001;71:1803-1808
  - 7 Rice TW, Blackstone EH, Adelstein DJ, Zuccaro G Jr, Vargo JJ, Goldblum JR, Rybicki LA, Murthy SC, Decamp MM. N1 esophageal carcinoma: the importance of staging and downstaging. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;121: 454-464
  - 8 Eloubeidi MA, Desmond R, Arguedas MR, Reed CE, Wilcox CM. Prognostic factors for the survival of patients with esophageal carcinoma in the U.S.: the importance of tumor length and lymph node status. *Cancer* 2002;95:1434-1443
  - 9 Raja S, Luketich JD, Kelly LA, Gooding WE, Finkelstein SD, Godfrey TE. Rapid, quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction: application to intraoperative molecular detection of occult metastases in esophageal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123:475-482
  - 10 Godfrey TE, Raja S, Finkelstein SD, Gooding WE, Kelly LA, Luketich JD. Prognostic value of quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in lymph node-negative esophageal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001;7:4041-4048
  - 11 Hosch S, Kraus J, Scheunemann P, Izbicki JR, Schneider C, Schumacher U, Witter K, Speicher MR, Pantel K. Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer. *Cancer Res* 2000;60: 6836-6840
  - 12 王洲, 刘相燕, 刘凡英. 食管癌淋巴结隐匿性转移的基因诊断. 中国癌症杂志 2002;12:317-319
  - 13 Wang Z, Yin H, Zhang L, Lan X, Li H. Gene diagnosis and prognosis of mediastinal lymph node occult micrometastasis in non-small cell lung carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2002;24:247-249
  - 14 Song ZB, Gao SS, Yi XN, Li YJ, Wang QM, Zhuang ZH, Wang LD. Expression of MUC1 in esophageal squamous-cell carcinoma and its relationship with prognosis of patients from Linzhou city, a high incidence area of northern China. *World J Gastroenterol* 2003;9:404-407
  - 15 王洲, 殷洪年. RT-PCR法检测 MUC1 mRNA 诊断肺癌纵隔淋巴结隐匿转移. 中国肺癌杂志 2002;5:191-93
  - 16 王洲, 殷洪年. 肺癌隐匿性淋巴结转移的诊断及其意义. 中国肺癌杂志 2001;4:396-398
  - 17 Jiao X, Krasna MJ. Clinical significance of micrometastasis in lung and esophageal cancer: a new paradigm in thoracic oncology. *Ann Thorac Surg* 2002;74:278-284
  - 18 Salerno CT, Frizelle S, Niehans GA, Ho SB, Jakkula M, Kratzke RA, Maddaus MA. Detection of occult micrometastases in non-small cell lung carcinoma by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Chest* 1998;113:1526-1532

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 2002年度各学科影响因子较高的医学3种期刊

学科	排名	期刊	影响因子
预防医学	1	中华传染病杂志	1.416
	2	中华结核和呼吸杂志	1.239
	3	营养学报	0.749
基础医学综合类	1	中华医院管理杂志	1.708
	2	中华医院感染学杂志	1.349
	3	中国危重病急救医学	0.845
药学	1	中国新药与临床杂志	0.537
	2	中国海洋药物	0.528
	3	药学学报	0.508
临床医学	1	WORLD J GASTROENTEROL	2.579
	2	世界华人消化杂志	1.926
	3	中华肝脏病杂志	1.858
中医中药学	1	骨与关节损伤杂志	0.720
	2	中国中西医结合急救杂志	0.533
	3	中草药	0.478
军事医学与特种医学	1	中国内镜杂志	0.992
	2	中华放射学杂志	0.975

# 老年胃食管反流病患者食管运动功能改变

郭荣斌, 彭丽华, 程留芳, 王巍峰

郭荣斌, 彭丽华, 程留芳, 王巍峰, 中国人民解放军总医院消化科  
北京市 100853

郭荣斌, 女, 1952-09-28 生, 甘肃正宁县人, 汉族. 1989 年解放军军医进修学院毕业, 副主任技师. 主要从事胃肠激素及胃肠功能性疾病的临床研究工作. 项目负责人: 郭荣斌, 100853, 北京市复兴路 28 号, 中国人民解放军总医院消化科.

电话: 010-68154653 传真: 010-68154653

收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-07-24

## Alteration of esophageal motility in elderly patients with gastroesophageal reflux disease

Rong-Bin Guo, Li-Hua Peng, Liu-Fang Cheng, Wei-Feng Wang

Rong-Bin Guo, Li-Hua Peng, Liu-Fang Cheng, Wei-Feng Wang,  
Department of Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Correspondence to: Rong-Bin Guo, Department of Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China.

Received: 2003-06-06 Accepted: 2003-07-24

### Abstract

**AIM:** To study the relationship between gastroesophageal reflux symptoms and esophageal motility in elderly gastroesophageal reflux disease (GERD).

**METHODS:** Esophageal manometry and 24-hour pH monitoring were performed in 40 elderly and 42 non-elderly patients of GERD, in which 21 cases were with reflux esophagitis (RE) and 21 with non-erosive reflux disease (NERD) confirmed by endoscopy.

**RESULTS:** Elderly RE and NERD patients had lower LESP ( $1.0 \pm 0.79$  and  $1.16 \pm 0.90$  kPa) than elderly control group ( $1.72 \pm 0.58$  kPa) and non-elderly control group ( $1.96 \pm 0.49$  kPa), respectively ( $P < 0.01$ ). The pressure of lower esophageal peristalsis wave (LEPP) and upper esophageal peristalsis wave (UEPP) were ( $4.94 \pm 2.23$  kPa) and ( $4.20 \pm 1.75$  kPa) in elderly RE, and ( $2.64 \pm 3.32$  kPa) and ( $4.58 \pm 2.33$  kPa) in elderly NERD. They were lower than elderly control group ( $10.22 \pm 4.55$  kPa) and ( $6.86 \pm 2.11$  kPa) ( $P < 0.01$ ). In elderly RE and NERD, the frequency of non-conductivity and reverse peristalsis wave was higher than that in control group ( $P < 0.01$ ). The seven parameters of pH monitoring were significantly higher in elderly RE and NERD than control group ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** There is some disturbance of esophageal motility in elderly RE and NERD. The disturbance of esophageal motility in elderly RE and NERD is more severe than that in non-elderly patients.

Guo RB, Peng LH, Cheng LF, Wang WF. Alteration of esophageal motility in elderly patients with gastroesophageal reflux disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):125-128

### 摘要

**目的:** 探讨老年人反流性食管炎(RE)与非糜烂性反流病(NERD)这两组临床症状相似而内镜下表现不同的患者,在食管运动功能及24 h pH监测的特点.

**方法:** 1998-10/2002-04 因反酸、烧心伴胸骨后不适等症状的患者,根据我国对老年人界定的年龄标准,将观察对象分成大于或等于60岁组(即老年组)和小于60岁组(对照组).再按内镜检查结果阳性和阴性分为RE组和NERD组.老年RE组20例,男15例,女5例,平均年龄 $68 \pm 7$ 岁;老年NERD组20例,男16例,女4例,平均年龄 $66 \pm 6$ 岁.均经血生化及影像学检查除外糖尿病、进行性系统性硬化、心源性胸痛等全身慢性疾病.老年对照组20例,男13例,女7例,平均年龄 $66 \pm 5$ 岁,仅有轻度腹胀,无任何反流症状.非老年RE组21例,平均年龄 $43 \pm 8$ 岁;非老年NERD组21例,平均年龄 $44 \pm 6$ 岁;非老年对照组28例,年龄18-57岁,来自本院工作人员.食管测压及pH监测分别采用美国Sandhill公司BioLab胃肠动力学检测系统及pH监测系统.

**结果:** 老年RE组及老年NERD组的LESP分别为( $1.0 \pm 0.79$  kPa)和( $1.16 \pm 0.90$  kPa),明显低于老年对照组的( $1.72 \pm 0.58$  kPa)和非老年对照组的( $1.96 \pm 0.49$  kPa) ( $P < 0.01$ );食管体部的动力学参数LEPP、UEPP在老年RE组为( $4.94 \pm 2.23$  kPa)、( $4.20 \pm 1.75$  kPa),老年NERD组为( $2.64 \pm 3.32$  kPa)、( $4.58 \pm 2.33$  kPa),均显著低于老年对照组的( $10.22 \pm 4.55$  kPa)、( $6.86 \pm 2.11$  kPa)和非老年对照组的( $9.13 \pm 3.50$  kPa)、( $6.20 \pm 2.08$  kPa) ( $P < 0.01$ );两疾病组食管体部顺行性蠕动波出现的频率百分比均显著低于对照组,而非传导性蠕动波及反向蠕动波出现的频率百分比则明显高于对照组 ( $P < 0.01$ );24 h pH监测的7项指标均显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ).

**结论:** 老年RE及NERD患者均存在明显的胃食管反流现象,与食管运动功能失调有关,主要表现为LESP及食管体部压力降低,蠕动波运动形式紊乱,且老年组食管运动功能减退重于非老年组,尤以老年RE组为著.

郭荣斌, 彭丽华, 程留芳, 王巍峰. 老年胃食管反流病患者食管运动功能改变. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):125-128

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/125.asp>

### 0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是

由多种因素引起的酸相关性疾病,其发病率近年来呈逐渐上升趋势.根据内镜下阴性或阳性即食管黏膜破损或不破损而分为反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)及非糜烂性反流病(non-erosive reflux disease, NERD).二者临床症状相似,患者大多具有烧心、反酸、反食及胸骨后疼痛等反流症状,其发病具有随年龄增长而上升的趋势.我们探讨老年人RE与NERD这两组临床症状相似而内镜下表现不同的患者,在食管运动功能及24 h pH监测各自的特点.

## 1 材料和方法

1.1 材料 1998-10/2002-04因反酸、烧心伴胸骨后不适等症状而来我院就诊的患者,根据我国对老年人界定的年龄标准,将观察对象分成大于或等于60岁组(老年组)和小于60岁组(对照组).再按内镜检查结果阳性者和阴性者分为RE组和NERD组,其中RE组20例,男15例,女5例,平均年龄 $68 \pm 7$ 岁;NERD组20例,男16例,女4例,平均年龄 $66 \pm 6$ 岁.该两组患者均经血生化及影像学检查除外糖尿病、进行性系统性硬化、心源性胸痛等全身慢性疾病.食管炎内镜及活检诊断标准见文献[1, 2].老年对照组20例,男13例,女7例,平均年龄 $66 \pm 5$ 岁,仅有轻度腹胀,无任何反流症状.非老年RE组21例,平均年龄 $43 \pm 8$ 岁;非老年NERD组21例,平均年龄 $44 \pm 6$ 岁.非老年对照组28例,年龄18-57岁,来自本院工作人员.

1.2 方法 食管测压仪器采用美国Sandhill公司BioLab胃肠动力学检测系统.检查前先用压力定标仪对4导固态式压力微传感器探头进行定标.患者空腹取坐位,经鼻孔插入导管至胃腔(探头至鼻距55-60 cm),记录基线.采用定点牵拉法,将探头固定于LES压力最高处,嘱患者咽水6-10次,5 mL/次,两次吞咽间隔时间大于30 s,观察指标:下食管括约肌(LES)的静息压(LESP)、LES松弛压(LESRP)、LES松弛率(LESRR)、LES松弛持续时间(LESRT).然后将探头置于食管体部,分别记录各项动力学指标:食管体部下段蠕动波压力(LEPP)、体部上段蠕动波压力(UEPP)、各段蠕动波传导速度和持续时间,观察各测量点蠕动波的协调性,计算出顺行性蠕动波、非传导波及反向蠕动波出现频率所占的百分比.24 h pH监测仪器采用美国Sandhill公司BioStar pH监测系统.检查前停止服用抑酸药及胃肠动药72 h以上,检查当日禁食水.清洁胸部皮肤,将心电监护电极贴于胸骨中段皮肤并将导线与记录仪连接.在pH4和pH7的标准缓冲液中标定探头.患者取坐位,将探头经鼻孔插入胃内.用pH定位法,缓慢向外牵拉探头至pH突然显著升高即为LES处,再继续向外牵拉5 cm,加以固定.按下记录键,启动记录仪.当患者出现烧心、反酸或疼痛等症状时,按记录仪上的专用按钮进行标记.监测24 h后,终止记录,将采集到的信号经BioLink红外传输装置传

入计算机,经分析软件进行数据分析,打印出监测报告.

## 2 结果

老年RE组及老年NERD组的LESP均明显低于老年对照组( $P < 0.01$ );老年RE组的LESRP既低于老年对照组( $P < 0.01$ ),亦低于老年NERD组( $P < 0.05$ ).非老年RE组及非老年NERD组的LESP均明显低于非老年对照组( $P < 0.01$ ),两疾病组之间的LESRP差异不显著( $P > 0.05$ ),但老年NERD组的LESRP低于非老年NERD组( $P < 0.01$ ,表1).老年RE组及NERD组的LEPP及UEPP均明显低于老年对照组( $P < 0.01$ );两疾病组的顺行性蠕动波出现频率百分比均显著低于对照组,而非传导性蠕动波及反向蠕动波出现的频率百分比则明显高于对照组( $P$ 均 $< 0.01$ ),在食管体部下段表现尤为突出.食管体部上段的反向蠕动波出现频率以RE组较多,而食管体部下段的反向波出现频率则以NERD组为著.非老年疾病组的食管体部压力变化呈现出与老年组相同趋势,两疾病组的LEPP、UEPP均低于对照组,其程度较老年组略轻( $P < 0.05$ );运动形式的异常与老年组相似.老年RE组与非老年RE组之间进行比较,各项参数差异不显著( $P$ 均 $> 0.05$ ),但老年NERD组与非老年NERD组比较,食管体部下段4项参数均显示出明显差异,前者LEPP显著降低,顺行波出现频率明显减少,异常波出现频率显著增多( $P < 0.01$ ,表2).

表1 各组下食管括约肌测压结果( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	LESP(kPa)	LESRP(kPa)	LESRR(%)	LESRT(s)
老年对照组	20	$1.72 \pm 0.58$	$0.13 \pm 0.32$	$88.4 \pm 10.9$	$4.7 \pm 3.5$
老年RE组	20	$1.0 \pm 0.79^b$	$-0.41 \pm 0.51^b$	$90.8 \pm 18.8$	$5.3 \pm 3.4$
老年NERD组	20	$1.16 \pm 0.90^b$	$-0.06 \pm 0.30^c$	$93.2 \pm 9.8$	$4.5 \pm 3.4$
非老年对照组	28	$1.96 \pm 0.49$	$0.09 \pm 0.28$	$89.7 \pm 8.1$	$5.1 \pm 1.8$
非老年RE组	21	$1.12 \pm 0.75^f$	$0.0 \pm 0.33^d$	$93.6 \pm 11.0$	$6.5 \pm 3.8$
非老年NERD组	21	$1.31 \pm 0.71^f$	$0.01 \pm 0.44$	$87.3 \pm 18.7$	$5.3 \pm 3.6$

测压参数以胃内压力作为基线,食管各部位的压力变化值以基线为参照,故松弛压低于基线时即为负值.<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 老年对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ ,<sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 老年RE组; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 非老年对照组.

老年RE组和老年NERD组24 h食管pH监测各项指标均明显高于老年对照组,具有显著性差异( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ).而老年两疾病组之间比较,各项参数无统计学意义( $P < 0.05$ ).非老年RE组的各项pH监测指标均明显高于非老年对照组,而非老年NERD组仅在最长反流持续时间、pH $< 4$ 的反流次数及总计分3项指标与正常参考值相比具有显著性差异( $P < 0.05$ ).另外,老年NERD组的反流次数明显高于非老年NERD组( $P < 0.01$ ,表3).

表2 各组食管体部运动功能检测结果( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	食管体部下段				食管体部上段			
		LEPP(kPa)	顺行波(%)	非传导波(%)	反向波(%)	UEPP(kPa)	顺行波(%)	非传导波(%)	反向波(%)
老年对照组	20	10.22±4.55	94.3±12.9	4.9±12.6	0.7±3.8	6.86±2.11	89.1±21.9	9.8±21.6	1.2±4.2
老年 RE 组	20	4.94±2.23 <sup>b</sup>	65.6±32.3 <sup>b</sup>	34.4±32.3 <sup>b</sup>	0	4.20±1.75 <sup>b</sup>	81.9±27.0	15.6±25.5	24.4±7.0 <sup>b</sup>
老年 NERD 组	20	2.64±3.32 <sup>b</sup>	42.7±39.0 <sup>b</sup>	59.8±42.6 <sup>b</sup>	18.3±7.8 <sup>b</sup>	4.58±2.33 <sup>b</sup>	77.5±25.3	17.4±23.6	5.2±10.4 <sup>d</sup>
非老年对照组	28	9.13±3.50	97.2±7.1	2.8±7.2	0	6.20±2.08	98.2±5.4	1.3±4.9	0.5±2.6
非老年 RE 组	21	6.93±4.14 <sup>e</sup>	71.7±36.6 <sup>f</sup>	25.5±36.4 <sup>f</sup>	2.9±8.0	5.00±2.66	77.1±30.0 <sup>f</sup>	21.3±29.4 <sup>f</sup>	1.6±5.1
非老年 NERD 组	21	7.31±2.78 <sup>e</sup>	86.1±14.7 <sup>f</sup>	11.2±13.5 <sup>f</sup>	2.8±7.1 <sup>e</sup>	5.11±1.57 <sup>e</sup>	79.1±20.5 <sup>f</sup>	17.6±17.9 <sup>f</sup>	3.4±11.6

<sup>b</sup>P < 0.01 vs 老年对照组; <sup>d</sup>P < 0.01 vs 老年 RE 组; <sup>e</sup>P < 0.05, <sup>f</sup>P < 0.01 vs 非老年对照组。

表3 各组食管 24h 的 pH 监测结果( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	立位 pH<4 时间(%)	卧位 pH<4 时间(%)	pH<4 总时间(%)	反流>5 min 次数	最长反流 持续时间(min)	pH<4 反流次数	总计分
老年对照组	20	5.4±4.2	1.4±2.1	3.9±3.0	2.0±1.6	11±8	85±74	18±13
老年 RE 组	20	21.0±20.7 <sup>b</sup>	13.6±15.8 <sup>b</sup>	17.6±17.3 <sup>b</sup>	9.2±9.7 <sup>b</sup>	36±38 <sup>b</sup>	181±131 <sup>b</sup>	85±76 <sup>b</sup>
老年 NERD 组	20	13.0±15.1 <sup>a</sup>	11.2±16.6 <sup>b</sup>	12.8±12.0 <sup>b</sup>	6.4±6.4 <sup>b</sup>	34±33 <sup>b</sup>	158±107 <sup>b</sup>	68±60
正常参考值		< 6.3	< 1.2	< 4.2	< 3	< 9.2	< 50	< 22
非老年 RE 组	21	21.7±23.6 <sup>d</sup>	22.6±21.7 <sup>d</sup>	22.6±21.9 <sup>d</sup>	13.2±12.1 <sup>c</sup>	44±35 <sup>d</sup>	190±113 <sup>d</sup>	115±99 <sup>d</sup>
非老年 NERD 组	21	8.9±15.3	5.4±12.3	7.4±14.3	3.1±5.9	25±46 <sup>c</sup>	67±39 <sup>c</sup>	38±65 <sup>c</sup>

正常参考值为仪器所用分析软件内部设置。 <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01 vs 老年对照组; <sup>c</sup>P < 0.05, <sup>d</sup>P < 0.01 vs 正常参考值。

### 3 讨论

胃食管反流包括生理性反流和病理性反流, 病理性胃食管反流即 GERD。临床上 GERD 主要包括 RE 和未见组织学改变, 而客观证实有症状性反流的异常现象。食管、胃的运动功能调节十分复杂, 生理学、解剖学研究食管动力产生的机制, 认为其支配为神经源性, 主要通过神经肌肉收缩机制完成蠕动及传导过程。生理状态下, 胃内压力高于位于胸腔内的食管内压, 食管下段括约肌在静息状态呈收缩状态, 维持一定的压力, 是抗反流的重要屏障, 起着阻止胃肠内容物反流, 保护食管黏膜的作用<sup>[3-6]</sup>。老年人由于生理状况发生改变, 食管运动功能也随之受到一定影响。李兆申 et al<sup>[7]</sup>对 10 a 间大宗样本的调查显示, 58.6% 的原发性 RE 患者年龄超过 50 岁, 提示我国人群中 RE 的发病有随年龄增高而上升的趋势, 李泽民 et al<sup>[8]</sup>的临床观察也证实了这一点。Stalet al<sup>[9]</sup>发现随着年龄增大, 食管裂孔疝的发病率也增高, 并增加了胃食管反流发生的频率。Avidan et al<sup>[10]</sup>在对 644 例 GERD 患者经多元线性回归分析后, 发现食管裂孔疝的存在及其引起的酸反流是 RE 致病因素中一个强力因子, 食管黏膜酸暴露促进了糜烂性食管炎的发展。但也有学者<sup>[11]</sup>持反对态度, 认为食管裂孔疝在 GERD 患者中并不构成影响 RE 严重性的危险因子。为了探究此种现象的实质, Kahrilaset al<sup>[12]</sup>通过研究发现, 裂孔疝压力可分为独立的两部分, 一部分由食管内在的括约肌弹性收缩力组成, 另一部分为食管裂孔外来

压力组成。因此, 食管下括约肌可看成是由膈肌脚横纹肌与 LES 平滑肌协同作用共同形成的一个复合式括约肌, LES 可看成是由食管内在括约肌弹性收缩力和膈肌脚外来压力组成的复合性压力。推测老年 GERD 患者复合性 LES 中食管下括约肌内在弹性压力所占比例相对较低, 故容易发生胃食管反流现象。王虹 et al<sup>[13]</sup>研究发现老年人重度 RE 患者中 65% 伴有食管裂孔疝。吴道宏 et al<sup>[14]</sup>的研究支持以上观点, 并观察到老年 GERD 伴食管裂孔疝的比例更高。本组老年患者中, RE 组 65%(13/20)伴有食管裂孔疝, NERD 患者中 55%(11/20)伴有食管裂孔疝, 与国内报道相近似。

RE 和 NERD 的发生与食管运动功能失调密切相关, LES 降低是 GERD 的病因之一<sup>[15-19]</sup>。我们观察到老年及非老年两疾病组的 LES 均明显低于对照组(P < 0.01); 以老年 RE 组的 LES 和 LESRP 为最低, 但两疾病组之间压力变化不显著, 提示 LES 的动力障碍及功能失调, 使其抗反流机制受到损害, 导致反流物对食管黏膜的攻击作用增强, 是两组患者共同的病理基础, 且老年 RE 患者下食管括约肌功能障碍的严重程度明显重于非老年患者。

食管体部的正常压力和顺行性运动功能是及时清除反流物的主要力量<sup>[20]</sup>。生理状态下, 食管体部在吞咽后会出现由近端向远端的顺行性蠕动。遇有反流时, 食管的扩张可通过神经反射出现继发性蠕动, 达到容量清除作用<sup>[21-23]</sup>。因此, 食管体部蠕动波的运动形式对于维

持正常的食管运动功能是一个不容忽视的重要因素. 本文老年及非老年两疾病组的 LEPP 及 UEPP 均明显低于对照组( $P < 0.01$ ), 顺行性蠕动波出现频率百分比均显著低于对照组, 而非传导性蠕动波及反向蠕动波出现的频率百分比则明显高于对照组( $P$  均 $< 0.01$ ), 这些现象在食管体部下段表现尤为突出, 提示由于该两组患者食管体部的廓清能力减弱, 反流物不能得到及时清除, 导致食管黏膜与反流物接触的时间延长, 加重了反流物对食管黏膜的损害. 我们还观察到老年 NERD 组的 LEPP 比非老年 NERD 组显著降低, 顺行波出现频率明显减少, 异常波出现频率明显增多( $P < 0.01$ ), 提示年龄的增长可能加重原本已经存在的食管体部运动功能障碍, 与国内报道<sup>[24]</sup>一致.

动态 24 h pH 监测能客观地反映生理状态下食管内 pH 的变化<sup>[25]</sup>, 了解胃食管反流与症状间的关系, 鉴别反流现象的严重程度. 大量研究<sup>[26-30]</sup>表明, NERD 患者反流症状的严重程度与食管炎患者相近似, 酸暴露是其病因之一. 本文老年两疾病组及非老年 RE 组的各项 pH 监测指标均明显高于对照组( $P < 0.01$ ). 而三组间的反流次数、pH  $< 4$  的时间百分比、最长反流持续时间、超过 5 min 的反流次数及总计分等指标则无统计学意义( $P > 0.05$ ). 提示老年 RE, NERD 及非老年 RE 患者都存在明显的胃食管反流现象. 与食管运动功能失调有关, 主要表现为 LES, LEPP, UEPP 降低, 食管体部蠕动波运动形式紊乱.

#### 4 参考文献

- 1 中华医学会消化内镜学会. 反流性食管病(炎)诊断及治疗方案(试行). 中华内科杂志 2000;39:210
- 2 任旭. 反流性食管炎的内镜和病理学诊断及分级. 世界华人消化杂志 2000;8:1127-1128
- 3 潘琳娜, 赵洪清. 反流性食管炎的病因及食管 pH 测定和 X 检查的诊断价值. 世界华人消化杂志 2000;8:1135-1136
- 4 张兆文, 董跃斌, 李春明. 反流性食管炎患者食管和胃运动功能的变化. 世界华人消化杂志 2000;8:1130-1131
- 5 李宝杰. 反流性食管炎的病理生理. 世界华人消化杂志 2000;8:1128-1130
- 6 郭慧平, 柯美云. 胃食管反流病的研究. 新消化杂志 1997;5:732-733
- 7 李兆申, 王雯, 许国铭, 于凤海, 邹多武, 孙振兴. 反流性食管炎 1827 例临床分析. 中华内科杂志 2001;40:9-12
- 8 李泽民, 陈正言. 老年反流性食管炎 78 例临床特点分析. 实用老年医学 2001;15:93-94
- 9 Stal P, Lindberg G, Ost A, Iwarzon M, Seensalu R. Gastroesophageal reflux in healthy subjects. Significance of endoscopic findings, Histology, Age and Sex. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:121-128
- 10 Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG, Sontag SJ. Acid reflux is a poor predictor for severity of erosive reflux esophagitis. *Dig Dis Sci* 2002;47:2565-2573
- 11 Awad RA, Camacho S. *Helicobacter pylori* infection and hiatal hernia do not affect acid reflux and esophageal motility in patients with gastro-esophageal reflux. *J Gastroenterol* 2002;37:247-254
- 12 Kahrilas PJ, Lin S, Chen J, Manka M. The effect of hiatus hernia on gastro-oesophageal junction pressure. *Gut* 1999;44:476-482
- 13 王虹, 刘宾, 姜佳丽. 老年人胃食管反流病的临床特点. 中国医学科学院学报 2002;24:178-180
- 14 吴道宏, 蔡昌豪, 吴本偶, 李园. 老年胃食管反流病伴滑动性食管裂孔疝患者食管运动功能测定. 解放军医学杂志 2002;27:71-73
- 15 程文芳, 易粹琼. 反流性食管炎患者食管运动功能的研究. 世界华人消化杂志 1999;7:444-445
- 16 吴道宏, 蔡昌豪. 胃食管反流病食管测压的研究. 世界华人消化杂志 2000;8:793-794
- 17 赵荣莱. 胃食管反流性疾病的研究进展. 华人消化杂志 1998;6:265-267
- 18 隋瑞林, 许国铭, 邹多武. 食管测压对反流性食管炎的诊断价值. 新消化病学杂志 1997;5:33-34
- 19 杨建, 徐肇敏. 胃食管反流病患者的内镜分级与食管动力学指标的关系研究. 江苏医药杂志 2002;28:510-512
- 20 Dodds WJ, Dent J, Hogan WJ, Helm JF, Hauser R, Patel GK, Egide MS. Mechanisms of gastroesophageal reflux in patients with reflux esophagitis. *N Engl J Med* 1982;307:1547-1552
- 21 谢鹏雁, Bardan E, Ren J, Hogan WJ, Shaker R. 食管扩张 - 一种胃食管反流触发机制. 北京医科大学学报 2000;32:121-124
- 22 林金坤, 胡品津, 陈旻湖, 李初俊, 任明, 陈慧. 胃食管反流病的食管继发蠕动异常 - 附 80 例食管继发蠕动诱发试验结果分析. 胃肠病学和肝病学杂志 1998;7:250-255
- 23 姜铀, 徐海珊, 张伯伦. 胃食管反流病多因素评价. 中国实用内科杂志 1999;19:31-33
- 24 丁元伟. 老年健康人及反流性食管炎患者食管运动功能的测定. 中华老年医学杂志 1999;18:30-31
- 25 Adhami T, Richter JE. Twenty-four hour pH monitoring in the assessment of esophageal function. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001;13:241-254
- 26 Ho KY, Kang JY. Reflux esophagitis patients in Singapore have motor and acid exposure abnormalities similar to patients in the Western hemisphere. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1186-1191
- 27 赵卡冰, 郭荣斌, 程留芳. 胃食管反流病患者 24 h 食管 pH 的监测分析. 解放军医学杂志 2002;27:41-43
- 28 王雯, 许国铭, 李兆申, 邹多武, 朱爱勇, 于凤海. 胃及十二指肠液对食管黏膜损伤的实验研究. 中华消化杂志 2000;20:240-242
- 29 韩宏锋, 康谊. 食管 24 h pH 动态监测与胃食管反流病的诊断. 河南医科大学学报 1999;34:108-109
- 30 朱惠明, 黄勋, 邓传珍, 詹群珊. 食管内酸、胆盐监测及内镜检查对胃食管反流病的诊治意义. 中华消化杂志 2001;21:608-610



# 大承气汤和针刺治疗胃肠运动功能障碍疾病的研究

齐清会, 王 简, 回建峰, 江 力, 吴咸中

齐清会, 王简, 回建峰, 江力, 吴咸中, 天津医科大学总医院 天津市 300052  
齐清会, 男, 1947-01-28 生, 沈阳市人, 汉族, 1970 年毕业于大连医学院。  
现为天津医科大学总医院中西医结合外科主任、医学博士、教授、博士生导师, 国务院学位委员会学科评议组成员。主要从事腹部手术、中药和针刺对胃肠运动功能影响的研究, 发表论文 70 篇。  
天津市自然科学基金资助项目, No. 29613055  
项目负责人: 齐清会, 300052, 天津市和平区鞍山道 154 号, 天津医科大学总医院。qiqh@medmail.com.cn  
电话: 022-60363584 传真: 022-27813550  
收稿日期: 2003-05-14 接受日期: 2003-06-02

## Effects of dachengqitang and acupuncture on human gastrointestinal motility disorder

Qing-Hui Qi, Jian Wang, Jian-Feng Hui, Li Jing, Xian-Zhong Wu

Qing-Hui Qi, Jian Wang, Jian-Feng Hui, Li Jing, Xian-Zhong Wu,  
Department of Surgery, General Hospital of Tianjin Medical University,  
Tianjin 300052, China  
Supported by the Natural Science Foundation of Tianjin City, No. 29613055  
Correspondence to: Dr. Qing-Hui Qi, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China. qiqh@medmail.com.cn  
Received: 2003-05-14 Accepted: 2003-06-02

## Abstract

AIM: To study the effects of dachengqitang and acupuncture at *zusanli* and *neiting* on disorders of the gastrointestinal motility and to elucidate the mechanism.

METHODS: The patients after abdominal surgery ( $n=34$ ), diabetes mellitus with gastroparesis ( $n=29$ ) and habitual constipation ( $n=27$ ) were selected to study the effects of dachengqitang and acupuncture of *zusanli* and *neiting* on disorder of the gastrointestinal motility with gastroduodenal manometry, electrogastrography (EGG), radioimmunity measurement of motilin, orocecal transit time test and  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled scintigraphic gastric emptying.

RESULTS: Dachengqitang was able to obviously correct gastric electric dysrhythmia and increased the contractile period and contractile power of migrating motor complex (MMC) phase III, prevent gastroparesis, increased the motilin content in serum and improved postoperative motility dysfunction of gastrointestinal. Dachengqitang could shorten orocecal transit time and improve the motility of gastrointestinal in patients with diabetes mellitus and habitual constipation; acupuncture on the points of *zusanli* and *neiting* could improve rhythm of gastria in patients with dyspepsia, and improve the power of EGG and the gastric emptying.

CONCLUSION: Dachengqitang can improve recovery of the gastrointestinal motility in patients after abdominal surgery and treat patients of diabetes mellitus with gastroparesis and habitual constipation. Acupuncture of *zusanli* and *neiting* has the advantages of using easy and reliable curative

effect and can be used in the treatment of the disorders of gastrointestinal motility.

Qi QH, Wang J, Hui JF, Jing L, Wu XZ. Effects of dachengqitang and acupuncture on human gastrointestinal motility disorder. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):129-132

## 摘要

目的: 观察大承气汤和针刺足三里、内庭穴对某些消化道运动功能障碍性疾病的治疗作用, 阐明机制。

方法: 选择腹部手术后、糖尿病和习惯性便秘等胃肠运动障碍性疾病患者为观察对象, 应用消化道灌注测压、胃电图描记、胃动素、口-盲传输时间、胃排空测定等手段, 观察大承气汤和针刺对消化道运动功能的影响。

结果: 大承气汤可显著改善术后胃电节律的紊乱, 减少胃肠逆蠕动的发生, 增加血中胃动素水平, 促进胃肠运动功能的恢复; 改善糖尿病和习惯性便秘患者的胃肠运动功能; 针刺足三里和内庭穴可改善手术后消化不良患者的胃电节律, 增加胃电幅度, 加速胃的排空。

结论: 大承气汤是显效的胃肠动力药, 针刺足三里和内庭穴具有双向调节功能且无副作用, 方法简便, 可用于消化道运动障碍性疾病的治疗。

齐清会, 王简, 回建峰, 江力, 吴咸中. 大承气汤和针刺治疗胃肠运动功能障碍性疾病的研究. 世界华人消化杂志 2004;12(1):129-132

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/129.asp>

## 0 引言

近些年来, 消化道运动功能的研究方兴未艾, 消化道测压和消化道电生理测试手段的更新以及计算机和各种处理软件的研制使其成为当前医学研究中发展最快, 涉及领域最广的领域之一<sup>[1-6]</sup>。我们本研究选择了人体为观察对象, 应用先进的消化道测压、胃肠生物电描记、消化道激素的放免测定、口-盲传输时间测定、 $^{99}\text{Tc}$ 同位素描记测定胃排空等手段, 直接观察中药下法常用方剂大承气汤的新剂型 - 大承气颗粒剂和针刺足阳明胃经的足三里、内庭穴对消化道运动功能的影响。现报告如下。

## 1 大承气汤对腹部手术后胃肠运动功能恢复的作用

1.1 实验对象 择期腹部手术患者 13 例为大承气汤治疗组, 男 5 例, 女 8 例, 年龄  $51.9 \pm 14.3$  岁。全部行手术

前后胃电图描记, 其中11例还行胃肠压力测定. 选择20例择期腹部手术患者为对照组, 男12例, 女8例, 年龄 $47.5 \pm 10.6$ 岁. 全部行手术前后胃电图描记, 其中8例行压力测定. 大承气颗粒剂是大承气汤的提取物, 每包3g, 6g相当于一付原药剂量. 由天津南开医院中药制剂室提供. 治疗组在手术前1d的午饭和晚饭前各给予大承气颗粒剂6g, 分别用50 mL温水冲服. 手术当日在手术结束后立即给予大承气颗粒剂6g保留灌肠(溶于50 mL温水中); 术后1d于晨起再次给予大承气颗粒剂6g保留灌肠; 术后2d、3d在清晨分别向胃内注入大承气颗粒剂6g(溶于50 mL温水中), 然后关闭胃减压腔90min. 对照组不给予大承气颗粒剂, 而给予等量的生理盐水, 其他治疗和治疗组完全相同.

**1.2 方法** 胃电图描记和消化道灌注测压采用瑞典CTD-SYNECTICS公司生产的高分辨率消化道压力和胃电图综合监测系统. 治疗组患者分别于手术前空腹, 手术后当日和术后1d、2d、3d应用大承气汤3h后记录胃电图一次, 每次1h以上. 对照组记录手术前、手术结束后3h和术后1d、2d、3d清晨胃电图. 测压管为自行设计的具有胃减压、测压和介入治疗三种功能的聚乙烯六腔导管. 内径最大的腔为胃减压腔; 开口于导管的最前端为注药腔, 可直接向肠道内注药, 4个测压孔分别距导管顶端0.5 cm, 15 cm, 30 cm, 45 cm. 手术前将测压管经鼻腔放入胃内, 腹部手术操作结束后, 将导管前端放入距Treitz韧带8-10 cm的空肠上段, 使第一个测压孔在空肠内, 第2个、第3个在十二指肠, 第4个在胃窦. 治疗组分别在手术后当日和术后第1d、2d、3d向空肠内注入大承气颗粒剂溶液后3h进行压力测定, 对照组在术后3h和术后第1d、2d、3d清晨向空肠内注入等量生理盐水后进行压力测定, 每次测定时间5h. 详细记录手术后患者腹胀情况和肛门排气、排便时间.

**1.3 结果** 治疗组患者手术后腹胀程度和持续时间较对照组明显减轻. 排气时间治疗组为 $2.54 \pm 1.20$  d较对照组的 $3.69 \pm 1.38$  d明显缩短( $P < 0.05$ ). 胃电的频率以低频波(0-2次/min)、正常波(2-4.5次/min)、高频波(4.5-10次/min)分别与术前相比较的比值表示. 治疗组患者正常波、低频波和高频波手术后当日及术后1d、2d、3d与术前无明显差异( $P > 0.05$ ). 对照组患者手术后当日正常波明显低于术前( $P < 0.001$ ); 手术后当日低频波明显高于术前( $P < 0.01$ ); 手术后当日高频波明显高于术前( $P < 0.01$ ). 治疗组与对照组相比较, 手术后当日治疗组正常波明显高于对照组( $P < 0.05$ ); 而低频波、高频波明显低于对照组( $P < 0.05$ , 表1). 治疗组患者手术后当日和术后1d、2d、3d平均波幅与术前相比较均无明显差异. 对照组手术后当日和术后1d、2d、3d平均波幅较术前均有明显降低( $P < 0.01$ ). 治疗组与对照组相比较, 术后2d、3d治疗组胃电图平均波幅较对照组明显升高( $P < 0.05$ , 表2). 治疗组各部位胃肠运动复合波(MMC)Ⅲ期数目占总数的百分比较为平均, 而对照组则分布不均.

治疗组记录到正蠕动波55个、逆蠕动波7个; 对照组记录到正蠕动波31个、逆蠕动波23个. 治疗组与对照组相比较, 治疗组正蠕动波的百分比明显高于对照组( $P < 0.01$ ), 治疗组逆蠕动波的百分比明显低于对照组( $P < 0.01$ ).

## 2 大承气汤对特发性便秘和糖尿病患者口-盲传输时间的影响

**2.1 对象** 选择门诊特发性便秘患者27例, 男10例, 女17例. 年龄 $44.3 \pm 18.5$ 岁. 病史平均 $6.4 \pm 6.1$ 年. 大便间隔时间为 $3.7 \pm 1.6$  d. 选择住院及门诊因糖尿病引起的便秘患者29例, 其中Ⅰ型糖尿病12例, Ⅱ型糖尿病17例. 男13例, 女16例. 年龄 $47.8 \pm 18.2$ 岁. 病史 $9.1 \pm 6.5$ 年. 大便间隔时间为 $3.1 \pm 1.5$  d. 对照组选择健康志愿者共23名, 男13名, 女10名, 年龄 $46.9 \pm 13.7$ 岁.

**2.2 方法** 特发性便秘组清晨禁食刷牙后洗必泰溶液漱口, 用集气袋收集空腹末段呼气3次, 抽出1 mL注入QSP-13型医用氢呼吸气敏色谱仪(北京市高宝城电子传感技术研究所). 取3次的平均值作为空腹氢浓度. 将乳果糖15g加温开水至100 mL, 快速饮服, 于服药后每隔10 min用同样方法收集平静末段呼气标本1份, 测定氢气浓度, 连续4h以上. 如果氢气浓度连续3次超过空腹氢气浓度10 ppm(part per million)以上, 则表示乳果糖已经小肠传输抵达盲肠, 这一时间间隔即为口-盲传输时间(orocecal transit time, OCTT). 于测试后2d中午及晚上各服大承气颗粒剂3g. 3d晨再次行OCTT测试. 记录服药后1wk的大便次数和消化系统症状. 糖尿病组: 测试顺序同对照组, 测试当日清晨停用胰岛素及口服降糖药. 对照组: 按常规行OCTT测试.

**2.3 结果** 特发性便秘患者大便时间间隔为 $2-11$  d(平均 $3.7 \pm 1.6$  d), 对照组为 $1.1 \pm 0.3$  d, 二者有明显差异( $P < 0.01$ ). 便秘组测得的OCTT为 $108.8 \pm 27.5$  min. 服药后OCTT为 $82.3 \pm 21.8$  min, 较服药前明显缩短. 服药后1wk内大便间隔时间明显缩短. 糖尿病患者29例大便时间间隔在 $2-7$  d(平均 $3.1 \pm 1.5$  d), 较对照组明显延长( $P < 0.01$ ). 测得的OCTT为 $105.9 \pm 23.7$  min. 服大承气颗粒剂后绝大多数患者的便秘症状在1wk内得到不同程度的改善. 服药后OCTT为 $75.7 \pm 25.7$  min, 较服药前明显缩短.

## 3 胆囊切除术后患者血浆胃动素改变及大承气汤对其影响

**3.1 对象** 择期胆囊切除术患者36例. 按入院时间分为大承气颗粒剂治疗组21例, 治疗对照组15例. 两组患者的年龄、性别、病史长短均无明显差异.

**3.2 方法** 全部患者均在静脉复合麻醉下行择期胆囊切除术, 两组患者手术术式及手术人员配备均保持一致. 中药治疗组患者于手术后8h即服大承气颗粒剂3g, 并从术后1d开始, 每日早、晚各服药3g, 直至消化道运动恢复后停药. 对照组服等量生理盐水. 全部患者均于手术前2h、术后2h及术后1d、2d、3d和8d

空腹采静脉血做胃动素的放免测定。

3.3 结果 两组患者术前血浆胃动素水平无明显差别, 术后血浆胃动素浓度的变化规律也极为相近, 但中药治疗组术后胃动素浓度峰值出现的平均时间为48 h, 明显短于对照组的72 h, 二者有显著差异( $P < 0.01$ , 表3)。

#### 4 针刺对腹部手术后消化不良患者胃电图及胃排空的影响

4.1 对象 腹部手术后患者20例, 男6例, 女14例, 年龄 $54.4 \pm 15.4$ 岁。于术后恢复饮食后出现不同程度的消化不良表现。全部行针刺足三里、内庭穴前后胃电图描记, 其中5例还行针刺前后 $^{99m}\text{Tc}$ 核素扫描胃排空试验。

4.2 方法 于胃电图检查前1 d行基础胃排空测定。清晨空腹, 嘱患者于3 min内服完试餐(40 g袋装红枣莲子羹加水搅拌成糊状约300 mL, 加入放射性同位素 $^{99m}\text{Tc}$ -树脂37 MBq混匀)。进食后, 患者平卧, 将 $\gamma$ 照相机对准患者腹部测定放射性计数。进食后即刻采取1 min放射性计数作为基础值, 以后每隔5 min采取一幅图像, 每次采取1 min计数, 共持续45 min。作为针刺治疗前的基础对照。第2 d行针刺治疗, 取双侧足三里及内庭穴。针刺得气后接电针仪(北京东华电子仪器厂生产的WQ-F型电针仪), 电针输出为锯齿状脉冲波, 频率为2次/s, 输出电压为20 V。治疗30 min,

同时记录针刺前后胃电图变化。第3 d晨针刺后行胃排空测定。用人工划定胃ROI(感兴趣区)区域, 计算各时相ROI区放射性计数与基础值之比作为胃排空指标。

4.3 结果 针刺后患者消化不良表现得到不同程度的改善; 针刺前空腹胃电图的平均波幅为 $46.7 \pm 36.4 \mu\text{V}$ , 针刺后胃电图的平均波幅为 $69.5 \pm 42.0 \mu\text{V}$ , 较针刺前明显增高( $P < 0.01$ )。针刺前胃电图频率正常波的百分比为 $60.0 \pm 19.1\%$ , 针刺后为 $79.8 \pm 10.2\%$ 。针刺后较针刺前明显提高( $P < 0.01$ ), 节律过缓的百分比针刺后为 $13.6 \pm 11.3\%$ 较针刺前 $31.1 \pm 19.5\%$ 明显降低( $P < 0.01$ )。针刺后胃电主要频率变异因子为 $36.0 \pm 10.3$ 与针刺前 $43.0 \pm 15.5$ 比较有明显差异( $P < 0.05$ )。针刺后胃电频率变得规整。针刺后胃排空缓慢得到改善。自进食后25 min开始胃内放射性计数与基础值之比明显减低( $P < 0.05$ , 表4)。

表4 针刺前后胃ROI区放射性计数与基础值之比( $\bar{x} \pm s$ )

t/min	针刺前(%)	针刺后(%)
5 min	$93.5 \pm 2.5$	$93.2 \pm 5.0$
15 min	$89.2 \pm 7.7$	$83.0 \pm 7.2$
25 min	$93.1 \pm 10.1$	$81.2 \pm 5.5^a$
35 min	$88.7 \pm 12.5$	$72.8 \pm 5.2^a$
45 min	$82.9 \pm 9.6$	$67.8 \pm 5.0^a$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 针刺前。

表1 胃电图频率手术前后比较( $\bar{x} \pm s$ )

分组		术前	手术后当日	术后1 d	术后2 d	术后3 d
治疗组	低频波	1.000	$1.114 \pm 0.696^a$	$0.886 \pm 0.361$	$1.118 \pm 0.533$	$0.991 \pm 0.780$
	正常波	1.000	$1.077 \pm 0.385^a$	$1.256 \pm 0.496$	$0.970 \pm 0.338$	$1.109 \pm 0.460$
	高频波	1.000	$1.323 \pm 1.177^a$	$1.404 \pm 1.103$	$1.156 \pm 0.963$	$1.275 \pm 1.201$
对照组	低频波	1.000	$2.040 \pm 1.388^b$	$1.796 \pm 1.991$	$1.539 \pm 1.365$	$1.471 \pm 0.894$
	正常波	1.000	$0.656 \pm 0.215^b$	$0.950 \pm 0.292$	$0.906 \pm 0.238$	$0.906 \pm 0.283$
	高频波	1.000	$2.454 \pm 2.897^b$	$1.911 \pm 1.545$	$1.947 \pm 1.028$	$1.746 \pm 1.479$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组; <sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs 术前。

表2 手术前后胃电图平均波幅比较( $\mu\text{V}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

分 组	术前	手术后当日	术后1 d	术后第2 d	术后第3 d
治疗组	$166.3 \pm 191.4$	$140.1 \pm 135.1$	$88.6 \pm 65.3$	$201.1 \pm 146.1^a$	$183.5 \pm 172.3^a$
对照组	$160.2 \pm 90.7$	$72.3 \pm 32.7^b$	$75.0 \pm 47.9^b$	$74.8 \pm 34.4^b$	$86.1 \pm 39.8^b$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 术前。

表3 两组手术前后胃动素浓度( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

组 别	n	术前	术后2 h	术后1 d	术后2 d	术后3 d	术后8 d
中药治疗组	21	$95.5 \pm 27.3$	$61.0 \pm 15.3$	$94.9 \pm 26.3^a$	$146.4 \pm 29.6^b$	$98.1 \pm 22.0^b$	$90.7 \pm 0.2$
治疗对照组	15	$91.9 \pm 28.2$	$62.1 \pm 17.6$	$58.6 \pm 19.1$	$63.1 \pm 18.5$	$128.9 \pm 25.2$	$91.3 \pm 0.2$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 治疗对照组; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 治疗对照组。

## 5 讨论

胃肠运动障碍性疾病是常见病、多发病,严重影响人类的生活质量。目前虽然开发了西沙比利和吗叮啉等药物,但副作用较大,疗效不满意且价格昂贵<sup>[7-9]</sup>。寻找有效的、无副作用的药物和治疗方法是当前消化系统疾病领域内的重要课题。

祖国医学在治疗胃肠运动障碍性疾病积累了丰富的经验。祖国医学认为,胃肠运动功能与“脾、胃”的状态密切相关。“脾升胃降”是脾胃系统内气血津液的运动规律。脾胃气机紊乱则可导致脾病和胃病,或脾胃同病。胃气不降,则糟粕不能下行,表现脘腹胀痛或便秘;胃不降反升则发生呕吐、嗝气和反胃。脾气虚可导致脾升不足或不升反降,表现为脾失健运,出现腹胀和泄泻。近些年来,国内很多学者对中药治疗胃肠运动障碍性疾病做了不少的尝试<sup>[10-14]</sup>。主要采用通腑攻下法、益气健脾法和理气开郁法<sup>[15-18]</sup>。同时应用胃肠动力学理论和技术进行了某些中药和针刺疗效机制的研究<sup>[19-28]</sup>。

大承气汤由大黄、芒硝、厚朴和枳实组成,是下法的代表方剂。动物实验的结果表明,大承气汤有增强胃肠运动功能,改善微循环和抗炎抑菌等作用<sup>[18, 28-30]</sup>。大承气汤还用于围手术期的治疗,并取得了满意的效果<sup>[31-32]</sup>。

本研究围绕大承气颗粒剂对人消化道运动功能的影响进行了较深入的研究。应用的检测手段除了消化道灌注测压、胃电图的描记和血清消化道激素测定外,还应用医用氢敏色谱仪观察了口-盲传输时间,应用<sup>99m</sup>Tc进行胃排空实验。除了观察外科患者外,还测试了内科患者。结果显示,大承气颗粒剂可促进腹部手术后胃肠运动功能的恢复,有利于减少手术后并发症,增加手术的成功率。大承气颗粒剂还可以通过加快口-盲传输时间等方式有效地治疗特发性便秘和糖尿病胃肠运动功能障碍患者。针刺足阳明胃经的足三里和内庭穴可通过改善胃电节律和幅度等方式促进腹部手术后消化不良患者消化道运动功能的恢复。本结果扩大了大承气汤的适应证,使其不仅适用于外科里实证的患者,还可用于腹部外科的肠道准备和内科特发性便秘和糖尿病胃肠运动功能障碍患者的治疗。这些为大承气颗粒剂这种新剂型走向市场提供了科学依据。

## 6 参考文献

- Miedema BW, Schillie S, Simmons JW, Burgess SV, Liem T, Silver D. Small bowel motility and transit after aortic surgery. *J Vasc Surg* 2002;36:19-24
- Pimentel M, Soffer EE, Chow EJ, Kong Y, Lin HC. Lower frequency of MMC is found in IBS subjects with abnormal lactulose breath test, suggesting bacterial overgrowth. *Dig Dis Sci* 2002;47:2639-2643
- El-Salhy M. Chronic idiopathic slow transit constipation: patho-

- physiology and management. *Colorectal Dis* 2003;5:288-296
- Pensabene L, Youssef NN, Griffiths JM, Di Lorenzo C. Colonic manometry in children with defecatory disorders. Role in diagnosis and management. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1052-1057
- 傅敏, 许国铭. 胃电图对胆道运动障碍性疾病的诊断价值. 世界华人消化杂志 2001;9:470-471
- Tomita R, Fujisaki S, Tanjoh K, Fukuzawa M. Studies on gastrointestinal hormone and jejunal interdigestive migrating motor complex in patients with or without early dumping syndrome after total gastrectomy with Roux-en-Y reconstruction for early gastric cancer. *Am J Surg* 2003;185:354-359
- 许国铭, 邹多武. 消化道动力紊乱的药物疗法. 中国实用外科杂志 1999;19:333-335
- 朱金照. 促胃肠动力药物的研究现状. 世界华人消化杂志 2001;9:1339-1444
- Narasimhan R, Mittal BR, Gupta NM. Effect of erythromycin and cisapride on emptying of the vagally denervated intrathoracic stomach. *Trop Gastroenterol* 2002;23:122-124
- 朱金照, 杨国汉, 冷恩仁, 陈东风. 中药的促胃肠动力作用. 世界华人消化杂志 1999;7:689-690
- 刘汶, 张大炜. 中药对胃肠运动功能的影响. 中国中西医结合脾胃杂志 1998;6:191-193
- 朱金照, 陈东风, 冷恩仁. 胃肠肽在胃肠运动调节中的作用. 世界华人消化杂志 1999;7:687-688
- 王国庆, 李宇航, 赵琰, 李丽娜, 钟相根. 半夏泻心汤及其拆方对正常大鼠胃肠运动功能的影响. 北京中医药大学学报 2001;24:19-21
- 朱金照, 冷恩仁, 陈东风, 张捷, 砂仁对大鼠胃肠运动及神经递质的影响. 中国中西医结合消化杂志 2001;9:205-207
- 李岩, 王学清, 张卫卫, 王江玥. 术香冲剂对小鼠胃肠动力的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:575-577
- 刘欣, 鄧敏, 雷莉, 龚均, 聂丹丽, 陈松盛, 董蕾. 复方中药健脾丸和保和丸对小鼠胃肠运动的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:54-56
- 王学清, 王秀杰, 李岩. 香砂平胃散对小鼠胃排空的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:571-574
- 赵琪, 崔乃强, 周文洛. 寒下药物对致病大肠杆菌 DNA 合成的抑制作用. 中国中西医结合外科杂志 1995;1:366-368
- 朱金照, 冷恩仁, 陈东风. 15 味中药促胃肠动力作用的筛选研究. 第三军医大学学报 2000;22:436-438
- 张航向, 任平, 黄熙, 李源. 中药对胃肠激素及胃肠运动的调节作用. 世界华人消化杂志 2000;8:1141-1144
- 王景杰, 黄欲新. 电针调控胃肠功能中降钙素基因相关肽的作用. 世界华人消化杂志 2000;8:913-915
- 刘文全, 王健, 郝志文. 针刺对功能性消化不良胃肠动力影响的临床研究. 中国针灸 2001;21:267-269
- 龙庆林, 王振华, 任文海. 白芍对大鼠胃电节律失常的影响机制. 世界华人消化杂志 2001;9:109-120
- 高巍, 黄裕新, 陈洪, 赵宁侠, 孙大勇, 张洪新, 王庆莉. 电针对胃经-脑肠肽-免疫网络的调控机制. 世界华人消化杂志 2001;9:279-283
- 李艳梅, 黄裕新, 张靖, 王庆莉. 电针对 LPS 干预大鼠胃排空功能的影响及与血清细胞因子的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:1110-1114
- 刘辉, 赵鸿, 易受乡. 近 10 a 来针刺足阳明胃经对胃肠功能影响的研究概况. 湖南中医药导报 1999;5:9-11
- 杨昱, 易受乡. 针刺影响胃肠运动与脑肠肽关系的研究现状与展望. 湖南中医药导报 2000;6:5-7
- 朱金照, 冷恩仁, 陈东风. 木香对大鼠胃肠运动的影响及其机制探讨. 中国中西医结合脾胃杂志 2000;8:236-238
- 李永渝, 魏玉, 李莉娟, 李岩, 杨智敏, 霍香, 大黄等 CCB 中药影响胃肠运动功能的机制探讨. 中国中西医结合外科杂志 1997;3:187-190
- 姬志伟, 罗连成, 何清宇, 薛文斗. 大承气冲剂对腹腔感染家兔胃肠运动功能的影响. 中国中西医结合外科杂志 1998;4:142-146
- 王绍山, 齐清会. 大承气冲剂术前肠道准备对腹部恶性肿瘤患者血清 NO, TNF 和 ICAM-1 的影响. 中医杂志 1999;40:293-294
- 王绍山, 齐清会. 大承气冲剂肠道预洁对腹部外科患者血清炎症性递质的影响. 中国中西医结合外科杂志 1999;5:385-387

# 消化道黏膜下肿瘤的超声内镜诊断及治疗

彭贵勇, 房殿春, 李向红

彭贵勇, 房殿春, 李向红, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院  
消化内科 重庆市 400038

彭贵勇, 男, 1963-07-11 生, 重庆市人, 汉族, 1985 年第三军医大学本科毕业, 1992 年第三军医大学获硕士学位, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师。主要从事消化道肿瘤的发病机制及内镜诊断治疗研究。

项目负责人: 彭贵勇, 400038, 重庆市高滩岩西南医院, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院消化科。p\_guiyong@yahoo.com.cn

电话: 023-65315659

收稿日期: 2003-05-10 接受日期: 2003-06-02

## Endoscopic diagnosis and treatment of submucosal tumors of gastrointestinal tract

Gui-Yong Peng, Dian-Chun Fang, Xiang-Hong Li

Gui-Yong Peng, Dian-Chun Fang, Xiang-Hong Li, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Correspondence to: Dr. Gui-Yong Peng, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. p\_guiyong@yahoo.com.cn

Received: 2003-05-10 Accepted: 2003-06-02

## Abstract

**AIM:** To improve the diagnoses and treatment for submucosal tumors of gastrointestinal tract.

**METHODS:** Endoscopic ultrasonography (EUS) was conducted in 136 patients with submucosal tumors (SMT) in gastrointestinal tract. Endoscopic therapy or surgical operation was taken according to the different layers of SMT.

**RESULTS:** A total of 33 cases of stromal tumors derived from mucosa; 2 cysts, 8 lipomas, 12 ectopic pancreases in stomach and 5 varices in gastric fundus from submucosa; 60 benign stromal tumors and 16 malignant stromal tumors from muscularis; 24 benign stromal tumors from mucosa, 6 benign stromal tumors from muscularis, 4 gastric lipomas, 2 cysts, 6 ectopic pancreas in stomach were resected by endoscopy; 28 cases of benign stromal tumors derived from muscularis, 15 malignant stromal tumors, 2 lipoma and 2 ectopic pancreas were removed by surgery. 97.7% of SMTs diagnosed by EUS were confirmed further by pathology.

**CONCLUSION:** Different layers of gastrointestinal tract with SMTs can be distinguished clearly by EUS, leading to definite diagnosis of SMTs. EUS is important to select treating methods of SMTs in gastrointestinal tract. Endoscopic therapy is an effective method for submucosal tumor of gastrointestinal tract.

Peng GY, Fang DC, Li XH. Endoscopic diagnosis and treatment of submucosal tumors of gastrointestinal tract. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):133-136

## 摘要

**目的:** 提高对消化道黏膜下肿瘤的诊断及治疗水平。

**方法:** 2000/2003 年对 136 例消化道黏膜下肿瘤用超声内镜进行诊断, 并根据其起源层次不同, 采用内镜治疗或手术治疗。

**结果:** 33 例良性间质瘤起源于黏膜肌层; 脂肪瘤 8 例, 异位胰腺 12 例, 胃底静脉曲张 5 例, 囊肿 2 例起源于黏膜下层; 60 例良性间质瘤及 16 例恶性间质瘤起源于固有肌层。24 例源于黏膜肌层及 6 例源于固有肌层的良性间质瘤、5 例脂肪瘤及 6 例异位胰腺经内镜切除, 2 例囊肿行内镜下穿刺治疗; 28 例源于固有肌层的良性间质瘤、15 例恶性间质瘤、2 例脂肪瘤及 2 例异位胰腺经手术切除。病理符合率为 97.7%。

**结论:** 超声内镜能够对消化道黏膜下肿瘤进行起源和定性诊断, 对黏膜下肿瘤治疗方案的选择具有重要的指导意义, 内镜治疗是黏膜下肿瘤治疗的有效手段。

彭贵勇, 房殿春, 李向红. 消化道黏膜下肿瘤的超声内镜诊断及治疗. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):133-136

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/133.asp>

## 0 引言

常规内镜对黏膜下肿瘤很难做出明确的诊断。由于超声内镜能够显示消化道壁的层次结构, 故能够明确黏膜下肿瘤的起源, 并根据其起源层次及回声特点, 初步明确病变性质, 在消化道黏膜下肿瘤的诊断和治疗中具有重要价值<sup>[1-8]</sup>。下面对我院消化道黏膜下肿瘤的内镜诊断及治疗进行总结。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我科 2000/2003 年胃肠镜发现隆起性病变并行超声内镜检查诊断为消化道壁内病变 136 例, 男 73 例, 女 63 例。年龄 25-76 (平均 48.9 岁)。其中位于食管 51 例, 胃 69 例, 十二指肠 8 例, 大肠 8 例。

**1.2 方法** 首先进行消化内镜检查, 发现隆起性病变后再行超声内镜检查。超声内镜为 Olympus UM-200 型, 超声频率为 7.5 MHz 和 12 MHz, UM-3R 超声小探头, 超声频率为 12 MHz 和 20 MHz。检查前准备同胃镜, 扫描时采用脱气水充盈 + 水囊法。患者左侧卧位, 将超声内镜送入消化道腔内, 抽尽腔内空气后, 注脱气水



100-500 mL, 在内镜光学系统的指导下将超声探头置于隆起型病变处, 注水填充水囊, 采用注水法和水囊法进行超声检查. 部分黏膜下肿瘤行内镜下治疗, 治疗方法包括高频电凝切除术、黏膜切除术、黏膜剥离术、穿刺硬化治疗, 部分黏膜下肿瘤行手术切除, 并行病理检查.

## 2 结果

**2.1 超声内镜诊断** 超声内镜诊断消化道黏膜下肿瘤136例. 其中良性间质瘤93例(68.4%), 直径0.5-3 cm, 60例位于固有肌层, 33例位于黏膜肌层; 恶性间质瘤16例(11.8%), 直径2.5-5 cm, 均起源于固有肌层; 脂肪瘤8例(5.8%), 直径1.2-2 cm, 均起源于黏膜下层; 异位胰腺12例(8.8%), 直径0.8-2 cm, 均起源于黏膜下

层; 胃底静脉曲张5例(3.7%); 囊肿2例(1.5%). 见表1.

**2.2 治疗结果** 位于固有肌层良性间质瘤60例, 行内镜下高频电凝切除6例, 行手术切除28例, 内镜定期随访26例; 位于黏膜肌层33例, 行内镜下高频电凝切除6例, 行黏膜切除术切除18例(图1); 恶性间质瘤16例, 行手术切除15例; 脂肪瘤8例, 手术切除2例, 内镜黏膜下电凝切除3例(图2), 黏膜剥离术切除1例; 异位胰腺12例, 内镜黏膜下电凝切除6例, 行手术治疗2例; 囊肿行内镜下穿刺治疗2例(表2). 内镜治疗中, 起源于固有肌层的良性间质瘤未能完全切除6例, 其余均完全切除, 无任何并发症. 标本行病理检查, 结果1例超声内镜诊断异位胰腺者手术证实为病灶壁外粘连所致, 1例内镜切除的异位胰腺, 病理诊断为胃憩室, 其他与超声内镜诊断一致, 病理符合率为97.7%.

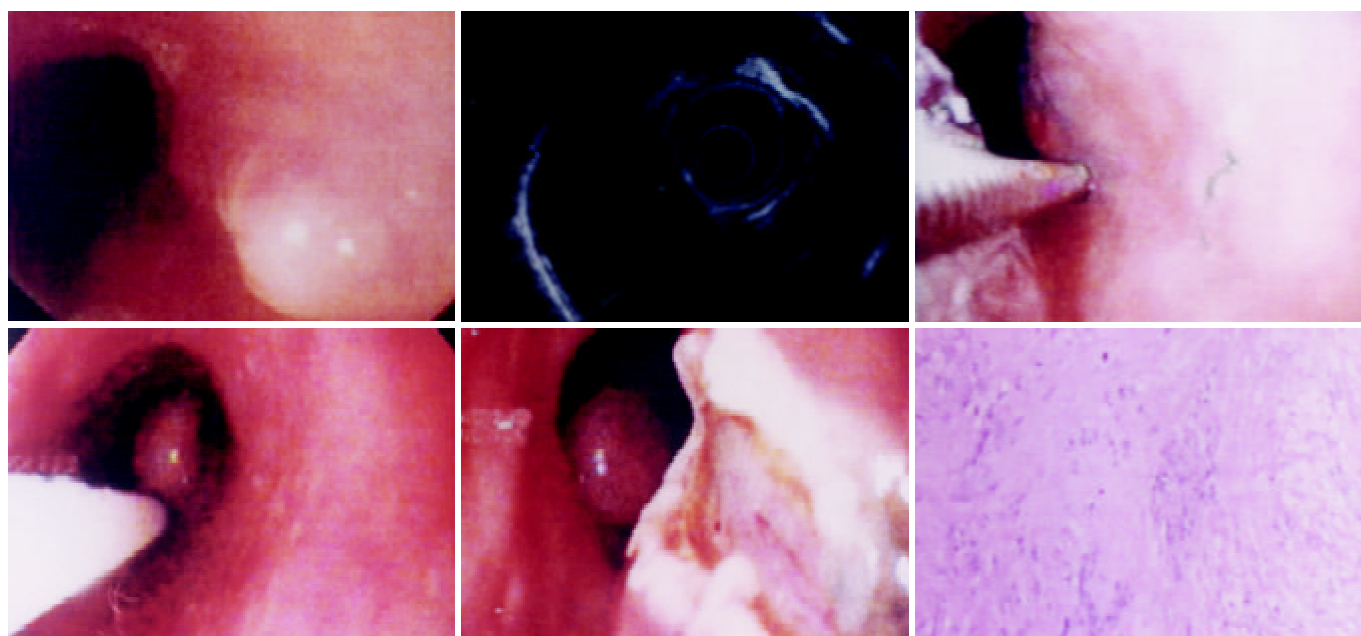


图1 食管良性间质瘤(1.5×2.0 cm), 源于黏膜肌层 黏膜切除术切除.

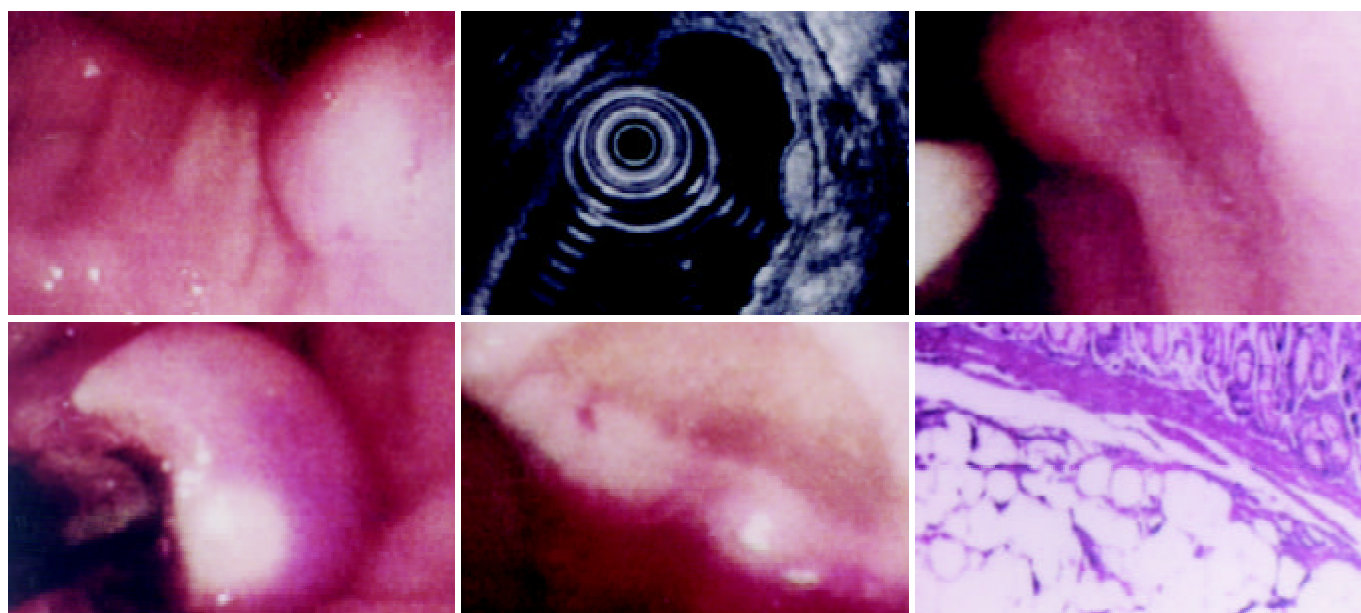


图2 胃脂肪瘤(1.5×1.5 cm), 源于黏膜下层, 高频电切除.



表1 消化道黏膜下肿瘤136例的分布及超声特点

超声内镜诊断	n	食管	胃	十二指肠	大肠	回声特点
良性间质瘤	93	46(31)	38(25)	5(2)	4	低回声、均匀、边界清楚
恶性间质瘤	16	4(4)	9(8)	1(1)	2(2)	低回声、不均匀、边界不清楚或清楚
脂肪瘤	8	1	5(4)	1(1)	1	强回声、均匀、边界清楚
异位胰腺	12	0	12(6)	0	0	低回声间以点状强回声、不均匀、边界清楚
静脉曲张	5	0	5	0	0	无回声、均匀、边界清楚
囊肿	2	0	0	1	1	无回声、均匀、边界清楚
总计		51(35)	69(43)	8(4)	8(2)	

( )病理证实.

表2 消化道黏膜下肿瘤136例的起源层次及治疗

超声内镜诊断	病变起源			治疗	
	黏膜肌层	黏膜下层	固有肌层	内镜	手术
良性间质瘤	33	0	60	30	28
恶性间质瘤	0	0	16	0	15
脂肪瘤	0	8	0	4	2
异位胰腺	0	12	0	6	2
静脉曲张	0	5	0	0	0
囊肿	0	2	0	2	0
总计	33	27	76	42	47

### 3 讨论

在常规内镜下可较容易地发现消化道的黏膜下肿瘤. 但肿瘤生长于壁内, 活检不易获得病理组织, 对其起源、发育方式、组织学特征、良恶性鉴别尚存在困难<sup>[9]</sup>. 超声内镜由于使用高频探头, 能区分消化道管壁的各层结构, 将消化道壁分为五层, 从内到外依次为黏膜层(高回声)、黏膜肌层(低回声)、黏膜下层(高回声)、固有肌层(低回声)和浆膜层或外膜层(高回声). 该层次结构与组织学结构及超声回声特点有明显的对应关系<sup>[10-11]</sup>. 在内镜光学系统的指导下超声内镜能准确定位, 将探头置于隆起处进行超声检查, 可以显示病变与腔壁的关系. 据隆起性病灶与消化道壁的层次结构的关系, 可较准确地判断出其起源的层次结构, 还可根据其内部回声特点对病灶进行定性诊断<sup>[12-16]</sup>. 本组中136例黏膜下肿瘤, 超声内镜均显示了病灶与消化道壁各层结构的关系, 明确了黏膜下肿瘤的起源, 并根据其起源层次及回声特点, 初步明确了病变性质. 其中87例获病理组织者, 85例病理结果证实了超声内镜的诊断, 准确率为97.7%. 有2例超声内镜诊断为异位胰腺者, 手术及病理未证实. 说明超声内镜对多数黏膜下肿瘤具有极高的定性及定位诊断价值. 超声内镜是诊断黏膜下肿瘤的最有效手段<sup>[1, 5]</sup>. 但对异位胰腺, 超声影像尚缺乏特异性, 也说明以往胃镜下诊断异位胰腺的表现: 局部隆起, 表面黏膜光滑, 顶部脐窝样改变也非特异性改变. 以往, 对黏膜下肿瘤多采取手术治疗. 超声内镜可为黏膜下肿瘤的治疗方案选择提供重要依据. 一般认为起源于

1-3层的病变可进行消化内镜治疗<sup>[17-20]</sup>, 而起源于4-5层的病变由于消化内镜不易彻底切除, 且容易造成穿孔等并发症, 多采用手术或腹腔镜治疗<sup>[21-29]</sup>. 我们对24例起源于黏膜肌层的良性间质瘤, 6例向腔内生长的固有肌层良性间质瘤和起源于黏膜下层的4例脂肪瘤及6例异位胰腺进行了内镜下切除, 2例囊肿行内镜下穿刺治疗取得了较好的效果, 并且无并发症发生. 我们认为, 对常规内镜诊断黏膜下肿瘤者, 应进行超声内镜检查以进一步明确肿瘤的起源及性质. 对囊肿采用内镜直视下穿刺抽液, 然后注入少量硬化剂治疗. 对黏膜下实质性肿瘤, 根据其起源层次和生长方式不同采用不同的内镜治疗方法: 对起源于2, 3层并向腔内生长者, 直接采用高频电切术切除. 对隆起不明显并且圈套有困难者, 如果起源于黏膜肌层, 我们主张采用黏膜切除术切除, 这样可以使肿瘤隆起更明显以方便圈套, 另外黏膜下层注入生理盐水增加了肿瘤与固有肌层的距离, 减少了电切时损伤固有肌层造成出血和穿孔的可能; 如果起源于黏膜下层, 我们主张采用黏膜剥离术摘除; 对起源于固有肌层者, 由于消化内镜治疗容易造成穿孔, 并且不易完全切除, 因此, 我们主张手术治疗, 但对少数不愿手术治疗、发生在食管并引起吞咽梗阻者, 为了改善症状, 可采用高频电切术切除突出于腔内的肿物.

我们的实践证明超声内镜检查, 对黏膜下肿瘤治疗方案的选择具有重要的指导意义, 在超声内镜指导下, 采用内镜治疗黏膜下肿瘤是一项简单、有效、方便、快速、经济、损伤小、较安全的治疗手段.

### 4 参考文献

- Rosch T, Kapfer B, Will U, Baronius W, Strobel M, Lorenz R, Ulm K. Accuracy of endoscopic ultrasonography in upper gastrointestinal submucosal lesions: a prospective multicenter study. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:856-862
- Ainsworth AP, Mortensen MB, Durup J, Wamberg PA. Clinical impact of endoscopic ultrasonography at a county hospital. *Endoscopy* 2002;34:447-450
- Shen EF, Arnott ID, Plevris J, Penman ID. Endoscopic ultrasonography in the diagnosis and management of suspected upper gastrointestinal submucosal tumours. *Br J Surg* 2002; 89:231-235

- 4 Chen TK, Wu CH, Lee CL, Lai YC, Yang SS, Tu TC. Endoscopic ultrasonography to study the causes of extragastric compression mimicking gastric submucosal tumor. *J Formos Med Assoc* 2001;100:758-761
- 5 Caletti G, Fusaroli P. Endoscopic ultrasonography. *Endoscopy* 2001;33:158-166
- 6 Gress F, Schmitt C, Savides T, Faigel DO, Catalano M, Wassef W, Roubein L, Nickl N, Ciaccia D, Bhutani M, Hoffman B, Affronti J. Interobserver agreement for EUS in the evaluation and diagnosis of submucosal masses. *Gastrointest Endosc* 2001;53:71-76
- 7 Tseng LJ, Mo LR, Jao YT, Tsai CC, Young TM, Cho CY. Rectal leiomyosarcoma diagnosed by endoscopic ultrasonography. *Hepatogastroenterology* 1999;46:2845-2848
- 8 Chen TK, Wu CH, Lee CL, Lai YC, Yang SS. Endoscopic ultrasonography in the differential diagnosis of giant gastric folds. *J Formos Med Assoc* 1999;4:261-264
- 9 Kojima T, Takahashi H, Parra-Blanco A, Kohsen K, Fujita R. Diagnosis of submucosal tumor of the upper GI tract by endoscopic resection. *Gastrointest Endosc* 1999;50:516-522
- 10 杨爱明, 陆星华, 鲁重美, 刘文平, 刘沙, 张明. 超声内镜在消化道黏膜下肿瘤诊断中的应用. *中华消化内镜杂志* 2000;17:163-165
- 11 彭贵勇, 周永宁, 杨建民, 王振华, 李向红. 超声内镜在上消化道隆起性病变诊断和治疗中的价值. *第三军医大学学报* 2001;23:1251-1253
- 12 Guo W, Zhang YL, Li GX, Zhou DY, Zhang WD. Comparison of preoperative TN staging of gastric carcinoma by endoscopic ultrasonography with CT examination. *China Natl J New Gastroenterol* 1997;3:242-245
- 13 Kohut M, Nowak A, Nowakowska-Dulawa E, Marek T, Kaczor R. Endosonography with linear array instead of endoscopic retrograde cholangiography as the diagnostic tool in patients with moderate suspicion of common bile duct stones. *World J Gastroenterol* 2003;9:612-614
- 14 Xi WD, Zhao C, Ren GS. Endoscopic ultrasonography in preoperative staging of gastric cancer: determination of tumor invasion depth, nodal involvement and surgical resectability. *World J Gastroenterol* 2003;9:254-257
- 15 郭文. 超声内镜检查在胃肠疾病中的临床应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:643-645
- 16 诸琦, 吴云林. 超声内镜对食管胃底静脉曲张的诊断及治疗疗效判断. *世界华人消化杂志* 2000;8:1137-1138
- 17 Sun S, Wang M, Sun S. Use of endoscopic ultrasound-guided injection in endoscopic resection of solid submucosal tumors. *Endoscopy* 2002;34:82-85
- 18 Waxman I, Saitoh Y, Raju GS, Watari J, Yokota K, Reeves AL, Kohgo Y. Gastrointest Endosc. High-frequency probe EUS-assisted endoscopic mucosal resection: a therapeutic strategy for submucosal tumors of the GI tract. *Gastrointest Endosc* 2002;55:44-49
- 19 Ouchi J, Araki Y, Chijiwa Y, Kubo H, Hamada S, Ochiai T, Harada N, Nawata H. Endosonographic probe-guided endoscopic removal of colonic pedunculated leiomyoma. *Acta Gastroenterol Belg* 2000;63:314-316
- 20 Giovannini M, Bernardini D, Moutardier V, Monges G, Houvenaeghel G, Seitz JF, Derlpero JR. Endoscopic mucosal resection (EMR): results and prognostic factors in 21 patients. *Endoscopy* 1999;31:698-701
- 21 Gastroenterol Clin Biol. Laparoscopic resection of benign submucosal stomach tumors. A report of 65 cases. *Gastroenterol Clin Biol* 2003;27(3 Pt 1):272-276
- 22 Walsh RM, Ponsky J, Brody F, Matthews BD, Heniford BT. Combined endoscopic/laparoscopic intragastric resection of gastric stromal tumors. *J Gastrointest Surg* 2003;7:386-392
- 23 Otani Y, Furukawa T, Suganuma K, Yoshida M, Saikawa Y, Kubota T, Kumai K, Mukai M, Kameyama K, Takami H, Kitajima M. Minimally invasive surgery for gastric carcinoid tumor. *Biomed Pharmacother* 2002;56(Suppl 1):217s-221s
- 24 Shimizu S, Noshiro H, Nagai E, Uchiyama A, Mizumoto K, Tanaka M. Laparoscopic wedge resection of gastric submucosal tumors. *Dig Surg* 2002;19:169-173
- 25 Ludwig K, Wilhelm L, Scharlau U, Amtsberg G, Bernhardt J. Laparoscopic-endoscopic rendezvous resection of gastric tumors. *Surg Endosc* 2002;16:1561-1565
- 26 Tagaya N, Mikami H, Kogure H, Kubota K, Hosoya Y, Nagai H. Laparoscopic intragastric stapled resection of gastric submucosal tumors located near the esophagogastric junction. *Surg Endosc* 2002;16:177-179
- 27 Walsh RM, Heniford BT. Laparoendoscopic treatment of gastric stromal tumors. *Semin Laparosc Surg* 2001;8:189-194
- 28 Tagaya N, Kita J, Kogure H, Kubota K. Laparoscopic intragastric resection of gastric leiomyoma using needlescopic instruments. Case report. *Surg Endosc* 2001;15:414
- 29 Choi YB, Oh ST. Laparoscopy in the management of gastric submucosal tumors. *Surg Endosc* 2000;14:741-745

感谢世界华人消化杂志电子版免费发送. 我是肿瘤科医生, 重点方向是胃肠道肿瘤. 在以后的学习和工作中, 我会竭力支持世界华人消化杂志, 并向我的同事推荐.

(李开春 lkc2003@126.com)

# 序贯粪隐血试验在自然人群连续性大肠癌普查中的应用

李世荣, 田素丽, 武子涛, 韩英, 盛剑秋, 高革, 夏长虹, 曹建彪, 晨智敏, 王志红, 李雅君

李世荣, 田素丽, 武子涛, 韩英, 盛剑秋, 高革, 夏长虹, 曹建彪, 晨智敏, 王志红, 李雅君, 北京军区总医院消化内科 北京市 100700  
李世荣, 男, 1939-01-31 生, 北京市人, 汉族. 1962 年毕业于天津医科大学医疗系, 主任医师, 第三军医大学内科教授, 博士生导师. 主要从事大肠癌早期诊断的研究.

项目负责人: 李世荣, 100700, 北京市东城南门仓 5 号, 北京市军区总医院消化内科. lishirong@263.sina.com

电话: 010-66721168

收稿日期: 2003-05-10 接受日期: 2003-06-02

## Application of sequential fecal occult blood test in consecutive screening of colorectal carcinoma for natural population

Shi-Rong Li, Su-Li Tian, Zi-Tao Wu, Ying Han, Jian-Qiu Sheng, Ge Gao, Chang-Hong Xia, Jian-Biao Cao, Zhi-Min Chen, Zhi-Hong Wang, Ya-Jun Li

Shi-Rong Li, Su-Li Tian, Zi-Tao Wu, Ying Han, Jian-Qiu Sheng, Ge Gao, Chang-Hong Xia, Jian-Biao Cao, Zhi-Min Chen, Zhi-Hong Wang, Ya-Jun Li, GI Unit, Beijing Army Region General Hospital, 5 Nanmencang, Beijing 100700, China

Correspondence to: Shi-Rong Li, GI Unit, Beijing Army Region General Hospital, Beijing 100700, China. lishirong@263.sina.com

Received: 2003-05-10 Accepted: 2003-06-02

## Abstract

**AIM:** To evaluate the effectiveness of consecutive screening of colorectal carcinoma (CRC) in raising survival rate and lowering morbidity from a natural population with sequential fecal occult blood test (SFOBT).

**METHODS:** From 1987 to 2002, we made annual screening of CRC for 3002 individuals aging from 51 to 92 years in a natural population with SFOBT.

**RESULTS:** The total of 2251 persons received the screening (Group A), but 751 persons did not submit to the screening (Group B). The screening rate was 74.98%. 44 new cases with CRC were found during the 16 years. The incidence of CRC in the population was  $91.61/10^5$ . In Group A 21 cases with CRC were detected and 6 cases were lost in the screening. The incidence and detecting rate of CRC were  $74.97/10^5$  and  $58.31/10^5$  respectively in Group A. In Group B, 17 cases with CRC were found. Its incidence was  $141.478/10^5$ . 94.44% of the cases of CRC in Group A and 29.42% in Group B were in the relative early stage of CRC respectively. 75% of cases with CRC in Group A survived over 5 years, but only 33.33% in Group B. 497 adenomas were detected, and removed colonoscopically in Group A. Of them, only one became malignant during 16 years of follow-up. The positive detecting rate of SFOBT for CRC was 77.77%. Its false negative rate and positive predictive value were 7.69% and 2.52% respectively.

**CONCLUSION:** The most of CRC detected by the consecutive screening are in the early or relatively early stages, and eventually lead to a higher survival rate. The removal of adenomatous polyps followed by colonoscopic surveillance significantly reduces the morbidity of CRC. Although SFOBT is an effective way for CRC screening, its false positive rate remains to be an important defect.

Li SR, Tian SL, Wu ZT, Han Y, Sheng JQ, Gao G, Xia CH, Cao JB, Chen ZM, Wang ZH, Li YJ. Application of sequential fecal occult blood test in consecutive screening of colorectal carcinoma for natural population. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(1):137-139

## 摘要

**目的:** 评价序贯粪隐血试验 自然人群连续性大肠癌普查在提高大肠癌患者长期存活率和降低大肠癌发病率的作用.

**方法:** 1987/2002 年, 我们应用序贯粪隐血试验(SFOBT), 对 3 002 名 51-92 自然人群进行 1 次/a 的大肠癌普查.

**结果:** 该人群中 2 251 人接受了普查(A 组), 751 人未能接受普查(B 组), 普查率为 74.98%. 16 a 中共发现大肠癌 44 例, 年平均大肠癌发生率为  $91.61/10^5$ . A 组检出 21 例大肠癌, 漏检 6 例大肠癌, 大肠癌发生率为  $74.97/10^5$ , 大肠癌检出率为  $58.31/10^5$ , B 组发现 17 例大肠癌, 大肠癌发生率为  $141.478/10^5$ . A 组中 94.44% 的大肠癌为 Dukes A、B 期, B 组中 29.42% 为 Dukes A、B 期. 两组大肠癌患者的 5 a 存活率分别为 75% 和 33.33%. A 组中检出 497 例大肠腺瘤, 均在肠镜下切除, 16 a 随访中仅 1 例恶变. SFOBT 的大肠癌阳性检出率为 77.77%, 假阴性率为 7.69%, 阳性预示值为 2.52%.

**结论:** 高龄自然人群普查可检出大部分早期和较早期大肠癌, 普查出的患者有较高的 5 a 存活率; 切除普查发现的大肠腺瘤, 并进行肠镜随访, 可明显降低大肠癌的发生; 序贯粪隐血试验虽可以获得很好的普查效果, 然而假阳性率过高仍是该方案的缺陷.

李世荣, 田素丽, 武子涛, 韩英, 盛剑秋, 高革, 夏长虹, 曹建彪, 晨智敏, 王志红, 李雅君. 序贯粪隐血试验在自然人群连续性大肠癌普查中的应用. 世界华人消化杂志 2004;12(1):137-139

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/137.asp>

## 0 引言

近年, 我国大肠癌的发病率明显上升<sup>[1]</sup>, 而大肠癌患者手术后存活率却大大低于经济发达国家<sup>[2]</sup>. 寻找有效的筛检方法, 提高早期癌的检出率, 延长患者存活时

间. 遏制发病率上升是当前一个重要而紧迫的任务. 连续性自然人群普查是提高患者生存率、降低发病率的有效途径<sup>[3-4]</sup>. 粪隐血试验是国际上公认的、行之有效的大肠癌筛检技术. 根据我国人口多、医疗经费不足的实际情况, 我们设计了序贯粪隐血大肠肿瘤初筛方案, 并从大肠肿瘤患者和自然人群普查等不同角度<sup>[5-7]</sup>论证了序贯粪隐血试验在我国大肠癌防治工作上的意义. 本研究在上述工作的基础上, 进一步探讨连续性普查在大肠癌防治工作中的有效性和可行性.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 1987/2002年, 每年5-6 mo对一组3 000名固定的中、老年人群进行一次大肠癌普查, 至今已16 a. 每1-2 a接受普查1次, 连续16 a者为普查组(A组), 凡连续因各种原因3 a或3 a以上未参加普查者均计入未普查人群(B组).

**1.2 方法** 采用序贯粪隐血大肠癌初筛方案(中华老年医学杂志 1990; 9: 152-154). 即首先进行化学法粪隐血试验(化学法粪隐血试剂为广东白云山药业公司生产), 隐血阴性者不再进入下一步检查, 阳性者进行免疫粪隐血试验(免疫粪隐血试剂盒为中-美万华普曼公司生产), 若免疫隐血阴性, 不再进入下一步检查, 阳性者进行全结肠镜检查. 肠镜阴性者第2 a重复上述筛查. 肠镜发现腺瘤时, 择期在肠镜下切除, 发现恶性肿瘤时, 镜下或剖腹手术治疗. 以上肿瘤患者每1-3 a接受临床或内镜随访. 绝大部分普查发现的大肠癌患者在我院手术, 少数患者确诊后拒绝手术治疗, 或在外院手术, 由于不了解其疾病分期和预后状况, 从生存期的统计中剔除. 部分患者手术后不足5 a, 死于其他疾病, 也从统计中剔除.

## 2 结果

年龄范围51-92岁, 中位年龄62岁. 男性2 260人, 女性742人. 平均普查率74.98%, 年平均2 251人参加了普查(A组); 751人未参加普查(B组). 16 a内全组人群个体变动(死亡和新加入)约7%.

**2.1 大肠癌发生率和检出率** 16 a中该人群共发生大肠癌44例, 平均年发生大肠癌2.75例(44/16), 大肠癌年发生率为 $91.61/10^5$ (2.75/3 002). A组共普查出大肠癌21例, 平均年检出大肠癌1.3 125例(21/16), 年检出率为 $58.31/10^5$ (1.3 125/2 251). 该组人群中, 因各种原因普查漏诊, 其后, 因有自觉症状而确诊6例. A组实际发生大肠癌27例, 平均年发生大肠癌1.6875例(27/16), 大肠癌年发生率为 $74.97/10^5$ (1.68 75/2 251). B组因本人出现症状, 到医院看病而确诊的大肠癌共17例, 平均年发生大肠癌1.0 625例(17/16), 大肠癌年发生率为 $141.478/10^5$ (1.0 625/751). 在普查出的21例大肠癌患者中, 18例在我院手术. 其中Dukes A期5例, Dukes B期12例, Dukes C期1例, 3例失访. B组中, 5-10 a未

参加普查, 后因有症状确诊大肠癌者6例; 16 a从未参加普查, 因有症状确诊大肠癌者7例. 在这些患者中Dukes B期2例, Dukes C期9例, Dukes D期2例, 4例患者失访.

**2.2 人群大肠癌患者的生存率** A组18例可获得随访结果的大肠癌患者中, 生存5 a以上者12例, 生存不足5 a者4例, (有2例患者在手术后不足5 a中死于心、肺和脑血管疾病, 不在统计之内). 5 a生存率75%(12/16). B组可获得随访结果的大肠癌患者中, 生存5 a以上者4例, 生存不足5 a者8例(有1例患者在手术后不足5 a中死于心、脑血管疾病, 不在统计之内), 5 a生存率33%(4/12).

**2.3 在A组中发现大肠息肉773例(表1)**, 其中腺瘤497例, 占64.3%. 普查人群的腺瘤发生率22.08%(497/2 251). 切除所发现的腺瘤, 16 a随访497例腺瘤患者中, 有1例发生大肠癌, 大肠癌发生率0.2%(1/497).

**2.4 序贯粪隐血试验结果** 在16 a内, 平均年序贯粪隐血阳性例数为52例, 占每年参加普查人数的2.31%(52/2 251). 16 a中, A组共检出大肠腺瘤497例, 大肠癌21例, 平均每年检出大肠肿瘤(包括癌和腺瘤)32.38例(518/16), 占年平均隐血阳性例数的62.26%(32.38/52). 普查人群实际发生大肠癌27例, 平均每年发生大肠癌1.6 875例. 其中序贯粪隐血试验检出21例大肠癌, 平均每年普查检出大肠癌1.3 125例. 序贯粪隐血试验年平均大肠癌阳性检出率为77.77%(1.3 125/1.6 875). 普查漏诊病例6例, 占应检出大肠癌的22.22%(6/27), 其中因粪隐血假阴性漏诊的2例, 占应检出大肠癌的7.4%(2/27). 虽粪便隐血阳性, 但患者拒绝接受肠镜检查而漏诊者4例, 占应检出大肠癌的14.8%(4/27). 序贯粪隐血试验年平均大肠肿瘤阳性预示值为62.27%(32.38/52), 年平均大肠癌阳性预示值2.52%(1.3 125/52).

表1 中、老年人群普查检出的大肠息肉

息肉大小(cm)	管状腺瘤	绒毛状腺瘤	伴中、重度异型增生的腺瘤	增生性息肉	炎性息肉	无病理诊断
<0.5	220	16	0	7	178	19
0.6-0.9	95	18	11	4	29	12
1.0-1.9	41	14	16	1	18	5
>2.0	20	23	23	0	2	1
总计	376	71	50	12	227	37

## 3 讨论

国外几个长期的随机对照研究表明, 自然人群普查可以明显提高大肠癌患者的长期存活率, 降低大肠癌的发病率<sup>[8-10]</sup>. 研究现阶段我国大肠癌普查工作的有效性和可行性有很大意义.

本研究显示, A组中Dukes A、B期大肠癌患者占94.44%, 5 a存活率为75%. 虽然该人群的大肠癌普查并非随机对照, 参加普查和未参加普查的人群无法进

行统计比较, 但从本组自然人群 16 a 普查、监测结果大致可看出, 未参加普查的人群中确诊的大肠癌大部分是中\晚期癌, Dukes A、B 期患者仅占该人群的 29.42%, 他们的 5 a 存活率仅为 33.33%。结果提示, 自然人群普查检出的大肠癌患者有更好的长期存活率。

Stryker et al 对 226 例 1 cm 以上的息肉患者进行了长期观察、随访, 发现这些患者在 5 a、10 a 和 20 a 大肠癌的累积发生危险分别为 4%、14% 和 35%<sup>[11]</sup>, 提示腺瘤是明确的大肠癌癌前病变, 不进行干预性治疗, 恶变率很高。在我们普查的人群中, 切除检出的大肠腺瘤 497 例, 其中仅 1 例发生大肠癌, 大肠癌的发生率为 0.2%, 大大低于上述文献报告。此外, A 组中大肠癌年发生率 74.97/10<sup>5</sup>, B 组中大肠癌年发生率达到 141.478/10<sup>5</sup>。这些结果也在某种程度上反映出, 切除普查中发现的腺瘤, 减少了普查组大肠癌的发生。

本次普查人群半数以上为 65-70 岁的老年人, 其大肠癌检出率为 58.31/10<sup>5</sup>, 明显高于本市相对年轻人群的检出率(36.57/10<sup>5</sup>)<sup>[5]</sup>, 提示从 50 岁开始进入普查, 可能会收到更好的效果, 与文献[12-13]报告相同。此外, 既往人群普查的效/价比分析也显示, “一般人群”的普查年龄确定为 50 岁以上, 采用序贯粪隐血试验可获得较好的效/价比, 而“高危人群”则采用直接肠镜检查有更好的效/价比<sup>[14-15]</sup>。疑为遗传性大肠癌家系的成员, 则应从青少年时期开始筛检<sup>[16]</sup>。

在没有发现更可靠的筛检手段以前, 粪隐血试验仍然被认为是有效的大肠癌筛检方法, 广泛用于大肠癌普查<sup>[17]</sup>。但是由于化学法隐血试验特异性差, 假阳性率高, 增加了肠镜检查数量, 不但使不应该进行肠镜检查者承受了一定痛苦和风险, 也增加了整体普查费用。免疫隐血试验虽有较高的特异性和敏感性, 但隐血试验本身价格较贵, 用于大量人群普查, 同样有一个经费过高的问题。为解决上述粪隐血试验存在的缺陷, 我们于 1987 年设计了序贯粪隐血大肠癌筛查方案。经临床和人群验证结果显示, 化学隐血试验与免疫隐血试验的敏感性没有统计学差异, 而後者的特异性却显著高于前者(中华老年医学杂志 1990; 9: 152-154)。根据上述结果自 1987 年开始将该方案用于自然人群普查。从既往多次横断面大肠癌普查结果证明序贯粪隐血大肠癌筛查方案检出的早期和较早期大肠癌显著多于临床检出的大肠癌<sup>[5]</sup>。本组多年连续性大肠癌普查结果再次表明, 序贯粪隐血试验的大肠癌阳性检出率可达到 77.77%, 其假阴性率仅 7.4%, 全部大肠肿瘤的阳性预示值为 62.27%, 提示了该方案在提高大肠癌患者生存时间和预防大肠癌发生上的作用。1996 年 Allison 对比了愈创木脂试验、水化愈创木脂试验、免疫化学试验和序贯粪隐血试验的敏感性和特异性。他们验证的结果是: 序贯粪隐血试验的大肠癌检出敏感性和特异性分别为 65.6% 和 97.3%, 认为是最佳的筛检方案<sup>[18]</sup>。Robert 在评论 Allison 的结果时指出, 水化愈创木脂试验虽然提高了敏感性,

但特异性很低, 导致普查中许多不必要的肠镜检查, 而序贯法可以得到相对高的敏感性, 特异性也增加了 10%, 是一个效/价比较好的方法<sup>[19]</sup>。由于粪便中的隐血并非大肠肿瘤的特异产物, 故不可能同时获得很高的敏感性和理想的特异性。我们的研究结果也显示, 序贯粪隐血试验对大肠癌的阳性预示值仅为 2.52%, 也就是说, 对于大肠癌患者来说, 序贯粪隐血大肠癌筛查方案也还存在假阳性率过高的缺陷, 需要寻找特异性更高的筛检指标, 改进现有筛检技术<sup>[20-21]</sup>。

#### 4 参考文献

- 1 高玉堂. 1990-1992 年中国恶性肿瘤 3 a 抽样调查的意义及评价. 中华肿瘤杂志 2000;22:263-264
- 2 Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. CA-A. Cancer J Clin 1999;49:263-264
- 3 Mandel JS, Church TR, Bond JH, Ederer F, Geisser MS, Mongin SJ, Snover DC, Schuman LM. The effect of fecal occult blood screening on the incidence of colorectal cancer. N Engl J Med 2000;343:1603-1607
- 4 Saito H. Screening for colorectal cancer :current status in Japan. Dis Colon Rectum 2000;43(10 Suppl):s78-84
- 5 北京地区大肠肿瘤普查协作组. “序贯粪隐血大肠肿瘤筛检方案”应用价值的再探讨. 中华消化杂志 2002;22:395-397
- 6 北京军区消化专业组. 序贯法粪隐血试验在大肠癌初筛中的应用 - 102,800 无症状人群普查结果. 中华肿瘤杂志 1993;15:230-233
- 7 李世荣, 晨智敏, 刘端祺, 韩英, 王志红, 张红光, 李亚君, 武子涛. 高危人群大肠肿瘤普查方案的效/价比分析. 中国内镜杂志 1997; 3:16-18
- 8 Mandel JS, Bond JH, Church TR, Snover DC, Bradley GM, Schuman LM, Ederer F. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. New Engl J Med 1993;328:1365-1371
- 9 Jorgensen OD, Kronborg O, Fenger C. A randomized study of screening for colorectal cancer using fecal occult blood testing: results after 13 years and seven biennial screening rounds. Gut 2002;50:29-32
- 10 Niv Y, Lev-Ei M, Fraser G. Protective effect of fecal occult blood test screening for colorectal cancer: worse prognosis for screening refusers. Gut 2002;50:33-37
- 11 Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE, Libbe SD, Ilstrup DM, MacCarty RL. Natural history of untreated colonic polyps. Gastroenterology 1987;93:1009-1013
- 12 Levin B, Smith RA, Feldman GE. Promoting early detection tests for colorectal carcinoma and adenomatous polyps. A framework for action: the strategic plan of the national colorectal cancer roundtable. Cancer 2002;95:1618-1628
- 13 Winawer S, Fletcher R, Rex D. Colorectal cancer screening and Surveillance: clinical guidelines and rationale-update based on new evidence. Gastroenterology 2003;124:544-560
- 14 李世荣, 张彩莲, 徐恩迪, 杨同占, 程南屏, 刘蕴衡, 何绮娜. 粪便序贯隐血与微量白蛋白互补对提高大肠肿瘤筛检率的价值. 中华肿瘤杂志 1995;17:381-383
- 15 万军, 张子其, 朱成. 结肠镜普查及随访对老年人早期结肠癌的诊断价值. 中华老年医学杂志 2001;20:343-345
- 16 盛剑秋, 沈志刚, 樊翠珍. 遗传性非息肉病性大肠癌临床表型分析. 中华医学杂志 2002;82:1371-1374
- 17 Bond JH. Colorectal cancer update prevention, screening, treatment, and surveillance. Med Clin North Am 2000;84:1163-1182
- 18 Allison JE, Tekawa IS, Ransom LJ and Adrain AL. A comparison of fecal occult blood tests for colorectal cancer screening. N Engl J Med 1996;334:155-159
- 19 Robert B. Fecal occult blood testing: beyond hemoccult. Gastroenterology 1997;112:664-665
- 20 吴显文, 李世荣, 田玉旺, 王志红, 邢惠清. 肠道脱落细胞 DNA 含量图像分析诊断大肠癌中的意义. 华人消化杂志 1998;6:88-89
- 21 余少平, 郑少金, 周洪跃. 单克隆抗体人群大肠癌普查意义再探讨. 华人消化杂志 1998;6(特刊 7):498

# 乙型和丙型肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学基础

成 军

成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
国家自然科学基金项目, No. C39970674, No. C03011402, No.C39900130, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目 No.98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室.  
cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2003-06-24 接受日期: 2003-07-16  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/141.asp>

编者按 乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)感染肝细胞之后,首先要借助肝细胞中的一些成分完成其复制和表达的生活周期,主要是肝细胞中的一些调节蛋白与这2种肝炎病毒调节基因序列之间的结合,并对于肝炎病毒的复制和表达过程进行调节,肝细胞中一些特有的调节蛋白在肝炎病毒的生活周期中具有十分重要的调节作用,这也是肝炎病毒相对嗜肝细胞特性的分子生物学基础.同样,肝炎病毒的蛋白,或者通过与肝细胞蛋白之间的直接结合,或者通过与DNA的结合以及肝细胞的信号转导途径影响肝细胞的基因表达类型和基因表达水平,或者改变肝细胞基因表达谱的时空规律,影响肝细胞的细胞周期、细胞凋亡、生长分化、信号转导、恶性转化等过程.这是HBV和HCV感染肝细胞之后引起慢性肝脏疾病的重要的分子生物学基础,一直是人们关注的焦点.

中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心,在成军博士、教授、主任医师、博士生导师的领导下,建立了筛选肝炎病毒调节基因结合蛋白的酵母单杂交技术,筛选肝炎病毒蛋白、肝细胞蛋白的结合蛋白的酵母双杂交技术,筛选肝炎病毒蛋白反式调节肝细胞基因的抑制性消减杂交和表达谱基因芯片研究技术等,系统研究肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制,并有新的发现.本专题研究中所发表的这些重要文章,对于进一步深入探索和研究肝炎病毒与肝细胞之间相互作用的分子生物学机制,将产生重要推动作用.

1	启动子DNA结合蛋白研究策略.....	141
2	丙型肝炎病毒与2型糖尿病关系的研究.....	143
3	核转录因子Rel/NF- $\kappa$ B与乙型肝炎病毒.....	145
4	丙型肝炎病毒与PKR信号转导系统.....	149
5	TATA盒结合蛋白与肝炎病毒的关系.....	151
6	乙型和丙型肝炎病毒对JNK/SAPK转导途径的影响.....	155
7	乙型和丙型肝炎病毒对ERK信号转导途径的影响.....	158
8	乙型和丙型肝炎病毒与转录因子AP-1.....	160
9	乙型和丙型肝炎病毒对MEKK1蛋白信号转导途径的影响.....	162
10	乙型和丙型肝炎病毒与转录因子ATF-2的调节.....	165
11	乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒与增生细胞核抗原的关系.....	168



# 启动子DNA结合蛋白研究策略

巨立中, 成 军, 钟彦伟

巨立中, 成军, 钟彦伟, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-24 接受日期: 2003-07-16

巨立中, 成军, 钟彦伟. 启动子DNA结合蛋白研究策略. 世界华人消化杂志 2004;12(1):141-142

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/141.asp>

## 0 引言

新基因新蛋白质的发现和鉴定, 以及他们之间相互作用的研究, 赋予分子生物学以永不衰竭的生命力. 启动子DNA结合蛋白的研究是从转录水平上研究基因表达的调节, 以寻找新的蛋白质为手段, 以了解其对转录调节作用为目的. 为阐明某些疾病的发病机制及基因治疗打下基础<sup>[1]</sup>. 现就启动子DNA结合蛋白研究策略综述如下.

## 1 启动子的结构及启动子DNA结合蛋白研究策略

启动子是一段位于结构基因5' - 端上游区的DNA序列, 能活化RNA聚合酶, 使之与模板DNA准确地结合, 并具有转录起始的特异性. 基因的特异性转录取决于酶与启动子能否有效地形成二元复合物. 启动子分三类: 启动子I、启动子II、启动子III. 只有启动子II指导mRNA的转录. 真核生物启动子II由两大部分组成: 上游元件(upstream element)和启动子核心(core promoter). 上游元件与转录的效率有关; 启动子核心包括3部分: TATA盒、起始子(initiator)及下游元件(downstream element). TATA盒为转录调控因子包括各种调节蛋白的结合区, 与转录起始位点的精确选择及转录有关, 起始子是转录起始所必须, 下游元件作用尚不清楚. 原核生物启动子区范围较小, 包括TATAAT区(Pribnow区)及其上游的TTGACA区<sup>[2, 3]</sup>.

基因转录实际上是RNA聚合酶, 转录调控因子和启动子区各种调控元件相互作用的结果. 启动子DNA结合蛋白作为转录调控因子通过与启动子DNA结合以调节基因转录. 犹如抗原-抗体特异性结合一样, 蛋白质与DNA的结合也是特异的, 这是研究启动子DNA结合蛋白的前提. 对启动子DNA结合蛋白的研究方法可分为2大类, 第1类是细胞内方法, 以已知启动子DNA序列筛选出与其相结合的蛋白编码基因, 通过生物信息分析来确定该蛋白质的名称, 由于是细胞内筛选, 因此更符合生理状态, 且操作简便, 适合高通量筛选, 用于寻找未知基因及蛋白质. 不足之处有二, 一是只能筛选可与启动子DNA特异性结合的蛋白质(如为筛选蛋白质这

已足够了), 但不能检查出精确的蛋白质结合位点. 二是特异性有时略差. 这类方法包括酵母单杂交技术, 噬菌体表面展示技术等. 第二类是细胞外法, 即在体外用重组的已知蛋白质与启动子DNA结合, 该法特异性好, 且能够在启动子DNA序列上找到精确的蛋白质结合位点, 但这种方法效率低, 操作复杂, 一般不用于寻找未知基因及蛋白质, 这类方法包括凝胶阻滞试验(gel retardation assay), DNase I足迹试验(DNase I Foot-printing assay)等. 研究者可根据研究目的选用其中一种或二者结合, 以达到既找到未知基因及蛋白质, 又能够找到该蛋白质的精确的结合位点及证实二者结合的特异性.

## 2 研究方法

**2.1 酵母单杂交技术** 酵母单杂交技术是1993年由Li et al<sup>[4, 5]</sup>从酵母双杂交技术发展而来的, 其基本原理为: 真核生物基因的转录起始需转录因子参与, 转录因子通常由一个DNA特异性结合功能域和一个或多个其他调控蛋白相互作用的激活功能域组成, 即DNA结合结构域(DNA-binding domain, BD)和转录激活结构域(activation domain, AD). 用于酵母单杂交系统的酵母GAL4蛋白是一种典型的转录因子, GAL4的DNA结合结构域靠近羧基端, 含有几个锌指结构, 可激活酵母半乳糖苷酶的上游激活位点(UAS), 而转录激活结构域可与RNA聚合酶或转录因子TFIID相互作用, 提高RNA聚合酶的活性. 在这一过程中, DNA结合结构域和转录激活结构域可完全独立地发挥作用. 据此, 我们可将GAL4的DNA结合结构域置换为文库蛋白编码基因, 只要其表达的蛋白能与目的基因相互作用, 同样可通过转录激活结构域激活RNA聚合酶, 启动下游报告基因的转录. 其基本操作过程为: (1)设计含目的基因(称为诱饵)和下游报告基因的质粒并将其转入酵母中; (2)将文库蛋白的编码基因片段与GAL4转录激活域融合表达的cDNA文库质粒转化入同一酵母中; (3)若文库蛋白与目的基因相互作用, 可通过报告基因的表达将文库蛋白的编码基因筛选出来. 在这里作为诱饵的目的基因就是启动子DNA片段, 文库基因所编码的蛋白就是启动子基因结合蛋白. 酵母单杂交技术广泛用于DNA与蛋白相互作用的研究<sup>[6, 7]</sup>, 洪源 et al 应用该技术成功筛选出乙型肝炎病毒表面抗原启动子SP I的结合蛋白<sup>[8]</sup>.

**2.2 噬菌体展示技术** 噬菌体属于单链DNA病毒<sup>[9]</sup>, 其DNA长约7 000bp, 基因组编码11种蛋白质, 其中5种为结构蛋白, 与噬菌体展示技术相关的是结构蛋白p III和p VIII, p VIII前体由73个氨基酸残基组成, 其中信号肽为23个残基, 根据构成外壳的功能可分四个区, 6-24氨基酸残基区域占据噬菌体表面的大部, 25-35氨基酸残基区域具有高度疏水性, C端与DNA相结合, 构成完整的内壁, N端为可活动的、外露在噬菌体表面的肽段, 是插入外源基因的最佳位置. p III前体由424个氨

基酸残基组成,位于噬菌体的尾部,由四个功能区组成,即信号肽区、受体结合区、C端的疏水区及穿膜区,穿膜区是最外露的区域,是插入外源基因的最佳位置.噬菌体展示技术是一种基因表达产物和亲选择相结合的技术,基本原理及操作过程为:以改构的噬菌体为载体,把待选基因片段定向插入噬菌体外壳蛋白基因区,如在噬菌p III和p VIII衣壳蛋白基因区的N端插入外源基因,形成的融合蛋白表达在噬菌的表面,不影响噬菌体的生活周期及天然构型,且易被相应的抗体或受体分子识别,外源蛋白或多肽表达于噬菌体的表面,与固定或固相支持物结合,通过适当的淘洗,洗去非特异性结合的噬菌体(即亲和富集法),选出目的噬菌体,而编码基因作为病毒基因组的一部分可通过分泌型噬菌体的单链DNA测序得知.在这一过程中,外源基因是编码启动子DNA结合蛋白的文库基因,而固定或固相支持物分子则为启动子DNA片段.噬菌体展示技术是一种经济高效的研究生物大分子相互作用的技术,如构建噬菌体随机多肽文库可用于筛选包括抗体、小分子、细胞表面受体等多种分子<sup>[10-14]</sup>.Cicchini et al<sup>[13]</sup>用噬菌体展示技术筛选出肝富有的转录因子HNF1a启动子结合蛋白.

**2.3 DNA 迁移率变动试验** DNA 迁移率变动试验(DNA mobility shift assay),又叫凝胶阻滞试验,是一种体外研究DNA与蛋白质相互作用的特殊的凝胶电泳技术.基本原理为:在凝胶电泳中,由于电场的作用,小分子DNA片段比其结合了蛋白质的DNA片段向阳极移动的速度快,因此,可标记短的双链DNA片段,将其与蛋白质混合,对混合物进行凝胶电泳,若目的DNA与特异性蛋白质结合,其向阳极移动的速度受到阻滞,对凝胶进行放射性自显影,就可找到DNA结合蛋白<sup>[15,16]</sup>.将该实验改进,DNA与更多的蛋白结合,移动速度进一步减慢,这种方法又称超级迁移率变动试验(supershift assay).由于其特异性好,DNA迁移率变动试验常用来鉴定其他方法筛选出的结果<sup>[17-18]</sup>.显而易见,克隆启动子DNA片段并标记,用该实验就可找到相应的结合蛋白.Garuti et al<sup>[19]</sup>用该试验证实肝细胞核因子3a(HNF3a)能与乙型肝炎病毒核心启动子特异性结合.

**2.4 DNase I 足迹试验** 足迹试验不仅能找到与特异性DNA结合的目标蛋白,而且能告知目标蛋白结合在哪些碱基部位,足迹试验的方法较多,常用的有DNase I 足迹试验、硫酸二甲酯足迹试验(dimethylsulfate, DMS),二者原理基本相同.DNase I 足迹试验的原理为:蛋白结合在DNA片段上,保护结合部位不被DNase破坏,这样,蛋白质在DNA片段上留下了“足迹”,在电泳凝胶的放射性自显影图片上,相应于蛋白质结合的部位没有放射性标记条带.技术流程为<sup>[15]</sup>:(1)待检双链DNA分子用P32作末端标记,通常只标记一端;(2)蛋白质与DNA混合,等二者结合后,加入适量的DNase I,消化DNA分子,控制酶的用量,使之达到每个DNA分子只发生

一次磷酸二酯键断裂,同时设未加蛋白质的对照;(3)从DNA上除去蛋白质,将变性的DNA加样在测序凝胶中作电泳和放射性自显影,与对照组相比后解读出足迹部位的核苷酸序列.足迹试验特异性好,定位精确,使用广泛<sup>[20,21]</sup>.Raney et al应用DNase I 足迹试验确定转录因子Sp1在HBV表面抗原启动子的结合位点为-49~-29核苷酸序列之间<sup>[11]</sup>.

### 3 参考文献

- 1 成军,刘研,陆荫英,李克,王琳.生物信息技术与新基因的研究.世界华人消化杂志 2003;11:474-477
- 2 Weaver RF. Molecular biology. 2 ed. 北京:科学出版社, 2002: 279-290
- 3 朱玉贤,李毅.现代分子生物学.第2版.北京:高等教育出版社, 2002:64-77
- 4 Li JJ, Herskowitz I. Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* 1993;262:1870-1873
- 5 Liu JD, Wilson TF, Milbrandt J, Johnston M. Identifying DNA-binding sites and analyzing DNA-binding domains using a yeast selection system. *Methods* 1993;5:125-137
- 6 Ishida H, Ueda K, Ohkawa K, Kanazawa Y, Hosui A, Nakanishi F, Mita E, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. Identification of multiple transcription factors, HLF, FTF, and E4BP4, controlling hepatitis B virus enhancer II. *J Virol* 2000;74:1241-1251
- 7 Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR. Cloning and characterization of a hepatitis B virus X binding protein that inhibits viral replication. *J Virol* 1998;72:1737-1743
- 8 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南.黄培堂译.第3版.北京:科学出版社, 2002:147-377
- 9 Blond-Elguindi S, Swirls SE, Dower WJ, Lipshutz RJ, Sprang SR, Sambrook JF, Gething MJ. Affinity panning of a library of peptides display on bacteriophages reveals the binding specificity of Bi P. *Cell* 1993;75:717-728
- 10 Doorbar J, Winter G. Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using phage display. *J Mol Biol* 1994;244: 361-369
- 11 Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 1996;380:364-366
- 12 Isalan M, Klug A, Choo Y. A rapid, generally applicable method to engineer zinc fingers illustrate by targeting the HIV-1 promoter. *Nat Biotechnol* 2001;19:656-660
- 13 Cicchini C, Ansuini H, Amicone L, Alonzi T, Nicosia A, Cortese R, Tripodi M, Luzzagao A. Searching for DNA-protein interactions by lambda phage display. *J Mol Biol* 2002;322:697-706
- 14 Weaver RF. Molecular biology, 2 ed. 北京:科学出版社, 2002: 124-127
- 15 朱玉贤,李毅.现代分子生物学.第2版.北京:高等教育出版社, 2002:166-170
- 16 Kwon JA, Rho HM. Transcriptional repression of the Human P53 gene by hepatitis B viral core protein (HBc) in human liver cells. *Bio Chem* 2003;384:203-212
- 17 Rho HR, Kwon JA. Hepatitis B viral core protein activities the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter through the nuclear factor κB binding site. *Biochem Cell Biol* 2002;80: 445-455
- 18 Johnson JJ, Raney AK, Mclachlan A. Characterization of a functional hepatocyte nuclear factor 3 binding site in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *Virology* 1995;208:147-158
- 19 Garuti R, Croce MA, Piccinini L, Tiozzo R, Bertolini S, Calandra S. Functional analysis of the promoter of human sterol 27-hydroxylase gene in HepG2 cells. *Gene* 2002;283:133-143
- 20 Nakamura I, Koike K. Identification of binding protein to the X gene promoter region of hepatitis B virus. *Virology* 1992; 191:533-540
- 21 Mclachlan A, Raney A. Characterization of the hepatitis B virus large surface antigen promoter Sp1 binding site. *Virology* 1995; 208:399-404

# 丙型肝炎病毒与2型糖尿病关系的研究

邵清, 成军, 白雪帆

邵清, 成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
白雪帆, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院感染科 陕西省西安市 710038  
国家自然科学基金项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目 No.98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室, cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2003-06-24 接受日期: 2003-07-16

邵清, 成军, 白雪帆. 丙型肝炎病毒与2型糖尿病关系的研究. 世界华人消化杂志 2004;12(1):143-145

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/143.asp>

## 0 引言

1989年应用分子生物学技术发现了丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV), 并证实可导致肝脏慢性疾病<sup>[1, 2]</sup>, 是输血后肝炎的主要病因. 全世界有1.7亿人感染HCV, 面临肝硬化和肝细胞癌的威胁<sup>[3-6]</sup>. 研究表明HCV感染及其所致慢性肝病与糖尿病(diabetes mellitus DM)有明显的相关性, 糖尿病的类型主要是2型糖尿病<sup>[7-12]</sup>, 尚未发展为糖尿病的患者其糖耐量是减低的<sup>[13-15]</sup>, 同时糖尿病患者中的HCV感染较高<sup>[16-19]</sup>. 应用干扰素治疗丙肝也是糖代谢紊乱的危险因素之一<sup>[20-22]</sup>.

## 1 2型糖尿病的病理机制

非胰岛素依赖型糖尿病的产生是重要的胰岛素敏感细胞(肝脏、肌肉和脂肪)对胰岛素产生抵抗, 以及胰岛 $\beta$ -细胞胰岛素产生相对不足的联合作用的结果. 尽管大多数2型糖尿病患者中, 至少于患病的早期阶段, 可以产生正常数量的胰岛素或者甚至有较高的胰岛素分泌, 但是这还不足以克服组织对胰岛素的抵抗. 胰岛素抵抗是2型糖尿病病理生理的基本组成成分. 但是, 他不是2型糖尿病惟一的缺陷, 他同样可以以较轻的程度存在于其他疾病中, 如肥胖、高血压、动脉硬化性疾病. 2型糖尿病胰岛素抵抗的特征性表现是: 降低了胰岛素刺激肌肉和脂肪组织对葡萄糖进行摄取的能力, 同样也抑制了肝脏产生糖原的能力. 产生胰岛素抵抗的机制牵涉到了体内一定数量生物化学组成成分, 如在靶细胞上的ar-f-2-HS-糖蛋白, PC-1和RAD, 或者在血液中的肿瘤坏死因子- $\alpha$ . 这些物质降低了胰岛素受体的生化功能. 这就意味着细胞内糖原、脂肪、蛋白质合成的降低, 并且将导致对胰岛素敏感的葡萄糖转运子(GLUT)向细胞表面转运的不足. 胰腺 $\beta$ -细胞产生胰岛素相对不足的机制, 牵涉到了 $\beta$ -细胞膜表面称为GLUT2的葡萄糖转运子组成成分下调的异常, 这样导致了 $\beta$ -细胞对葡萄糖失去了敏感性. 尽管在这方面积累起来的有关

知识越来越多, 但是我们现在还不能确切地了解2型糖尿病基本发病机制中的分子和遗传学机制.

2型糖尿病患者的胰岛素分泌有以下特点: (1)大部分2型糖尿病患者中, 在葡萄糖输入之前, 其基础胰岛素水平高于正常人. (2)在2型糖尿病患者中, 迅速的胰岛素分泌阶段缺失, 这就导致不能对抗血糖水平的升高, 这些表明, 在2型糖尿病患者中存在有靶细胞(肝脏、肌肉、脂肪)对胰岛素的抵抗, 以及对葡萄糖敏感的 $\beta$ -细胞的下调节, 在血糖水平升高时反馈机制不足, 这二者之间的相互作用, 引起了葡萄糖调控方面出现动态缺陷.

胰岛素抵抗是2型糖尿病早期的缺陷, 存在于大多数葡萄糖耐量减低的个体中. 他基本存在于所有的2型糖尿病患者中. 胰岛素抵抗是1种状态, 机体对胰岛素的应答降低, 最主要受累的是肝脏和肌肉.

## 2 HCV和2型糖尿病

研究表明HCV感染及其所致慢性肝病与糖尿病(diabetes mellitus DM)有明显的相关性, 糖尿病的类型主要是2型糖尿病<sup>[7-11]</sup>, 尚未发展为糖尿病的患者其糖耐量是减低的<sup>[12-14]</sup>.

2.1 HCV感染与2型糖尿病发病率的流行病学调查 Arao et al<sup>[7]</sup>对日本866例慢性病毒性疾病患者进行了丙型肝炎病毒(HCV)与糖尿病(diabetes mellitus DM)相关性的回顾性研究. 其中707例丙肝和159例乙肝患者, 肝硬化的比例分别是33%和32%, 同时调查459例糖尿病患者的丙肝感染率作为对照. 结果: 丙肝患者DM的发生率20.9% ( $P < 0.02$ ), 高于乙肝患者的11.9%, 肝硬化患者DM的发生率在丙肝患者和乙肝患者分别为30.8%和11.8% ( $P < 0.01$ ). 多变量分析显示II型糖尿病主要与男性和肝硬化相关. 由丙肝导致的肝硬化DM的发生几率是乙肝的3.2倍. 结果显示丙肝与DM的相关性比乙肝更大.

Mehta et al<sup>[8]</sup>报道丙肝可以促进糖尿病的发展, 之间的关联在总体水平尚未进行研究, 其生物学机制亦未明. 作者调查了1988-1994年9841名20岁以上的美国成年人, 结果8.4%的人有2型糖尿病, 2.1%的人丙肝抗体阳性. 2型糖尿病发生多的较年长、非白人、高体重指数和较低的社会经济地位, 在确认先前非正规用药的人发生率低. 40岁以上的丙肝患者2型糖尿病的发生率是同年龄非丙肝患者的3倍以上.

2.2 HCV感染与2型糖尿病 Caronia et al<sup>[9]</sup>非胰岛素依赖糖尿病(NIDDM)可能与慢性丙肝病毒感染相关. 研究结果提示丙肝病毒相关肝硬化糖尿病的发生率较乙肝病毒相关肝硬化高, 并与Child分级和年龄相关, 丙肝患者胰岛素水平检测结果显示其胰岛素抵抗, 急性胰岛素反应结果提示 $\beta$ 细胞功能受损, 因此丙肝病毒感染与NIDDM具有明确的相关性.

Perseghin et al<sup>[32]</sup>认为外周胰岛素抵抗和肝细胞功能受损是肝硬化中导致糖尿病的2个主要因素, (受体的或受体后的)胰岛素抵抗的机制不清, 但在肝病的病理

和病程中他是1个重要的并发症. 为避免糖尿病的发生而校正胰岛素抵抗状态时,  $\beta$  细胞的储备是极端重要的, 肝硬化患者中许多因素可导致 $\beta$ 细胞功能的还原作用. 有一些是发展为糖尿病的倾向性因素如与肝病无关的遗传或环境; 其他一些因素(肝和胰岛过量铁沉积、丙肝病毒感染、肝细胞癌的存在)是肝病依赖的, 并且由于对先前情况的促进, 因此是至关重要的. 肝硬化中糖尿病的高发生率是由发病早期严重的胰岛素抵抗和肝病相关因素使 $\beta$ 细胞功能受损共同作用的结果.

尽管有许多报道是关于慢性肝病患者糖尿病和糖耐量减低的发生率升高, 但此现象的机制并没有被阐明. Paraschiv et al<sup>[13]</sup>研究了30个口服糖耐量试验有变化的丙肝患者的胰腺内分泌特点, 同时研究了20个诊断肝病后发展为糖尿病的丙肝患者. 发现丙肝患者的血浆胰岛素和C肽是降低的, 提示胰岛素分泌功能的缺损是导致糖耐量减低和进展为明确糖尿病的主要机制.

Konrad et al<sup>[15]</sup>为研究丙肝病毒感染和糖耐量减低之间的关系, 通过糖耐量试验检测非肝硬化丙肝患者的胰岛素敏感性、糖的有效性和 $\beta$ 细胞的分泌. 结果丙肝患者的胰岛素敏感性和糖的有效性均降低, 胰岛素敏感性与丙氨酸转移酶和天冬氨酸转移酶关系不大. 多元回归分析显示肝纤维化分值和组织活性指数(HAI)与胰岛素敏感性明显相关. 丙肝患者的胰岛素分泌明显增强. 结论为正常糖耐量丙肝患者有胰岛素和葡萄糖抵抗. 糖耐量减低与丙肝所致肝病的严重程度有关.

Mason et al<sup>[16]</sup>报道了慢性肝病和糖尿病之间的关系, 其中丙型肝炎病毒感染患者21%有糖尿病, 多变量分析显示HCV感染与糖尿病具有强相关性, 糖尿病特别是2型糖尿病患者HCV感染率增高, 除慢性肝病因素外, 丙型肝炎病毒感染是发展为糖尿病的另1危险因素. Picerno et al<sup>[18]</sup>证明2型糖尿病是HCV感染的1个危险因素.

血液中的肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF $\alpha$ )降低了胰岛素受体的生化功能, 是产生胰岛素抵抗的原因之一, 是有效的胰岛素作用的抑制因素. 研究表明HCV感染后患者TNF $\alpha$ 水平升高, 并可导致肝病加重<sup>[23-30]</sup>. Gochee et al<sup>[31]</sup>用实时聚合酶链式反应(PCR)检测18个丙肝患者的胶原I、TNF $\alpha$ 、细胞色素P450 2E1(CYP 2E1)、转化生长因子和CD14的mRNA, 结果显示50%具有肝脂肪变性的患者TNF $\alpha$  mRNA表达增加. TNF $\alpha$ 涉及慢性丙肝肝脂肪变性的肝损伤及肝纤维化进程.

目前治疗HCV感染的主要方案是 $\alpha$ 干扰素合用利巴韦林. 研究<sup>[19-21]</sup>表明应用 $\alpha$ 干扰素治疗丙肝可导致糖尿病的发生和糖耐量的减低. Uto et al<sup>[20]</sup>报道了1例慢性丙肝患者在干扰素治疗期间发生的多种自身抗体相关胰岛素依赖型糖尿病(IDDM). 此患者57岁有慢性甲状腺炎, 治疗期间甲状腺功能受到监控. 治疗15 wk后, 干扰素总量530百万单位, 空腹血糖488 mg/dL, 尿C肽免疫反应降低, 糖尿病确诊, 查自身抗体包括抗胰

岛素受体抗体(AIRA)、抗核抗体(ANA)、抗DNA抗体, 并且甲状腺自身抗体效价升高. 但没有胰岛素细胞抗体和抗谷氨酸脱羧酶抗体. 停用干扰素并开始胰岛素治疗, 但血糖控制欠佳, 2 mo后AIRA转阴, 18 mo后胰岛素抗体(IA)阳性. 自从干扰素治疗开始, 血清转氨酶持续正常, 血清HCV RNA曾转阴, 有可能是干扰素治疗引起免疫紊乱导致多种自身抗体和IDDM的发生. Chen et al<sup>[14]</sup>调查了中国人丙肝患者糖耐量下降及这些患者干扰素治疗与糖耐量下降之间的关系. 34.6%的丙肝患者有糖耐量下降, 并且比空腹血糖正常的患者明显年龄长、体重指数高、遭受肥胖症痛苦、有家族糖尿病史和以前曾接受干扰素治疗. 逐步多因素logistic回归显示: 57岁以上、肥胖症、干扰素治疗史和糖尿病家族史是丙肝患者糖耐量降低倾向的危险因素, 根据作者的了解, 这是第一个以总体为基础报告干扰素治疗是糖耐量下降的独立影响因素.

HCV感染可引起肝脏的慢性疾患, 并可引起多系统损伤. HCV与糖代谢的研究使我们进一步了解了HCV的致病作用, 为防治丙肝提供了一定的线索, 为今后的研究提供了帮助.

### 3 参考文献

- 1 Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-362
- 2 Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-364
- 3 Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C in the West. *Semin Liver Dis* 1995;15:5-14
- 4 Mansell CJ, Locarnini SA. Epidemiology of hepatitis C in the East. *Semin Liver Dis* 1995;15:15-32
- 5 Mamiya N, Worman HJ. Hepatitis C virus core protein binds to a DEAD box RNA helicase. *J Biol Chem* 1997;274:15751-15756
- 6 National institutes of health consensus development panel. *Hepatology* 1997;26:1S-156S
- 7 Arao M, Murase K, Kusakabe A, Yoshioka K, Fukuzawa Y, Ishikawa T, Tagaya T, Yamanouchi K, Ichimiya H, Sameshima Y, Kakumu S. Prevalence of diabetes mellitus in Japanese patients infected chronically with hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 2003;38:355-360
- 8 Mehta SH, Brancati FL, Sulkowski MS, Strathdee SA, Szklo M, Thomas DL. Prevalence of type 2 diabetes mellitus among persons with hepatitis C virus infection in the United States. *Ann Intern Med* 2000;133:592-599
- 9 Caronia S, Taylor K, Pagliaro L, Carr C, Palazzo U, Petrik J, O'Rahilly S, Shore S, Tom BD, Alexander GJ. Further evidence for an association between non-insulin-dependent diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1999;30:1059-1063
- 10 Kolarski V, Petrova D, Todorov A, Slavchev B. The extrahepatic manifestations in hepatitis C virus (HCV) infection. *Vutr Boles* 1999;31:11-15
- 11 Armas-Merino R, Wolff C, Soto R, Jiron MI, Parraguez A. Hepatitis C virus and resulting diseases. *Rev Med Chil* 1999;127:1240-1254
- 12 Thuluvath PJ, John PR. Association between hepatitis C, diabetes mellitus, and race. a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2003;98:438-441
- 13 Paraschiv C, Graur M, Butnariu G, Mihai B, Constantinescu

- D. The pathological mechanisms of glycoregulation disturbances in chronic hepatitis B and C. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2002;107:294-297
- 14 Chen LK, Hwang SJ, Tsai ST, Luo JC, Lee SD, Chang FY. Glucose intolerance in Chinese patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2003;9:505-508
- 15 Konrad T, Zeuzem S, Toffolo G, Vicini P, Teuber G, Briem D, Lormann J, Lenz T, Herrmann G, Berger A, Cobelli C, Usadel K. Severity of HCV-induced liver damage alters glucose homeostasis in noncirrhotic patients with chronic HCV infection. *Digestion* 2000;62:52-59
- 16 Mason AL, Lau JY, Hoang N, Qian K, Alexander GJ, Xu L, Guo L, Jacob S, Regenstein FG, Zimmerman R, Everhart JE, Wasserfall C, Maclaren NK, Perrillo RP. Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1999;29:328-333
- 17 Mayo MJ. Extrahepatic manifestations of hepatitis C infection. *Am J Med Sci* 2003;325:135-148
- 18 Picerno I, Di Pietro A, Spataro P, Di Benedetto A, Romano G, Scoglio ME. Is diabetes mellitus a risk factor for HCV infection? *Ann Ig* 2002;14:473-477
- 19 Okan V, Araz M, Aktaran S, Karsligil T, Meram I, Bayraktaroglu Z, Demirci F. Increased frequency of HCV but not HBV infection in type 2 diabetic patients in Turkey. *Int J Clin Pract* 2002;56:175-177
- 20 Uto H, Matsuoka H, Murata M, Okamoto T, Miyata Y, Hori T, Ido A, Hirono S, Hayashi K, Tsubouchi H. A case of chronic hepatitis C developing insulin-dependent diabetes mellitus associated with various autoantibodies during interferon therapy. *Diabetes Res Clin Pract* 2000;49:101-106
- 21 Konrad T, Zeuzem S, Vicini P, Toffolo G, Briem D, Lormann J, Herrmann G, Berger A, Kusterer K, Teuber G, Cobelli C, Usadel KH. Evaluation of factors controlling glucose tolerance in patients with HCV infection before and after 4 months therapy with interferon-alpha. *Eur J Clin Invest* 2000;30:111-121
- 22 Konrad T, Vicini P, Zeuzem S, Toffolo G, Breim D, Lormann J, Herrmann G, Wittmann D, Lenz T, Kusterer K, Teuber G, Cobelli C, Usadel KH. Interferon-alpha improves glucose tolerance in diabetic and non-diabetic patients with HCV-induced liver disease. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999;107:343-349
- 23 Dolganiuc A, Kodys K, Kopasz A, Marshall C, Do T, Romics L Jr, Mandrekar P, Zapp M, Szabo G. Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J Immunol* 2003;170:5615-5624
- 24 Frese M, Barth K, Kaul A, Lohmann V, Schwarzle V, Bartenschlager R. Hepatitis C virus RNA replication is resistant to tumour necrosis factor-alpha. *J Gen Virol* 2003;84:1253-1259
- 25 Taliani G, Badolato MC, Nigro G, Biasin M, Boddi V, Pasquazzi C, Clerici M. Serum concentration of gammaGT is a surrogate marker of hepatic TNF-alpha mRNA expression in chronic hepatitis C. *Clin Immunol* 2002;105:279-285
- 26 Constantini PK, Wawrzynowicz-Syczewska M, Clare M, Boron-Kaczmarek A, McFarlane IG, Cramp ME, Donaldson PT. Interleukin-1, interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy. *Liver* 2002;22:404-412
- 27 Caradonna L, Mastronardi ML, Magrone T, Cozzolongo R, Cuppone R, Manghisi OG, Caccavo D, Pellegrino NM, Amoroso A, Jirillo E, Amati L. Biological and clinical significance of endotoxemia in the course of hepatitis C virus infection. *Curr Pharm Des* 2002;8:995-1005
- 28 Macias J, Sanchez-Quintero A, Pineda JA, Abad MA, Rubio A, Rosa R, Leal M, Lissen E. Minimal liver injury in chronic hepatitis C virus infection is associated with low levels of soluble TNF-alpha/Fas receptors and acquisition in childhood. *Liver* 2001;21:410-414
- 29 Spanakis NE, Garinis GA, Alexopoulos EC, Patrinos GP, Menounos PG, Sklavounou A, Manolis EN, Gorgoulis VG, Valis D. Cytokine serum levels in patients with chronic HCV

infection. *J Clin Lab Anal* 2002;16:40-46

- 30 Liu ZX, Nishida H, He JW, Lai MM, Feng N, Dennert G. Hepatitis C virus genotype 1b core protein does not exert immunomodulatory effects on virus-induced cellular immunity. *J Virol* 2002;76:990-997
- 31 Gochee PA, Jonsson JR, Clouston AD, Pandeya N, Purdie DM, Powell EE. Steatosis in chronic hepatitis C: association with increased messenger RNA expression of collagen I, tumor necrosis factor-alpha and cytochrome P450 2E1. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:386-392
- 32 Perseghin G, Caloni M, Mazzaferro V, Luzi L. Hepatogenic diabetes. *Recenti Prog Med* 2001;92:757-761

## 核转录因子Rel/NF- $\kappa$ B与乙型肝炎病毒

刘妍, 成军, 王建军, 杨倩

刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2003-06-24 接受日期: 2003-07-16

### 摘要

乙型肝炎病毒(HBV)的感染, 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌(HCC)的发生密切相关. 真核细胞转录因子NF- $\kappa$ B在慢性HBV感染及致HCC发生过程中发挥重要作用, 本文对核转录因子Rel/NF- $\kappa$ B的分子生物学特征、活化和转录调控机制、参与HBV编码蛋白致病及在细胞凋亡发生过程中的机制进行了简要综述.

刘妍, 成军, 王建军, 杨倩. 核转录因子Rel/NF- $\kappa$ B与乙型肝炎病毒. 世界华人消化杂志 2004;12(1):145-148

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/145.asp>

### 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)的感染, 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌(HCC)的发生密切相关. 虽然HBV感染与肝细胞癌之间的关系已经得到确定, 但是具体的分子生物学机制还有许多工作要做. 其中肝炎病毒编码蛋白对于肝细胞基因组表达的反式调节作用, 即肝炎病毒蛋白与肝细胞基因组启动子DNA结合, 对于肝细胞基因表达谱产生影响, 从而调节肝细胞的生长、代谢、凋亡及恶性转化, 在HBV感染致病机制中起着重要作用<sup>[1-2]</sup>. 真核细胞转录因子NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B)能够广泛调节机体的免疫应答和炎症反应. 自1980年发现NF- $\kappa$ B以来, 人们对其分子生物学特征、作用机制及与疾病的关系作了广泛研究, 近年研究发现NF- $\kappa$ B在慢性乙型肝炎病毒感染及致肝

细胞癌发生过程中发挥重要作用<sup>[3,4]</sup>.

## 1 NF- $\kappa$ B 的结构与功能

**1.1 NF- $\kappa$ B 与 Rel 蛋白质家族** NF- $\kappa$ B 是真核细胞转录因子 Rel 蛋白质家族成员,作为一种 DNA 结合蛋白质因子,最初是在研究 B 淋巴细胞免疫球蛋白  $\kappa$  轻链基因调控时发现的,可以和增强子  $\kappa$ B 序列特异性结合,促进  $\kappa$  轻链基因的表达,因而得名<sup>[3]</sup>. 后来研究发现多种与 NF- $\kappa$ B 结构相关的、能与 DNA 特定区域结合而发挥转录调控作用的蛋白质,包括 p50/p105、p52/p100、RelA(p65)、RelB 和 c-Rel 等,称为 Rel 蛋白质家族. 他们之间可以形成多种形式的同源或异源二聚体,如  $\kappa$ BF1(p50 亚基同源二聚体), p50 和 p52 的前体蛋白 p105 和 p100 分别称为 NF- $\kappa$ B1 和 NF- $\kappa$ B2,而起主要调控作用的是 p50 和 RelA 亚基组成的异源二聚体,这就是通常所说的 NF- $\kappa$ B<sup>[5]</sup>.

Rel 蛋白质家族分子结构氨基末端(N端)约300个氨基酸残基(aa)区域具有共同特征,称为 Rel 同源区,包括 DNA 结合功能域、二聚体化功能域、核定位序列(NLS)及潜在的 cAMP 依赖性的蛋白激酶 A(PKA)磷酸化位点,与其浆内定位、激活后迁移入核以及 DNA 结合功能有关. 而羧基末端(C端)却有显著的差异,据此可将 Rel 蛋白质分为 2 类: 1 类含有锚蛋白(ankyrin)重复序列,如 p105 和 p100; 另 1 类含有反式激活(transactivation, TA)功能域,如 RelA、RelB、c-Rel.

**1.2 NF- $\kappa$ B 抑制因子及与 NF- $\kappa$ B 间的作用** 研究发现<sup>[6]</sup> NF- $\kappa$ B 活性只出现在某些细胞核抽提物中,而在静止期的细胞,他是以无活性的潜伏状态定位于胞质中,原因是 NF- $\kappa$ B 与其抑制因子相互结合而存在. 这些抑制因子包括 I $\kappa$ B 蛋白质家族( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\varepsilon$ 、 $\lambda$ ), NF- $\kappa$ B 前体分子 p105 和 p100 以及原癌基因 bcl3 的产物,其中最重要的是 I $\kappa$ B $\alpha$  和 I $\kappa$ B $\beta$ , 他们具有特征性的锚蛋白重复序列,能与 RelA 亚基 DNA 位点结合,覆盖 p50 NLS. 他们的主要作用有: 阻止 NF- $\kappa$ B 向核内转移; 阻止 NF- $\kappa$ B 与 DNA  $\kappa$ B 位点结合; 促进 NF- $\kappa$ B 与 DNA 复合物解离. NF- $\kappa$ B 与其抑制因子之间的结合存在一定的特异性.

**1.3 NF- $\kappa$ B 的活化及转录调控** 定位于胞质的 NF- $\kappa$ B p50-RelA 二聚体,要进入胞核发挥转录调控作用,首先必须使 RelA 亚基与 I $\kappa$ B 或 p105、p100 分离,以解除对 p50 NLS 的覆盖. 只有在多种因素的作用后, NF- $\kappa$ B 才能被活化. 能够激活 NF- $\kappa$ B 的因素很多,包括各种应激刺激、细菌黏多糖、多种细胞因子、病毒、促细胞分裂剂及氧自由基等都能够激活 NF- $\kappa$ B. 在这些因素作用下, I $\kappa$ B 抑制因子降解, NF- $\kappa$ B p50-RelA 二聚体释放并向核内转移. I $\kappa$ B 的降解失活需经磷酸化和蛋白降解的过程,并受细胞氧化势的影响<sup>[7]</sup>. 有报称肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor)激活 NF- $\kappa$ B 的机制是: TNF- $\alpha$  与靶细胞表面受体结合,经第二信使二乙酰甘油(DG)途径生成 N-磷脂酰鞘氨醇,调控特异性蛋

白激酶和磷酸酶,作用于 I $\kappa$ B 后引起其构象发生改变,被泛素-蛋白酶体(ubiquitin-proteasome)途径识别而降解. 同时一些刺激因子可通过激活肿瘤坏死因子受体相关因子 TRAF(TNF-receptor associated factor)2、5 或 6,继而活化 NF- $\kappa$ B 诱导激酶 NIK(NF- $\kappa$ B inducing kinase), NIK 将 I $\kappa$ B 激酶 IKK $\alpha$ / $\beta$  (I $\kappa$ B kinase)磷酸化, IKK 又将 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化,导致 I $\kappa$ B 降解. 活化的 NF- $\kappa$ B 可上调 I $\kappa$ B 的基因转录,反馈调节 I $\kappa$ B 迅速合成,使 NF- $\kappa$ B 再度失活,终止转录, NF- $\kappa$ B 被运回胞质重新利用. 另外, NF- $\kappa$ B 蛋白还可调节其自身亚基的转录,因为这些基因启动子内也存在 NF- $\kappa$ B<sup>[8]</sup>.

进入核内的 NF- $\kappa$ B 形成由两个 p50 和两个 RelA 亚基组成的活性异源四聚体分子,其中两个 p50 亚基识别靶基因启动子和增强子中的  $\kappa$ B 位点, RelA 亚基 TA 功能域发挥转录激活功能.  $\kappa$ B 位点一般由 10 bp 组成,基础碱基的保守性不同决定了 NF- $\kappa$ B 对该基因转录激活作用的大小.

**1.4 NF- $\kappa$ B 激活的病理生理意义** 多种器官和组织(包括肝脏)都表达核转录因子 NF- $\kappa$ B. 研究发现,  $\kappa$ B 位点存在于多种细胞和病毒的基因组中,因而 NF- $\kappa$ B 能够调控众多基因转录. 早期研究主要集中在 NF- $\kappa$ B 调控机体细胞黏附、免疫应答、细胞程序性死亡、炎症细胞的趋化作用、细胞分化、细胞外基质的降解等. NF- $\kappa$ B 诱导表达 IL-2,与 T 细胞增生有关,还可诱导表达 MHC-I 类抗原、巨噬细胞炎症蛋白 MIP-1 $\alpha$ 、干扰素 IFN- $\beta$ 、血管紧张素原、IL-6、细胞集落刺激因子等. 近年发现 NF- $\kappa$ B 还是与细胞存活密切相关的基因,对细胞程序性死亡起抑制作用,可抑制 TNF 诱导的细胞凋亡. 在一些病毒感染中,如免疫缺陷病毒(HIV-1) Tat 蛋白、EB 病毒(EBV)潜伏膜蛋白(LMP-1)、HBV X 蛋白、人 T 细胞白血病病毒-1(HTLV-1) Tax 蛋白、鸟逆转录病毒肿瘤蛋白 v-Rel 等能够通过 NF- $\kappa$ B 桥接作用,促进其自身复制、某些原癌基因的激活、抑癌基因的失活而致感染的靶细胞恶性转化,在这些病毒慢性感染及致肿瘤发生过程中起重要作用<sup>[9]</sup>.

## 2 NF- $\kappa$ B 与乙型肝炎病毒感染

**2.1 NF- $\kappa$ B 与乙型肝炎病毒 X 蛋白** 乙型肝炎病毒(HBV)X 蛋白可在多种真核细胞中反式激活同源或异源病毒和细胞基因的转录调控区,促进靶基因的表达. X 蛋白反式激活作用的机制主要有两个方面,1 是核内通过某些 DNA 结合蛋白激活转录因子或通过基本转录机制起作用; 另 1 机制是胞质中 X 蛋白通过细胞信号转导途径激活各种类型的转录因子,包括活化蛋白 AP-1、AP-2、AP-3、NF- $\kappa$ B、环 AMP 应答元件 CRE、Oct-1 等. 其中 AP-1 的作用是依赖蛋白激酶 C(PKC)的第二信使 DG 途径. 研究认为 NF- $\kappa$ B 在 X 蛋白激活机制中起重要作用,经 NF- $\kappa$ B 的 X 蛋白反式激活作用是非 PKC 依赖的,而是通过一些细胞因子、dsRNA、活性氧



等发挥作用. 与之相反的结论是 NF- $\kappa$ B 同 AP-1 一样, 是依赖 PKC 的 Ras/Raf/MAPK(mitogen activated protein kinase)连锁反应, 一方面 I $\kappa$ B 磷酸化、蛋白水解、NF- $\kappa$ B 活化入核; 另一方面使前体蛋白 p105 磷酸化、降解、RelA 释放增加. NF- $\kappa$ B 活化后, 一方面作用于病毒基因促进病毒复制, 另一方面作用于原癌基因的  $\kappa$ B 位点, 使原癌基因过表达, 加之多种因素综合作用, 可致肝细胞转化和肝细胞癌(HCC)的发生<sup>[10-20]</sup>. 研究发现, HBV X 蛋白能反式激活可诱导的一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)基因启动子而上调 iNOS 的基因表达. 一系列基因缺失突变分析显示, iNOS 基因启动子近端的 NF- $\kappa$ B 结合位点, 是 X 蛋白激活 iNOS 基因的结构基础. 细胞质中的 X 蛋白表达是其反式激活 iNOS 基因启动子的必要条件, 如果强制性地使在细胞核中表达 X 蛋白则失去其激活 iNOS 基因表达的活性. 表明 X 蛋白的亚细胞定位与其诱导 iNOS 基因表达水平的作用密切相关<sup>[21-22]</sup>.

**2.2 NF- $\kappa$ B 与截短型乙肝病毒表面抗原中蛋白** 近年研究发现, 从肝癌细胞系或肝癌组织中亚克隆出截短型 PreS2/S 基因表达产物(truncated middle surface proteins, MHBst), 这种变异的病毒表面中蛋白, 缺失了位于 C-末端的膜定位信号, 使 MHBst 具备内质网(ER)定位功能, 未能进入分泌途径而在内质网滞留, 其前-S2 区指向胞质区, 从而有机会与胞质蛋白相互作用, 发挥其广泛的反式激活效应. 全长的 MHBs 蛋白的前-S2 区指向 ER 腔, 进入高尔基复合体而分泌. 所以说 MHBst 的反式激活功能依赖于其 N-末端前-S2 区的胞质定位功能. MHBst 的前 S2 区发生 PKC 依赖的磷酸化反应, 前 S2 区域与 PKC  $\alpha/\beta$  结合, 触发 PKC 依赖的 c-Raf-1/MAP2- 激酶信号传递链式反应, 结果激活了转录因子如 AP-1、NF- $\kappa$ B、AP-2、SRE、Sp1 和 c-myc、c-fos 启动子, 参与病毒感染后的炎症反应和 HCC 的发生. 这种反式效应并不具有宿主细胞特异性, MHBst 在不同来源细胞中均具有反式激活作用, 而并非肝细胞特异的转录激活因子<sup>[23-32]</sup>.

**2.3 NF- $\kappa$ B 与乙肝病毒表面抗原大蛋白** 研究发现乙肝病毒表面抗原大蛋白(large HBV surface protein, LHBs)独特的拓扑结构决定其具有反式激活作用, LHBs 的前-S1 和前-S2 区有一个与翻译不同步的转位过程, 在横跨内质网膜时是指向内质网的胞质侧, 这种在胞质滞留的前-S2 区, 有机会与细胞中信号转导相关因子相互作用, 发挥其反式激活作用. LHBs 前 S2 区在翻译后初期定位于 ER 的胞质侧, 与 MHBst 相似, 能够激活多种启动子元件, 具有同样的转录激活功能. LHBs 的转录激活是依赖 PKC 的 AP-1 和 NF- $\kappa$ B 活化途径, 下游 c-Raf-1 激酶抑制剂能够明显阻断 LHBs 对 AP-1 和 NF- $\kappa$ B 的激活, 提示功能性的 c-Raf-1 激酶是该途径的先决条件. 慢性 HBV 感染的患者体内 LHBs 持续过表达, 转录反式激活病毒的启动子元件与病毒复制密切相关<sup>[33]</sup>.

**2.4 NF- $\kappa$ B 与乙肝病毒核心抗原** 研究发现, 乙型肝炎病毒核心抗原(HBV core protein, HBc)对 HBV 前基因组启动子具有转录激活功能. 对 HBV 前基因组启动子一系列的缺失突变分析显示, 负责转录激活的位点是位于 HBV 增强子 II/前基因组启动子上游的 NF- $\kappa$ B 结合位点(GGGACGTACT, 核苷酸 1 408-1 417). 对转染 HBc 的 HepG2 细胞核提取物进行电泳泳动度迁移率实验, 结果显示 HBc 具有正性激活剂的作用, 能够增强 NF- $\kappa$ B 的 DNA 结合活性, 促进肝细胞病毒复制<sup>[34]</sup>.

**2.5 NF- $\kappa$ B 与肝癌细胞程序性死亡** 有学者研究了 HBV X 蛋白与 NF- $\kappa$ B 在细胞程序性死亡中的作用, 用与 NF- $\kappa$ B 抑制因子 I $\kappa$ B 降解有关的蛋白酶抑制剂 ALLN 处理人肝癌细胞, 抑制 I $\kappa$ B 的降解, 从而阻断 HBV X 蛋白对 NF- $\kappa$ B 的活化. 然后用阿霉素诱导处理的肝癌细胞, 研究发现, 同等剂量阿霉素在相同实验条件下, 当 NF- $\kappa$ B 被阻断于非活性状态时的细胞程序性死亡率明显高于 NF- $\kappa$ B 处于活性状态时的细胞程序性死亡率. 即 HBV X 蛋白通过活化核转录因子 NF- $\kappa$ B 抑制肝癌细胞程序性死亡. NF- $\kappa$ B 是一种细胞存活基因, 是细胞死亡信号因子传递过程中的负反馈调节机制, 许多死亡信号在传递过程中同时可激活细胞的存活机制, NF- $\kappa$ B 的活化就是其中的机制之一. NF- $\kappa$ B 氨基端约有 300 aa 与病毒癌基因 v-Rel 同源, 与细胞存活相关. 切除 2/3 体积肝的小鼠在术后 30 min, 肝核转录因子 NF- $\kappa$ B 迅速增加, 1 h 达高峰. NF- $\kappa$ B p65 亚基基因敲除的转基因小鼠在胚胎 15-16 d 死亡, 伴随大量肝细胞程序性死亡, 导致肝功能衰竭. 同时发现抑制 NF- $\kappa$ B 活化可诱导小鼠发生程序性死亡. HBV X 蛋白通过对核转录因子 NF- $\kappa$ B 的活化而激活细胞的存活机制, 对细胞程序性死亡产生抗性, 使肝细胞呈克隆性增生<sup>[35, 36]</sup>.

研究发现肿瘤坏死因子(TNF $\alpha$ )与 TNFR 结合后可通过信号转导途径诱导细胞凋亡, 同时通过另一条途径激活与细胞存活相关基因 NF- $\kappa$ B, 而核转录因子 NF- $\kappa$ B 抑制 TNF $\alpha$  诱导的细胞凋亡, 即 TNF $\alpha$  诱导细胞凋亡的同时活化 NF- $\kappa$ B, 建立细胞防御机制, 在凋亡启动阶段就阻断死亡信号的传递, NF- $\kappa$ B 可激活 TNFR 相关因子 TRAF1、TRAF2、IAP (inhibitor of apoptosis)1 和 IAP2. 这些基因产物可相互协同在早期抑制 TNF $\alpha$  诱导的细胞凋亡. 同时核转录因子 NF- $\kappa$ B 对凋亡相关因子 caspase 8 有直接阻断作用, 而由此抑制一系列 caspase 的活化, 这也是 NF- $\kappa$ B 抗细胞凋亡的重要机制<sup>[37, 38]</sup>.

此外, 表达 HBV X 蛋白的细胞系可以抵抗抗-Fas 抗体诱导的细胞凋亡, 而且与 NF- $\kappa$ B 的激活有关. X 蛋白对于 NF- $\kappa$ B 的激活能力与内源性的 I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA 的表达水平有关. HBV X 蛋白的表达伴随着 NF- $\kappa$ B 介导的基因转录活动. 应用特异性抑制剂抑制 NF- $\kappa$ B, 或者表达 I $\kappa$ B $\alpha$  的表达载体进行转染并抑制 NF- $\kappa$ B, 可显著促进细胞凋亡, 但是对没有转染 X 蛋白基因的细胞没有影响. 可见, HBV X 蛋白的表达及其对于 NF- $\kappa$ B 的激

活是X蛋白调节肝细胞凋亡的重要的信号转导机制<sup>[39,40]</sup>.

另一方面,重要的细胞调控蛋白 cyclin D1 是 NF- $\kappa$ B 的靶基因, NF- $\kappa$ B 可启动 cyclin D1 的转录,促进 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 期向 S 期转化,细胞过度增生,在其他协同因素下恶性转化,发生癌变<sup>[41]</sup>. 在肝细胞癌治疗过程中在常规化疗药物治疗的同时,可以选择性的阻断 NF- $\kappa$ B 活化,从而促进肝癌细胞的程序性死亡,有助于提高疗效. 随着 NF- $\kappa$ B 研究的不断深入,进一步阐明其在肝炎病毒蛋白致病中的作用,一方面可设想用 NF- $\kappa$ B 拮抗剂从 NF- $\kappa$ B 水平上阻断 X 蛋白的作用,减轻病毒复制、损伤及慢性感染的致癌性;另一方面在病毒蛋白水平,用肝炎病毒蛋白抑制剂或基因工程技术来阻断肝炎病毒蛋白的表达,达到同样的目的. 有望为乙型和丙型肝炎病毒的基因治疗打开一个新思路.

### 3 参考文献

- 1 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 2 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:217-219
- 3 Chytil M, Verdine GL. The Rel family of eukaryotic transcription factors. *Curr Opin Struct Biol* 1996;6:91-100
- 4 Tai DI, Tsai SL, Chang YH, Huang SN, Chen TC, Chang KS, Liaw YF. Constitutive activation of nuclear factor kappaB in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000;89:2274-2281
- 5 Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996;87:13-20
- 6 Gilmore TD, Morin PJ. The I kappa B proteins: members of a multifunctional family. *Trends Genet* 1993;9:427-433
- 7 Sha WC. Regulation of immune responses by NF-kappa B/Rel transcription factor. *J Exp Med* 1998;187:143-146
- 8 Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kB in preventing TNF- $\alpha$ -induced cell death. *Science* 1996;274:782-784
- 9 Grilli M, Chiu JJ, Lenardo MJ. NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol* 1993;143:1-62
- 10 陆荫英, 刘妍, 成军, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 蛋白的功能研究进展. 国外医学病毒学分册 2002;9:33-36
- 11 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙肝病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 12 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及其反式激活功能的影响. 解放军医学杂志 2002;27:125-127
- 13 Waris G. Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C. *J Biosci* 2003;28:311-321
- 14 Yen TS. Hepadnaviral X protein: review of recent progress. *J Biomed Sci* 1996;3:20-30
- 15 Doria M, Klein N, Lucito R, Schneider RJ. The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of Ras and nuclear activator of transcription factors. *EMBO J* 1995;14:4747-4757
- 16 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- 17 Su F, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates transcription factor NF-kappaB by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins. *J Virol* 1996;70:4558-4566
- 18 Lucito R, Schneider RJ. Hepatitis B virus X protein activates transcription factor NF-kappa B without a requirement for protein kinase C. *J Virol* 1992;66:983-991
- 19 Mahe Y, Mukaida N, Kuno K, Akiyama M, Ikeda N, Matsushima K, Murakami S. Hepatitis B virus X protein transactivates human interleukin-8 gene through acting on nuclear factor  $\kappa$ B and CCAAT/enhancer-binding protein-like cis-elements. *J Biol Chem* 1991;266:13759-13763
- 20 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 21 Amaro MJ, Bartolome J, Carreno V. Hepatitis B virus X protein transactivates the inducible nitric oxide synthase promoter. *Hepatology* 1999;29:915-923
- 22 Majano P, Lara-Pezzi E, Lopez-Cabrera M, Apolinario A, Moreno-Otero R, Garcia-Monzon C. Hepatitis B virus X protein transactivates inducible nitric oxide synthase gene promoter through the proximal nuclear factor kappaB-binding site: evidence that cytoplasmic location of X protein is essential for gene transactivation. *Hepatology* 2001;34:1218-1224
- 23 刘妍, 成军, 张跃新, 段惠娟, 牟劲松, 韩萍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 截短型 HBsAg 中蛋白反式激活基因的克隆. 中华传染病杂志 2002;20:218-221
- 24 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV 核心蛋白与截短型 HBV 表面抗原中蛋白协同反式激活功能的研究. 中华肝脏病杂志 2002;10:354-357
- 25 Hildt E, Munz B, Saher G, Reifenberg K, Hofschneider PH. The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *EMBO J* 2002;21:525-535
- 26 Hildt E, Hofschneider PH. The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:315-329
- 27 Meyer M, Caselmann WH, Schluter V, Schreck R, Hofschneider PH, Baeuerle PA. Hepatitis B virus transactivator MHBst: activation of NF-kappa B, selective inhibition by antioxidants and integral membrane localization. *EMBO J* 1992;11:2991-3001
- 28 Natoli G, Avantiaggiati ML, Balsano C, De Marzio E, Collepardo D, Elfassi E, Levrero M. Characterization of the hepatitis B virus preS/S region encoded transcriptional transactivator. *Virology* 1992;187:663-670
- 29 刘妍, 成军. HBV 截短的表面抗原蛋白 MHBs' 的反式激活作用. 国外医学病毒学分册 2000;7:190-193
- 30 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 夏小兵, 斯崇文. 外周血中乙型肝炎病毒截短型囊膜中蛋白基因的克隆化与分析. 中华肝脏病杂志 2001;9:163-165
- 31 刘妍, 成军, 董菁, 夏小兵, 李克, 杨继珍. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. 肝脏 2001;6:8-10
- 32 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙肝病毒表面抗原中蛋白上调 c-myc 基因表达的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:141-144
- 33 Hildt E, Saher G, Bruss V, Hofschneider PH. The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* 1996;225:235-239
- 34 Kwon JA, Rho HM. Hepatitis B viral core protein activates the hepatitis B viral enhancerII/pregenomic promoter through the nuclear factor kappaB binding site. *Biochem Cell Biol* 2002;80:445-455
- 35 Mosialos G. The role of Rel/NF-kappa B proteins in viral oncogenesis and the regulation of viral transcription. *Semin Cancer Biol* 1997;8:121-129
- 36 Bellas RE, FitzCerald MJ, Fausto N, Sonenshein GE. Inhibition of NF-kB activity induces apoptosis in murine hepatocytes. *Am J Pathol* 1997;151:891-896
- 37 Gilmore TD, Koedood M, Piffat KA, White DW. Rel/NF-kappa B/IkB proteins and cancer. *Oncogene* 1996;13:1367-1378
- 38 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kB in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- 39 Pan J, Duan LX, Sun BS, Feitelson MA. Hepatitis B virus X protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF-kappa B. *J Gen Virol* 2001;82(Pt 1):171-182
- 40 Yun C, Um HR, Jin YH, Wang JH, Lee MO, Park S, Lee JH, Cho H. NF-kappaB activation by hepatitis B virus X (HBx) protein shifts the cellular fate toward survival. *Cancer Lett* 2002;184:97-104
- 41 Hinz M, Krappmann D, Eichten A. NF-kB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Bio* 1999;19:260-268

## 丙型肝炎病毒与PKR信号转导系统

杨倩, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 党晓燕, 张树林

杨倩, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 党晓燕, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. [cj@genetherapy.com.cn](mailto:cj@genetherapy.com.cn)

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-24 接受日期: 2003-07-16

杨倩, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 党晓燕, 张树林. 丙型肝炎病毒与PKR信号转导系统. 世界华人消化杂志 2004;12(1):149-151

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/149.asp>

### 0 引言

在病毒感染真核细胞的过程中, 干扰素(IFN)诱导细胞的抗病毒机制是机体防御感染的第一道防线. 在病毒感染过程中, 分泌的干扰素主要用于保护邻近细胞免受感染, 限制病毒扩散<sup>[1]</sup>. I型IFN由IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 两种亚型组成, IFN- $\alpha$ 主要由白细胞分泌产生, IFN- $\beta$ 主要由成纤维细胞、上皮细胞产生. I型IFN与相应的受体结合, 激活信号级联反应, 从而调节至少30个基因的转录翻译水平, 其中包括双链RNA激活的蛋白激酶(double-stranded RNA-activated protein kinase, PKR)和2'-5'寡聚腺苷酸合成酶(2'-5' oligoadenylates synthesis), 这两种酶的激活均需要病毒复制过程中产生的双链RNA<sup>[2, 3]</sup>. PKR参与机体的抗病毒机制, 与细胞凋亡密切相关, 从而受到越来越多的关注.

### 1 PKR的结构与生物学特点

PKR是经典的IFN诱导产物, 参与IFN的抗病毒机制. PKR又称为DAI或p68, 由551个氨基酸残基组成, 其N端为调节区(1-265 aa), 具有两个与dsRNA结合的部位, 分别位于55-75 aa及145-166 aa区域内, 其中前一个区域是必需的; 其C端(266-551 aa)为催化部位. PKR分子量为68 kDa, 属于保守双链RNA结合分子家族, 该家族还包括大肠杆菌RNA酶III等<sup>[4]</sup>. Jiménez-García et al<sup>[5]</sup>通过比较腺病毒2感染和未感染的HeLa细胞发现, 在未感染的细胞中PKR分布在细胞质, 同时也发现PKR在核浆中也有散在分布, 感染细胞与未感染细胞有相似的细胞分布. 研究表明低浓度的dsRNA具有激活作用, 然而高浓度的dsRNA却阻止该活化作用. 目前认为dsRNA对PKR的激活与双链RNA长度有关, 而与序列结构无关, 激活PKR最少需要30 bp dsRNA, 随着dsRNA的延长激活能力逐渐增强. 但有学者发现含有双链长度不超过20 bp的单链Tm1-3RNA亦能激活PKR, 提示PKR的激活可能存在多种形式. PKR与dsRNA结合后, 形成二聚体, 随后进入自主磷酸化和随后的不依赖dsRNA的底物磷酸化,

PKR的N端有两个保守的dsRNA结合基序(motif), 第一个基序含有与dsRNA结合的高度保守性氨基酸序列; C端为催化活性结构域, 但这一活性在dsRNA结合前是封闭的, 当N端基序上结合dsRNA后, 可能通过蛋白质构型的改变, 使C端的酶活性表现出来<sup>[6-10]</sup>.

活化的PKR能够识别蛋白质合成的起始因子真核翻译起始因子-2(eukaryotic initiation factor-2, eIF-2), 并使eIF-2的 $\alpha$ 亚基51位丝氨酸磷酸化. 异源二聚体的eIF-2能够结合GTP和tRNA, 形成三元复合物. 该复合物与40S核糖体亚单位结合形成一个43S的复合物<sup>[11]</sup>. 43S的聚合物参与识别mRNA起始密码子, 结合60S核糖体亚单位同时伴随GTP的水解转变为GDP. 在下一个同样的循环开始前, 与eIF-2结合的GDP在eIF-2B催化作用下由GTP替代. eIF-2 $\alpha$ 亚基51位丝氨酸磷酸化将大大提高GDP对eIF-2的亲水性, 使GDP与GTP的交换受到阻滞. 虽然eIF-2-GDP与eIF-2B能够形成稳定复合物, 但由于在细胞中eIF-2的含量远远高于eIF-2B, 因此比例较少的eIF-2磷酸化即可阻断细胞中eIF-2B的催化作用. PKR催化eIF-2 $\alpha$ 51位丝氨酸磷酸化, 改变eIF2功能, 阻止eIF2B发挥作用, 从而降低eIF2-GTP的水平, 使蛋白合成和病毒复制水平下降<sup>[12-15]</sup>.

最近研究还发现在肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、dsRNA、病毒感染等刺激下, 激活的PKR可以诱发凋亡. 这一发现提示PKR除了阻断病毒蛋白合成外, 还可以通过诱发凋亡发挥抗病毒作用. PKR诱发凋亡机制与其磷酸化eIF-2 $\alpha$ 、激活NF- $\kappa$ B和p53有关<sup>[16-18]</sup>. 实验发现: 表达51 aa发生丝氨酸 $\rightarrow$ 丙氨酸替换的eIF-2 $\alpha$ 变异体的NIH3T3细胞可以抵抗血清缺失和肿瘤坏死因子- $\alpha$ 诱导的凋亡<sup>[19]</sup>; 在HeLa细胞中同样变异体的表达亦可保护细胞由PKR大量表达诱发的凋亡<sup>[20]</sup>; 51 aa发生丝氨酸 $\rightarrow$ 天冬氨酸替换的eIF-2 $\alpha$ 变异体功能与磷酸化eIF-2 $\alpha$ 相似, 表达该变异体的COS-1细胞可以诱导凋亡发生<sup>[21]</sup>. 这些研究结果显示eIF-2 $\alpha$ 可以直接诱发凋亡产生. 机制可能与磷酸化eIF-2 $\alpha$ 诱导一些与凋亡相关的mRNA优先表达相应蛋白有关, 这与酿酒酵母氨基酸缺乏反应相似, Bcl-2家族中的Bax的表达可能与此有关<sup>[22]</sup>. 此外, PKR还可以激活与炎症、凋亡密切相关的NF- $\kappa$ B、p53及IRF1. NF- $\kappa$ B异源二聚体与I $\kappa$ B结合时处于无活性状态, 当与激活因子发生反应时, 磷酸化I $\kappa$ B发生遍在蛋白依赖的蛋白酶体降解, 使得NF- $\kappa$ B转位核内. PKR在细胞内促使I $\kappa$ B磷酸化和激活NF- $\kappa$ B, 目前认为是通过直接磷酸化I $\kappa$ B磷酸激酶复合物而发挥作用, 缺乏PKR的细胞不能对dsRNA产生抑制<sup>[23-25]</sup>.

PKR可以激活p53, 具体机制尚不明确, PKR磷酸化p53蛋白392位丝氨酸可能与其调节p53功能有关, 在缺乏PKR的细胞p53的功能受到损伤.

### 2 PKR与丙型肝炎的关系

在病毒感染机体的过程中, 病毒常常发生变异抵抗

PKR 介导的抗病毒机制, 主要表现为以下几种方式: (1)产生拮抗 dsRNA 的 RNA 或蛋白, 阻止 PKR 的活性; (2)产生 dsRNA 结合蛋白, 隔离与 PKR 结合; (3)产生蛋白阻止 PKR 二聚体化; (4)产生蛋白干扰 PKR 与 eIF2 的结合; (5)激活磷酸酶使 PKR 和 eIF2 去磷酸化; (6)阻止 PKR 的表达或诱导 PKR 降解<sup>[26-28]</sup>.

丙型肝炎病毒(HCV)属黄病毒属家族, 可引起机体的持续性感染, 导致慢性肝炎和肝硬化, 并与肝细胞癌、淋巴细胞增生紊乱密切相关. 目前惟一有效的治疗途径是运用干扰素, 但是大多数患者对治疗无明显反应<sup>[29-31]</sup>. 其中病毒发生变异逃避 PKR 抗病毒作用, 是其抵抗干扰素治疗的主要机制之一. NS5A 和 E2 两种蛋白参与调节机体对 dsRNA 的反应, 研究表明这两种蛋白能够与 PKR 结合, 并阻止其发挥抗病毒作用. 同时分子流行病学研究发现 NS5A 或 E2 序列, 特别是与 PKR 结合的区域, 与病毒的持续感染、对干扰素治疗的反应有紧密的联系<sup>[32]</sup>. 这些发现表明病毒的持续感染机制之一, 可能与 NS5A 和 E2 阻止激活的 PKR 引发的抗病毒作用有关. E2 是病毒的包膜蛋白, 参与病毒与靶细胞的结合, 在丙肝病毒不同株之间 E2 具有高变的特点, Taylor et al<sup>[33]</sup>研究 E2 在干扰素抵抗中的作用发现, 来自不同病毒分离株 E2 均含有一个 12 氨基酸的序列, 该序列与 PKR 自磷酸化位点、eIF2 磷酸化位点相似, 该序列在不同株之间高度保守. 实验证实 PKR 与 E2 能够在体外结合, 体内、外实验均证实 E2 可以阻断 PKR 的活性; Pflugheber et al<sup>[34]</sup>构建包含 HCV 复制子的 Huh7 细胞系, 将其中一个命名为 10A, 包含的病毒复制子编码氨基酸(aa)序列中于 2 040 位插入赖氨酸, 该位点靠近的氨基末端; 另一个命名为 H27, 包含的病毒复制子于 2 198 位发生亮氨酸(L)与丝氨酸(S)的替换, 该位点邻近 PKR 结合区域; 细胞培养结果表明 10A 复制水平超过 H27 的 5 倍. 为了进一步明确病毒复制水平与 NS5A、PKR 之间的关系, Pflugheber et al 利用免疫共沉淀技术发现与 Huh7 细胞相比, H27 细胞产生的 PKR 水平升高显著; 当在这两种细胞系中加入 dsRNA 后, PKR 的活性明显升高; 而在 10A 细胞系中 PKR 呈现出低度的活性, 对 dsRNA 刺激无明显反应, 当加入 NS5A 抗体后 PKR 活性恢复. PKR 与 NS5A 在 10A 细胞中的亚细胞定位相互重叠, 而在 H27 细胞中却无此现象出现. 由此研究者认为由 10A 细胞病毒复制子编码的 NS5A 能够与 PKR 结合并且抑制其活性. 同时研究者也注意到在两种不同的病毒复制子中都包含有 64 个 aa 组成的 PKR 结合域, 但发生 L2198S 替换或其他紧邻 PKR 结合区域的 aa 替换, 可能会改变 NS5A 对 PKR 结合、调节.

PKR 的激活在不同的病毒、不同的宿主之间将产生截然不同的结果. 进一步对 PKR 作用机制及其信号传导通路的研究, 明确其抗病毒的具体机制, 为发展新的治疗策略提供新的方向.

### 3 参考文献

- 1 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因区结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 2 Krishna M, Kirk AS, Zhu SH, Wek RC. Inhibitory sequences in the N-terminus of the double-stranded-RNA-dependent protein kinase, PKR, are important for regulating phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2a (eIF2a). *Eur J Biochem* 2001;268:1143-1153
- 3 Polyak SJ, Tang N, Wambach M, Barber GN, Katze MG. The P58 Cellular Inhibitor Complexes with the Interferon-induced, Double-stranded RNA-dependent Protein Kinase, PKR, to Regulate Its Autophosphorylation and Activity. *J Biol Chem* 1996;271:1702-1707
- 4 James MC, Jeffreyl IW, Puijn GJ, Thijssen JP, Clemens MJ. Translational control by the La antigen Structure requirements for rescue of the double-stranded RNA-mediated inhibition of protein synthesis. *Eur J Biochem* 1999;266:151-162
- 5 Jiménez-García LF, Green SR, Mathews MB, Spector DL. Organization of the double-stranded RNA-activated protein kinase DAI and virus-associated VA RNAI in adenovirus-2-infected HeLa cells. *J Cell Sci* 1993;106:11-22
- 6 Vuyisich M, Spangord RJ, Beal PA. The binding site of the RNA-dependent protein kinase (PKR) on EBER1 RNA from Epstein-Barr virus. *EMBO Rep* 2002;3:622-627
- 7 Li S, Koromilas AE. Dominant negative function by an alternatively spliced form of the interferon-inducible protein kinase PKR. *J Biol Chem* 2001;276:13881-13890
- 8 Wong AH, Durbin JE, Li S, Dever TE, Decker T, Koromilas AE. Enhanced antiviral and antiproliferative properties of a STAT1 mutant unable to interact with the protein kinase PKR. *J Biol Chem* 2001;276:13727-13737
- 9 Spangord RJ, Beal PA. Selective binding by the RNA binding domain of PKR revealed by affinity cleavage. *Biochemistry* 2001;40:4272-4280
- 10 Tian B, Mathews MB. Functional characterization of and co-operation between the double-stranded RNA-binding motifs of the protein kinase PKR. *J Biol Chem* 2001;276:9936-9944
- 11 Baltzis D, Li S, Koromilas AE. Functional characterization of pkr gene products expressed in cells from mice with a targeted deletion of the N terminus or C terminus domain of PKR. *J Biol Chem* 2002;277:38364-38372
- 12 Ryman KD, White LJ, Johnston RE, Klimstra WB. Effects of PKR/RNase L-dependent and alternative antiviral pathways on alphavirus replication and pathogenesis. *Viral Immunol* 2002;15:53-76
- 13 Ben-Asouli Y, Banai Y, Pel-Or Y, Shir A, Kaempfer R. Human interferon-gamma mRNA autoregulates its translation through a pseudoknot that activates the interferon-inducible protein kinase PKR. *Cell* 2002;108:221-232
- 14 Vatter KM, Staschke KA, Wek RC. Mechanism of activation of the double-stranded-RNA-dependent protein kinase, PKR: role of dimerization and cellular localization in the stimulation of PKR phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 (eIF2). *Eur J Biochem* 2001;268:3674-3684
- 15 Vatter KM, Staschke KA, Zhu S, Wek RC. Inhibitory sequences in the N-terminus of the double-stranded-RNA-dependent protein kinase, PKR, are important for regulating phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2alpha (eIF2alpha). *Eur J Biochem* 2001;268:1143-1153
- 16 Zhang F, Romano PR, Nagamura-Inoue T, Tian B, Dever TE, Mathews MB, Ozato K, Hinnebusch AG. Binding of double-stranded RNA to protein kinase PKR is required for dimerization and promotes critical autophosphorylation events in the activation loop. *J Biol Chem* 2001;276:24946-24958
- 17 Gil J, Rullas J, Garcia MA, Alcamí J, Esteban M. The catalytic activity of dsRNA-dependent protein kinase, PKR, is required for NF-kappaB activation. *Oncogene* 2001;20:385-394
- 18 Ishii T, Kwon H, Hiscott J, Mosialos G, Koromilas AE. Activation of the I kappa B alpha kinase (IKK) complex by double-stranded RNA-binding defective and catalytic inactive mutants of the interferon-inducible protein kinase PKR. *Oncogene* 2001;20:1900-1912
- 19 Souquere-Besse S, Pichard E, Filhol O, Legrand V, Rosal-Calatrava M, Hovanessian AG, Cochet C, Puvion-Dutilleul F. Adenovirus infection targets the cellular protein kinase CK2

- and RNA-activated protein kinase (PKR) into viral inclusions of the cell nucleus. *Microsc Res Tech* 2002;56:465-478
- 21 Gil J, Rullas J, Alcamí J, Esteban M. MC159L protein from the poxvirus molluscum contagiosum virus inhibits NF-kappaB activation and apoptosis induced by PKR. *J Gen Virol* 2001; 82:3027-3034
  - 22 Saelens X, Kalai M, Vandenabeele P. Translation inhibition in apoptosis: caspase-dependent PKR activation and eIF2-alpha phosphorylation. *J Biol Chem* 2001;276:41620-41628
  - 23 Ung TL, Cao C, Lu J, Ozato K, Dever TE. Heterologous dimerization domains functionally substitute for the double-stranded RNA binding domains of the kinase PKR. *EMBO J* 2001;20:3728-3737
  - 24 Bonnet MC, Weil R, Dam E, Hovanessian AG, Meurs EF. PKR stimulates NF-kappaB irrespective of its kinase function by interacting with the IkappaB kinase complex. *Mol Cell Biol* 2000;20:4532-4542
  - 25 Gil J, Alcamí J, Esteban M. Activation of NF-kappa B by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR involves the I kappa B kinase complex. *Oncogene* 2000;19:1369-1378
  - 26 Francois C, Duverlie G, Rebouillat D, Khorsi H, Castelain S, Blum HE, Gatignon A, Wychowski C, Moradpour D, Meurs EF. Expression of hepatitis C virus proteins interferes with the antiviral action of interferon independently of PKR-mediated control of protein synthesis. *J Virol* 2000;74:5587-5596
  - 27 Langland JO, Jacobs BL. The role of the PKR-inhibitory genes, E3L and K3L, in determining vaccinia virus host range. *Virology* 2002;299:133-141
  - 28 Ward SV, Samuel CE. Regulation of the interferon-inducible PKR kinase gene: the KCS element is a constitutive promoter element that functions in concert with the interferon-stimulated response element. *Virology* 2002;296:136-146
  - 29 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因区结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
  - 30 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
  - 31 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒 NS2 基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132
  - 32 Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285:107-110
  - 33 Taylor DR, Tian B, Romano PR, Hinnebusch AG, Lai MM, Mathews MB. Hepatitis C virus envelope protein E2 does not inhibit PKR by simple competition with autophosphorylation sites in the RNA-binding domain. *J Virol* 2001;75:1265-1273
  - 34 Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter R Jr, Wang CF, Ware F, Sodora DL, Gale M Jr. Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc. Natl Acad Sci U S A* 2002;99:4650-4655

## TATA盒结合蛋白与肝炎病毒的关系

王春花, 成军, 郎振为, 刘妍, 王建军, 纪冬, 党晓燕

王春花, 成军, 刘妍, 王建军, 纪冬, 党晓燕, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

郎振为, 首都医科大学佑安医院病理科 北京市 100054  
国家自然科学基金项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目 No.98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-24 接受日期: 2003-07-16

王春花, 成军, 郎振为, 刘妍, 王建军, 纪冬, 党晓燕. TATA盒结合蛋白与肝炎病毒的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(1):151-155

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/151.asp>

### 0 引言

病毒性肝炎流行范围非常广泛, 就我国而言, 其发病率之高, 危害性之大, 堪称传染病之魁首. 以乙型肝炎为例, 全球约有3.5亿慢性病毒携带者, 其中至少20-30%患有不同程度的肝脏损害. 我国人群中乙型肝炎病毒(HBV)的感染率高达60%, 其中约1.2亿为HBsAg携带者. 此外, 慢性HBV和丙型肝炎病毒(HCV)也是引起肝硬化和肝细胞癌(HCC)的重要原因, 对人类健康造成极大危害, 至今缺乏有效的控制. 肝炎病毒在肝细胞中的长期存在、复制、扩散是肝炎病毒慢性感染的关键, 这两种病毒在体内感染的分子生物学机制一直是研究者们关注的重点, 许多研究越来越显示TATA盒结合蛋白(TBP, TATA box binding protein)与其关系密切, 本文简要介绍近年来在这方面的研究进展.

### 1 TATA结合蛋白的结构和功能

在细胞和生物体生长、分泌、细胞系定向等过程中, 基因表达的转录水平调控是非常重要的一个环节. 过去10a中, 对细胞特异性的转录因子与特定基因调节区(如启动子和/或增强子)的DNA元件(或称反应元件)结合, 抑制或刺激转录起始的研究, 取得了重大进展. 例如由DNA聚合Ⅱ酶转录的基因, 由数个转录因子组成一个转录复合体, 其基本成分包括TBP和TBP相关因子(TBP-associated factor, TAF), 必需经聚合酶Ⅱ正确定位于特定的DNA后方能启动转录. 有趣的是, 有些转录因子能直接与TBP作用, 刺激或抑制基因的转录.

1.1 TATA盒子 启动子是一段特定的直接与RNA聚合酶及其转录因子相结合、决定基因转录起始与否的DNA序列. 不同的启动子对RNA聚合酶的亲和力不同, 所结合的反式作用因子(trans-acting factors)也不同, 因此, 基因转录活性也很不相同. 真核生物有3类RNA聚合酶, 负责转录3类不同的启动子. (1)由RNA聚合酶Ⅰ负责转录的rRNA基因, 启动子(I类)比较单一, 由转录起始位点附近的两部分序列构成. (2)由RNA聚合酶Ⅲ负责转录的是5S rRNA、tRNA和某些核内小分子RNA(snRNA), 其启动子(Ⅲ类)组成较复杂, 又可被分为三个亚类. 5S rRNA和tRNA基因的启动子是内部启动子(internal promoter), 位于转录起始位点的下游, 都由两部分组成. 第三亚类启动子由三个部分组成, 位于转录起始位点上游. (3)由RNA聚合酶Ⅱ负责转录的Ⅱ类基因包括所有蛋白质编码基因和部分snRNA基因, 后者的启动子结构与Ⅲ类基因启动子中的第三种类型相似, 编码蛋白质的Ⅱ类基因启动子在结构上有共同的保守序列. 以RNA聚合酶Ⅱ的启动子结构为例, 人们

比较了上百个真核生物 RNA 聚合酶 II 的启动子核苷酸序列后发现; 在 -25/-30 区有 TATA 盒, 又称为 Hogness 盒或 Goldberg-Hogness 盒. 其一致序列为 T28A97A93A85A63T37A83A50T37, 基本上都由 A、T 碱基所组成, 其与转录起始点一起组成核心启动子元件, 是 RNA 聚合酶起始转录所必需的最小的 DNA 序列, 核心元件单独起作用时只能确定转录起始位点和产生基础水平的转录. 离体转录实验也表明, TATA 盒决定了转录起点的选择, 天然缺少 TATA 盒则可能从多个位点开始转录.

**1.2 TATA 结合蛋白** TATA 结合蛋白是与 RNA 聚合酶 II 共同组成转录起始复合物, 存在于所有真核细胞中的一种普遍转录因子<sup>[1-4]</sup>. 以反式作用影响转录的因子可统称为转录因子(transcription factors, TF). 在真核细胞中 RNA 聚合酶通常不能单独发挥转录作用, 而需要与其他转录因子共同协作. 与 RNA 聚合酶 I、II、III 相应的转录因子分别称为 TF I、TF II、TF III, 对 TF II 研究最多. 以前认为与 TATA 盒结合的蛋白因子是 TF II - D, 后来发现 TF II - D 实际包括两类成分: 与 TATA 盒结合的蛋白是 TBP, 是唯一能识别 TATA 盒并与其结合的转录因子, 是三种 RNA 聚合酶转录时都需要的; 其他称为 TBP 相关因子 TAF, 至少包括 8 种能与 TBP 紧密结合的因子. 转录前先是 TF II - D 与 TATA 盒结合; 继而 TF II - B 以其 C 端与 TBP-DNA 复合体结合, 其 N 端则能与 RNA 聚合酶 II 亲和结合; 接着由两个亚基组成的 TF II - F 加入装配, TF II - F 不仅能与 RNA 聚合酶形成复合体, 还具有依赖于 ATP 供给能量的 DNA 解旋酶活性, 能解开前方的 DNA 双螺旋, 在转录链延伸中起作用. 这样, 启动子序列就与 TF II - D、B、F 及 RNA 聚合酶 II 结合形成一个有转录功能基础的“最低限度”转录前起始复合物(pre-initiation complex, PIC), 转录 mRNA. TF II - H 是多亚基蛋白复合体, 具有依赖于 ATP 供给能量的 DNA 解旋酶活性, 在转录链延伸中发挥作用; TF II - E 是两个亚基组成的四聚体, 而可能与 TF II - B 联系不直接与 DNA 结合, 能提高 ATP 酶的活性; TF II - E 和 TF II - H 的加入就形成了完整的转录复合体, 能转录延伸生成链 RNA. TF II - A 能稳定 TF II - D 与 TATA 盒的结合, 提高转录效率; 但不是转录复合体一定需要的.

可见任何与细胞内 TBP 作用的因素都可间接作用于 TATA 盒子, 从而影响整个细胞内基因活动. 目前所知 TBP 至少参与构成了三种不同的蛋白复合体, SL1、TF II D、TF III B, 其通过与不同的 TBP 相关因子结合, 在 RNA 聚合酶 I、II、III 启动子转录中各自发挥特殊的作用<sup>[2]</sup>. TBP 复合物通过 TBP 直接与 DNA 相互作用, 直接募集到含有 TATA 元件的启动子上, 否则在缺少 TATA 元件的启动子, 是 TBP 通过蛋白与蛋白的相互作用而聚集的. Wang et al<sup>[5]</sup>报道细胞内 TBP 含量增多能增强昆虫和哺乳动物细胞依赖 RNA 聚合酶 I 的核糖体 DNA 启动子. 对 RNA 聚合酶 II 依赖的启动子, TBP 的过

量表达会因启动子的结构不同而有不同的调控作用: 在果蝇细胞中 TBP 的过量表达均能不同程度地促进含有 TATA 元件启动子, 并且是限速步骤, 而对缺少 TATA 元件的启动子起抑制作用或没有影响<sup>[6]</sup>. 在哺乳动物中, TBP 既能增强某些转录激活因子的作用, 例如病毒蛋白 16 (VP16), 也能起抑制作用, 例如 Sp1 或 NF-1<sup>[7]</sup>. 对 RNA 聚合酶 III 依赖的启动子, TBP 的过量表达能充分诱导其活性<sup>[8-9]</sup>. TBP 与 3 种 RNA 聚合酶关系密切, 而肝炎病毒在体内的转录翻译都离不开 RNA 聚合酶, 受此启发在这方面已有大量的研究, 许多证据支持肝炎病毒直接或间接与 TBP 作用, 从而调控基因表达<sup>[10-15]</sup>.

## 2 TBP 与乙型肝炎病毒的关系

HBV 为含有一段单股区的双链环状 DNA 病毒, 属嗜肝 DNA 病毒科, 其基因组结构紧密, 可分为结构基因序列和调节基因序列两部分, 二者可具有相互重叠的特点. HBV 基因的负链核苷酸序列中, 至少有 4 个开放读码框(open reading frame, ORF), 包括编码外膜蛋白的 S 基因区, 编码核衣壳蛋白的 C 基因区, 编码聚合酶的 P 基因区和调节病毒基因转录水平的 X 基因区, 4 种 ORF 分别有各自的启动子<sup>[16]</sup>.

HBV pX 是存在于哺乳动物肝 DNA 病毒的一种转录激活因子. X 开放读码框架是 HBV DNA 中最小的一个开放读框, 编码 145-154 个氨基酸残基的 HBxAg 蛋白<sup>[17]</sup>. X 蛋白的功能一直是研究关注的焦点, 被认为具有广泛的反式激活作用, 能激活多种病毒及细胞基因调控子, 是 HBV 致原发性肝细胞癌(PHC)的主要原因之一. 在动物宿主中 X 蛋白对于病毒的复制是必需的<sup>[18-19]</sup>, 其表达与病毒复制密切相关<sup>[20]</sup>, 而 TBP 作为一种功能明确的普遍转录因子, 很多证据表明其与 X 蛋白关系密切.

Wang et al<sup>[9]</sup>曾经报道在哺乳动物和昆虫细胞内 HBV X 蛋白的表达能增加细胞内 TBP 水平. 由于 X 蛋白已被证实是一种功能复杂的反式转录因子, 其引起的 TBP 含量升高可能有助于 X 蛋白作用于大量各种各样的病毒和细胞的启动子. Trivedi et al<sup>[8]</sup>已发现 Pol III 依赖的三类启动子均可受到升高的 TBP 的刺激, 无论是原发的 TBP 升高还是继发的由 X 蛋白<sup>[9]</sup>或佛波醇酯激活蛋白激酶 C<sup>[21]</sup>引起的. 有资料表明这是由于这些启动子上功能性的包含 TBP 的 TF III B 复合物增多所致<sup>[8-9]</sup>. Aufiero et al<sup>[22]</sup>在 1990 年就提出 pX 能反式激活 RNA 聚合酶 III 依赖的启动子. 其认为 X 蛋白的一个新的特性是 III 类基因的强效转录反式激活因子. 在 X 基因瞬时转染并稳定整合其内的肝细胞中, RNA 聚合酶 III (Pol III) 转录启动的频率提高 20-40 倍, 并且 Pol III 转录起始复合物形成的速率加快. 由于转录因子 TFIIIC 限速 Pol III 转录起始复合物, 认为 TFIIIC 很可能是 X 蛋白的靶位. Wang et al<sup>[5]</sup>也报道 X 蛋白依赖的 TBP 升高, 能增强昆虫和哺乳动物细胞依赖 Pol I 的核糖体 DNA 启动子活性. 目前的研究认为 TBP 的过量表达加强了依赖 RNA 聚合酶 I 和



Ⅲ的启动子活性,而对RNA聚合酶Ⅱ依赖的启动子,如前所述TBP的过量表达会因启动子的结构不同而有不同的调控作用。

X蛋白已被广泛证实是一种转录激活因子,现有资料认为基于其亚细胞定位而明显不同的两种机制分别调控基因活性<sup>[23]</sup>。许多X蛋白响应性的依赖Pol Ⅱ的启动子,包含AP-1和NF- $\kappa$ B位点者,都可被X蛋白诱导调控,此作用是通过Ras-Raf-MEK(MAP kinase kinase)-MAP(Mitogen-activated protein)激酶途径和Jun末端激酶途径完成的<sup>[24-26]</sup>。Wang et al<sup>[5, 27]</sup>在1997年和1998年也先后揭示了X蛋白介导TBP增多及其诱导RNA聚合酶Ⅰ、Ⅲ启动子都依赖于Ras信号途径的激活。这些功能是X蛋白定位于细胞质中完成的<sup>[24]</sup>。然而,有证据同样支持X蛋白可直接与核内的某些转录元件相互作用,作为一种转录共激活因子诱导特定细胞内启动子。

Qadri et al<sup>[28]</sup>研究发现HBx蛋白(pX)在体外直接特定结合到普遍转录因子TBP,阐明了通过与其相互作用pX调节转录调控机制的基本原理,该结论有助于解释pX对细胞内多种启动子反式激活的复杂行为。并发现当TBP羧基端高度保守区域截断后就失去了结合能力,而氨基端缺失未有影响;缺失体分析显示TBP羧基端高度保守的含有71个氨基酸的区域对其与pX相互作用必不可少。pX与TBP作用的最小结合域包括110-143氨基酸。不同种的TBP包括酵母属、果蝇属、块茎茄属(土豆)均与pX结合。ATP非水解类似物能抑制TBP-pX相互作用,暗示其结合需ATP参与。

Wang et al<sup>[5, 27]</sup>研究已证明在表达HBV X蛋白的细胞中通过Ras信号途径的激活,引起普遍转录因子TBP明显增多,此作用是通过增强RNA聚合酶Ⅰ、Ⅲ依赖的启动子活性而实现的。为进一步探讨调控TBP的作用机制是否在转录水平上,Johnson et al<sup>[29]</sup>设计了核连续分析(nuclear run-on assays)揭示X蛋白能增加TBP基因转录激活复合物的数量;对转化和原代肝细胞瞬时转染分析,发现X蛋白的表达能通过激活Ras信号途径诱导TBP基因启动子,此机制同时还需要Raf鸟嘌呤核苷酸分裂刺激因子(RaIGDS)和Raf信号参与;受此启发继续研究了在原代鼠肝细胞中调控TBP基因启动子的由Ras介导的下游信号途径。通过对最具代表性的Ras效应器,RaIGDS、Raf和3-磷酸肌醇激酶(PI-3 kinase)的研究发现,RaIGDS、Raf任一激活都能充分诱导TBP启动子活性,除PI-3激酶外并需要MEK的活化。另外,明显不同于Ras激活途径,且不需MEK的另一激活途径,似乎也能诱导TBP启动子活性。通过对TBP启动子转录调控必需区的DNA序列分析得到三块不同的结构域,他们通过调控RaIGDS、Raf和依赖Ras不依赖MEK的3种激活途径而调节TBP启动子活性。Johnson et al<sup>[29]</sup>的结论提供了新的证据,即TBP能在转录水平被调控,并鉴定出3条由Ras介导激活的调控真核细胞调控普遍转录因子的途径。

### 3 TBP与丙型肝炎病毒的关系

丙型肝炎病毒(HCV)是正链RNA病毒,是慢性肝炎、肝纤维化、肝癌的病因<sup>[30]</sup>。HCV直接与黄病毒属中的黄病毒和瘟病毒相关,由10 kb基因组构成,含一个大的开放读码区,编码3 010-3 033氨基酸多聚蛋白前体和5'-与3'-末端非译码区。HCV基因组的结构是从5'-非编码区,3-4个结构蛋白(C、E1、E2/p7),6个非结构蛋白(NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B)和3'-非译码区。

P53是肿瘤抑制因子,P53蛋白直接诱导基因的表达并参与细胞周期的调节。肝炎病毒编码的蛋白也作用于肝细胞,引起肝脏的损害。肝炎病毒与P53互相作用,导致肝细胞病变,特别是肿瘤的发生。P53不论是野生型还是突变型,都可以影响转录,其与TBP关系密切认为是可能的转录调控机制之一。Martin et al<sup>[31]</sup>报道从人和酵母克隆的TBP都能与人的P53相互作用。当与P53特异的单克隆抗体和蛋白A-琼脂糖共孵育时,TBP与野生型或突变型的P53均出现免疫共沉淀反应。野生型鼠P53也能与人TBP相互作用。蛋白印迹分析表明P53和TBP相互作用是直接的。通过凝胶滞留分析发现TBP和野生型或突变型P53的复合物都能结合到TATA盒子上。Chang et al<sup>[32]</sup>通过缺失体分析显示P53的转录激活域(transcriptional activation domain, TAD)能被分为两个亚单位,分别为1-40和43-73个氨基酸。体外谷胱甘肽S转移酶(GST)Pull-down分析在P53 TAD介导的体内反式激活和体外P53 TAD与TBP结合活性之间建立了线性相关。其研究暗示对于P53 TAD而言至少TBP是其中一种直接靶体。P53 TAD与TBP(TF Ⅱ D)结合度是一项控制P53 TAD活性的重要参数。Chen et al<sup>[33]</sup>也证实P53既能与TBP也能与部分纯化的TF Ⅱ D协作结合到含有特定P53结合位点和TATA盒的DNA片段中,并认为更稳定的P53-TF Ⅱ D(TBP)启动子复合物的形成可能是P53激活转录的机制。

由此不难看出,凡能与P53相互作用的因素都会间接通过TBP而调控基因的表达。病毒蛋白的功能,有的抑制P53功能<sup>[34-39]</sup>,有的增强其功能<sup>[40-45]</sup>。目前的研究发现倾向于HCV编码蛋白多间接或直接通过与P53相互作用而调节普遍转录因子TBP。如HCV编码非结构蛋白5A(NS5A),是一个56-58 kD磷酸蛋白,产生于病毒多聚蛋白过程。Qadri et al<sup>[46]</sup>在研究中阐明了NS5A的功能特性。体内免疫共沉淀提示NS5A与TATA结合蛋白和P53形成异源复合物。TBP和P53突变证实与NS5A结合减少。确定功能关系的相关性发现,在体内NS5A抑制P53和TBP结合到DNA一致的结合序列。在HCT116P53(+/-)细胞系,NS5A也抑制P53-TBP和P53切除修复交叉互补因子3(ERCC3)蛋白与蛋白复合物构成,而且NS5A抑制P53调节p21(WAF1)启动子和抑制合成启动子(含多个P53反应DNA元件结合位点)。总之,NS5A通过与P53和TBP功能关系影响细胞的关键过程。这是解

释NS5A能产生影响细胞基因表达和细胞生长调节机制之一。Otsuka et al<sup>[47]</sup>研究 HCV 蛋白是否影响 P53 功能,提示非结构蛋白抑制P53功能,而核心蛋白增加P53 DNA 结合亲和力和转录能力而增强 P53 功能。Otsuka et al<sup>[47]</sup>发现在 HCV 的7种蛋白中(核心、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B),只有核心蛋白增强了 P53 转录活性和 p21 (waf1) 蛋白表达,他可能是 P53 主要靶基因。电泳泳动度迁移率分析(EMSA)认为核心蛋白既增强 P53 结合 DNA 的亲和力又提高了 P53 自身转录能力。在 GST 融合蛋白结合分析中发现核心蛋白与 P53 的羧基端相互作用。另外,核心蛋白也能与 hTAF(II)28 组成体内外的转录因子复合物的一种元件。这些结果表明 HCV 核心蛋白在 HCV 感染期间与 P53 相互作用并能调节依赖 P53 的启动子活性。

TBP 是体内一种重要的普遍转录因子,肝炎病毒可以直接与其相互作用,或者通过信号转导途径,借助其他转录因子等机制间接与 TBP 相互作用,此为肝炎病毒感染宿主细胞,复制扩散和致病的重要机制之一。但是,肝炎病毒和 TBP 的关系还没有完全阐明,还需要进一步研究。

#### 4 参考文献

- Cormack BP, Struhl K. The TATA-binding protein is required for transcription by all three nuclear RNA polymerases in yeast cells. *Cell* 1992;69:685-696
- Hernandez N. TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev* 1993;7:1291-1308
- Schultz MC, Reeder RH, Hahn S. Variants of the TATA binding protein can distinguish subsets of RNA polymerase I, II, and III. *Cell* 1992;69:697-702
- Struhl K. Duality of TBP, the universal transcription factor. *Science* 1994;263:1103-1105
- Wang HD, Trivedi A, Johnson DL. Regulation of RNA polymerase I-dependent promoters by the hepatitis B virus X protein via activated Ras and TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* 1998;18:7086-7094
- Colgan J, Manley JL. TFIID can be rate limiting in vivo for TATA-containing, but not TATA-lacking, RNA pol II promoters. *Genes Dev* 1992;6:304-315
- Sadovsky Y, Webb P, Lopez G, Baxter JD, Fitzpatrick PM, Gizang-Ginsberg E, Cavailles V, Parker MG, Kushner PJ. Transcriptional activators differ in their responses to overexpression of TATA-box-binding protein. *Mol Cell Biol* 1995;15:1554-1563
- Trivedi A, Vilalta A, Gopalan S, Johnson DL. TATA-binding protein is limiting for both TATA-containing and TATA-lacking RNA polymerase III promoters in *Drosophila* cells. *Mol Cell Biol* 1996;16:6909-6916
- Wang HD, Yuh CH, Dang CV, Johnson DL. The hepatitis B virus increases the cellular level of TATA-binding protein which mediates transactivation of RNA polymerase III genes. *Mol Cell Biol* 1995;15:6720-6728
- Feitelson MA, Zhu M, Duan LX, London WT. Hepatitis Bx antigen and P53 are associated in vitro and in liver tissue from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1993;8:1109-1117
- Haviv I, Matza Y, Shaul Y. pX, the HBV-encoded activator, suppresses the phenotypes of TBP and TAFII250 mutants. *Genes Dev* 1998;12:1217-1226
- Haviv I, Vaizel D, Shaul Y. The X protein of hepatitis B virus coactivates potent activation domains. *Mol Cell Biol* 1995;15:1079-1085
- Huang J, Kwong J, Sun ECY, Liang TJ. Proteasome complex as a potential cellular target of hepatitis B virus X protein. *J Virol* 1996;70:5582-5591
- Lee TH, Elledge SJ, Butel JS. Hepatitis B virus X protein interacts with a probable cellular DNA repair protein. *J Virol* 1995;69:1107-1114
- Wang XW, Forrester K, Yeh H, Feitelson MA, Gu JR, Harris CC. Hepatitis B virus X protein inhibits P53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2230-2234
- 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1997:25-42
- 成军, 董菁. 乙型肝炎病毒前基因组启动子的调节机制. 国外医学·流行病学传染病学分册 2002;29:15-18
- Chen HS, Kaneko S, Girones R, Anderson RW, Hornbuckle WE, Tennant BC, Cote PJ, Gerin JL, Purcell RH, Miller RH. The woodchuck hepatitis B virus X gene is important for the establishment of virus infection in woodchucks. *J Virol* 1993;67:1218-1226
- Zoulm F, Saputelli J, Seeger C. Woodchuck hepatitis B virus X protein is required for viral infection *in vivo*. *J Virol* 1994;68:2026-2030
- Dandri M, Schirmacher P, Rogler CE. Woodchuck hepatitis virus X protein is present in chronically infected woodchuck liver and woodchuck hepatocellular carcinomas which are permissive for viral replication. *J Virol* 1996;70:5246-5254
- Garber ME, Vilalta A, Johnson DL. Induction of *Drosophila* RNA polymerase III gene expression by the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) is mediated by transcription factor IIIB. *Mol Cell Biol* 1994;14:339-347
- Aufiero B, Schneider RJ. The hepatitis B virus X gene product transactivates both RNA polymerase II and III promoters. *EMBO J* 1990;9:497-504
- Doria M, Klein N, Lucito R, Schneider RJ. The hepatitis B virus Hbx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of Ras and nuclear activator of transcription factors. *EMBO J* 1995;14:4747-4757
- Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10350-10354
- Benn J, Su F, Doria M, Schneider RJ. Hepatitis B virus Hbx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-related and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Virol* 1996;70:4978-4985
- Natoli G, Avantiaggiati ML, Chirillo P, Puri PL, Ianni A, Balsano C, Levrero M. Ras-and Raf-dependent activation of c-Jun transcriptional activity by the hepatitis B virus transactivator pX. *Oncogene* 1994;9:2837-2843
- Wang HD, Trivedi A, Johnson DL. Hepatitis B virus X protein induces RNA polymerase III-dependent gene transcription and increases cellular TATA-binding protein by activating the Ras signaling pathway. *Mol Cell Biol* 1997;17:6838-6846
- Qadri I, Maguire HF, Siddiqui A. Hepatitis B virus transactivator protein X interacts with the TATA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1003-1007
- Johnson SA, Mandavia N, Wang HD, Johnson DL. Transcriptional regulation of the TATA-binding protein by Ras cellular signaling. *Mol Cell Biol* 2000;20:5000-5009
- Shiratori Y, Shiina S, Imamura M, Kato N, Kanai F, Okudaira T, Teratani T, Tohgo G, Toda N, Ohashi M. Characteristic difference of hepatocellular carcinoma between hepatitis B and C- viral infection in Japan. *Hepatology* 1995;22:1883-1885
- Martin DW, Munoz RM, Subler MA, Deb S. P53 binds to the TATA-binding protein-TATA complex. *J Biol Chem* 1993;268:13062-13067
- Chang J, Kim DH, Lee SW, Choi KY, Sung YC. Transactivation ability of P53 transcriptional activation domain is directly related to the binding affinity to TATA-binding protein. *J Biol Chem* 1995;270:25014-25019
- Chen X, Farmer G, Zhu H, Prywes R, Prives C. Cooperative DNA binding of P53 with TFIID (TBP): a possible mechanism for transcriptional activation. *Genes Dev* 1993;7:1837-1849
- Sheppard HM, Corneillie SI, Espiritu C, Gatti A, Liu X. New insights into the mechanism of inhibition of P53 by simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol* 1999;19:2746-2753

- 35 Prost S, Ford JM, Taylor C, Doig J, Harrison DJ. Hepatitis B x protein inhibits P53-dependent DNA repair in primary mouse hepatocytes. *J Biol Chem* 1998;273:33327-33332
- 36 Pise-Masison CA, Radonovich M, Sakaguchi K, Appella E, Brady JN. Phosphorylation of P53: a novel pathway for P53 inactivation in human T-cell lymphotropic virus type 1-transformed cells. *J Virol* 1998;72:6348-6355
- 37 Pise-Masison CA, Choi KS, Radonovich M, Dittmer J, Kim SJ, Brady JN. Inhibition of P53 transactivation function by the human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax protein. *J Virol* 1998;72:1165-1170
- 38 Chen W, Cooper NR. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 and latent membrane protein independent lytransactivate P53 through induction of NF-kappaB activity. *J Virol* 1996;70:4849-4853
- 39 Murono S, Yoshizaki T, Park CS, Furukawa M. Association of Epstein-Barr virus infection with P53 protein accumulation but not bcl-2 protein in nasopharyngeal carcinoma. *Histopathology* 1999;34:432-438
- 40 Muganda P, Carrasco R, Qian Q. The human cytomegalovirus IE2 86 kDa protein elevates P53 levels and transactivates the P53 promoter in human fibroblasts. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1998;44:321-331
- 41 McCormack SJ, Brazinski SE, Moore JL Jr, Werness BA, Goldstein DJ. Activation of the focal adhesion kinase signal transduction pathway in cervical carcinoma cell lines and human genital epithelial cells immortalized with human papillomavirus type 18. *Oncogene* 1997;15:265-274
- 42 Chirillo P, Pagano S, Natoli G, Puri PL, Burgio VL, Balsano C, Levrero M. The hepatitis B virus X gene induces P53-mediated programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8162-8167
- 43 Megyeri K, Berencsi K, Halazonetis TD, Prendergast GC, Gri G, Plotkin SA, Rovera G, Gonczol E. Involvement of a P53-dependent pathway in rubella virus-induced apoptosis. *Virology* 1999;259:74-84
- 44 Devireddy LR, Jones CJ. Activation of caspases and P53 by bovine herpesvirus 1 infection results in programmed cell death and efficient virus release. *J Virol* 1999;73:3778-3788
- 45 Tsuchihara K, Hijikata M, Fukuda K, Kuroki T, Yamamoto N, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein regulates cell growth and signal transduction pathway transmitting growth stimuli. *Virology* 1999;258:100-107
- 46 Qadri I, Iwahashi M, Simon F. Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and P53, inhibiting their DNA binding and P53 interactions with TBP and ERCC3. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:193-204
- 47 Otsuka M, Kato N, Lan K, Yoshida H, Kato J, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein enhances P53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem* 2000;275:34122-34130

## 乙型和丙型肝炎病毒对 JNK/SAPK 转导途径的影响

王琳, 李克, 成军, 张健, 刘敏

王琳, 李克, 成军, 张健, 刘敏, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-24 接受日期: 2003-07-16

王琳, 李克, 成军, 张健, 刘敏. 乙型和丙型肝炎病毒对 JNK/SAPK 转导途径的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(1):155-158

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/155.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)的感染是世界范围内导致肝细胞癌(HCC)发生的主要危险因素, HCC在慢性病毒携带者中的危险性增加了100倍. 像所有肿瘤的发生一样, 病毒诱导HCC的发生是多步骤过程, 宿主因素作为始动因素增加肝细胞的增生, 随后恶性化. 信号分子在信号转导过程中起到不可缺少的作用, 常成为外源性蛋白的靶作用目标引起细胞正常生理活动的改变, 如有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)系统的干扰往往引起细胞分化、增生、死亡的紊乱. 目前所知MAPK超家族包含三条平行的MAPK级联反应: ERK、JNK/SAPK、P38MAPK途径, 以高度保守的三级激酶级联的形式(MAPKKK-MAPKK-MAPK)转导信号, 他们拥有各自的底物和调节蛋白激酶, 接受不同的信号刺激引起特异的细胞效应, 这些信息流之间的‘交谈’构成信号转导的网络, 使细胞察觉到细胞外环境的变化做出适当的应答. JNK/SAPK信号转导途径主要对毒素、炎性细胞因子、紫外线照射、渗透压等应激信号进行转导, 肝炎病毒蛋白作用于JNK/SAPK可对细胞的分化、增生等产生影响.

## 1 JNK/SAPK 通路的构成

JNK/SAPK最早作为一个新的54 kDa MAPK蛋白从放线酮处理的大鼠肝脏中分离出来, 由三个分隔的基因 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 相互接合产生的8-10种同功型蛋白组成, 存在于人类细胞中的JNK形式为JNK1、JNK2、JNK3(JNK1, 2). 在静止的细胞中, JNK通常定位在细胞质内的微管结构上, 一旦被激活即转位核内发挥激酶活性<sup>[1-3]</sup>. JNK的部分底物已被鉴定: 结合并磷酸化c-JUN第63和73位丝氨酸残基, 活化后的c-JUN与核内蛋白c-FOS异二聚体形成AP-1转录因子复合物, 使得c-FOS获得DNA结合能力, 增加AP-1驱动基因的表达. 其中AP-1启动的目标之一就是c-jun基因本身, 所以c-jun基因的反式激活将引发一个正反馈环<sup>[4]</sup>. JNK的同功型蛋白酶还可以激活另外一些AP-1转录因子家族成员JUNB、JUND、转录因子2(ATF2), 与这些转录因子不同的亲和力可能是产生专一性信号转导的基础. 其他核内靶目标包括三元复合因子ELK-1、血清反应蛋白1a(SAP-1a), 他们的活化可致使c-FOS蛋白表达的激增<sup>[5-6]</sup>. JNK/SAPK具有核转位性质, 但不是所有底物都定位于核内. JNK/SAPK可磷酸化胞质内定位的T细胞活化核因子(NF-AT4和NFATc), 阻碍其核内的转位及激活. 因此, JNK在胞质中很可能作为调节成分影响表达和转录过程<sup>[7]</sup>.

蛋白质的磷酸化和去磷酸化是蛋白质活性调节的一种重要方式, 普遍存在于细胞的信号转导过程中. 像其他MAP激酶一样, JNK的活化也是通过上游激酶的磷酸化来实现的. MAPKK类激酶SEK1(MKK4和MKK7)磷酸化JNK酪氨酸和苏氨酸位点, 因此也称为双特异蛋

白激酶(DSP)<sup>[8]</sup>. DSP本身的激活也依赖于磷酸化作用,主要通过两类丝氨酸/苏氨酸激酶: MEKKs和混合系激酶(MIKs). MLK酶类含有SH3结合域、亮氨酸拉链和小GTP酶结合域,与这些区域的结合, MLKs可以汇集上游多种调节信号到JNK/SAPK通路<sup>[9]</sup>. 最新报道发现MLK3可在体内磷酸化MEK-1,但是MEK的活化并不伴有ERK的激活,而是引起SEK-1-JNK-JUN的级联反应. JNK通路持续不断的激活可导致丝裂原激活的ERK通路信号转导的衰退<sup>[10]</sup>.

在MAPKKK上游参与构成JNK/SPK信号转导途径的信号分子包括Ras相关的Rho小GTP酶家族成员,如Rac1和Cdc42,炎症细胞因子如TNF $\alpha$ ,原癌基因bcr-abl, tpl 2, met, her 2/neu, ret, 和mas,神经酰胺,紫外线、丝裂酶素等.

## 2 JNK/SAPK的生物学功能

JNK参与广泛的生物学过程,包括胚胎发育,细胞凋亡/存活,癌基因表达细胞的转化,血管生成、T细胞激活、B细胞增生、细胞因子的产生和炎症的发生. 值得强调的是JNK在这些系统中的作用依赖于细胞系的类型和相关功能.

**2.1 细胞凋亡/存活** 在神经生长因子(NGF)诱导分化的PC12细胞中, MEKK1的表达可激活JNK/SAPK,并导致ERKs的抑制和细胞的凋亡. 表达c-JUN的显负性突变体封闭JNK/SAPK通路可致存活细胞增多,因此JNK/SAPK被认为介导凋亡事件<sup>[11]</sup>. 目前已经证实电离辐射、氧化应激、细胞外液渗透压变化及热休克可导致神经细胞、上皮细胞、血管内皮细胞、多种肿瘤细胞凋亡的发生,细胞对这些刺激因素的应激反应中均有JNK/SAPK的激活,并多伴有Bad、Bax表达的上调与Bcl-2、Bcl-xL的表达受抑. 而在一些系统中JNK/SAPK与凋亡没有一对一的关系,在一些特定的情况下, JNK/SAPK具有细胞保护剂的活性,促进细胞的存活和增生. 对于某些导致细胞凋亡的有害刺激的应答,需要JNK/SAPK的激活以诱导基因转录的改变<sup>[12]</sup>.

**2.2 细胞转化** 在许多系统中,细胞的转化与ras/Raf/MEK/ERK的活性有关,但是JNK/SAPK对细胞表型的转化同样发挥作用. 研究证明,转染显负性SEK1可阻碍癌基因ras诱导的JNK/SAPK活性和ras诱导的转化,在没有EKR参与的情况下野生型SEK1的转染可增加ras的转化能力<sup>[13]</sup>. JNK/SAPK促进细胞转化与其作用于细胞周期元件相关,SV40小T抗原通过刺激细胞周期素D1启动子诱导细胞转化,此事件可被显负性的SEK1所阻断,说明JNK/SAPK通路具有促进细胞转化的功能<sup>[14]</sup>. c-jun的反式激活可能对这种效应非常重要,对应于细胞内的c-jun病毒癌基因v-jun可结合JNK/SAPK的 $\delta$ 区域,该区域介导其自身的转化,并下调TPA应答元件<sup>[15]</sup>.

**2.3 免疫系统的活化** JNK/SAPK通路在T细胞介导的特

异性免疫应答中担任重要的角色. JNK作用于白介素-2(IL-2)的启动子和增强元件诱导IL-2的表达,进一步促进T细胞的分化, JNK2以Th1特异的方式被诱导,并在干扰素 $\gamma$ (IFN $\gamma$ )的产生中发挥作用. JNK可作为NFATc激酶并磷酸化其蛋白的两个丝氨酸残基,其中之一为钙调磷酸酶结合位点, JNK1抑制钙调磷酸酶的结合,导致转录因子NFATc核内转位的丧失,而Th2的分化依赖于此过程,因此JNK可能在胞质内充当一个调节成分,负性调节Th2的分化<sup>[16]</sup>.

**2.4 炎症** 急性炎症是机体对于微生物入侵和组织完整性破坏的一种多方面应答,包括血管通透性的改变、炎症因子的募集、免疫细胞的活化、活性氧的产生、细胞间基质的消化和修复等许多程序将被启动. 应激活蛋白激酶级联对于多种炎症因子、趋化因子的产生及受体的活化是必需的,如TNF $\gamma$ 、白介素-8(IL-8)和白细胞趋化因子受体5(CCR5)等. 其他炎症递质如氧化氮合成酶、基质金属蛋白酶、尿激酶纤溶酶原激活剂的表达也经此通路得到增加. 环氧化酶2的表达也依赖于JNK/SAPK的活性,并生成炎症产物前列腺素. 另外在内皮细胞内的激活可以上调细胞粘连分子如E-选择素,可能引起炎症细胞募集到炎症区域<sup>[17]</sup>.

**2.5 发育** 在细胞培养皿中抑制或缺失JNK/SAPK组分,细胞可以继续生存,细胞正常的生长和分化不受影响. 在多细胞的有机体发生JNK/SAPK组分缺失,将导致严重的缺陷. 果蝇属的c-JUN同系物DJUN、JNK/SAPK同系物DJNK、NKK7同系物HEP的缺失突变,致使早期胚胎死亡<sup>[18]</sup>. JNK/SAPK通路对哺乳动物的发育同样重要,缺失SEK1的小鼠死于子宫内第12.5 d,特别是肝原性的缺陷不适于进一步的发育<sup>[19]</sup>. JNK/SAPK通路还参与哺乳动物免疫系统的发育和分化. SEK1的缺失发生在淋巴细胞中时,将导致T细胞发育和外周淋巴细胞补给的缺陷<sup>[20]</sup>.

**2.6 肝细胞功能** 一些证据指出JNK/SAPK通路对肝脏生长调节十分重要. 在刺激DNA合成的因素如肝细胞生长因子、高渗葡萄糖和TNF $\alpha$ 作用下, JNK/SAPK将被激活<sup>[21]</sup>. 肝细胞的另一激活剂凝血酶作为肝细胞丝裂原在肝再生中起作用. 由于失去对肝细胞生长因子的反应, SEK1的缺失导致肝源性缺陷使胚胎发育停止. JNK/SAPK还参与诱导化学性、代谢性解毒酶的合成<sup>[22]</sup>,以及肝移植后的缺血/再灌注损伤过程.

## 3 JNK/SAPK与肝炎病毒

HBV是导致肝细胞癌的主要病原体,多种因素包括炎症因子引起的损伤、肝再生期间的突变累积、DNA修复的缺陷、病毒DNA的整合、细胞癌基因的激活、以及细胞生存通路的诱导涉及肝癌的发生. HBV X蛋白(HBx)的表达及其肝细胞中多种不同基因表达的异常调节被认为是HBV感染引起肝细胞癌的重要分子生物学机制之一. HBx最早被描述为多种启动子的反式激活

剂,但其胞质内定位的属性决定该蛋白对包括信号转导分子的胞质内组分的调节作用.在细胞质内,HBx表现为刺激 Ras-Raf-MAPK 系统,该系统对转录因子 AP-1 的激活作用十分重要.HBx 对 JNKs 的激活作用导致由 HBx 活化的 JNK 执行的 c-JUN 氨基端磷酸化作用引起的 AP-1 DNA 结合过度的产生和活化,包括瞬时的 c-FOS 蛋白从头合成和 c-JUN 的持续合成.新的 c-JUN 合成可被共表达的 MAP 激酶致活酶(MEKK-1)所阻断,这就证明 HBx 通过激活 JNK 信号途径促进 c-JUN 的合成.HBx 对 JNK 途径的活化作用导致 c-JUN 二聚体复合物积累<sup>[23]</sup>.

JNK/SAPK 通路被证明是 Fas 介导凋亡的细胞存活通路,JNK/SAPK 激活 c-fos/c-jun 引起的转录,有利于 G<sub>0</sub>/S 细胞周期的转变,保护细胞在血清饥饿时的存活<sup>[24]</sup>.有实验证实 HBV 慢性毒株的 X 蛋白通过上调 JNK/SAPK 途径抑制 Fas 介导的凋亡,Fas 介导的凋亡被认为是导致肝脏疾病时肝细胞损伤的主要机制之一.酶学分析显示 JNK/SAPK 在细胞内的活性被 HBx 高度上调,在正常小鼠纤维母细胞、人类原代培养肝细胞和 p53 缺乏小鼠红白血病细胞中表达 HBx 可防止细胞死亡,而在 JNK 通路上游激酶 SEK1 缺失的细胞中,无论有无 HBx 的存在都将形成 Fas 介导的凋亡.说明 HBx 的抗凋亡作用并不依赖于 p53,SEK1 相关的 JNK/SAPK 途径为 HBx 拮抗 Fas 介导的凋亡所需要,HBx 直接或间接抑制 caspas3、8 活性及细胞色素 C 从线粒体中的释放.免疫共沉淀和共聚焦免疫荧光显微镜观察到 HBx 与胞质内蛋白 MEKK1、SEK1、JNK/SAPK 蛋白共同定位,HBx 的存在可能在不影响 SAPK/SEK1 转录表达水平的基础上提高这种激酶复合物的活性<sup>[25]</sup>.

MAPK/JNK 及其介导的细胞内信号转导也是 HCV 蛋白作用的重要靶位.在四环素诱导的 Tet 缺失的 HepG2 系统中核心表达激活 JNK 有丝分裂原激酶诱导 MAPK 磷酸酶 MKP1 的表达,细胞发生增生.此过程伴有 c-Jun 和 ATF2 而非 ELK-1 和 c-Fos 的激活,AP-1 的激活也并不依赖于 c-Fos,全长或 N 末端截短的 HCV 核心蛋白发挥相同的效应,促进 HCV 感染的肝细胞瘤性转化<sup>[26]</sup>.

#### 4 参考文献

- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 1994;369:156-160
- Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 1994;76:1025-1037
- Casanova E, Garate C, Ovalle S, Calvo P, Chinchetru MA. Identification of four splice variants of the mouse stress-activated protein kinase JNK/SAPK alpha-isoform. *Neuroreport* 1996;7:1320-1324
- Dai T, Rubie E, Franklin CC, Kraft A, Gillespie DA, Avruch J, Kyriakis JM, Woodgett JR. Stress-activated protein kinases bind directly to the delta domain of c-Jun in resting cells: implications for repression of c-Jun function. *Oncogene* 1995;10:849-855
- Zinck R, Cahill MA, Kracht M, Sachsenmaier C, Hippskind RA, Nordheim A. Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase pathways that converge on Elk-1. *Mol Cell Biol* 1995;15:4930-4938
- Janknecht R, Hunter T. Activation of the Sap-1a transcription factor by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997;272:4219-4224
- Chow CW, Rincon M, Cavanagh J, Dickens M, Davis RJ. Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* 1997;278:1638-1641
- Sanchez I, Hughes RT, Mayer BJ, Yee K, Woodgett JR, Avruch J, Kyriakis JM, Zon LI. Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* 1994;372:794-798
- Tibbles LA, Ing YL, Kiefer F, Chan J, Iscove N, Woodgett JR, Lassam NJ. MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6. *EMBO J* 1996;15:7026-7035
- Shen YH, Godlewski J, Zhu J, Sathyanarayana P, Leaner V, Birrer MJ, Rana A, Tzivion G. Cross talk between JNK/SAPK and ERK/MAPK pathways: Sustained activation of JNK blocks ERK activation by mitogenic factors. *J Biol Chem* 2003; [Epub ahead of print]
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995;270:1326-1331
- Spector MS, Auer KL, Jarvis WD, Ishac EJ, Gao B, Kunos G, Dent P. Differential regulation of the mitogen-activated protein and stress-activated protein kinase cascades by adrenergic agonists in quiescent and regenerating adult rat hepatocytes. *Mol Cell Biol* 1997;17:3556-3565
- Clark GJ, Westwick JK, Der CJ. p120 GAP modulates Ras activation of Jun kinases and transformation. *J Biol Chem* 1997;272:1677-1681
- Watanabe G, Howe A, Lee RJ, Albanese C, Shu IW, Karnezis AN, Zon L, Kyriakis J, Rundell K, Pestell RG. Induction of cyclin D1 by simian virus 40 small tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12861-12866
- Black EJ, Catling AD, Woodgett JR, Kilbey A, Gillespie DA. Transcriptional activation by the v-Jun oncoprotein is independent of positive regulatory phosphorylation. *Oncogene* 1994;9:2363-2368
- Dong C, Davis RJ, Flavell RA. Signaling by the JNK group of MAP kinases. c-jun N-terminal Kinase. *J Clin Immunol* 2001;21:253-257
- Tibbles LA, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:1230-1254
- Sluss HK, Han Z, Barrett T, Davis RJ, Ip YT. A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in Drosophila. *Genes Dev* 1996;10:2745-2758
- Ganiatsas S, Kwee L, Fujiwara Y, Perkins A, Ikeda T, Labow MA, Zon LI. SEK1 deficiency reveals mitogen-activated protein kinase cascade crossregulation and leads to abnormal hepatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6881-6886
- Nishina H, Fischer KD, Radvanyi L, Shahinian A, Hakem R, Rubie EA, Bernstein A, Mak TW, Woodgett JR, Penninger JM. Stress-signalling kinase Sek1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3. *Nature* 1997;385:350-353
- Auer KL, Contessa J, Brenz-Verca S, Pirola L, Rusconi S, Cooper G, Abo A, Wymann MP, Davis RJ, Birrer M, Dent P. The Ras/Rac1/Cdc42/SEK/JNK/c-Jun cascade is a key pathway by which agonists stimulate DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes. *Mol Biol Cell* 1998;9:561-573
- Elbirt KK, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Bonkovsky HL. Mechanism of sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 in hepatoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1998;273:8922-8931
- Benn J, Su F, Doria M, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Virol* 1996;70:4978-4985
- Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11215-11219

- 25 Diao J, Khine AA, Sarangi F, Hsu E, Iorio C, Tibbles LA, Woodgett JR, Penninger J, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem* 2001;276:8328-8340
- 26 Erhardt A, Hassan M, Heintges T, Haussinger D. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. *Virology* 2002;292:272-284

## 乙型和丙型肝炎病毒对ERK信号转导途径的影响

张健, 成军

张健, 成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. [cj@genetherapy.com.cn](mailto:cj@genetherapy.com.cn)  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2003-06-24 接受日期: 2003-07-16

张健, 成军. 乙型和丙型肝炎病毒对ERK信号转导途径的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(1):158-160

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/158.asp>

### 0 引言

在病毒性肝炎的发病机制中, 病毒蛋白对肝细胞信号转导通路的影响是病毒感染以后形成慢性感染、肝纤维化、肝细胞癌的重要的分子生物学机制, 对于慢性肝炎的预后也有重要意义<sup>[1-3]</sup>. 细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)亚族之一. MAPK是生物体内重要的信号转导系统之一, 参与介导生长、发育、分裂、分化、死亡以及细胞间的功能同步等多种细胞过程. 在哺乳动物细胞中已发现和克隆了ERK、JNK/SAPK、p38/RK、ERK5/BMK1四个MAPK亚族. 这些MAPK能被多种炎性刺激所激活, 并对炎症的发生、发展起重要调控作用. MAPK对细胞从整个G1期到S期起决定性作用. 具有双重特异性的MAP激酶的激酶(MEK1和MEK2)磷酸化和激活后, 可以激活ERK1和ERK2. 激活的ERK可使许多效应蛋白磷酸化, 这些效应蛋白包括细胞进展至S期所必需的蛋白表达的转录因子<sup>[4]</sup>. MAP激酶系统很明显在细胞周期的G1期起作用, 也可能在G2/M期起作用. 已经证明细胞进入有丝分裂期后, 内源性ERK1和ERK2生化活性降低<sup>[5-6]</sup>, 也有人认为正常的MEK/ERK活性对细胞进入有丝分裂期是必需的<sup>[7-8]</sup>.

### 1 ERK与乙型肝炎病毒

乙型肝炎病毒(HBV)对肝细胞信号转导系统的影响,

不仅是HBV蛋白对肝细胞中信号转导的影响, 还包括肝细胞蛋白与HBV DNA调节序列的结合及调节. 但是, HBV蛋白对于肝细胞信号转导通路的影响是HBV感染以后形成慢性病毒感染、肝纤维化及肝细胞癌的重要的分子生物学机制. 乙型肝炎病毒X(HBx)蛋白是一种具有双重作用的转录激活因子, 在培养细胞中表达后, 可在细胞质刺激信号转导途径和细胞核内的转录因子中起到转录激活作用. 在细胞质内, HBx表现为刺激Ras-Raf-MAPK系统, HBx与MAPK信号转导系统的作用在HBV的各种蛋白中表现十分明显, 这可以部分解释其转录激活作用机制<sup>[9]</sup>.

Benn et al<sup>[10]</sup>发现HBx蛋白对ERKs和c-Jun氨基端激酶(JNKs)有刺激作用. JNK被HBx活化后, c-Jun氨基端发生磷酸化, 引起AP-1 DNA结合活度的产生和活化, 包括瞬时的c-Fos蛋白的从头合成和c-Jun的持续合成. 新的c-Jun合成可被共表达的MAP激酶致活酶(MEKK-1)所阻断, 这就证明HBx通过激活JNK信号途径促进c-Jun的合成. c-fos基因与Raf-C4共表达, Raf-C4发生接触反应突变后可阻断c-fos的活性, 表明HBx通过作用于Ras-Raf途径产生c-Fos. HBx对ERK和JNK途径的活化作用导致AP-1-c-Jun二聚体复合物积累.

Nijhara et al<sup>[11]</sup>通过研究发现, 伴随病毒核蛋白颗粒介导的HBV DNA的传递, 很大一部分肝细胞以剂量依赖性方式表达HBx蛋白, 进而导致肝细胞的ERK活性明显增强. HBx诱导的ERK活性可持续30d. 有趣的是, 发现c-Jun氨基末端激酶(JNKs)活性也可以持续30d. 这种构成的ERK和JNK激活作用作为HBx持续表达的结果也导致更下游元件刺激作用的持续, 例如c-Jun和c-Fos蛋白水平的增高伴随激活蛋白1结合活性的持续诱导.

HBx也可通过刺激细胞内的信号转导途径调节转录作用. Henkler et al<sup>[12]</sup>研究了HBx对MAP激酶(Erk)和JNK/SAPK激活作用的效率, 证实了在静止细胞中对Erk/MAP激酶有刺激作用. 然而, 在分离的细胞中, AP-1独立的Erk激活作用和c-Jun(丝氨酸-63)的磷酸化作用可被HBx诱导, 而对Erk-2则不同. 这些证据提示HBx杂乱的激活Erk和JNK应答途径, 这种对信号系统的全面作用可能受外部丝裂原刺激素影响.

### 2 ERK与丙型肝炎病毒

丙型肝炎病毒(HCV)是一种正链RNA病毒, 其致病机制与DNA病毒和逆转录病毒有明显的区别. MAPK/ERK及其介导的细胞内信号转导是HCV蛋白作用的重要靶位. 通过与ERK的作用, HCV核心蛋白与MEK相互作用影响细胞的有丝分裂过程. 在有丝分裂期间MEK与ERK有活性分离现象. 有丝分裂的MEK1活性和其与ERK活性的分离作用依赖于细胞周期蛋白B-Cdc2的激活. 这种分离作用有许多机制. MEK1的氨基末端区域包含一个ERK结合区, 这个区域的突变, 由于炭疽



毒素致死因子或胱冬肽酶引起的蛋白分解缺失, 导致 MEK1 激活 ERK 的能力消失<sup>[13-14]</sup>. 不论在何种细胞, ERK 结合区的缺失都可以完全抑制细胞质 ERK 的活性, 但是对 MEK1DN51 激活的细胞膜结构的 ERK 来说, ERK 结合区并不是必需的. 这种现象可能的机制为由于支架蛋白(例如 MP-1)可同时结合 MEK 和 ERK, 因此可从 MEK1DN51 补偿 ERK 结合区缺失的影响<sup>[15]</sup>. 然而, 截短型的 MEK1DN51 在有丝分裂期激活膜结合 ERK 的能力消失, 说明抑制 MEK 对 ERK 激活能力的还有另外的有丝分裂特异性机制. 由于 ERK 可以上调细胞周期蛋白 B-Cdc2 抑制剂 WEE1 激酶, 因此可以延长进入有丝分裂期的时间<sup>[16-17]</sup>. 可以推测膜相关的有丝分裂激活因子 MEK1 除了 ERK 之外还可能调节其他因子.

HCV 核心蛋白具有致癌特性, 但是其具体机制仍不很清楚. 为阐明 HCV 核心蛋白激活 MEK-ERK 途径的确切机制, Fukuda et al<sup>[18]</sup>在一些细胞系中瞬时表达 HCV 蛋白, 并且应用 Gal4-EIk1 萤虫素酶测定法、体内 MAPK 激酶测定及斑点杂交分析研究信号转导途径. 结果发现, 当面对丝分裂素信号时, HCV 核心蛋白在 MEK 下游增强 Elk1 的激活作用, 而对 ERK 活性和 Elk1 的磷酸化作用并无影响. 这些证据表明, HCV 核心蛋白可能通过作用于典型的磷酸化作用过程中激活 Elk1. Giambartolomei et al<sup>[19]</sup>发现在表达 HCV 核心蛋白的稳定细胞系中响应 EGF 的 Raf/MEK/Erk 途径的持续激活. HCV 基因型 1 和 3 的核心蛋白激活 MEK1 和 Erk1/2 MAP 激酶, 并且在血清缺乏条件下通过体外激酶测定内源性的 Raf1 和免疫检测过磷酸化的 Erk1 和 Erk2, 发现 HCV 核心蛋白的表达引起 Raf1 和 MAP 激酶基础活性增高. 此外, Erk1/2 和下游转录因子 Elk-1 的响应有丝分裂刺激物 EGF 的活性显著延长. HCV 核心蛋白直接激活 MAP 激酶系统的能力和延长其响应有丝分裂刺激物的活性可能促成 HCV 感染的肝细胞致癌性转化.

Yao et al<sup>[20]</sup>发现 HCV 核心蛋白通过抑制 ERK 和 MEK 的磷酸化作用抑制补体依赖的调节途径的人 T 淋巴细胞应答. 补体蛋白参与对抗病原体的早期先天的免疫应答, 并且在清除宿主血液循环内的病毒抗原起到重要作用. 当感染 HCV 后, 个体首先在血液循环中表达的是 HCV 核心蛋白, 他可以通过与补体 C1q 受体的球状区域(gC1qR)的相互作用抑制人 T 细胞的增生. 为研究 HCV 核心蛋白/gC1qR 诱导的对 T 细胞增生的抑制作用的机制, Yao et al 检测了在 T 细胞激活早期阶段核心蛋白的作用. HCV 核心诱导的 ERK/MEK 有丝分裂素激活蛋白激酶的功能缺陷导致 IL-2 和 IL-2R $\alpha$  基因转录抑制, 这种抑制作用会导致白介素 2(IL-2)产生和白介素 2 受体(IL-2R)表达的抑制. 重要的是, 抗-gC1qR 抗体处理后具有逆转 HCV 核心诱导的抑制 ERK/MEK 磷酸化作用的能力, 这就提示 HCV 核心和 gC1qR 的相互作用可以干扰 ERK/MEK 有丝分裂素激活蛋白激酶的活化. 这些结果说明 HCV 核心诱导的以补体依赖方式对 T 细

胞活化的阻碍作用对病毒感染后 HCV 的持续存在起到主要作用.

Zhu et al<sup>[21]</sup>通过研究发现白介素-1(Interleukin-1, IL-1)在慢性丙型肝炎患者体内的产量下降, 说明 IL-1 与丙型肝炎病毒的清除有关. 应用亚基因组复制细胞系, 他们发现 IL-1 可以有效的抑制亚基因组 RNA 复制及病毒蛋白表达, 这种抑制效应与 ERK 的激活作用有关.

MAPK/ERK 与细胞的增生和组织的增生过程密切相关. 赵兰娟 et al<sup>[22]</sup>应用人肝癌细胞系 HepG2 进行了研究. HepG2 细胞中 MAPK/ERK 蛋白在受到 HCV E2 蛋白的刺激以后发生磷酸化修饰, 而且 MAPK/ERK 的磷酸化与作用的 HCV E2 蛋白的浓度有关, 是一种剂量和时间依赖性的效应. MAPK/ERK 在 HepG2 受到 HCV E2 蛋白的刺激后被激活, 表明 HCV E2 参与了细胞内信号转导, 而且可能在 HCV 感染的致病过程中发挥重要作用.

### 3 参考文献

- 1 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 2 成军, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒感染与脂类代谢的相关性. 肝脏 2002;7:56-58
- 3 成军. 慢性丙型肝炎肝脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 4 Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 1996;271:20608-20616
- 5 Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Ueki K, Izumi T, Chatani Y, Kohno M, Kasuga M, Yazaki Y, Akanuma Y. Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells. *J Biol Chem* 1992;267:20293-20297
- 6 Edelmann HM, Kuhne C, Petritsch C, Ballou LM. Cell cycle regulation of p70 S6 kinase and p42/p44 mitogen-activated protein kinases in Swiss mouse 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1996;271:963-971
- 7 Wright JH, Munar E, Jameson DR, Andreassen PR, Margolis RL, Seger R, Krebs EG. Mitogen-activated protein kinase kinase activity is required for the G(2)/M transition of the cell cycle in mammalian fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:11335-11340
- 8 Hayne C, Tzivion G, Luo Z. Raf-1/MEK/MAPK pathway is necessary for the G2/M transition induced by nocodazole. *J Biol Chem* 2000;275:31876-31882
- 9 Klein NP, Schneider RJ. Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras. *Mol Cell Biol* 1997;17:6427-6436
- 10 Benn J, Su F, Doria M, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Virol* 1996;70:4978-4985
- 11 Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Rana A, Majumdar SS, Kumar V, Sarkar DP. Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 by the hepatitis B virus X protein in mouse hepatocytes in vivo. *J Virol* 2001;75:10348-10358
- 12 Henkler F, Lopes AR, Jones M, Koshy R. Erk-independent partial activation of AP-1 sites by the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol* 1998;79(Pt 11):2737-2742
- 13 Duesbery NS, Webb CP, Leppla SH, Gordon VM, Klimpel KR, Copeland TD, Ahn NG, Oskarsson MK, Fukasawa K, Paull KD, Vande Woude GF. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science* 1998;280:734-737

- 14 McGuire TF, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D(3)-induced apoptosis of murine squamous cell carcinoma cells. Selective induction of caspase-dependent MEK cleavage and up-regulation of MEK-1. *J Biol Chem* 2001;276:26365-26373
- 15 Schaeffer HJ, Catling AD, Eblen ST, Collier LS, Krauss A, Weber MJ. MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* 1998; 281:1668-1671
- 16 Colanzi A, Deerinck TJ, Ellisman MH, Malhotra V. A specific activation of the mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis. *J Cell Biol* 2000;149:331-339
- 17 Bardwell AJ, Flatau LJ, Matsukuma K, Thorner J, Bardwell L. A conserved docking site in MEKs mediates high-affinity binding to MAP kinases and cooperates with a scaffold protein to enhance signal transmission. *J Biol Chem* 2001;276: 10374-10386
- 18 Fukuda K, Tsuchihara K, Hijikata M, Nishiguchi S, Kuroki T, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein enhances the activation of the transcription factor, Elk1, in response to mitogenic stimuli. *Hepatology* 2001;33:159-165
- 19 Giambartolomei S, Covone F, Leviero M, Balsano C. Sustained activation of the Raf/MEK/Erk pathway in response to EGF in stable cell lines expressing the Hepatitis C Virus (HCV) core protein. *Oncogene* 2001;20:2606-2610
- 20 Yao ZQ, Nguyen DT, Hiotellis AI, Hahn YS. Hepatitis C virus core protein inhibits human T lymphocyte responses by a complement-dependent regulatory pathway. *J Immunol* 2001; 167:5264-5272
- 21 Zhu H, Liu C. Interleukin-1 inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by activation of extracellular regulated kinase pathway. *J Virol* 2003;77:5493-5498
- 22 赵兰娟, 刘厚奇, 曹洁. 丙型肝炎病毒 E2 蛋白对 HepG2 细胞 MAPK/ERK 的激活. *生物化学与生物物理学报* 2001;33:691-695

## 乙型和丙型肝炎病毒与转录因子AP-1

王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 王春花

王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 王春花, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

国家自然科学基金项目, No. C39970674, No. C03011402

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-24 接受日期: 2003-07-16

王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 王春花. 乙型和丙型肝炎病毒与转录因子 AP-1. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):160-162

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/160.asp>

### 0 引言

在慢性病毒性肝炎的发病机制中, 病毒蛋白对肝细胞信号转导通路的影响是病毒感染以后形成慢性感染、肝纤维化、肝细胞癌的重要的分子生物学机制, 对于慢性肝炎的预后也有重要意义. 激活蛋白1(AP-1)对于病毒性肝炎的发病机制有重要意义, 他最先被发现作为一种转录因子通过佛波酯肿瘤启动子乙酸盐(TPA)介导金属硫蛋白II基因的产生, 因此他的识别位点被称

为TPA响应元件(TRE)<sup>[1]</sup>. 之后发现AP-1活性可被许多其他的刺激剂包括生长因子、细胞因子、T细胞活化剂、神经递质和紫外线诱导产生<sup>[2]</sup>. 病毒性肝炎的病毒蛋白通过与AP-1的相互作用可以部分解释病毒感染发病的分子生物学机制.

### 1 AP-1参与转录调控的分子生物学机制

诱导AP-1活化可通过提高AP-1组分的丰度和激活其活性. AP-1是Jun和Fos家族序列特异性转录激活剂. 通过使Jun和Fos DNA结合蛋白互相结合成同二聚体或异二聚体结合到一个通用的位点而发挥转录激活作用. 一些顺式元件响应一系列细胞外刺激素的刺激介导c-fos的产生<sup>[3]</sup>. 一种cAMP响应因子响应神经递质和应用cAMP或Ca作为第二信使的多肽激素刺激分别激活蛋白激酶A(PKA)或钙调素依赖的蛋白激酶<sup>[4]</sup>. 一种血清响应因子(SRE)介导生长因子, 细胞因子和其他刺激丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)活化因子诱导的c-fos产生, 和Sis通过刺激激活JAK的蛋白激酶活性诱导增强子产生<sup>[5]</sup>. 综合上述, 不难理解几乎任何可能的细胞外刺激物可诱导c-Fos的快速产生.

AP-1组分通过他们的磷酸化作用来调节翻译后的调控形式已在c-Jun、c-Fos和ATF2中证实, 在其他Jun和Fos蛋白中也有类似的调控方式. 对于c-Jun, 紧靠其基序的磷酸化作用位点通过c-Jun同型二聚体而不是通过c-Jun/c-Fos异二聚体抑制DNA结合<sup>[6]</sup>. 另一方面, c-Jun在反式激活区域Ser-73和Ser-63的磷酸化作用使其同型二聚体和与c-Fos形成的异二聚体都具有转录激活作用<sup>[7]</sup>. 这些不能影响DNA结合活性的氨基酸残基被新发现的MAPK家族成员Jun或JNKs磷酸化<sup>[8]</sup>. 到目前为止, JNKs是可以有效的磷酸化c-Jun氨基末端的唯一的蛋白激酶, ERK1或ERK2都不能磷酸化c-Jun氨基末端刺激位点, 相反可以磷酸化靠近DNA结合区羧基末端的抑制位点<sup>[9]</sup>. 被PKA代替JNK磷酸化c-Jun的特异性突变体(Ser-73磷酸化而Ser-63很少)有直接的反式激活功能<sup>[10]</sup>. 磷酸化作用可以通过CREB结合蛋白(CBP)的募集来使c-Jun具有转录激活活性, CBP由于其结合到磷光体CREB, 另一种被PKA激活的bZIP转录因子而得名<sup>[11]</sup>. 伴随着氨基端位点的磷酸化, c-Jun可以结合CBP, 并且CBP使其具有转录激活作用<sup>[12]</sup>. CBP连接CREB或c-Jun的磷酸化活性区域到基本转录激活结构.

### 2 AP-1与乙型肝炎病毒

乙型肝炎病毒(HBV)感染为慢性病毒性肝炎的常见原因. Lee et al<sup>[13]</sup>研究发现HBV基因增强子1(Enh I)上有特异的AP-1结合位点. 病毒蛋白和一些其他的激活因子可通过与AP-1结合位点的作用调控HBV的转录与表达. 与Jun和Fos家族的相互作用也是影响AP-1功能的重要方式.

整合的HBV DNA可编码两种转录激活因子: HBxAg蛋白和前-S2激活剂. 前-S2激活剂的激活功能基于其细胞质内前-S2区定位. 前-S2区有PKC依赖的磷酸化作用. 前-S2区可结合蛋白激酶C(PKC) $\alpha/\beta$ 并且激发PKC依赖的c-Raf-1/MAP2激酶信号转导系统的活化, 最终导致转录因子如AP-1和NF- $\kappa$ B的激活. 此外, 通过这种信号系统的激活, 前-S2激活剂引起肝细胞增生率增加. 依据致癌作用的二步方式(起始和加速), 前-S2激活剂可以通过激活PKC/c-Raf-1/MAP2激酶信号级联系统起到类似肿瘤启动子的功能. 这样一种多阶段的进程在肝细胞癌(HCC)的潜伏期内可能长期起作用<sup>[14]</sup>.

HBxAg蛋白引起的不同细胞基因的转录激活作用是HBV相关的肝细胞癌发生机制之一<sup>[15]</sup>. HBxAg蛋白是一种具有双重作用的转录激活因子, 在培养细胞中表达后, 他可在细胞质刺激信号转导途径和细胞核内的转录因子起到转录激活作用. 在细胞质内, HBxAg表现为刺激Ras-Raf-MAPK系统, 这个系统对转录因子AP-1的激活作用十分重要<sup>[16]</sup>. Lee et al 研究了HBxAg与潜在的致癌物和反式激活病毒早期蛋白如Ad5 E1A、HPV-16 E6和SV40 T的相互作用. 在HBxAg存在下, 只有HPV-16 E6对Enl有明显的协同反式激活作用. 进一步应用Enl启动子的缺失, 异种启动子和突变来分析HPV-16 E6的功能, 结果显示这种协同效用由Enl上的E因子的AP-1位点介导, 通过直接激活AP-1的活性来实现, 这就证明了HBV感染的细胞伴随其他病毒感染如HPV-16能够增强HBV和其他癌基因在增强子的AP-1位点的转录激活作用. HBxAg也可通过刺激细胞内的信号转导途径调节转录作用. Henkler et al<sup>[17]</sup>研究了HBxAg对MAP激酶(Erk)和JNK/SAPK激活作用的效率, 证实静止细胞中对Erk/MAP激酶有刺激作用. 然而, 在分离的血细胞中, AP-1独立的Erk激活作用和c-Jun(丝氨酸-63)的磷酸化作用可被HBxAg诱导, 而对Erk-2则否. 这些证据提示HBxAg杂乱地激活Erk和JNK应答途径, 这种对信号系统的全面作用可能受外部的丝分裂原刺激素影响.

HBxAg启动子被认为是可被HBxAg蛋白本身自动调节, 也可以与许多细胞调节蛋白相互作用. Choi et al<sup>[18]</sup>应用X启动子氯霉素乙酰基转移酶质粒与转录激活因子2(ATF2)表达载体共转染HepG2细胞研究了ATF2对X启动子的作用. HBxAg在HBV E区活化AP-1介导的转录作用, 这种转录活性在ATF2存在时被抑制, 提示ATF2通过抑制AP-1介导的HBxAg基本转录位点抑制X启动子的自活化. 由于AP-1和ATF2的结合位点在HBV E区有重叠, ATF2对X启动子的抑制作用通过ATF2-Jun异二聚体与AP-1因子竞争结合位点来实现. 然而, 少部分X启动子有一个ATF2结合位点, 可以被ATF2激活. 这些证据提示X蛋白的合成被ATF2特异性的调节.

Choi et al<sup>[19]</sup>应用氯霉素乙酰转移酶(CAT)系统发现

胰岛素以剂量依赖作用刺激HBV X启动子的转录活性. 一种阻止AP-1结合到E位点的突变可以去除胰岛素对HBV X启动子的激活作用. 另外, 在HepG2细胞中, 胰岛素通过作用于HBV的E位点和与AP-1相同的结合位点激活极少量的胸腺嘧啶核苷激酶(tk)基因启动子的活性. 应用胰岛素处理的HepG2细胞核提取物移动迁移率电泳分析(EMSA)发现, 胰岛素实际上增强核蛋白结合到HBV E位点和同样的AP-1结合位点. HBV E和AP-1的低聚核苷酸是这种结合作用的有效竞争剂. 这些结果说明胰岛素通过HBV Enl的AP-1结合位点提高HBxAg蛋白的表达. 因此推测胰岛素可能通过与其他细胞癌基因相互作用增大HBV感染细胞发展为肝癌过程中HBxAg的作用. Banerjee et al<sup>[20]</sup>发现在HBV感染细胞中, 应用黄曲毒素B(AFB)和苯并芘(BP)处理24 h后, HepG2细胞中AP-1升高5-10倍, 同时HBsAg也增加. 提示一些致癌物质诱导的转录激活因子可能影响病毒的致癌作用, 引起细胞癌变.

### 3 AP-1与丙型肝炎病毒

丙型肝炎病毒(HCV)感染后, 进展为慢性病毒性肝炎和HCC的频率相对较高. 但是他的分子生物学机制还不是很清楚. 既往研究发现, 持续表达HCV核心蛋白的转基因小鼠经常发展为HCC, 提示核心蛋白在HCC形成过程中可能起到重要作用. HCV核心蛋白核包含定位信号区类似序列, 并且对细胞的新陈代谢有多种作用, 在转录调控, 细胞凋亡和恶性转换中扮演重要角色<sup>[21]</sup>.

Meng et al<sup>[22]</sup>应用报道基因测定显示极少量的MCP-1启动子翻译起始位点上游128个核苷酸对HCV介导的活化作用是最佳的. 应用EMSA分析和抗-AP-1抗体分析发现HCV诱导在这一区域的AP-1结合活性. 转染的全长HCV-S1上调AP-1结合活性和的转录. Kato et al<sup>[23]</sup>研究了7种HCV蛋白(核心蛋白、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B)和4种HBV蛋白(前-C、C、聚合酶、X蛋白). 发现在这11种蛋白中, HCV核心蛋白对细胞内信号系统影响最强, 尤其是NF- $\kappa$ B、AP-1、SRE相关信号途径, 其水平较这些信号途径公认的反式作用因子HBxAg蛋白要强. 此外, HCV核心蛋白通过NF- $\kappa$ B和AP-1激活IL-8启动子. HCV核心蛋白与JNK和MAPKK有协同激活作用, 而JNK和MAPKK可以调节AP-1的活性, 这就提示HCV核心蛋白可能通过JNK和MAPKK共同激活AP-1<sup>[24]</sup>. Tsutsumi et al<sup>[25]</sup>研究发现在HCV感染相关HCC中, c-Jun氨基末端激酶, AP-1的活性及下游的效应因子活性均升高, 因此, 体内细胞因子的表达伴随AP-1的激活和核心蛋白的表达可能在持续HCV感染的肝细胞恶性转化中可能有重要作用.

许多研究提示HCV非结构蛋白5A(NS5A)与HCV感染后对于干扰素 $\alpha$ (IFN- $\alpha$ )治疗的抵抗作用有关. Polyak et al<sup>[26]</sup>研究发现, NS5A在人细胞内的表达诱导白介素-8(IL-8) mRNA和蛋白的产生, 并且这种效用与在体外

检测到的抑制 IFN 的抗病毒作用有关. NS5A 诱导由 IL-8 启动子诱导的报告基因的复制, 并且 IL-8 启动子的最初的 133 bp 是 NS5A 反式激活作用所必须的最小片段. NS5A- $\delta$  N110 和 NS5A- $\delta$  N222 刺激 IL-8 启动子的产生比 NS5A 全蛋白水平更高. 另外, IL-8 启动子的诱发突变提示 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 对肿瘤坏死因子  $\alpha$  存在下 NS5A- $\delta$  N222 的反式激活有重要意义, 并且 NF-IL-6 可以抑制这种作用. 这就提示 AP-1 在 HCV 感染后对 IFN- $\alpha$  治疗的抵抗作用方面起到一定的作用.

#### 4 参考文献

- Lee W, Haslinger A, Karin M, Tjian R. Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* 1987; 325:368-372
- Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991;1072:129-157
- Treisman R. The serum response element. *Trends Biochem Sci* 1992;17:423-426
- Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME. CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* 1991;252:1427-1430
- Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264:1415-1421
- Boyle WJ, Smeal T, Defize LH, Angel P, Woodgett JR, Karin M, Hunter T. Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* 1991;64:573-584
- Deng T, Karin M. c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature* 1994;371:171-175
- Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 1994;76:1025-1037
- Chou SY, Baichwal V, Ferrell JE Jr. Inhibition of c-Jun DNA binding by mitogen-activated protein kinase. *Mol Biol Cell* 1992;3:1117-1130
- Smeal T, Hibi M, Karin M. Altering the specificity of signal transduction cascades: positive regulation of c-Jun transcriptional activity by protein kinase A. *EMBO J* 1994;13:6006-6010
- Kwok RP, Lundblad JR, Chivria JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, Goodman RH. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 1994;370:223-236
- Arias J, Alberts AS, Brindle P, Claret FX, Smeal T, Karin M, Feramisco J, Montminy M. Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* 1994;370:226-229
- Lee DH, Choi BH, Rho HM. The synergistic transactivation of the hepatitis B viral (HBV) pregenomic promoter by the E6 protein of human papillomavirus type 16 (HPV-16 E6) with HBV X protein was mediated through the AP1 site of E element in the enhancer I (EnI) in human liver cell. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265:62-66
- Hildt E, Hofschneider PH. The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:315-329
- Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Rana A, Majumdar SS, Kumar V, Sarkar DP. Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 by the hepatitis B virus X protein in mouse hepatocytes *in vivo*. *J Virol* 2001; 75:10348-10358
- Benn J, Su F, Doria M, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Virol* 1996;70:4978-4985
- Henkler F, Lopes AR, Jones M, Koshy R. Erk-independent partial activation of AP-1 sites by the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol* 1998;79:2737-2742
- Choi CY, Choi BH, Park GT, Rho HM. Activating transcription factor 2 (ATF2) down-regulates hepatitis B virus X promoter activity by the competition for the activating protein 1 binding site and the formation of the ATF2-Jun heterodimer. *J Biol Chem* 1997;272:16934-16939
- Choi BH, Park CJ, Rho HM. Insulin activates the hepatitis B virus X gene through the activating protein-1 binding site in HepG2 cells. *DNA Cell Biol* 1998;17:951-956
- Banerjee R, Caruccio L, Zhang YJ, McKercher S, Santella RM. Effects of carcinogen-induced transcription factors on the activation of hepatitis B virus expression in human hepatoblastoma HepG2 cells and its implication on hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2000;32:367-374
- Isoyama T, Kuge S, Nomoto A. The core protein of hepatitis C virus is imported into the nucleus by transport receptor Kap123p but inhibits Kap121p-dependent nuclear import of yeast AP1-like transcription factor in yeast cells. *J Biol Chem* 2002;277:39634-39641
- Meng SH, Garzino-Demo A, Hong W, Hwee TY, Joo TY, Goh PY, Gee LS, Pheng LS. Expression of a full-length hepatitis C virus cDNA up-regulates the expression of CC chemokines MCP-1 and RANTES. *Virology* 2002;303:253-277
- Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- Shrivastava A, Manna SK, Ray R, Aggarwal BB. Ectopic expression of hepatitis C virus core protein differentially regulates nuclear transcription factors. *J Virol* 1998;72:9722-9728
- Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Kimura S, Koike K, Miyamura T. Alteration of intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in transgenic mice expressing hepatitis C virus core protein. *Virology* 2002;304:415-424
- Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001;75:6095-6106

## 乙型和丙型肝炎病毒对 MEKK1 蛋白信号转导途径的影响

纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花

纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-24 接受日期: 2003-07-16

纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花. 乙型和丙型肝炎病毒对 MEKK1 蛋白信号转导途径的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(1):162-165  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/162.asp

## 0 引言

磷酸化和去磷酸化是蛋白质调节其功能、活性的一种重要方式,有些蛋白质在磷酸化状态时具有活性,而在非磷酸化状态时没有活性,如丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)等,而有些蛋白质则相反,在磷酸化状态时没有活性,而在非磷酸化状态时具有活性,如转录因子I $\kappa$ B $\alpha$ 的抑制活性.蛋白质通过磷酸化-去磷酸化调节功能、活性并进而影响细胞的很多生命过程.哺乳类动物的蛋白激酶可以分为两个主要家族:磷酸化丝/苏氨酸残基的丝/苏氨酸激酶或者磷酸化酪氨酸残基的酪氨酸激酶.激酶的主要功能是通过细胞对外部信息功能性反应来参与信号转导过程,在所有的激酶中,MAPK系统介导细胞的生理、病理改变,在细胞增生、恶性转化和应激应答的调节中具有重要作用<sup>[1-2]</sup>,其在进化过程中具有高度保守性,并且对许多细胞功能都是必需的<sup>[3]</sup>.MEKK1是MAPK信号转导系统中的一员,他可以激活其下游的细胞外信号调节激酶(ERK)MAPK途径、c-Jun氨基端激酶/应激活化蛋白激酶(JNK/SAPK)MAPK途径,还可以激活NF- $\kappa$ B、JAK-STAT途径,从而使细胞各信号转导系统互相影响、调节.另外,MEKK1可以与乙型肝炎病毒(HBV)以及丙型肝炎病毒(HCV)相互作用,在他们的致病(癌)过程中具有重要作用,对MEKK1及整个MAPK信号转导系统的理解将有助于进一步明确病毒性肝炎的发病机制,以及开辟新的抗病毒治疗方案,为提高病毒性肝炎的诊疗水平铺平道路.

## 1 MEKK1的功能

MEKK1属于MAPKKK(MAPK激酶激酶)家族成员,1993年由于其与酵母MEKK酶Ste11p序列具有相似性而被克隆、鉴定出来,全长cDNA分析说明MEKK1是195 kD的蛋白,其羧基端为催化区,可以磷酸化与其结合的蛋白,氨基端为调节区,介导了蛋白-蛋白相互作用并影响其行为与功能.他的出现说明除了Raf还有其他的途径激活ERK途径,MEKK1对细胞的生存、凋亡的调控相当重要,可以调节转录因子、死亡受体及其配体的表达<sup>[4]</sup>.Bonvin et al<sup>[5]</sup>通过对比全长MEKK与MEKK结构域介导的反应的观察,发现MEKK与其结构域在激活NF- $\kappa$ B、ERK MAPK途径、JNK/SAPK MAPK途径的模式,甚至在细胞增生、凋亡方面都截然不同,缺失突变说明MEKK的氨基端结构域决定了不同的细胞内信号转导途径及细胞反应的特异性及力度.

MEKK1的激活物有许多,从而可以与许多信号转导途径相联系.Kim et al<sup>[6]</sup>报道了糖原合酶激酶3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )结合蛋白阻断了GSK3 $\beta$ 对于MEKK1的激活,从而介导了MEKK1的激活而启动了相应的信号转导途径,说明了GSK3 $\beta$ 是MEKK1天然的激活剂.MEKK1受到刺激以后被激活,通过一系列级联反应导致了细胞骨架及细胞形状的改变.MEKK1磷酸化激活MKK(MAP/ERK激酶)1和MKK4(SEK1),导致了ERK1/2和JNK/SAPK的激

活,其中MEKK1亚结构域X的残基对于其介导的MKK4的激活是非常关键的<sup>[7]</sup>.MEKK1有一个植物同源性结构域(PHD),为一环指样结构,具有雌三醇(E3)连接酶活性,位于PHD内的半胱氨酸441突变为丙氨酸(C441A)后抑制了MEKK1的广泛分布,从而影响了MEKK1酶活性的激活,抑制了其下游一系列的级联信号转导途径,使得MEKK1具有阴性调节ERK1/2的机制<sup>[8-10]</sup>.

JNK/SAPK MAPK途径参与了多种应激反应,诸如缺氧、冷休克、高渗所介导的反应.在哺乳细胞内有3个JNK/SAPK编码基因,许多不同的JNK/SAPK蛋白是通过不同的剪切产生的.调节JNK/SAPK的一个重要的上游激酶是MEKK1,他直接与JNK/SAPK结合,说明其与这个途径有着重要的调节关系.MEKK1受其上游MAPKKK激酶所调节,如Nck-相互作用激酶(Nck)和生发中心激酶(GCK)等,主要与MEKK1的氨基端相互作用.MEKK1的调节相当复杂,因为他与众多的蛋白相互作用,如MKK4,人类T细胞亲淋巴细胞I型(HTLV-1)产生的一种变形蛋白,14-3-3蛋白,Raf-1,p115 RhoGAP,Rac和Cdc42小GTP酶等,其中一些可以介导MEKK1催化区的去抑制或启动自激活<sup>[11]</sup>.MEKK1在其活化状态时,仍然具有大量的可磷酸化位点,MEKK1催化区核心激活环内的两个苏氨酸残基对于酶活性的激活是必需的.Gallagher et al<sup>[12]</sup>提出了MEKK1介导的JNK/SAPK激活模型:MEKK1与MKK4结合,形成了复合体,MKK4与MEKK1的酶结构域结合,而当MEKK1被激活后MKK4就与之分离,JNK/SAPK与MEKK1距离氨基端约62-70残基的D结构域(由疏水氨基酸残基组成)结合.p21激活激酶(PAK)1能够磷酸化MEKK1的JNK/SAPK结合结构域D的丝氨酸67残基,从而改变了D结构域的状态,降低了MEKK1与JNK/SAPK的亲合力,因此JNK/SPAK未被激活.而当JNK/SAPK未与MEKK1结合时,MKK4会磷酸化自身的视黄醛X受体,从而使丝氨酸67去磷酸化,恢复了JNK/SAPK与MEKK1的结合.

MEKK1还可以激活NF- $\kappa$ B、JAK-STAT途径.Janus激酶-信号传导与转录活化因子(JAK-STAT)负责细胞外多肽或细胞因子刺激信号通过跨膜受体的转导,直接作用于细胞核中的基因的启动子序列,不需要第二信使进行转录调节,从进化角度看,从低级的真核细胞到人类,这一信号转导通路都是高度保守的<sup>[13]</sup>.到目前为止,在哺乳动物细胞中共鉴定了7种STAT蛋白,其中STAT3可以被MAPK家族所激活(磷酸化STAT3的丝氨酸-727),说明了MAPK级联与JAK-STAT途径存在着交互作用.Lim et al<sup>[14]</sup>研究说明MEKK1介导了STAT3内的酪氨酸-705和丝氨酸-727的双磷酸化,从而激活了STAT3.Zhou et al<sup>[15]</sup>研究表明Ras通过激活AP-1途径和增加NF- $\kappa$ B转录功能来调节TNF $\alpha$ 趋化因子的表达,而MEKK1对AP-1和NF- $\kappa$ B都具有激活作用.IKK(I $\kappa$ B激酶)是NF- $\kappa$ B激活的一个关键激酶,

IKK 激活后,磷酸化 I $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B 的抑制剂),去除 I $\kappa$ B 对 NF- $\kappa$ B 的抑制,使 NF- $\kappa$ B 易位于核内并引起了免疫反应、病毒感染和凋亡过程中大量基因表达.而瞬时转染活化的 MEKK1 可以磷酸化并激活 IKK,进一步激活 NF- $\kappa$ B.另外 Purcell et al<sup>[16]</sup>还发现 HBV X 蛋白可以不通过 IKK 而激活 NF- $\kappa$ B.

## 2 MEKK1 与慢性病毒性肝炎

凋亡(apoptosis),又称为程序化细胞死亡(programmed cell death, PCD),是多细胞有机体为调控机体发育,维护内环境稳定,由基因控制的细胞主动死亡过程,其形态学特征:细胞核的变化为染色质凝聚、核碎裂;细胞质的变化为细胞质浓缩、细胞器肿胀、膜皱褶、凋亡小体形成.在慢性肝炎病毒致病的过程中,凋亡起着重要的作用.

Boldt et al<sup>[17]</sup>使用 MEKK1 的酶切片段来激活 JNK,用 Raf-1 的 Ras 结合结构域(RBD)来抑制 Ras-ERK 途径,另外还设计了 RBD-MEKK1 融合蛋白来激活 JNK 途径,同时阻断 ERK 途径,他们发现 MEKK1 蛋白以及 RBD 单独都能够减少细胞系的克隆生成,而 RBD-MEKK1 融合蛋白介导凋亡的效率却很低,其原因是 RBD-MEKK1 酶活性较低,运用 Ras 和 Raf-1 的突变形式说明 RBD-MEKK1 融合蛋白酶活性低是由于与 Ras 蛋白的结合. MEKK1 过度表达导致了三个 MAPK 家族 JNK、ERK、p38 的强烈的激活,而通过协同表达 MKK4 的阴性突变形式或是 MEK、p38 的抑制剂都不能阻断凋亡,从而说明 MEKK1 介导的凋亡是通过下调所有的 MAPK 信号途径,而不是激活单独的途径.

凋亡的诱导开始于线粒体上,使其渗透性发生变化从而释放凋亡蛋白进入胞质内,进一步发生凋亡的生化 and 形态学改变. MEKK1 也涉及了这过程, Gibson et al<sup>[18]</sup>通过实验说明了 MEKK1 引起的渗透性改变是因为其开放了渗透性转换孔(PT pore),而抑制 PT 孔的开放和活性氧簇产生可以有效的减少 MEKK1 介导的凋亡.然而, MEKK1 的过度表达却不能引起线粒体释放细胞色素 C 或激活 caspase 9. 既然 Bcl 2 调节了线粒体内的变化并且阻断了 MEKK1 介导的凋亡.他的激活可以介导死亡受体,如 Fas 和死亡受体 4、5 表达的增加,进一步激活转录因子,如 NF- $\kappa$ B,从而导致了 caspase 激活的凋亡. MEKK1 诱导的凋亡涉及了 MEKK1 被剪切为一个 91 kD 的酶片段,依赖于 caspase 3 样的分子. MEKK1 剪切型的过度表达相对于其全长来说更加有利于激活 caspases、介导凋亡. MEKK1 通过 SEK1 激活 SAPK,他被前凋亡蛋白酶 caspase 3 (CPP32)在 D68(DTVD68/G)位点上所剪切,剪切型的 MEKK1 改变了蛋白的分布状态, caspase 3 可以阻断由 Fas 配体激活的 SAPK 和 MEKK1 途径,却不能阻断细胞快速的应激反应,应激因子介导的 SAPK 信号不依赖于 caspase 3 的功能. Deak et al<sup>[19]</sup>认为 MEKK1 的激活存在着两种途径,一种为快速途径,

不依赖于蛋白酶.另一种为慢速激活,涉及了剪切型 MEKK1 的释放和 caspase 3 的激活.

HBV 持续性感染是导致人类肝脏疾病的主要因素之一,并且与原发性肝癌(HCC)明显相关,目前世界约有 4 亿人感染了 HBV. HBV x 基因编码 17 kD(154 aa)的 HBx 蛋白(HBxAg),它具有多种活性,包括反式激活病毒、宿主细胞基因,与 p53 结合,抑制 DNA 的修复,刺激信号转导途径等,在 HBV 致病过程中发挥重要的作用. 凋亡是 HBV 感染导致慢性疾病的重要机制之一. 在病毒复制期间, HBxAg 可以使得细胞对凋亡非常敏感,而不依赖于其他的 HBV 基因. 细胞对于高剂量的肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF $\alpha$ )介导的凋亡的耐受,由于 HBx 的表达而变得非常的敏感. HBxAg 表达可以抑制细胞受到抗-Fas 诱导的 caspase 3 和 8 的活性,抑制线粒体细胞色素 c 的释放. 共沉淀和共聚焦荧光显微图像分析结果表明 HBxAg 与细胞质中含有 MEKK1、SEK1、SAPK、14-3-3 蛋白复合体的共同分布. HBxAg 是一个多功能的蛋白,可以激活 Ras-Raf-MAPK 和蛋白激酶 C 转导途径,延迟性激活 MEKK1/JNK 途径,刺激 RNA 多聚酶 II、III 的转录以及结合、激活一些转录因子,而且 HBx 可以刺激静止细胞进入细胞周期. Su et al<sup>[20]</sup>研究显示 HBxAg 介导的凋亡是通过迟发性激活 N-myc 和 MEKK1 的途径产生的,而不是通过上调肿瘤坏死因子(TNF)受体,抑制 HBx 激活 N-Myc 或 MEKK1 可以使细胞死亡受到阻断.

丙型肝炎病毒(HCV)是一种正链 RNA 病毒,其致病机制与 DNA 病毒和逆转录病毒有明显的区别<sup>[21-23]</sup>. MAPK/ERK 及其介导的细胞内信号转导是 HCV 蛋白作用的重要靶位. HCV 核心蛋白的表达可以激活 ERK 和 p38 MAPK,诱导 MAPK 的磷酸酶 MKP-1 的表达和细胞增生<sup>[24]</sup>. HCV 基因型 1 和 3 的核心蛋白激活 MEK1 和 ERK 1/2 MAPK,在血清饥饿条件下,通过体外激酶测定内源性 Raf-1 和过磷酸化的 ERK 1/2 的免疫检测,发现 HCV 核心蛋白的表达引起 Raf-1 和 MAPK 基础活性增高.此外, ERK 1/2 和下游转录因子 Elk-1 的响应有丝分裂刺激物 EGF 的活性显著延长. HCV 核心蛋白直接激活 MAPK 系统的能力和延长其响应有丝分裂刺激物的活性可能促成 HCV 感染的肝细胞致瘤性转化<sup>[25]</sup>. HCV 可以激活 MAPK 系统,但对于 HCV 直接与 MEKK1 的关系目前研究尚少,需要进一步研究明确.

## 3 参考文献

- 1 Camps M, Nichols A, Arkinstall S. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J* 2000; 14:6-16
- 2 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 丙型肝炎病毒与 MAPK 信号转导系统. *世界华人消化杂志* 2003;11:466-469
- 3 Fanger GR, Gerwins P, Widmann C, Jarpe MB, Johnson GL. MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr Opin Genet* 1997;7:67-74
- 4 Schlesinger TK, Fanger GR, Yujiri T, Johnson GL. The TAO of MEKK. *Front Biosci* 1998;3:D1181-D1186



- 5 Bonvin C, Guillon A, van Bemmelen MX, Gerwins P, Johnson GL, Widmann C. Role of the amino-terminal domains of MEKKs in the activation of NF kappa B and MAPK pathways and in the regulation of cell proliferation and apoptosis. *Cell Signal* 2002;14:123-131
- 6 Kim JW, Lee JE, Kim MJ, Cho EG, Cho SG, Choi EJ. Glycogen synthase kinase 3 beta is a natural activator of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 1 (MEKK1). *J Biol Chem* 2003;278:13995-14001
- 7 Huang J, Tu Z, Lee FS. Mutations in protein kinase subdomain X differentially affect MEKK2 and MEKK1 activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:532-540
- 8 Lu Z, Xu S, Joazeiro C, Cobb MH, Hunter T. The PHD domain of MEKK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2. *Mol Cell* 2002;9:945-956
- 9 Witowsky JA, Johnson GL. Ubiquitylation of MEKK1 inhibits its phosphorylation of MKK1 and MKK4 and activation of the ERK1/2 and JNK pathways. *J Biol Chem* 2003; 278:1403-1406
- 10 Coscoy L, Ganem D. PHD domains and E3 ubiquitin ligases: viruses make the connection. *Trends Cell Biol* 2003;13:7-12
- 11 Christerson LB, Gallagher E, Vanderbilt CA, Whitehurst AW, Wells C, Kazempour R, Sternweis PC, Cobb MH. p115 Rho GTPase activating protein interacts with MEKK1. *J Cell Physiol* 2002;192:200-208
- 12 Gallagher ED, Xu S, Moomaw C, Slaughter CA, Cobb MH. Binding of JNK/SAPK to MEKK1 is regulated by phosphorylation. *J Biol Chem* 2002;277:45785-45792
- 13 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 丙型肝炎病毒与 JAK-STAT 信号转导系统. *世界华人消化杂志* 2003;11:464-466
- 14 Lim CP, Cao X. Regulation of Stat3 activation by MEK kinase 1. *J Biol Chem* 2001;276:21004-21011
- 15 Zhou L, Tan A, Iasovskaia S, Li J, Lin A, Hershenon MB. Ras and mitogen-activated protein kinase kinase-1 coregulate activator protein-1- and nuclear factor- $\kappa$ B-mediated gene expression in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28:762-769
- 16 Purcell NH, Chenfei Yu C, He D, Xiang J, Paran N, DiDonato JA, Yamaoka S, Shaul Y, Lin A. Activation of NF- $\kappa$ B by hepatitis B virus X protein through an I $\kappa$ B kinase-independent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G669-G677
- 17 Boldt S, Weidle UH, Kolch W. The kinase domain of MEKK1 induces apoptosis by dysregulation of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res* 2003;283:80-90
- 18 Gibson EM, Henson ES, Villanueva J, Gibson SB. MEK kinase 1 induces mitochondrial permeability transition leading to apoptosis independent of cytochrome c release. *J Biol Chem* 2002;277:10573-10580
- 19 Deak JC, Cross JV, Lewis M, Qian Y, Parrott LA, Distelhorst CW, Templeton DJ. Fas-induced proteolytic activation and intracellular redistribution of the stress-signaling kinase MEKK1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5595-5600
- 20 Su F, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8744-8749
- 21 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因区结合蛋白的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:223-225
- 22 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:213-215
- 23 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. *世界华人消化杂志* 2001;9:1379-1383
- 24 Erhardt A, Hassan M, Heintges T, Haussinger D. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. *Virology* 2002;292:272-284
- 25 Giambartolomei S, Covone F, Levrero M, Balsano C. Sustained activation of the Raf/MEK/Erk pathway in response to EGF in stable cell lines expressing the Hepatitis C Virus (HCV) core protein. *Oncogene* 2001;20:2606-2610

## 乙型和丙型肝炎病毒与转录因子 ATF-2 的调节

王春花, 成军, 郎振为, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕

王春花, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

郎振为, 首都医科大学佑安医院病理科 北京市 100045

国家自然科学基金项目, No. C39970674, No. C03011402, 军队“九、五”科技攻关项目 No.98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-24 接受日期: 2003-07-16

王春花, 成军, 郎振为, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕. 乙型和丙型肝炎病毒与转录因子 ATF-2 的调节. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):165-168

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/165.asp>

### 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)的感染, 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌(HCC)的发生密切相关. 虽然 HBV 和 HCV 感染与 HCC 之间的关系已经得到确定, 但是要阐明其具体的分子生物学机制还有许多工作要做. 由于肝炎病毒可以影响细胞信号转导, 引起细胞的病变及恶性转化<sup>[1]</sup>, 而激活转录因子-2 (activating transcription factor-2, ATF-2) 是重要的细胞信号转导途径中的转录因子, 因此深入研究二者的相互关系对肝炎病毒的发病机制会有进一步的了解.

### 1 ATF-2 的结构和功能特点

1.1 碱性-亮氨酸拉链 ATF-2 是具有碱性-亮氨酸拉链结构的 ATF/CREB 家族的一种活性转录因子. 碱性-亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP) 家族结构的特点是蛋白质分子的肽链上每隔6个氨基酸就有一个亮氨酸残基, 结果就导致这些亮氨酸残基都在  $\alpha$  螺旋的同一个方向出现. 两个相同结构的两排亮氨酸残基就能以疏水键结合成二聚体, 该二聚体的另一端的肽段富含碱性氨基酸残基, 借其正电荷与 DNA 双螺旋链上带负电荷的磷酸基团结合. 若不形成二聚体则对 DNA 的亲合和结合力明显降低. 亮氨酸拉链是最简单的二聚作用界面之一. 它能够介导有高度选择性的, 非常重要的蛋白质结合作用. 他最早是作为 C/EBP 和 GCN4 中的序列模体以及许多转录因子相互作用的界面而被鉴定和认识的.

这些蛋白质可以识别两类 DNA 元件: AP-1/TRE 和 ATF/CRE 序列模体. AP-1/TRE 元件有保守的 TGACTCA, 他是一个拟二元对称. 与这个位点结合的蛋白质包括 Fos 和 Jun 家族, 他们可以被促进有丝分裂的、诱导分化的和神经原专一的刺激所诱导. 但是, 来自活

性转录因子(ATF)家族,和来自与cAMP响应元件(CRE)结合的蛋白质(CREB)家族的转录因子虽然也有亮氨酸拉链,却不与DNA中的AP-1结合位点相互作用,而与DNA序列中的ATF/CRE元件结合,其含有TGACGTCA保守序列,他是一个二元对称.与这个位点结合的蛋白质基因的表达与cAMP、钙和病毒所诱导的反应有关.不仅如此,这两个家族之间的成员还可以通过亮氨酸拉链相互作用,形成混合的异源二聚体.可是,这些异源二聚体却又有完全不同的DNA结合专一性.比如,ATF-4与Fos/Jun形成的二聚体优先结合CRE.这可以解释为什么Fos/Jun也有一定的CRE结合活性.所以,由于细胞内各种组分的数量、比例和他们相互作用形成的异源二聚体等的差别,就可以在细胞核内造成非常复杂的基因表达调节格局,并在各种信号转导通路之间形成自由对话的局面.

**1.2 ATF家族** ATF是一种参与许多腺病毒E1A和cAMP诱导的启动子转录调节的细胞转录因子,这是一类与DNA结合特异性和免疫交叉反应性相关的蛋白质家族<sup>[2]</sup>. Horikoshi et al<sup>[3]</sup>发现ATF能通过结合到大量上游启动子和增强子元件而促进腺病毒E4启动子的转录. DNA酶印迹分析表明当ATF和TFIID(哺乳动物TATA相关因子)同时结合到启动子上时能发生协同作用,而促进RNA聚合酶II和普通转录起始因子TFIIB和TFIIE对启动子的识别.并且即使ATF从该完整的前起始复合物上解离后,TFIID和其他的普通转录因子的复合物也是稳定的.该实验表明ATF是TFIID的直接靶目标,这种相互作用有利于完整的转录前起始复合物的组装,并且ATF的作用是瞬时的.

ATF/CREB都可以结合到CRE元件上,区别在于磷酸化激活机制不同. CREB在将细胞外刺激所诱发的细胞内信号传入细胞核的过程中起着重要的作用.细胞外的信号(配体)与细胞表面的信号接受装置-受体相互作用,激活了AMP环化酶,使细胞内cAMP的量大为增加. cAMP与蛋白激酶A(PKA)的调节亚基结合,PKA的催化亚基则将向细胞核移行的CREB蛋白磷酸化.这时,CREB的第133位丝氨酸残基被磷酸化,CREB也因而活化,并促使他的靶基因表达<sup>[4-7]</sup>.而ATF则还需要其他的胞质蛋白激酶的磷酸化作用.

早在1988年Lin et al<sup>[8]</sup>认为ATF在体内可被两种明显不相关的诱导物所诱导:腺病毒E1a蛋白和cAMP. ATF可作为E1a和cAMP信号传导通路中的一个环节而参与许多E1a和cAMP诱导的启动子的转录表达.而后1990年Liu et al<sup>[9]</sup>进一步研究了E1a的作用机制,发现E1a蛋白包含转录激活域当结合到启动子上时就能发挥作用,但是E1a不是一种序列特异性DNA结合蛋白,许多病毒早期启动子都有一个或多个ATF家族的结合位点,E1a就是通过与特异性ATF蛋白即ATF-2作用而将其激活域定位于病毒启动子上进而调节基因的表达.

**1.3 ATF-2的结构和功能** ATF-2分子量为54.5 kD,作

为ATF/CREB家族中的一员,同样具有碱性-亮氨酸拉链结构,以同型二聚体或异源二聚体的形式结合到CRE元件上<sup>[10]</sup>,所以又称为CRE结合蛋白-1(CRE-binding protein-1, CRE-BP1),在埃希氏大肠杆菌中表达的CRE-BP1不仅可以结合到生长抑素和纤维连接蛋白基因的CRE元件上,还可以结合到腺病毒E4基因的CRE元件上,这也暗示着CRE-BP1与腺病毒的转录因子ATF是不可区分的<sup>[11]</sup>. ATF-2在细胞广泛表达但在脑组织中含量最高<sup>[12]</sup>.

ATF-2包含两个功能结构域,氨基端反式激活域和羧基端DNA结合域. DNA结合域中具有碱性亮氨酸拉链基序;反式激活域又分为两个亚区:氨基端亚区具有与通常存在于DNA结合域中知名的锌指基序相似的结构,包含一个反平行的 $\beta$ -片层和一个 $\beta$ -螺旋. 锌原子四周并列着两个半胱氨酸和两个组氨酸残基<sup>[13]</sup>. 羧基端亚区呈现高度灵活的无序结构,包含两个能被SAPK(stress-activated protein kinases)磷酸化的苏氨酸位点,当ATF-2特异性结合到靶蛋白上时,其可能会发生构象的改变.

Livingstone et al<sup>[14]</sup>在Liu et al<sup>[9]</sup>实验的基础上设计了蛋白缺失实验发现ATF-2的氨基端对于ATF-2与E1a之间的相互作用是必不可少的;并且在缺少E1a的情况下,当与异源DNA结合域融合后,ATF-2的氨基端仍能激活转录.在完整蛋白中此激活结合域被遮盖了.激活所必需的氨基端残基对于介导E1a的刺激也是必需的,特别是69和71位的两个苏氨酸残基必不可少,这些残基在体内、外都可被MAPK家族的JNK/SAPK亚家族有效地磷酸化. ATF-2可通过氨基端不同磷酸化位点的结构域结合到UV诱导激酶,这个结合域对于体外JNK/SAPK的磷酸化和体内的转录激活都是必需的. UV的辐射激活了JNK/SAPK信号传导通路,进而促进了氨基端的活性.由此推测尽管ATF-2能结合到E1a蛋白上,但氨基端的激活域对于这种结合是不起作用的, E1a本身具有激活域,其与ATF-2的结合只是借助其DNA结合域定位于启动子上而发挥其激活作用. ATF-2与DNA结合蛋白ATF/CREB家族的其他成员一样,其激活域是通过特定的信号传导途径来调节的.

关于ATF-2参与的特殊的信号传导途径已有陆续的报道. Shuman et al<sup>[15]</sup>研究报道ATF可在肝组织中表达并且其特定碱基被MAPK/P38, MAPK/JNK磷酸化后表现出明显增加的DNA结合和转录活性. Sano et al<sup>[16]</sup>也报道ATF-2是转化生长因子(TGF)介导的两条信号传导途径的共同靶位;经典的TGF-Smad途径中, Smad3和Smad4形成异源二聚体,此复合物经由Smad蛋白的MH1结构域与ATF-2的亮氨酸拉链区域相结合并激活ATF-2的转录活性.此外还发现TGF通过激活TGF激活激酶-1(TAK-1)(此为MAPKKK家族中的一员)激活MAPK/P38而间接磷酸化ATF-2.认为在TGF介导的Smad和Tak-1两条信号传导途径中ATF-2作为一种共

同的靶目标而发挥重要作用。

MAPK 家族是一种丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶家族, 其通过磷酸化 ATF-2 的特定碱基而激活其转录活性, 作用于靶基因, 引起转录响应。但 ATF-2 在 MAPK 信号调节和细胞增生过程中的作用知之较少, Crowe et al<sup>[17]</sup> 在此方面作了深入研究, ATF-2 在人类肝癌细胞系中过量表达, 能抑制细胞周期中 G1/S 期的转换, 降低细胞的增生速率; 减弱的增生与细胞周期有关, 并且不依赖于 MAPK/ERK1 的表达抑制。遗传学和药理学均表明 ERK1 活性抑制足以修复 ATF-2 在细胞周期进程和细胞增生中的作用。该研究发现在肝癌细胞增生中 ATF-2 具有新的功能, 并且暗示存在一种可能的反馈机制调节 MAPK 信号传导途径。

Woo et al<sup>[18]</sup> 认为 ATF-2 不仅参与了大量的细胞内信号传导途径, 还猜测作为一种抑癌蛋白发挥作用。他们发现 ATF-2 基因存在于人类 2q32 染色体上, 此区域也是人类肺癌 LOH 共同的定位区域。在成神经细胞瘤和肺癌中, 在 2q 染色体上可以检测到 LOH 表现出高发生率; 并且 ATF-2 基因变异的杂合鼠中肺癌的发生率较高。受此启发猜测 ATF-2 基因可能作为一种候选的 2q 染色体上抑癌基因而在人类致癌机制中发挥作用。经深入研究发现 ATF-2 基因不是 2q 染色体上主要的抑癌基因, 但可能 ATF-2 突变参与了一小亚类肺癌的发生。

## 2 乙型肝炎病毒与 ATF-2 的关系

乙型肝炎病毒的慢性感染是引发肝细胞癌的主要危险因素, HBV 诱导细胞恶性的发病机制还未完全弄清。HBV 基因组的 X 开放读码框(ORF)编码一条 145-154 个氨基酸残基的蛋白, 分子量 17 kD 左右。乙型肝炎病毒 X 蛋白(HBxAg) 对于土拨鼠的嗜肝病毒感染和其他哺乳动物嗜肝 DNA 病毒在体内复制是必不可少的。HBxAg 对多种增强子及启动子有反式激活作用。

自从 1987 年 Spandua et al<sup>[19]</sup> 报告了 HBxAg 的表达能反式激活劳氏肉瘤病毒(RSV)和 SV40 中的氯霉素乙酰转移酶(CAT)报告基因以来, 很多实验室很快证实了 HBxAg 对多种同源或异源病毒或细胞的基因转录调节区有反式激活作用, 如 HBV 增强子 / 核心启动子、S 基因启动子, SV40 的增强子及早期启动子, 单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶(HSV-TK)启动子; 人 T 淋巴细胞 I 型病毒(HTLV-1)的长末端重复序列(LTR)、人免疫缺陷病毒 I 型(HIV-1)、RSV 及  $\beta$ -干扰素等的启动子。HBxAg 也可反式激活聚合酶(pol)I、II、III 启动子<sup>[20, 21]</sup>, 很多顺式作用元件也随之被报道与 X 蛋白有相互作用, 被定义为 X 应答元件(XRE), 包括 AP-1、AP-2、c/EBP $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、SRF、BP、Ets、ATF1 及 CREB。HBxAg 可以作为转录的反式激活因子, 也可以与其他反式激活因子相互作用而起作用<sup>[22-24]</sup>。bZip 家族、Egr1 的反式激活因子都被报道与 HBxAg 有结合作用。

HBxAg 虽然没有对基本转录起作用, 但他能激活

转录; 但其对启动子的选择机制不清楚, pX 不能独立结合到核酸分子上, HBxAg 可能需要一系列的转录激活因子才能发挥其协同转录激活因子的作用。Haviv et al<sup>[25]</sup> 提出一种可能的解释, HBxAg 一旦加入转录作用, 就可与一些反式激活因子如 bZip 家族相互作用。

Williams et al<sup>[26]</sup> 证实了这种猜测, 通过设计体外重组蛋白和 DNA 结合试验探讨了 CREB/ATF 与 pX 蛋白 - 蛋白相互作用的机制, 报道发现 pX 能与 CREB/ATF 家族的碱性亮氨酸拉链区域相结合, 而非酵母反式激活蛋白 Gal4 的 DNA 结合域, 虽然这种结合不能改变 CREB/ATF 形成二聚体的速率, 但能增加 CREB/ATF 与 CRE 元件的亲合性, 在 pX 转染 PC12 细胞系时, 受叉头蛋白刺激后生长抑素启动子的转录活性增加 15 倍, 这个结果有力支持了 X-CREB/ATF 蛋白 - 蛋白相互作用具有重要意义的观点。

进一步的研究<sup>[27]</sup> 发现 pX 不但能增加 ATF 的亲合性还能与细胞内转录因子 CREB 和 ATF-2 形成蛋白 - 蛋白复合物并能改变他们的 DNA 结合特异性。尽管单独的 CREB 和 ATF-2 不能结合到 HBV 增强子上, 但 pX-CREB 或 pX-ATF-2 复合物却能结合到 HBV 增强子元件上。因此, pX 通过与细胞因子相互作用而拓宽了这些调节蛋白的 DNA 结合的特异性, 并且为 pX 提供了一条能参与转录调节的机制, 该结论提供了一种在病毒感染时被转录因子调控了的基因修复策略, 即可通过改变其 DNA 结合的特异性来实现。

pX 与 ATF-2<sup>[28]</sup> 相互作用是 pX 在体内许多重要反式作用机制的重要途径之一。例如, 磷酸烯醇丙酮酸羧基激酶(PEPCK) 基因就受到 pX 经由两个不同的启动子区域而调节其转录水平, 其中之一就是通过 pX 与 C/EBP $\alpha$  和 ATF-2 相互作用形成复合物而作用于近端启动子的 cAMP 反应元件位点(CRE-1), 从而介导了 PEPCK 基因的反式激活。

## 3 丙型肝炎病毒与 ATF-2 的关系

丙型肝炎病毒基因组含有单一的开放读码框架, 编码 3 010-3 033 个氨基酸残基的多肽前体, 两侧是 5' - 非翻译区及 3' - 非翻译区。多肽前体至少被加工为十种结构蛋白和非结构蛋白, 其中核心区(1-573 nt)编码的 21 kD HCV 核衣壳蛋白(191 aa)是一种多功能蛋白质, 在 HCV 致病过程中可能起着重要的作用<sup>[29-30]</sup>, 最近研究发现其与 HCV 感染后脂肪肝的形成有一定关系<sup>[31-33]</sup>。

HCV 核衣壳蛋白可以与许多病毒和细胞内的蛋白和启动子相互作用, 其与 ATF-2 作用机制也有相关报道。Erhardt et al<sup>[34]</sup> 利用四环素调节系统创建了 HepG2 Tet-off 细胞系来研究全长的(191 aa)和氨基端截短型(160 aa)核衣壳蛋白的表达调节。在该系统中 HCV 核心蛋白的表达激活 MAPK 家族的 3 个亚族 ERK, JNK 和 p38 激酶, 诱导 MAP 激酶磷酸酶(MKP-1)的表达, 促进了细胞的增生。此过程伴随着 c-Jun 和 ATF-2 的激活, 而不是 E1k-1 和 c-Fos。并且全长型和氨基端截短型核衣壳蛋白作用类似。

## 4 参考文献

- 1 成军. 肿瘤相关基因. 第1版. 北京: 北京医科大学出版社, 1999: 29-60
- 2 Hai TW, Liu F, Allegretto EA, Karin M, Green MR. A family of immunologically related transcription factors that includes multiple forms of ATF and AP-1. *Genes Dev* 1988;2:1216-1226
- 3 Horikoshi M, Hai T, Lin YS, Green MR, Roeder RG. Transcription factor TF interacts with the TATA factor to facilitate establishment of a preinitiation complex. *Cell* 1988;54:1033-1042
- 4 Gonzalez G A, Yamamoto KK, Fisher WH, Karr D, Menzel P, Biggs W, Vale WW, Montminy MR. A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature* 1989;337:749-752
- 5 Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL, Habener JF. Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science* 1988;242:1430-1433
- 6 Montminy MR, Bilezikjian LM. Binding of a nuclear protein to the cyclic AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 1987;328:175-178
- 7 Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH, Montminy MR. Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficiency of nuclear factor CREB. *Nature* 1988;334:494-498
- 8 Lin YS, Green MR. Interaction of a common cellular transcription factor, ATF, with regulatory elements in both E1a and cyclic AMP-inducible promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:3396-3400
- 9 Liu F, Green MR. A specific member of the ATF transcription factor family can mediate transcription activation by the adenovirus E1a protein. *Cell* 1990;61:1217-1224
- 10 Hai T, Liu F, Coukos WJ, Green MR. Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes Dev* 1989;3:2083-2090
- 11 Maekawa T, Sakura H, Kanei-Ishii C, Sudo T, Yoshimura T, Fujisawa J, Yoshida M, Ishii S. Leucine zipper structure of the protein CRE-BP1 binding to the cyclic AMP response element in brain. *EMBO J* 1989;8:2083-2090
- 12 Takeda J, Maekawa T, Sudo T, Seino Y, Imura H, Saito N, Tanaka C, Ishii S. Expression of the CRE-BP1 transcriptional regulator binding to the cyclic AMP response element in central nervous system, regenerating liver, and human tumors. *Oncogene* 1991;6:1009-1014
- 13 Nagadoi A, Nakazawa K, Uda H, Okuno K, Maekawa T, Ishii S, Nishimura Y. Solution structure of the transactivation domain of ATF-2 comprising a zincinger-like subdomain and a flexible subdomain. *J Mol Biol* 1999;287:593-607
- 14 Livingstone C, Patel G, Jones N. ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J* 1995;14:1785-97
- 15 Shuman JD, Cheong J, Coligan JE. ATF-2 and C/EBPalpha can form a heterodimeric DNA binding complex in vitro. Functional implications for transcriptional regulation. *J Biol Chem* 1997;272:12793-12800
- 16 Sano Y, Harada J, Tashiro S, Gotoh-Mandeville R, Maekawa T, Ishii S. ATF-2 is a common nuclear target of smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 1999;274:8949-8957
- 17 Crowe DL, Shemirani B. The transcription factor ATF-2 inhibits extracellular signal regulated kinase expression and proliferation of human cancer cells. *Anticancer Res* 2000;20:2945-2949
- 18 Woo IS, Kohno T, Inoue K, Ishii S, Yokota J. Infrequent mutations of the activating transcription factor-2 gene in human lung cancer, neuroblastoma and breast cancer. *Int J Oncol* 2002;20:527-531
- 19 Spandau DF, Lee CH. Transactivation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J Virol* 1988;62:427-434
- 20 Aufiero B, Schneider RJ. The hepatitis B virus X-gene product transactivates both RNA polymerase II and III promoters. *EMBO J* 1990;9:497-504
- 21 Twu JS, Robinson WS. Hepatitis B virus X gene can transactivate heterologous viral sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86: 2046-2052
- 22 Seto E, Mitchell PJ, Yen TS. Trnsactivation by the hepatitis B virus X protein depends on AP-2 and other transcription factors. *Nature* 1990;344:72-74
- 23 Faktor O, Budlovsky S, Ben-Levy R, Shaul Y. A single element within the hepatitis B virus enhancer binds multiple protein and resonda to multiple stimuli. *J Virol* 1990;64:1861-1863
- 24 Wang HD, Trixedi A, Johnson DL. Regulation of RNAPolymerase I-dependent promoters by the hepatitis B virus X protein via activated Ras and TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* 1998;18: 7086-7094
- 25 Haviv I, Shamay M, Doitsh G, Shaul Y. Hepatitis B virus pX targets TFIIBin transcription coactivation. *Mol Cell Biol* 1998; 18:1562-1569
- 26 Williams JS, Andrisani OM. The hepatitis B virus X protein targets the basic region-leucine zipper domain of CREB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3819-3823
- 27 Maguire HF, Hoeffler JP, Siddiqui A. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science* 1991;252:842-844
- 28 Kong HJ, Hong SH, Lee MY, Kim HD, Lee JW, Cheong J. Direct binding of hepatitis B virus X protein and retinoid X receptor contributes to phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transactivation. *FEBS Lett* 2000;483:114-118
- 29 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1997:37-42
- 30 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 31 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白 AI 结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 32 成军, 任进余, 李莉, 陆志樑, 李克, 洪源, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. 世界华人消化杂志 2002;10:1022-1026
- 33 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健. 丙型肝炎病毒蛋白与脂蛋白之间的相互作用. 世界华人消化杂志 2002;10:1030-1032
- 34 Erhardt A, Hassan M, Heintges T, Haussinger D. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. *Virology* 2002;292:272-284

## 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒与增生细胞核抗原的关系

纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕

纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕. 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

国家自然科学基金项目, No. C39970674, No. C03011402, 军队“九、五”科技攻关项目 No.98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038 项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-24 接受日期: 2003-07-16

纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒与增生细胞核抗原的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(1):168-171

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/168.asp>

## 0 引言

增生细胞核抗原(proliferation cell nuclear antigen, PCNA)位于真核细胞中,为一环形发夹样蛋白结构,与复制因子和细胞周期蛋白 p21(Cip1/Waf1)相互作用,是DNA延长的“分子开关”。他不仅对于DNA的复制,而且对于细胞的许多功能都是必需的,因此对于PCNA调节DNA复制及阐明蛋白相互作用的确切机制的理解是非常重要的。

### 1 增生细胞核抗原的结构特点

PCNA是一种酸性蛋白质,含有216个氨基酸残基(aa),环形结构,由3个亚单位组成,每个亚单位由2个结构域组成。PCNA存在于细胞核中,是DNA聚合酶 $\delta$ 的辅助蛋白。PCNA基因存在6个外显子,定位于第20号染色体。PCNA基因的表达与细胞的增生状态相关,其启动子序列包含了一些转录因子的结合位点,其转录由一定数量的生长因子所刺激,所以在静止期细胞内PCNA的表达水平很低<sup>[1-2]</sup>。PCNA蛋白是增生细胞合成DNA所必需的核蛋白,在细胞增生周期的G1后期表达,并开始升高,G1/S期交界处表达为高峰,S期持续高水平,G2期明显下降。

环形发夹结构蛋白存在于所有生物体中,在原核生物中称之为 $\beta$ 发夹,在真核生物中称之为PCNA。虽然二者存在着不同,并且缺乏其序列同源性的检测,但二者功能上很相似,都可以围绕在DNA周围,并沿DNA滑动,使DNA复制得以快速进行。细胞中的PCNA有可溶性和不可溶性两种形式,后者是DNA复制所必需的<sup>[3]</sup>。PCNA与DNA多聚酶 $\delta$ 、 $\epsilon$ 相互作用,在染色体复制中发挥作用<sup>[4]</sup>。通过对PCNA与p21(Cip1/Waf1)复合体的研究,发现PCNA不仅仅与DNA相互作用,而且还与蛋白相互作用,这个相互作用具有一种复制中的调节角色,因为p21阻断了PCNA的作用<sup>[5-8]</sup>。

很长时间内,PCNA的功能被描述为保持DNA多聚酶与DNA相黏附的发夹样作用,并且在DNA复制过程中加速DNA合成的速度。但之后大量研究都报道了PCNA可以与许多蛋白结合,这些蛋白在细胞周期控制、DNA复制、核苷酸切除修复、复制后的错配修复、碱基切除修复、凋亡以及胞核嘧啶甲基化等过程中起作用。这些蛋白包括:多聚酶 $\beta$ 、发夹负荷体复制因子C(RFC)、结构特异性核酸内切酶Fen1、细胞周期蛋白激酶抑制因子p21、DNA连接酶I、人DNA-(胞嘧啶-5)甲基转移酶(MCMT)、核苷酸切除修复核酸内切酶XPG、DNA错配修复蛋白MSH3、MSH6、PMA2、hMYH、染色质集合因子1(CAF-1)、MyD118等<sup>[9-11]</sup>,提示了PCNA在核苷酸切除修复、错配修复、碱基切除修复以及在冈崎片段的成熟或是在包括了5'-末端修剪或DNA缺口填补的过程中起作用。

PCNA蛋白是决定细胞生存与否的重要分子。PCNA基因由p53诱导,在决定细胞命运的过程中,PCNA蛋

白与p53控制蛋白Gadd45、MyD118、CR6以及最重要的p21相互作用。如果细胞中PCNA蛋白过多而P53缺乏时,DNA开始复制。另一方面,如果细胞中P53存在并且PCNA蛋白水平高,DNA修复开始。如果PCNA蛋白无功能或者是量的缺少,就发生凋亡<sup>[12]</sup>。

在高级真核生物中,碱基切除修复可以通过两个途径进行:DNA多聚酶 $\beta$ 依赖途径和PCNA依赖途径。Matsumoto et al<sup>[13]</sup>使用6个人类纯化蛋白重新构建了PCNA依赖的无嘌呤嘧啶位点(AP site)修复反应,这些蛋白包括AP核酸内切酶、复制因子C(RFC)、PCNA、Pen1核酸内切酶、DNA多聚酶 $\beta$ (pol $\beta$ )和DNA连接酶I。在这一体系中,修复反应过程中核苷酸替换数目大约为2个。PCNA能够直接与RFC、pol $\beta$ 、Fen1和DNA连接酶I相互作用。PCNA作为分子衔接子将这些因子带到DNA修复位点。

从原核生物到真核生物的进化过程包含了PCNA从简单的DNA多聚酶复合体中的环形发夹蛋白转变为一种控制细胞关键性发展途径的执行分子的过程。多细胞有机体的进化导致了多细胞过程的发展,如分化、衰老和凋亡。PCNA在单细胞生物中已经是必需的蛋白,在多细胞生物体的生存中也是关键性蛋白。

### 2 PCNA与肝脏疾病

PCNA为细胞增生特征性蛋白。核分裂相一直是组织学上研究细胞增生活性的基本方法,PCNA免疫组化染色方法为疾病机制的研究及临床诊断提供了一个相当客观、可信的指标<sup>[14]</sup>。

**2.1 PCNA对于慢性肝炎发病机制的意义** 慢性肝炎的一个主要的组织形态学上的特点就是由大量肝细胞坏死以及与之相关的肝细胞增生所致的肝细胞再生。Han et al<sup>[15]</sup>通过PCNA标记指数(PCNA-LI)的免疫组织化学技术和电子显微镜技术进行了研究多种乙型肝炎患肝细胞的增生活性的试验,结果说明具有AFH(囊泡形成肝细胞)的重型肝炎患者的增生活性明显下降,提示了增生活性的差异与肝细胞坏死和AFH有关,有助于进一步研究慢性肝炎的发病机制。

**2.2 PCNA对肝细胞癌(HCC)的意义** PCNA是细胞周期G1/S相合成的细胞核蛋白,与细胞增生活性有关。最近发现,HCC的PCNA研究有病理和临床意义,而且与癌基因有关。(1)病理意义:PCNA-LI与肝癌大小、组织学分级、核分裂相计数和转移密切相关,提示PCNA可能是反映肝癌侵袭能力的一项重要指标,对肝癌转移和预后有着辅助意义。Ikeguchi et al<sup>[16-17]</sup>研究表明,肿瘤细胞的增生活性与肿瘤细胞的分化及预后密切相关。肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,对癌细胞增生活性的评价对临床有指导意义。(2)临床应用:Donato et al<sup>[18]</sup>对208例代偿期肝硬化患者的随访观察,并进行腹部B超及血清甲胎蛋白(AFP)检查,以及肝活检标本进行PCNA检测,经长期观察及统计学分析后得出结果,代

偿期肝硬化患者可以进展为肝细胞肝癌. 通过肝细胞的增生状态(通过 PCNA 标记指数, PCNA-L)可进行可靠的预测.(3)与癌基因的关系: 资料表明<sup>[19]</sup>, HCC 中 PCNA 与 p53 基因表达密切相关. p53 是最常见的抑癌基因之一, 具有阻断细胞增生引起细胞凋亡的作用, p53 与 DNA 有很高的亲和力或能抑制 DNA 的复制, 或能阻断各种生长因子基因的转录, 或能激活抗增生基因的翻译, 从而限制细胞增生, 起抑制作用. p53 在多种肿瘤中存在基因突变, 被认为是多基因变化的基础. 野生型 p53 抑制细胞转化, 是一种抑癌基因, 而突变型 p53 则诱使细胞转化、癌变, 与恶性肿瘤的进展和预后有明显关系. 突变型 P53 或野生型 P53 蛋白形成复合体, 使结合 DNA 的能力减弱, 或由于 P53 本身构象改变获得一种新的功能, 或中和了少量野生型 P53 的负调节作用, 最终引起细胞生长失控与转化. 肝癌中 P53 阳性率显著增高, 并与癌分化相关, 一般认为 p53 基因在不同外显子的不同方式的突变和突变型 P53 蛋白在组织中的表达是一致的. p53 基因在肝硬变时期可发生突变, P53 蛋白和 PCNA 的过量表达在肝硬变的增生结节向 HCC 发展的过程中起着重要的作用, 与肝细胞的异常增生和癌变有关, 在 HCC 发展的早期阶段是重要的分子生物学标记. 总之, PCNA 与 HCC 的发生、分化、大小、侵袭、复发和预后等密切相关, 且与原癌基因的表达和抑癌基因突变呈正相关, 提示深化研究 PCNA 有可能在 HCC 防治上取得重大进展.

2.3 PCNA 对于肝母细胞瘤(hepatoblastoma, HB)的意义  
肝母细胞瘤是小儿常见的胚胎性肝脏恶性肿瘤. 近年来随着分子生物学的发展, 对肿瘤的发生机制有了新的认识. 大量研究资料表明正常细胞内基因组在外来因素的参与下发生改变, 原癌基因被激活和(或)抑癌基因失活, 细胞生长发育的正负调控、平衡发生紊乱, 最终导致细胞癌变. 现已发现多种基因与原发性肝细胞癌的发生、发展关系密切, 有研究提示了肝母细胞瘤细胞的 PCNA 表达明显强于对照组, 其阳性细胞也仅分布在肝窦髓外造血细胞及中央静脉周围肝细胞, 表明在肝母细胞瘤中细胞增生能力明显增强. 在 P53 蛋白阳性者中 PCNA 的强阳性明显增高, 也说明突变型 P53 抑制细胞增生能力减弱, 使细胞获得增生和分裂的优势, 细胞分化越差, 细胞增生能力越强, 预后越差. 野生型 P53 属抑癌基因, 突变型 P53 抑制细胞增生能力减弱, 使细胞向恶性转化, P53 蛋白阳性表达间接反应 P53 基因突变. 肝母细胞瘤的发生、发展与 p53 基因突变有关. 在混合型中间叶性肿瘤成分的阳性表达也提示其具有多向分化的恶性潜能. PCNA 的合成和表达与细胞增生能力相平行. 故在肝母细胞瘤中检测 P53 蛋白及 PCNA 作为判断肿瘤细胞的生物学行为具有一定的实用价值<sup>[20]</sup>.

### 3 PCNA 与肝炎病毒的关系

可以引起慢性疾病的肝炎病毒主要为乙型肝炎病毒(HBV)

及丙型肝炎病毒(HCV). 其中以丙型肝炎病毒感染更易转为慢性过程, 之后再进一步发展为肝硬化、肝细胞肝癌. 由于其高流行性、隐匿的病程和持续感染的诊断不足使得其成为严重的医学和社会经济学问题. 其致病机制及诊断、治疗都是研究热点. PCNA 蛋白定位于细胞核, 是评价细胞增生的指标. 由于肝硬化是肝细胞、纤维支架增生所致, 肿瘤的发生和细胞异常增生密切相关, 而且肿瘤的恶性程度也主要是由肿瘤细胞的增生活性决定的, 故明确 PCNA 与肝炎病毒之间的关系非常重要.

HBV 复制与肝细胞增生、分化的相互关系在 HBV 感染致病机制上有着重要作用. Ozer et al<sup>[21]</sup>进行了评价肝细胞增生对 HBV 复制效应的研究, 结果显示了在肝细胞内 HBV DNA 与 PCNA 成负相关, HBV 的复制具有细胞周期依赖性, 这也支持了在静止期肝细胞病毒复制增加的观念, 这也可以解释在细胞再生过程中病毒复制减少的机制.

HCV 核心蛋白在其致癌作用中具有重要作用. Wang et al<sup>[22]</sup>研究显示核心蛋白可与 p21Waf1/Cip1/Sdi1(p21)细胞周期调节剂形成复合体, 核心蛋白的氨基端(24-52 aa)与 p21 的羧基端(139-164 aa)参与了复合体的形成. p21 在其 147、149 和 150 残基的点突变可以减弱 p21 与 PCNA 的作用, 但这并不影响复合体的形成, 这可以将核心结合序列与 PCNA 结合序列相区别. 由于核心蛋白、PCNA 与 p21 的结合位点非常接近, 所以核心蛋白与 PCNA 可以竞争性 p21 相互作用. 核心蛋白与 p21 的独特性相互作用可以提供研究 HCV 致病机制的新方向.

### 4 参考文献

- 1 Oku T, Ikeda S, Sasaki H, Fukuda K, Morioka H, Ohtsuka E, Yoshikawa H, Tsurimoto T. Functional sites of human PCNA which interact with p21 (Cip1/Waf1), DNA polymerase delta and replication factor C. *Genes Cells* 1998;3:357-369
- 2 Bruck I, O'Donnell M. The ring-type polymerase sliding clamp family. *Genome Biol* 2001;2:3001
- 3 Bravo R, Macdonald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 1987;105:1549-1554
- 4 Waga S, Stillman B. The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 1998;67:721-751
- 5 Kelman Z, Hurwitz J. Protein-PCNA interactions: a DNA-scanning mechanism? *Trends Biochem Sci* 1998;23:236-238
- 6 Flores-Rozas H, Kelman Z, Dean FB, Pan ZQ, Harper JW, Elledge SJ, O'Donnell M, Hurwitz J. Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8655-8659
- 7 Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994;369:574-578
- 8 Lopez de Saro FJ, O'Donnell M. Interaction of the beta sliding clamp with MutS, ligase, and DNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:8376-8380
- 9 Shibahara K, Stillman B. Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* 1999;96:575-585
- 10 Jonsson ZO, Hindges R, Hubscher U. Regulation of DNA repli-



- cation and repair proteins through interaction with the front side of proliferating cell nuclear antigen. *EMBO J* 1998;17:2412-2425
- 11 Parker A, Gu Y, Mahoney W, Lee SH, Singh KK, Lu AL. Human homolog of the MutY repair protein (hMYH) physically interacts with proteins involved in long patch DNA base excision repair. *J Biol Chem* 2001;276:5547-5555
- 12 Paunesku T, Mittal S, Protic M, Oryhon J, Korolev SV, Joachimiak A, Woloschak GE. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol* 2001;77:1007-1021
- 13 Matsumoto Y. Molecular mechanism of PCNA-dependent base excision repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001;68:129-138
- 14 Haratake J, Takeda S, Kasai T, Nakano S, Tokui N. Predictable factors for estimating prognosis of patients after resection of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1993;72:1178-1183
- 15 Han NI, Lee YS, Choi H, Choi JY, Yun SK, Cho SH, Han JY, Yang JM, Ahn BM, Choi SW, Lee CD, Cha SB, Sun HS, Park DH. PCNA expression and electron microscopic study of acinus-forming hepatocytes in chronic hepatitis B. *Korean J Intern Med* 2002;17:100-106
- 16 Ikeguchi M, Sato N, Hirooka Y, Kaibara N. Computerized nuclear morphometry of hepatocellular carcinoma and its relation to proliferative activity. *J Surg Oncol* 1998;68:225-230
- 17 al-Sheneber IF, Shibata HR, Sampalis J, Jothy S. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer. *Cancer* 1993;71:1954-1959
- 18 Donato MF, Arosio E, Del Ninno E, Ronchi G, Lampertico P, Morabito A, Balestrieri MR, Colombo M. High rates of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with high liver cell proliferative activity. *Hepatology* 2001;34:523-528
- 19 周汉高, 顾公望. 肝癌增生细胞核抗原的研究. *华人消化杂志* 1998;6:634-635
- 20 Rugge M, Sonogo F, Pollice L, Perilongo G, Guido M, Basso G, Ninfo V, Pennelli N, Gambini C, Guglielmi M, Fabiano A, Leandro G, Keeling JW. Hepatoblastoma: DNA nuclear content, proliferative indices, and pathology. *Liver* 1998;18:128-133
- 21 Ozer A, Khaoustov VI, Mearns M, Lewis DE, Genta RM, Darlington GJ, Yoffe B. Effect of hepatocyte proliferation and cellular DNA synthesis on hepatitis B virus replication. *Gastroenterology* 1996;110:1519-1528
- 22 Wang F, Yoshida I, Takamatsu M, Ishido S, Fujita T, Oka K, Hotta H. Complex formation between hepatitis C virus core protein and p21Waf1/Cip1/Sdi1. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:479-484

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 答读者问 •

## 如何订购《世界华人消化杂志》?

### 1 如何订购 2004 年《世界华人消化杂志》?

答:《世界华人消化杂志》由北京报刊发行局公开发售, 邮发代号 82-262. 订阅 2004 年《世界华人消化杂志》, 请在邮局办理订阅事宜.

### 2 2004 年《世界华人消化杂志》的订阅价格是多少?

答:《世界华人消化杂志》2004 年为月刊, 单价 24.00 元/期, 全年 12 期, 共计 288.00 元(含邮资).

### 3 错过邮局征订时间, 如何补订《世界华人消化杂志》?

如错过邮局征订时间, 您可直接向编辑部联系办理邮购、补订手续.

### 4 购买历年《世界华人消化杂志》应该如何办理?

答:《世界华人消化杂志》1993 年创刊至 2002 年, 存有少量的精装合订本. 如您需订购, 请参阅下表, 选择您所需要的《世界华人消化杂志》合订本.

### 5 如何办理汇款手续?

答: 请按以下详细地址办理邮局汇款:

邮政编码: 100023

收款人地址: 北京市 2345 信箱

收款人姓名: 世界胃肠病学杂志社发行部

电话: 010-85381892

附:《世界华人消化杂志》订单

订刊目录	期数	单价	订数	合计金额
《新消化病学杂志》1993 年合订本	1-4 期	120.00 元/套		
《新消化病学杂志》1994 年合订本	1-4 期	120.00 元/套		
《新消化病学杂志》1995 年合订本	1-4 期	120.00 元/套		
《新消化病学杂志》1996 年合订本	1-12 期	340.00 元/套		
《新消化病学杂志》1997 年合订本	1-12 期	350.00 元/套		
《华人消化杂志》1998 合订本	1-12 期	350.00 元/套		
《世界华人消化杂志》1999 年合订本	1-12 期	350.00 元/套		
《世界华人消化杂志》2000 年合订本	1-12 期	350.00 元/套		
《世界华人消化杂志》2001 年合订本	1-12 期	350.00 元/套		
《世界华人消化杂志》2002 年合订本	1-12 期	350.00 元/套		
《世界华人消化杂志》2003 年合订本	1-12 期	350.00 元/套		
《华人消化杂志》1998 年特刊号	特刊	34.00 元		
《世界华人消化杂志》2004 年(月刊)	1-12 期	288.00 元/期		

### 6 订刊时我还需注意什么?

答: 特别要提醒的是, 请将您所需订购年份的期刊及数量在汇款单附言栏写清楚, 并将您的邮政编码、收件人地址、收件人姓名工整、清晰书写清楚, 以便我部及时正确的邮寄给您.

# 益生菌和肠易激综合征

王伟岸, 胡品津

王伟岸, 胡品津, 中山大学附属第一医院消化科 广东省广州市 510058  
项目负责人: 王伟岸, 510058, 广东省广州市, 中山大学附属第一医院消化科. wangweian@IBSChina.com  
电话: 020-87755766-8172  
收稿日期: 2003-05-14 接受日期: 2003-06-19

## 摘要

流行病学研究表明一部分肠易激综合征(IBS)患者发生在急性肠道感染之后, 也有少数研究报道小肠细菌增生与 IBS 的症状发作有一定联系, 这部分患者在抗生素治疗后症状好转. 这些研究提供了采用肠道菌群调节药物治疗 IBS 的可能性. 益生菌是一类具有调整宿主肠道微生物群生态平衡而发挥生理作用的微生物制剂, 已用于包括 IBS 在内的多种疾病的治疗, 取得了一定的效果. 但有关益生菌治疗 IBS 的研究设计还存在不少问题, 难以提供益生菌治疗肠易激综合征的循证医学依据. 本文从 (1) 正常肠道菌群和益生菌防治策略的概念、(2) 益生菌用于 IBS 治疗的流行病学基础、(3) 益生菌在 IBS 治疗中的应用及 (4) 益生菌治疗 IBS 的问题和展望 4 个方面总结了相关研究进展.

王伟岸, 胡品津. 益生菌和肠易激综合征. 世界华人消化杂志 2004;12(1): 172-176

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/172.asp>

## 0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种常见的以结肠症状为主要表现的功能性肠病, 临床上以不能用结构或生化异常来解释的腹部不适和(或)腹痛伴排便习惯改变为特征<sup>[1]</sup>. 由于病因和发病机制不清, 临床上缺乏非常有效的治疗药物<sup>[2-5]</sup>. 近年来, 随着研究的深入, 对 IBS 病因和病理生理有了新的认识, 针对某一病理生理特征的治疗成了 IBS 治疗药物开发的方向<sup>[3-5]</sup>. 流行病学相关研究显示至少一部分 IBS 患者的发病与肠道菌群紊乱有关<sup>[6-9]</sup>. 因此, 根据微生物生态学理论采用益生菌(probiotics)恢复正常肠道菌群来预防和(或)治疗这类 IBS 的发病具有可行性<sup>[10-13]</sup>.

## 1 正常肠道菌群和益生菌防治策略

人类肠道栖息着大约 400 多种细菌, 这些胃肠道正常菌群主要由厌氧菌、兼性厌氧菌和需氧菌组成, 其中专性厌氧菌占 99% 以上, 其中仅类杆菌及双歧杆菌就占细菌总数 90% 以上<sup>[14-16]</sup>. 正常情况下, 由于胃酸、胆汁作用及小肠液流量大、肠道蠕动快, 胃、十二指肠、空肠细菌的种类及数量极少, 细菌浓度小于  $10^3$  / mL,

主要为革兰氏阳性需氧菌, 如链球菌、葡萄球菌和乳酸杆菌. 而回肠末端由于肠液流量少, 蠕动减慢, 细菌数逐渐增加到  $10^5$ - $10^8$  / mL, 主要为乳酸杆菌、大肠杆菌、类杆菌和梭状芽孢杆菌等. 在结肠, 细菌数明显增加( $10^9$ - $10^{12}$  / mL), 主要为厌氧的双歧杆菌、类杆菌、乳酸杆菌, 而潜在的致病性梭状芽孢杆菌和葡萄球菌很少<sup>[6-7]</sup>. 人在出生前, 肠道是无菌的, 出生后几个小时肠道即可检测到来自母体阴道和粪便的细菌, 在随后发育过程中, 肠道菌群与喂养方式关系密切, 但在断奶后, 人类肠道的菌群在一生中相对稳定, 以至于某些菌株始终可从收集自胃肠道标本中检测到, 不过每个人之间的肠道菌群又有个体化差异<sup>[13-18]</sup>.

正常人的胃肠道微生物菌群的稳定性是几种因素包括胃液酸度、胃肠动力、胆盐、免疫防御因素、结肠 pH 和微生物之间竞争营养和肠道结合位点的结果<sup>[14]</sup>. 这些一起提供了一道抵御微生物菌群破坏的屏障, 即定植抗力<sup>[14-16]</sup>. 在长期的进化过程中, 人类肠道菌群通过其间的共生、互生、共养、助生、中立以及偏生、寄生、竞争、吞噬等相互作用保证了肠道菌群的相对稳定, 同时通过与宿主之间的动态性生理性作用建立了微生物与宿主、非生物环境因素相互依赖、相互作用的高度有序的统一体, 即达到了微生态平衡. 这一状态是保证胃肠正常功能发挥的基础<sup>[13-16]</sup>. 正常肠道菌群在某种程度上是“被忽视了的营养库”, 不但对上消化道传输下来未被消化吸收的食物残渣进行发酵, 获得自身生存需要的能量, 而且还可合成 B 族维生素和维生素 K 以及肠道上皮细胞的营养物质. 人体结肠内细菌生长的基本底物来自上消化道未消化的碳水化合物. 食物中的碳水化合物约为 10-60 g/d 可到达结肠, 除了食物提供的底物外, 机体本身也产生可酵解的碳水化合物. 酵解的终产物是短链脂肪酸, 同时还产生大量的气体如  $H_2$ 、 $CO_2$ 、 $CH_4$ 、 $H_2S$  等,  $H_2$  可由细菌进一步分解或排出. 短链脂肪酸可降低肠道微环境的 pH 值, 对致病菌的生长有抑制作用. 肠道菌群还可通过代谢作用使致癌原失活, 使前药转化为活性药物等; 肠道菌群还有助于正常肠道黏膜免疫应答形成和维持, 参与机体的免疫体防御功能<sup>[14-21]</sup>.

一旦由于外部或内在因素, 正常的肠道微生态平衡被破坏, 即可出现暂时或持久的菌群失调、肠道功能发生障碍, 甚至表现出明显的临床症状<sup>[7, 10, 14, 15]</sup>, 即为微生态失衡<sup>[14]</sup>. 随着人类生活方式的跨越式变化, 人类肠道菌群的进化程度在一定程度上已难以适应现代

的生活方式, 各种应激、膳食结构和进食习惯的改变都对肠道微生态平衡直接产生了不良作用, 进而影响肠道正常功能. 抗生素的大量应用也是破坏胃肠道微生物菌群平衡的重要因素<sup>[14, 22-25]</sup>. 这些因素作用的结果是导致胃肠道微生物菌群平衡偏离了潜在的有益或促进健康的细菌, 如乳酸杆菌和双歧杆菌, 而转向有害细菌或病原菌增加<sup>[12, 14, 16, 23-29]</sup>. 这一过程是可逆的, 临床可通过改善肠道微生态环境、增强宿主的适应性、进行合理的营养调整、短期应用抗生素、提高益生菌群的定植能力或生态制剂来恢复微生态平衡, 达到防治疾病的目的, 即微生态防治理论的核心内容<sup>[25-29]</sup>.

所谓益生菌, 又称“益生素”或“益生剂”, 主要是指通过调整宿主肠道微生物群生态平衡而发挥生理作用的微生物制剂<sup>[30-32]</sup>. 益生菌能通过宿主消化道屏障而存活下来, 并能定植在宿主消化道而发挥相当的生理作用, 因此益生菌必须是活的具有一定保存期的微生物制剂, 其作用特征是其临床应用价值超出了其本身的营养价值. 目前主要的菌种类型有乳酸菌类和双歧杆菌, 还包括肠球菌属、芽孢杆菌属、大肠杆菌和酵母菌等<sup>[33-36]</sup>.

益生菌作用的机制还不十分清楚. 一般认为有生物化学性抑制或促进、营养竞争、免疫清除和黏附受体竞争等<sup>[15, 16, 21-24]</sup>. 生物化学抑制作用表现在一种细菌可通过分泌细菌素(bacteriocin)抑制另外的细菌. 双歧杆菌和乳酸杆菌都有这种作用<sup>[23, 25, 26, 28]</sup>. 乳酸杆菌和双歧杆菌的终末代谢产物是短链脂肪酸, 可降低肠腔 pH 值和氧化还原电势, 而对其他微生物产生拮抗作用, 还可通过与其他细菌竞争有限的特殊营养物直接抑制有害和病原菌的生长. 益生菌是形成宿主定植抗力的重要因素. 定植抗力是拮抗致病菌和条件致病菌在宿主黏膜定植的重要生理作用, 这种定植抗力的形成与双歧杆菌和乳酸杆菌的定植和参与膜菌群的构成有关. 益生菌通过自身细胞壁上多糖结构黏附于宿主黏膜上皮细胞, 形成肠黏膜菌群为第一道生物屏障, 这就是定植、占位、营养争夺、膜菌群和生物屏障拮抗的作用机制. 益生菌还具有免疫刺激因子的作用, 通过刺激免疫器官发育、促进红细胞免疫功能、作为免疫佐剂提高黏膜免疫水平, 进而提高人体总的免疫水平, 增强机体抗病力<sup>[14-16, 22, 31-36]</sup>. 此外, 益生菌通过改变肠道微环境, 促进肠蠕动, 从而使外源菌难以与黏膜表面接触而排出体外<sup>[14, 33, 34]</sup>.

国内商品化的常用的益生菌制剂包括: 丽珠肠乐(双歧杆菌)、整肠生(地衣芽孢杆菌)、促菌生(蜡样芽孢杆菌)、米雅 B M(酪酸菌)、培菲康(三联菌制剂, 主要含双歧杆菌、嗜酸乳杆菌及肠球菌)、金双歧(含长双歧杆菌、保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌)、威特四联活菌片(由双歧杆菌、乳杆菌、肠球菌和蜡杆芽孢杆菌构成)等.

近年来, 基于这些作用特征, 益生菌已用于包括与肠道菌群改变有关的一些疾病的治疗, 取得了一定

效果, 这些疾病包括炎症肠病、遗传性过敏症、食物变态反应、血液渗析、肝性脑病<sup>[37-47]</sup>. 同时, 还发现对儿童和妇女的健康有重要意义<sup>[48-50]</sup>.

## 2 益生菌用于 IBS 治疗的流行病学基础

2.1 肠道菌群紊乱与 IBS 发病的流行病学研究 细菌性胃肠炎在 IBS 症状发作中的作用已被广泛研究. Neal et al<sup>[6]</sup>对 544 例经实验室检查证实的细菌性胃肠炎患者进行的队列研究发现, 胃肠炎 6 mo 后 25% 的患者仍有排便习惯改变. Rodriguez et al<sup>[7]</sup>对胃肠炎患者的随访研究发现, 1 a 后 303 例胃肠炎患者 IBS 发病率 1 000 人年数为 39.7; 相对危险 11.9, 而 575 169 例对照组的 IBS 发病率 1 000 人年数为 3.5. 这些数据说明至少某一类型的 IBS 是由细菌感染引起的. 新近, Gwee et al<sup>[9]</sup>报道, 接受问卷调查的 70 例急性胃肠炎住院的患者中, 22 例后来出现了符合 IBS 的症状, 并且 6 mo 后这些患者症状仍然存在.

抗生素广泛用于人类疾病的预防和治疗, 但抗生素能够通过影响肠道固有的细菌种群以及特定种群而对人类和动物胃肠道微生物菌群生态平衡产生不利地作用, 是一种最可能的(而不是潜在的)胃肠道正常微生物菌群破坏因素, 因此认为抗生素可能参与了 IBS 的发病机制<sup>[14]</sup>. 2 组前瞻性研究评价了抗生素在 IBS 病因中可能的作用. 对 300 例子宫切除后预防性给予甲硝唑或安慰剂治疗的患者进行前瞻性双盲对照研究, 发现抗生素预防组 IBS 症状的发生率高于安慰剂组<sup>[14]</sup>; Mendall et al<sup>[51]</sup>对 421 例普通门诊患者进行调查, 符合曼宁标准的 48 例 IBS 患者症状发作与抗生素关系密切, 优势率(OR)为 3.7 (95% CI: 1.80, 7.60). 同时也有报道, 采用抗生素治疗可减轻 IBS 患者的症状<sup>[8]</sup>. 这些研究固然存在研究设计的问题, 但至少说明 IBS 患者存在肠道细菌紊乱和(或)病原菌滋生两种可能性.

2.2 IBS 患者粪便菌群特征 采用常规微生物学技术对 IBS 患者肠道菌群进行研究的报道很多. 1982 年 Balsari et al<sup>[52]</sup>对 20 例 IBS 患者的粪便微生物进行了观察, 发现与正常人相比, IBS 患者粪便中大肠菌(coliforms)明显减少, 并且乳酸杆菌和双歧杆菌的数量也显著降低. 这说明尽管 IBS 患者粪便微生物在性质上和正常人很相似, 但在一些细菌种类上有相当大的数量差异. 1987 年 Brad1ey et al<sup>[53]</sup>对 1 例与食物有关的 IBS 患者粪便微生物的检测发现, 在随访的 18 mo 内, 该患者粪便总的细菌数量变异很大(每克粪便干重细菌数  $1.3 - 59 \times 10^{11}$  cfu(菌落形成单位, colony forming unit), 以链球菌、大肠埃希氏杆菌和变形杆菌为主的兼性微生物的比例高, 优势厌氧性微生物是梭菌属而不是通常的双歧杆菌. Wyatt et al<sup>[54]</sup>让 2 例发作与食物有关的 IBS 患者服用可诱发症状的食物, 观察食物刺激前后粪便微生物的变化, 发现尽管 1 例患者食物刺激后双歧杆菌和乳酸杆菌从 21% 增至 43%, 但在食物刺激过程中主要细菌种类变化不大. 有人对 6 例

符合罗马 II 标准的 IBS 患者进行盲肠活检标本、盲肠腔和粪便微生物的研究,并与 6 例正常人对照.发现与正常人相比,IBS 患者粪便中厌氧菌的数量显著减少. IBS 患者盲肠黏膜和盲肠腔有乳酸杆菌,但在粪便中检测不到. 5 例 IBS 患者盲肠黏膜有需氧性生物生存,而在正常人中只有 2 例<sup>[14]</sup>.

2.3 结肠发酵异常的证据 食物耐受不良可能是 IBS 发病中的重要因素<sup>[55]</sup>.所谓食物耐受不良,可定义为非免疫机制介导的对食物的不良反应,这一反应可通过膳食成分剔除疗法(dietary elimination)而缓解,通过食物刺激而诱发<sup>[56-57]</sup>.约 50% 的 IBS 患者经膳食成分剔除疗法后症状好转, Nanda et al<sup>[56]</sup>对 200 例 IBS 患者进行 3 wk 的膳食成分剔除疗法试验, 189 例完成研究的患者中, 91 例 (48.2%)症状改善, 50 % 有 2-5 种可诱发症状的食物,但这些患者无食物变态反应的证据.随后几项研究也有类似的发现<sup>[21-22]</sup>. King et al<sup>[58]</sup>通过标准饮食和膳食成分剔除疗法的交叉对照试验对 6 例女性 IBS 患者和 6 例女性对照者进行研究,发现正常饮食下, IBS 患者的最大气体排出率高于对照组(2.4 mL/min IQR 1.7-2.6 vs 0.6, 0.4-1.1); 尽管 IBS 患者总的产气量并不比对照组高 (中位值为 527 mL/24 h IQR 387-660 vs 412 234-507), 但氢产量明显增加(332, 318-478 vs 162 126-217,  $P=0.009$ ). 膳食成分剔除疗法后, IBS 患者症状减轻, 最大气体排出率降低(0.5 mL/min IQR 0.3- 0.7). 这些可能由从小肠进入盲肠的食物残渣的发酵功能障碍引起, 以致发酵产气过多, 尤其是氢. 细菌对碳水化合物和蛋白质的厌氧性分解过程即为发酵. 因此, IBS 患者结肠气产量的变化可能与耗氢 - 细菌的活性有关, 发酵异常产生的过量气体是 IBS 症状的重要诱因, 加上 IBS 患者对肠道气体的转运和耐受也发生异常, 因此患者的症状加重.所以, IBS 患者的食物耐受不良与结肠发酵功能障碍有关, 发酵异常可能是 IBS 发病的重要因素.

尽管上述流行病学相关研究尚不足以说明肠道菌群紊乱与 IBS 之间的因果关系, 但 IBS 症状发作期间肠道菌群紊乱是可能的<sup>[14, 59]</sup>.

### 3 益生菌在 IBS 治疗中的应用

虽然在 IBS 的治疗策略中, 饮食调整一直被推崇, 但严格限制饮食成分是非常困难的, 难以实施<sup>[55]</sup>. 基于上述流行病学相关研究和 IBS 患者的食物耐受不良可能源自结肠异常发酵的假设, 通过对肠道菌群进行调控治疗 IBS 就有了一定的理论基础和事实依据.

有关益生菌治疗 IBS 的经验报道不少, 但严格的临床研究报道却很有限<sup>[14]</sup>. 这可能是因为 IBS 是一种多因素的疾病, 研究同质性患者是困难的. 乐托尔(lacteol fort) 是一种每个胶囊含有  $5 \times 10^{10}$  热灭菌的嗜酸乳酸菌的益生菌制剂. Halpern et al<sup>[60]</sup>1996 年报道了采用随机、双盲、交叉试验方法用乐托尔治疗 18 例 IBS 的结果,

每例患者随机先给予 6 wk 治疗, 在 2 wk 清洗期后, 交叉到另外的治疗组再治疗 6 wk, 发现乐托尔对总体胃肠功能的改善具有统计学上意义( $P=0.018$ ). 几组采用植物乳酸杆菌 299v 治疗 IBS 的试验结果差异很大. Niedzielin et al<sup>[61]</sup>观察了植物乳杆菌 299V (LP299v) 对 IBS 患者的影响, 治疗 4 wk 后, 与对照组相比, LP299v 治疗组患者的腹痛明显减轻( $P=0.0012$ ), 便秘患者的排便频率趋于正常 ( $P=0.17$ ). 95% 的 LP299v 治疗组患者总的 IBS 症状改善, 而安慰剂组仅 15% ( $P<0.0001$ ); 并且发现以活性形式补充益生菌, 不管是否采用其他药物, 症状改善均比单独给予失活的益生菌或其他药物明显. Nobaek et al<sup>[62]</sup>发现服用含有  $2 \times 10^{10}$  cfu 植物乳酸杆菌 (DSM 9843) 的野玫瑰果饮料 4 wk 后, 40% 以上的治疗组 IBS 患者肠胃气胀减轻在 50% 以上, 而安慰剂组仅为 18%; 治疗后 12 mo 随访时, 治疗组患者肠功能仍好于对照组. 新近, Sen et al<sup>[63]</sup>采用双盲对照交叉方法研究植物乳酸杆菌 299v 对 12 例 IBS 患者症状和结肠发酵的影响, 发现患者服用  $6.25 \times 10^9$  cfu/d 的植物乳酸杆菌 299v 后, 尽管治疗组在摄取乳果糖后 120 min 时呼气氢水平显著减少 ( $P=0.019$ ), 但氢总产量和症状并无明显改变.

O' Sullivan et al<sup>[64]</sup>通过随机、双盲交叉试验观察干酪乳杆菌菌株(lactobacillus casei) GG (LGG)治疗 IBS 患者的疗效, 符合罗马标准的 24 例患者随机给予  $1 \times 10^{10}$  cfu/d 肠衣 LGG 或安慰剂, 发现尽管 LGG 组可减轻患者的腹泻, 但两组间其他症状(疼痛、排便急迫感和腹胀)的变化并无显著差异. 因此, 单独给予干酪乳杆菌 GG 菌株治疗“腹泻型”肠易激综合征亚群的价值值得进一步研究. 张达荣 et al<sup>[65]</sup>采用酪酸菌制剂的对 21 例 IBS 患者进行治疗, 治疗后腹泻次数明显减少, 总有效率为 83.4%, 并且双歧杆菌和乳酸杆菌明显升高. 益生菌制剂 VSL-3 含有婴儿双歧杆菌(bifidobacterium infantis)Y1 和短双歧杆菌(bifidobacterium breve)Y8 菌株. Brigidi et al<sup>[66]</sup>发现 VSL-3 可改善肠易激综合征或功能性腹泻患者临床症状, 并改变粪便微生物组成和生物化学特性, VSL-3 治疗后粪便乳酸杆菌、双歧杆菌和嗜热链球菌(streptococcus thermophilus)显著增加, 而肠球菌、大肠菌、拟杆菌和产气荚膜梭菌无显著变化. 另外, 粪便  $\beta$ - 半乳糖苷酶增加, 尿尿素酶活性降低. 新近, 胡品津 et al<sup>[67]</sup>报道一组多中心随机双盲双模拟对照试验显示, 采用双歧杆菌(丽株肠乐)治疗符合罗马 II 标准的 60 例患者 4 wk 后, 患者的总体症状评分和腹泻症状评分均明显降低( $P<0.01$ ), 并且随疗程延长, 疗效呈增加趋势. Kim et al<sup>[68]</sup>新近报道益生菌 VSL#3 可有效缓解腹泻型 IBS 患者的腹部气胀, 但这种作用与胃肠道动力改变无关.

### 4 问题和展望

在严格意义上, 益生菌是一种具有健康促进作用的功

能食品, 已用于多种肠道疾病的辅助治疗, 取得了一定的疗效<sup>[32-35, 70]</sup>. 但总体而言, 益生菌用于 IBS 的治疗还主要限于试验研究阶段<sup>[14, 69]</sup>. 一方面, 目前肠道菌群紊乱与 IBS 的因果关系还不明确<sup>[71, 72]</sup>; 另一方面, 现有的益生菌治疗试验结果还不一致, 缺乏支持采用益生菌治疗 IBS 的可靠循证医学证据<sup>[14, 73-75]</sup>.

总结文献有关益生菌治疗 IBS 的报道, 可发现如下几个可能影响试验结果的主要问题<sup>[14, 73-76]</sup>: (1) 采用的研究方法多是随机双盲的安慰剂交叉试验研究, 而非罗马标准委员会推荐的随机双盲的安慰剂平行试验研究, 这种临床试验设计不适合临床症状波动很大的疾病, 如 IBS; (2) IBS 本身是一种临床表现复杂、病因多样的异质性症状群, 而目前报道的研究所包含的样本量偏少, 难以对这些患者按症状学或病理生理特征进一步分层, 说明不同亚型与益生菌效果的关系, 尽管有研究表明益生菌对 IBS 患者的腹泻症状有一定的效果; (3) 益生菌剂型的标准化问题也是值得重视的问题, 目前国内外益生菌生产厂家很多, 每种制剂的活菌数量和种类千差万别, 尽管有关临床经验性报道很多, 也很难通过临床试验资料的荟萃分析来证实益生菌治疗 IBS 的疗效; (4) 即使 IBS 患者存在肠道菌群紊乱, 换言之, IBS 的发生确实与肠道菌群紊乱有关, 但由于每个人的生活环境不同, 正常情况下肠道菌群的组成肯定存在个体化差异. 这种差异是否能够延续到疾病状态还不清楚, 不过采用同一益生菌治疗可能存在不同种类肠道菌群紊乱的 IBS 患者, 其结果相互矛盾就不足为奇了.

因此, 在未来的研究中, 应通过对不同症状亚型和(或)病理生理亚型 IBS 患者粪便和(或)肠道菌群进行定量和定性研究, 为益生菌用于 IBS 治疗奠定基础. 然后, 在预先设置病例入选标准和终效评价指标的基础上, 通过多中心、大规模的随机双盲安慰剂对照平行试验针对性地研究不同益生菌制剂对各类 IBS 患者临床症状甚至肠道菌群的影响, 确立益生菌治疗 IBS 的循证医学依据. 总之, 目前所能预期的, 益生菌概念的提出及相关制剂的临床应用为 IBS 的临床治疗提供了新的思路; IBS 发病与肠道菌群紊乱和结肠发酵异常有一定关联的研究表明, 对那些急性胃肠炎或其他原因造成肠道菌群紊乱而存在发生肠功能紊乱如 IBS 的高危人群进行益生菌预防治疗具有一定的合理性; 益生菌可作为 IBS 治疗的辅助手段, 但作为主要治疗药物加以推荐还需要更扎实的临床证据.

## 5 参考文献

- 1 Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Muller-Lissner SA. Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut* 1999;45(Suppl 2):II43-II47
- 2 Hasler WL. The irritable bowel syndrome. *Med Clin North Am* 2002;86:1525-1551
- 3 Somers SC, Lembo A. Irritable bowel syndrome: evaluation and treatment. *Gastroenterol Clin North Am* 2003;32:507-529
- 4 Berrada D, Canenguez K, Lembo T. New approaches to the medical treatment of irritable bowel syndrome. *Curr*

- Gastroenterol Rep* 2003;5:337-342
- 5 Talley NJ. Pharmacologic therapy for the irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2003;98:750-758
- 6 Neal KR, Hebden J, Spiller R. Prevalence of gastrointestinal symptoms six months after bacterial gastroenteritis and risk factors for development of the irritable bowel syndrome: postal survey of patients. *BMJ* 1997;314:779-782
- 7 Rodriguez LA, Ruigomez A. Increased risk of irritable bowel syndrome after bacterial gastroenteritis: cohort study. *BMJ* 1999;318:565-566
- 8 Pimentel M, Chow EJ, Lin HC. Eradication of small intestinal bacterial overgrowth reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3503-3506
- 9 Gwee KA. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2001;4:287-291
- 10 Floch MH. Probiotics, Irritable bowel syndrome, and inflammatory bowel disease. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2003;6:283-288
- 11 Quigley EM. Current concepts of the irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2003;237:1-8
- 12 Marteau PR. Probiotics in clinical conditions. *Clin Rev Allergy Immunol* 2002;22:255-273
- 13 Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003;361:512-519
- 14 Madden JA, Hunter JO. A review of the role of the gut microflora in irritable bowel syndrome and the effects of probiotics. *Br J Nutr* 2002;88(Suppl 1):s67-72
- 15 Yen PK. Probiotics and prebiotics for bowel health. *Geriatr Nurs* 2003;24:192-193
- 16 Dunne C. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:136-145
- 17 Saarela M, Lahteenmaki L, Crittenden R, Salminen S, Mattila-Sandholm T. Gut bacteria and health foods-the European perspective. *Int J Food Microbiol* 2002;78:99-117
- 18 Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* 2003;62:67-72
- 19 Rolfe RD. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr* 2000;130(Suppl 2):s396-s402
- 20 Gardiner GE, Ross RP, Wallace JM, Scanlan FP, Jagers PP, Fitzgerald GF, Collins JK, Stanton C. Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar cheese. *J Agric Food Chem* 1999;47:4907-4916
- 21 Heller F, Duchmann R. Intestinal flora and mucosal immune responses. *Int J Med Microbiol* 2003;293:77-86
- 22 Fooks LJ, Gibson GR. Probiotics as modulators of the gut flora. *Br J Nutr* 2002;88(Suppl 1):s39-s49
- 23 Sullivan A, Barkholt L, Nord CE. *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus F19* prevent antibiotic-associated ecological disturbances of *Bacteroides fragilis* in the intestine. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:308-311
- 24 Resta-Lenert S, Barrett KE. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 2003;52:988-997
- 25 Schultz M, Linde HJ, Lehn N, Zimmermann K, Grossmann J, Falk W, Scholmerich J. Immunomodulatory consequences of oral administration of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in healthy volunteers. *J Dairy Res* 2003;70:165-173
- 26 Liu Q, Nobaek S, Adawi D, Mao Y, Wang M, Molin G, Ekelund M, Jeppsson B. Administration of *Lactobacillus plantarum* 299v reduces side-effects of external radiation on colon anastomotic healing in an experimental model. *Colorectal Dis* 2001;3:245-252
- 27 McCarthy J, O' Mahony L, O' Callaghan L, Sheil B, Vaughan EE, Fitzsimons N, Fitzgibbon J, O' Sullivan GC, Kiely B, Collins JK, Shanahan F. Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut* 2003;52:975-980
- 28 Perdigon G, Locascio M, Medici M, Pesce de Ruiz Holgado A, Oliver G. Interaction of bifidobacteria with the gut and their influence in the immune function. *Biocell* 2003;27:1-9
- 29 Annuk H, Shchepetova J, Kullisaar T, Songisepp E, Zilmer M, Mikelsaar M. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *J Appl Microbiol* 2003;94:403-412
- 30 Montalto M, Arancio F, Izzi D, Cuoco L, Curigliano V, Manna

- R. Gasbarrini G. Probiotics: history, definition, requirements and possible therapeutic applications. *Ann Ital Med Int* 2002; 17:157-165
- 31 Marteau P, Seksik P, Jian R. Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. *Br J Nutr* 2002;88(Suppl 1):s51-s57
- 32 Fric P. Probiotics in gastroenterology. *Gastroenterology* 2002; 40:197-201
- 33 Reid G, Sanders ME, Gaskins HR, Gibson GR, Mercenier A, Rastall R, Roberfroid M, Rowland I, Cherbut C, Klaenhammer TR. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J Clin Gastroenterol* 2003;37:105-118
- 34 Drisko JA, Giles CK, Bischoff BJ. Probiotics in health maintenance and disease prevention. *Altern Med Rev* 2003;8:143-155
- 35 Kennedy RJ, Kirk SJ, Gardiner KR. Probiotics. *Br J Surg* 2001; 88:1018-1019
- 36 Ouwehand A, Vesterlund S. Health aspects of probiotics. *IDrugs* 2003;6:573-580
- 37 Kalliomaki M, Isolauri E. Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3:15-20
- 38 Shanahan F. Probiotics in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001; 48:609
- 39 Kwon J, Farrell R. Probiotics and inflammatory bowel disease. *Bio Drugs* 2003;17:179-186
- 40 Guslandi M, Giollo P, Testoni PA. A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:697-698
- 41 Ishikawa H, Akedo I, Umesaki Y, Tanaka R, Imaoka A, Otani T. Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *J Am Coll Nutr* 2003;22: 56-63
- 42 Karthik SV. Probiotics in inflammatory bowel disease. *J R Soc Med* 2003;96:370
- 43 Famularo G, Mosca L, Minisola G, Trinchieri V, De Simone C. Probiotic lactobacilli: a new perspective for the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* 2003;9:1973-1980
- 44 Charlesworth EN. Probiotics in primary prevention of atopic disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 2003;3:281
- 45 Vanderhoof JA, Young RJ. Role of probiotics in the management of patients with food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003;90(6 Suppl 3):s99-s103
- 46 Takayama F, Taki K, Niwa T. Bifidobacterium in gastro-resistant seamless capsule reduces serum levels of indoxyl sulfate in patients on hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2003;41(3 Suppl 1):s142-s145
- 47 Solga SF. Probiotics can treat hepatic encephalopathy. *Med Hypotheses* 2003;61:307-313
- 48 Van den Driessche M, Veereman-Wauters G. Functional foods in pediatrics. *Acta Gastroenterol Belg* 2002;65:45-51
- 49 Vanderhoof JA, Young RJ. Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;27: 323-332
- 50 Smejkal C, Kolida S, Bingham M, Gibson G, McCartney A. Probiotics and prebiotics in female health. *J Br Menopause Soc* 2003;9:69-74
- 51 Mendall MA, Kumar D. Antibiotic use, childhood affluence and irritable bowel syndrome (IBS). *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998;10:59-62
- 52 Balsari A, Ceccarelli A, Dubini F, Fesce E, Poli G. The fecal microbial population in the irritable bowel syndrome. *Microbiologica* 1982;5:185-194
- 53 Bradley HK, Wyatt GM, Bayliss CE, Hunter JO. Instability in the faecal flora of a patient suffering from food-related irritable bowel syndrome. *J Med Microbiol* 1987;23:29-32
- 54 Wyatt GM, Bayliss CE, Lakey AF, Bradley HK, Hunter JO, Jones VA. The faecal flora of two patients with food-related irritable bowel syndrome during challenge with symptom-provoking foods. *J Med Microbiol* 1988;26:295-299
- 55 Floch MH, Narayan R. Diet in the irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2002;35(1 Suppl):s45-s52
- 56 Nanda R, James R, Smith H, Dudley CR, Jewell DP. Food intolerance and the irritable bowel syndrome. *Gut* 1989;30: 1099-1104
- 57 Zar S, Kumar D, Benson MJ. Food hypersensitivity and irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:439-449
- 58 King TS, Elia M, Hunter JO. Abnormal colonic fermentation in irritable bowel syndrome. *Lancet* 1998;352:1187-1189
- 59 Rath HC. The role of endogenous bacterial flora: bystander or the necessary prerequisite? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15:615-620
- 60 Halpern GM, Prindiville T, Blankenburg M, Hsia T, Gershwin ME. Treatment of irritable bowel syndrome with Lactecol Fort: a randomized, double-blind, cross-over trial. *Am J Gastroenterol* 1996;91:1579-1585
- 61 Niedzielin K, Kordecki H, Birkenfeld B. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:1143-1147
- 62 Nobaek S, Johansson ML, Molin G, Ahne S, Jeppsson B. Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in a abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1231-1238
- 63 Sen S, Mullan MM, Parker TJ, Woolner JT, Tarry SA, Hunter JO. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on colonic fermentation and symptoms of irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2002;47:2615-2620
- 64 O' Sullivan MA, O' Morain CA. Bacterial supplementation in the irritable bowel syndrome. A randomised double-blind placebo-controlled crossover study. *Dig Liver Dis* 2000;32:294-301
- 65 张达荣, 董晓旭, 包幼甫. 肠易激综合征患者服用酪酸菌制剂前后肠道菌群状况. *中国微生态学杂志* 1999;11:164-166
- 66 Brigidi P, Vitali B, Swennen E, Bazzocchi G, Matteuzzi D. Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. *Res Microbiol* 2001;152:735-741
- 67 胡品津, 林金坤. 广州双歧杆菌协作组. 双歧杆菌治疗腹泻型肠易激综合征疗效观察. *胃肠病学* 2003;8(增刊):A11-23
- 68 Kim HJ, Camilleri M, McKinzie S, Lempke MB, Burton DD, Thomforde GM, Zinsmeister AR. A randomized controlled trial of a probiotic, VSL#3, on gut transit and symptoms in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:895-904
- 69 Bazzocchi G, Gionchetti P, Almerigi PF, Amadini C, Campieri M. Intestinal microflora and oral bacteriotherapy in irritable bowel syndrome. *Dig Liver Dis* 2002;34(Suppl 1):s48-s53
- 70 Holmes S. Are probiotics and other functional foods the medicines of the future? *Prof Nurse* 2003;18:627-630
- 71 王伟岸, 潘国宗. 肠道炎症后的肠易激综合征. *国外医学内科分册* 1999;26:93-96
- 72 Dunlop SP, Jenkins D, Spiller RC. Distinctive clinical, psychological, and histological features of postinfective irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1578-1583
- 73 Barbara G, Corinaldesi R. Probiotics: could they turn out to be ineffective in irritable bowel syndrome? *Dig Liver Dis* 2000; 32:302-304
- 74 Faber SM. Are probiotics useful in irritable bowel syndrome? *J Clin Gastroenterol* 2003;37:93-94
- 75 Thompson WG. Probiotics for irritable bowel syndrome: a light in the darkness? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13: 1135-1136
- 76 Gorbach SL. Probiotics in the third millennium. *Dig Liver Dis* 2002;34(Suppl 2):s2-s7



# IBD 的病理生理和病因学进展

任宏宇, 宋 军, 易粹琼

任宏宇, 宋军, 易粹琼, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022

项目负责人: 任宏宇, 430022, 湖北省武汉市解放大道 1277 号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. hongyur@yahoo.com

电话: 027-85726381 传真: 027-85726343

收稿日期: 2003-05-14 接受日期: 2003-06-27

## 摘要

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD), 主要指溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和 Crohn's 病(crohn's disease, CD), 是胃肠系疾病的重要病征之一. 免疫反应异常是 IBD 发生的基本病理生理改变, 本文对免疫反应介导肠道炎症的最新认识, 进行了理论上的总结和回顾. 讨论了遗传因素对 IBD 发展的意义和肠腔菌群在 IBD 病程中表现的重要作用.

任宏宇, 宋军, 易粹琼. IBD 的病理生理和病因学进展. 世界华人消化杂志 2004;12(1):177-179

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/177.asp>

## 0 引言

炎症性肠病(IBD) 被准确定义已近 10 a, 其发病是世界范围的, 每年的发病率为 4-10/10 万人; 流行率为 40-100/10 万人. 通常 IBD 的患病年龄为 30-40 岁, 无男女性别差异. 发病率的日益增加, 使该病的研究受到广泛的重视, 发病机制的认识日臻完善, 从免疫、遗传、和病原学三方面, 本文对近期的研究进展进行了综述.

## 1 IBD 的免疫致病机制

1.1 经典的免疫致病过程 IBD 的病理特点为黏膜的炎症, 是由抗原启动的一系列过程和步骤的累积, 这种反应会针对未知的病原体, 也可能不恰当的对无害抗原产生反应. 现有的资料至少有两种机制支持肠上皮细胞参与黏膜细胞的初始免疫反应: 1 通过释放细胞因子、化学因子和其他炎症前因子来传导炎症进入细胞<sup>[1]</sup>; 2 具有抗原提呈细胞(APC)功能<sup>[2]</sup>. 通常, 抗原被吸收后, APC 将其和主要组织相容性抗原复合体(MHC) 一起提呈, T 细胞通过 T 细胞受体结合相应的 MHC 分子来识别特异的抗原多肽. 依 APC 是否经典, 如经典的巨噬细胞, 或非经典的 APC, 如肠细胞, 最终所产生的免疫反应有所不同. 正常情况下, T 细胞会对肠细胞参与的抗原提呈产生耐受<sup>[3]</sup>. 可是, 在 IBD 患者, 肠细胞参与的抗原提呈可活化 T 细胞<sup>[4]</sup>. 由 MHC II 抗原结合 APC 和 T 细胞受体 CD4 的复合物产生抗原特异的 T 细胞活

化, 但还不足以起始免疫反应<sup>[5]</sup>. T 细胞活化所必须的是非抗原特异的第二个共刺激信号, 即在 APC 表面的 B7 分子结合到 T 细胞表面的 CD28 时, T 细胞活化. 没有这些第二信号, T 细胞会发生耐受和凋亡. 经几天的活化后, T 细胞表达第二个 B7 配体 CTLA-4(cytotoxin tell lymphocyto-associated molecular-4), 可抑制白介素-2(IL-2)的表达和进一步的 T 细胞增生, 因此免疫反应受挫<sup>[6-7]</sup>. CD40 和 CD40 的配体相互作用提供另一共刺激信号<sup>[8]</sup>. 抗原的特异性和第二信号决定着是否细胞介导的免疫或机体体液免疫占优势<sup>[9]</sup>. 研究表明 CD 患者的辅助性 T 细胞 Th1 反应明显, UC 的机体免疫显著增高. 巨噬细胞参与了黏膜免疫的发生, 活化的 T 细胞产生干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )激活巨噬细胞, 活化的巨噬细胞产生 IL-12 和 IL-18, 而促使 Th1 细胞分化<sup>[10]</sup>. Th1 细胞分泌的 IFN- $\gamma$  也抑制 Th2 细胞的分化<sup>[10]</sup>. 相反, Th2 细胞的产物 IL-10 会抑制 Th1 细胞反应. 活化的巨噬细胞产生的炎症前细胞因子, 包括 IL-1、肿瘤坏死因子(TNF)和化学细胞因子 IL-8, 特别是 TNF 在 IBD 发生中有广泛的炎症前作用, TNF 的产物通过自分泌方式活化其他巨噬细胞. 结合到细胞表面的 TNF 提供共刺激信号, 进一步阻碍 T 细胞反应. TNF 诱导血管内皮表达黏附因子, 使得新产生的炎症细胞流进黏膜. TNF 也具血管内的前凝聚作用, 并可促使一氧化氮、血小板活化因子、前列环素的释放. TNF 激活颗粒状细胞通过: (1) 诱导颗粒状细胞表面的整合素黏附到内皮细胞, 随后血细胞渗进黏膜; (2) 由颗粒内产生超氧自由基产物, 为反应作准备; (3) 诱导颗粒释放<sup>[11]</sup>. 最后, TNF 可升高金属蛋白酶的产物, 直接参与局部组织降解.

从机体循环补充炎症细胞是炎症反应扩大的关键步骤. 这是一个完善协调的过程, 涉及整合素和选择素在白细胞表面的表达、免疫球蛋白超家族的膜和选择素的相互作用, 如细胞间黏附分子 1(Inter cellular adhesion molecule 1, ICAM-1) 和血管细胞间黏附分子 1 (vascular cellular adhesion molecular 1, VCAM-1), 在内皮细胞的表达. 循环中的淋巴细胞、单核细胞和颗粒细胞表面的选择素会致这些细胞对血管内皮细胞的初次接触, 随后结合在免疫球蛋白超家族膜上的整合素加强这种接触, 白细胞活化, 血细胞渗入黏膜.  $\alpha 4 \beta 1$  整合素与 IBD 的关系尤为密切. 多数的单核细胞和淋巴细胞有  $\alpha 4 \beta 1$ , 并结合与 VCAM-1. 而  $\alpha 4 \beta 7$  选择性作用于肠组织, 结合于黏膜性细胞黏附分子(mucosal addressin cell adhesion molecular 1, MAdCAM1)<sup>[12]</sup>. ICAM-1 主要

结合于单核细胞和中性粒细胞, 需要 $\beta 2$ 整合素. 然后, 白细胞沿化学因子梯度和化学黏附作用进入黏膜和黏膜下层. 随即细胞产生大量的非特异性的炎性物质, 主要为花生四烯酸的代谢产物, 如血栓素、白三烯、自由基、前列腺素, 也包括氧反应代谢物和一氧化氮, 终致组织炎性损伤. 相关的其他细胞因子有IL-15, 其是具有多种生物活性的细胞因子, 在炎性部位能刺激T细胞的增生和移行. CD的固有层T淋巴细胞产生IL-15水平升高. 据报道, UC患者的固有层T淋巴细胞分泌大量的IL-5.

1.2 自身免疫现象 特别是UC, 炎症反应损伤自身抗原, 如黏液蛋白、高雪氏细胞、结肠细胞或其他细胞, 被认为是IBD发生的基础. 在大部分UC患者, 发现抗中性粒细胞抗体. 可是, 抗体的滴度与UC的活动程度不太相符. 有些研究认为, UC患者的抗人肠原肌球蛋白抗体升高. 另外, 在肠腔上皮表面, 发现有伴随抗结肠抗体的活性补体成分聚集. 有些微生物多肽, 具有和人体自身抗原相同的免疫决定簇时, 会导致阻断对固有肠道抗原的免疫耐受. 如有些研究发现, 分枝杆菌的热休克蛋白HSP65与人的HSP60有交叉识别. 迄今, 导致炎症反应的固有抗原和致病过程尚不明确.

## 2 遗传因素

许多临床研究发现遗传因素增加了IBD的易感性. 理由是, CD和UC在不同人群表现出不一样的发病率和流行率; 罕见遗传病患者的远亲有IBD相关的现象; 更进一步IBD存在家庭聚集性. 同时发现, 发生IBD患者的第一代亲属罹患IBD的危险性较背景人群高4-20倍, IBD的绝对危险性为7%<sup>[13-14]</sup>. 特别是CD患者, 单合子(单卵)的双胞胎与双合子(双卵)的双胞胎相比, IBD的发病率有一致性<sup>[13]</sup>. 这些发现均提示易感性是遗传的, 而且对CD的发病作用更显重要. 由于, 在IBD的遗传因素研究中未见简单孟德尔遗传表现, 说明IBD的遗传危险性为多基因产物造成. 经广泛的候选基因研究, 最相关的发现是MHC位点. 最近, 通过小片段广泛基因组微卫星DNA标志的筛选方法, 获得一定的进展. 在多发疾病的亲戚成员作DNA筛选, 证实CD患者的亲戚间有一个连锁于16号染色体的区域<sup>[15-16]</sup>. 尽管危险性同这个假定区有关, 命名为IBD1, 但不太高. 这些研究也发现IBD连锁于其他几个基因组区域. 这些位点多数均同CD和UC相关, 提示CD和UC可能有共同的遗传特征. 经过对16号染色体的详细图谱分析, 确认一基因连锁位点, 这个基因编码胞质蛋白名为NOD2(也称CARD15), 表达于巨噬细胞, 作为细菌脂多糖型识别受体, 调节核因子 $\kappa B$ (NF- $\kappa B$ )的活性和巨噬细胞的调亡. 欧洲和北美的CD患者更多见NOD2突变体. 这些NOD2突变体可能抑制巨噬细胞NF- $\kappa B$ 对细菌脂多糖的活化反应. 具纯合子NOD2突变的人易患CD要高20倍, 病变常见于回肠<sup>[17-18]</sup>. 杂合子NOD2突变者的危险

也升高, 约少于20% CD患者会有纯合子NOD2突变. 另外, 5号染色体附近基因编码一些细胞因子受体, 是与CD发作早期相关的一个位点<sup>[19]</sup>.

## 3 环境和疾病的相互作用

无论遗传因素如何增加IBD的易感性, 疾病的发生仍依赖致病因子的参与. 已明确的致病因子有非甾体类抗炎药的使用, 可损伤肠上皮黏膜而致病; 吸烟可能改变基因的表现型, 尽管可防止UC, 但提高CD的危险性<sup>[20]</sup>. 逐渐多的证据表明肠腔菌群为IBD发病所必需, 甚至起中心环节的作用. 相关依据为, 在IBD相关的肠黏膜, 发现细菌抗原增多和细菌的核酸序列; 作基因改造后的鼠结肠炎模型研究发现, 如敲除IL-10基因的鼠, 若将这些鼠放在无菌环境, 不发生结肠炎, 殖入共生菌后则快速发生结肠炎<sup>[21]</sup>. 临床上, 多数抗生素和原生素(Probiotic)治疗IBD有效. 研究也发现IBD患者的结肠上皮出现表面黏附性的和细胞间的细菌增加. 现有研究仍未明确正常黏膜与肠腔菌群的相互作用机制, 和他们的改变与IBD的关系, 而成为现研究的热点. 尽管尚未发现任何IBD特异性致病菌, 但一些研究发现, UC易感染志贺氏菌和弯曲菌; CD则多与厌氧菌如类细菌和艰难梭菌相关. 细菌成分如脂多糖、鞭毛蛋白多具有强烈的炎性前作用, 可能参与炎症的起动, 尤其细菌脂多糖会活化NOD2的信号传导, 有可能成为CD发病因素.

总之, 最近对IBD发病机制的深入研究, 对免疫介导肠炎症反应的系统认识, 为临床治疗提供了新的策略和方法. 在IBD的发生中, 遗传因素会导致患者的黏膜免疫反应失调. 虽然, 肠腔菌群的确切致病作用还不清楚, 但相信随研究的进展, 将会有更多发现.

## 4 参考文献

- 1 Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* 1997;100:6-10
- 2 Mayer L, Eisenhardt D, Salomon P, Bauer W, Plous R, Piccinini L. Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1991;100:3-12
- 3 Mayer L, Sperber K, Chan L, Child J, Toy L. Oral tolerance to protein antigen. *Allergy* 2001;56(Suppl 67):12-15
- 4 Lenschow DJ, Su GH, Zuckerman LA, Nabavi N, Jellis CL, Gray GS, Miller J, Bluestone JA. Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11054-11058
- 5 Janeway CA Jr, Bottomly K. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 1994;76:275-285
- 6 Boussiotis VA, Freeman GL, Gribben JG, Daley J, Gary G, Nadler LM. Activated human B lymphocytes express three CTLA-4 counterreceptors that costimulate T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11059-11063
- 7 Stuber E, Strober W, Neurath M. Blocking the CD40L-CD40 interaction in vivo specifically prevents the priming of Thelper 1 cells through the inhibition of interleukin 12 secretion. *J Exp Med* 1996;183:693-698
- 8 Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, Carramanzana NM, Deem RL, Shealy D, Targan SR. A role for TNF- $\alpha$  and mucosal T help-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol* 1997;159:6276-6282

- 9 Dinarello CA. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103(1 Pt 1):11-24
- 10 Creery WD, Diaz-Mitoma F, Filion L, Kumar A. Differential modulation of B7-1 and B7-2 isoform expression on human monocytes by cytokines which influence the development of T helper cell phenotype. *Eur J Immunol* 1996;26:1273-1277
- 11 Beutler B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J Invest Med* 1995;43:227-235
- 12 Picarella D, Hurlbut P, Rottman J, Shi X, Butcher E, Ringler DJ. Monoclonal antibodies specific for beta 7 integrin and mucosal addressin cell adhesion molecular-1 (MAdCAM-1) reduce inflammation in the colon of scid mice reconstituted with CD45RBhigh CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 1997;158:2099-2106
- 13 Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins: A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988;29:990-996
- 14 Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen IA, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991;324:84-88
- 15 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603
- 16 Ogura Y, Bonen DK, Inohara N. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-606
- 17 Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;122:854-866
- 18 Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:867-874
- 19 Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS. Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* 2001;29:223-228
- 20 Cosnes J, Beaugerie L, Carbornnel F, Gendere JP. Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology* 2001;120:1093-1099
- 21 Rath HC, Schultz M, Freitag R. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun* 2001;69:2277-2285

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 答读者问 •

## 如何订购《世界胃肠病学杂志(英文版)》?

### 1 如何订购 2004 年《世界胃肠病学杂志(英文版)》?

答:《世界胃肠病学杂志(英文版)》由北京报刊发行局公开发售,邮发代号 82-261。订阅 2004 年《世界胃肠病学杂志(英文版)》,请在邮局办理订阅事宜。

### 2 2004 年《世界胃肠病学杂志(英文版)》的订阅价格是多少?

答:《世界胃肠病学杂志(英文版)》2004 年由月刊改为半月刊,单价 50.00 元/期,全年 24 期,共计 1200.00 元(含邮资)。

### 3 如错过邮局征订时间,如何补订《世界胃肠病学杂志(英文版)》?

如错过邮局征订时间,您可直接向编辑部联系办理邮购、补订手续。

### 4 购买历年《世界胃肠病学杂志(英文版)》应该如何办理?

答:《世界胃肠病学杂志(英文版)》自 1995 年创刊至 2002 年,存有少量的精装合订本。如您需订购,请参阅下表,选择您所需要的《世界胃肠病学杂志(英文版)》合订本。

### 5 如何办理汇款手续?

答:请您按以下详细地址办理邮局汇款:

邮政编码: 100023

收款人地址: 北京市 2345 信箱

收款人姓名: 世界胃肠病学杂志社发行部

电话: 010-85381892

附:《世界胃肠病学杂志》订单

订书目录	期数	单价	订数	合计金额
世界胃肠病学杂志 1996 年合订本	1-4 期	288.00 元/套		
世界胃肠病学杂志 1997 年合订本	1-4 期	288.00 元/套		
世界胃肠病学杂志 1998 年合订本	1-6 期	338.00 元/套		
世界胃肠病学杂志 1999 年合订本	1-6 期	338.00 元/套		
世界胃肠病学杂志 2000 年合订本	1-6 期	338.00 元/套		
世界胃肠病学杂志 2001 年合订本	1-6 期	338.00 元/套		
世界胃肠病学杂志 2002 年合订本	1-6 期	338.00 元/套		
世界胃肠病学杂志 2003 年合订本	1-12 期	676.00 元/套		
世界胃肠病学杂志 2004 年(半月刊)	1-24 期	1200.00 元/套		

### 6 订刊时我还需注意什么?

答:特别要提醒的是,请将您所需订购年份的期刊及数量在汇款单附言栏写清楚,并将您的邮政编码、收件人地址、收件人姓名工整、清晰书写清楚,以便我部及时正确的邮寄给您。

# 核因子- $\kappa$ B 与炎症性肠病

李军华, 于皆平, 何小飞

李军华, 于皆平, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060  
何小飞, 咸宁医学院附属医院消化内科 湖北省咸宁市 437100  
项目负责人: 于皆平, 430060, 湖北省武汉市解放路 238 号, 武汉大学人民医院消化内科. lihard@163.com  
电话: 0278-8041911-2135  
收稿日期: 2003-04-08 接受日期: 2003-10-11

## 摘要

核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)是一类具有多向活性的转录调控因子, 参与多种基因的表达和调控, 在炎症及免疫反应、细胞生长增生、凋亡及感染等方面起着重要作用. 本文重点介绍核因子- $\kappa$ B 结构和激活机制, 及其在炎症性肠病中的表达及可能的作用机制; NF- $\kappa$ B 抑制剂在炎症性肠病治疗上的应用.

李军华, 于皆平, 何小飞. 核因子- $\kappa$ B 与炎症性肠病. 世界华人消化杂志 2004; 12(1):180-183

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/180.asp>

## 0 引言

1986 年, Sen 和 Baltimore<sup>[1]</sup>首次从 B 淋巴细胞核提取物中检测到一种转录调控因子, 他能与 B 淋巴细胞中免疫球蛋白  $\kappa$  轻链基因增强子  $\kappa$ B 序列(GGGACTTTCC)特异性结合并具有转录调节活性, 故被命名为核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B). 研究表明, NF- $\kappa$ B 同样以无活性的形式广泛存在于其他细胞胞质中; 激活的 NF- $\kappa$ B 与核内相关基因的  $\kappa$ B 基序特异结合, 启动或调节相关基因转录, 在免疫和炎症反应、细胞生长、病毒感染及某些疾病急性期反应等方面起着重要作用<sup>[2-11]</sup>. 近年研究显示, NF- $\kappa$ B 与炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)关系密切<sup>[12-14]</sup>. 本文就此方面作一综述.

## 1 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 结构及活化

NF- $\kappa$ B 是 NF- $\kappa$ B/Rel 家族的一员; 该家族的特征是其肽链亚基均存在约 300 bp 组成的 Rel 同源结构域(Rel homology domain, RHD), 内含二聚体化区、DNA 结合区和核定位序列, 分别介导 Rel 蛋白间的二聚体化, Rel 蛋白和 DNA 特异性结合及与 I $\kappa$ B(inhibitor of  $\kappa$ B)家族成员相互作用. NF- $\kappa$ B/Rel 家族包括<sup>[15-16]</sup>: NF- $\kappa$ B<sub>1</sub>(p50/p105)、NF- $\kappa$ B<sub>2</sub>(p52/p100)、p65(RelA)、RelB 及 C-Rel, 其中大多亚基均可相互结合成同源或异源二聚体, NF- $\kappa$ B 最常见的形式是由 p50 或 p52 与 p65 亚基组成的异二聚体<sup>[16]</sup>. 根据结构和功能等方面的差异 Rel 家族成员可分为两类: 一类是前体蛋白 p105 和 p100, 其 C 端具有锚蛋白重复序列(ankyrin repeat motif), 但无反式激活区,

可水解为成熟的 p50 和 p52, p52、p50 同源二聚体对转录起抑制作用<sup>[17]</sup>; 另一类由 p65(RelA)、RelB 和 C-Rel 组成, 其 C 端含有一个或多个反式激活区, 具有激活基因转录的功能.

静息状态下, NF- $\kappa$ B 二聚体与 I $\kappa$ B 单体偶联, 以无活性的形式存在于细胞质中<sup>[18-19]</sup>. I $\kappa$ B 与 NF- $\kappa$ B 结合具有以下意义: I $\kappa$ B 可与 NF- $\kappa$ B 亚基的 RHD 结合, 覆盖核定位序列, 使 NF- $\kappa$ B 不能发生核易位; 在核内阻止 NF- $\kappa$ B 与 DNA 结合; 解离 NF- $\kappa$ B 与 DNA 结合的复合体. I $\kappa$ B 家族包括 I $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\beta$ 、I $\kappa$ B  $\gamma$ /p105、I $\kappa$ B  $\delta$  / p100、I $\kappa$ B  $\epsilon$  和 Bcl-3<sup>[20-22]</sup>. 所有已知的 I $\kappa$ B 均有一由 30-33 氨基酸组成的重复序列(ankyrin), I $\kappa$ B 蛋白籍此与 NF- $\kappa$ B 的 RHD 作用, 不同的 I $\kappa$ B 分子对 NF- $\kappa$ B 各亚基具有不同的调节活性, 已证实, I $\kappa$ B $\alpha$  与 NF- $\kappa$ B 的瞬时活化有关, 而 I $\kappa$ B $\beta$  则参与了 NF- $\kappa$ B 的持续活化过程. I $\kappa$ B $\alpha$  对 p50-p65 异二聚体的抑制作用强于对 p50 同源二聚体的作用, 而 I $\kappa$ B $\beta$  对 p50-p65 异二聚体的抑制作用强于 p50-C Rel 复合体, 但 I $\kappa$ B $\alpha$  对二者的抑制作用无差异<sup>[16]</sup>.

细胞质中的 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 复合体可被多种因素激活: 如细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )、氧化剂、病毒、抗原、佛波醇酯(PMA)、放射线等. 其激活机制是一个复杂的过程, 尚未完全阐明, 但至少包括以下步骤: (1) I $\kappa$ B 从 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 复合物中解离并降解, 暴露 NF- $\kappa$ B 的核定位序列; (2) NF- $\kappa$ B 易位至核内与特定的  $\kappa$ B 序列结合. 研究表明, I $\kappa$ B 激酶(I- $\kappa$ B kinases, IKKs)在此过程中起着重要的作用. IKKs 可特异性磷酸化 I $\kappa$ B N 端 32 和 36 位丝氨酸, 磷酸化的 I $\kappa$ B 通过泛素连接酶与多个泛素分子结合后发生构象改变, 被 26S 蛋白酶识别并降解, NF- $\kappa$ B 得以释放并移入核内<sup>[18, 23-27]</sup>. NF- $\kappa$ B 在核内与新合成的 I $\kappa$ B 结合后出核, 在胞质中失活.

## 2 NF- $\kappa$ B 在 IBD 中的表达及调控

众多资料显示, 溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩(CD)患者肠黏膜组织活检中 NF- $\kappa$ B p65 亚单位表达明显上调, 且在 CD 患者中尤为明显<sup>[12, 28-29]</sup>. 免疫组织化学染色表明 CD 中活化的 NF- $\kappa$ B 主要定位于黏膜固有层单核细胞(LPMC)及巨噬细胞内, 但黏膜下表皮细胞和内皮细胞中亦可见阳性染色. 双重免疫荧光染色进一步发现活化的 NF- $\kappa$ B 几乎存在于所有主要的单核细胞亚群中, 包括 CD3+ T 淋巴细胞、CD20+ B 淋巴细胞和 CD68+ 的单核吞噬细胞/巨噬细胞. 几乎所有 NF- $\kappa$ B 的阳性染色

都表现在核内, 而仅有少量的 NF- $\kappa$ B 阳性细胞表现为胞质着色<sup>[12, 28]</sup>. Schreiber et al<sup>[12]</sup>采用 western blot 及电泳迁移率改变法(EMSA)发现在 CD 和 UC 患者肠活检组织核提取物中的 NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平明显增高, 但在总的组织提取物中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平与正常对照组并无差别, 提示 IBD 中 NF- $\kappa$ B 是由胞质转位胞核活化后而发挥生物学功能的。

Thiele et al<sup>[28]</sup>同时观察了 CD 患者中 NF- $\kappa$ B p50 和 NF- $\kappa$ B-C Rel 亚单位的水平变化. EMSA 显示仅有少量的 p50 从胞质转位至胞核, 而经激素治疗后转位至胞核的 p50 明显增多; western blot 发现转位至核内的 NF- $\kappa$ B-C Rel 有轻度增高, 同时用抗 -C Rel 抗体进行的 Supershift 实验表明 C-Rel 并非 NF- $\kappa$ B 的主要成分. Neurath et al<sup>[29]</sup>的研究表明 IBD 中 p50 和 C Rel 亚单位表达升高, 但 p65 表达上升更显著, 进一步说明在 IBD 中起主要作用的是 p65 亚基; p50 在炎症过程中并不活化, 甚至可能参与封闭 NF- $\kappa$ B p65 的  $\kappa$ B 结合序列的过程<sup>[12]</sup>.

有关 IBD 中 I $\kappa$ B 的报道不一, Yang et al<sup>[30]</sup>在 IL-2 缺陷鼠结肠炎发现除 NF- $\kappa$ B 活性升高外, 还伴有 I $\kappa$ B $\alpha$  表达上调, 但大多数人认为 IBD 患者肠组织中 I $\kappa$ B 水平与正常人并无不同<sup>[12, 28]</sup>. 实验方法及观察时段的不同是导致结果相异的可能原因之一, 在体外实验中发现 TNF- $\alpha$  等刺激后 I $\kappa$ B 可在短时间(约 10 min)内快速反应性地降解或消失, 但 60-90 min 后再现, 恢复到刺激前水平<sup>[12, 31]</sup>. 由于 I $\kappa$ B 和 p50 是参与 NF- $\kappa$ B 胞内负反馈调节的主要成分, 这可能提示 IBD 中 NF- $\kappa$ B 的自身调节过程存在异常。

### 3 NF- $\kappa$ B 在 IBD 发病中可能的作用机制

CD 和 UC 都是非特异性的慢性肠道炎症性疾病, 目前病因、发病机制尚不十分清楚, 可能与感染、免疫异常、遗传及精神等多种因素有关<sup>[32-41]</sup>, 但肠道局部炎症损伤是其病理基础, 以大量炎性细胞浸润和持续存在, 肠道炎症损伤为特征表现. NF- $\kappa$ B 通过对细胞因子、黏附分子、趋化(化学)因子及其他炎性递质的调控在 IBD 炎症反应中起着关键作用。

很多证据均表明了循环和肠道局部细胞因子表达异常是 IBD 发病的重要机制之一<sup>[42-48]</sup>, 目前发现许多与此密切相关的细胞因子基因启动子或增强子部位均有  $\kappa$ B 位点, NF- $\kappa$ B 在核内与  $\kappa$ B 序列结合促进多种炎性细胞因子如 IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  及 TNF- $\beta$  等的基因转录<sup>[2, 16]</sup>. 在 IBD 复杂的细胞因子网络失调中, NF- $\kappa$ B 活化可能是一中心环节. 已有资料表明 IBD 中 NF- $\kappa$ B 活性增高的同时伴有 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  等水平上升<sup>[12, 28, 29]</sup>. IL-1、TNF- $\alpha$  可促进 NF- $\kappa$ B 进一步活化, 后者通过正反馈使 IL-1、TNF- $\alpha$  分泌更加增多, 同时使其他细胞因子 IL-6、IL-8 等表达也增加, 产生级联反应, 使炎症过程得到放大和持续。

有研究表明在炎症性肠病患者肠浆膜组织纤维母细胞中 NF- $\kappa$ B 和 ICAM-1 的表达有明显增强<sup>[49]</sup>, Jobin

et al<sup>[31]</sup>在鼠肠上皮细胞系 CEI-6 细胞中发现 TNF- $\alpha$  可以激活 NF- $\kappa$ B 而促使 ICAM-1 mRNA 和蛋白表达上升, 且采用蛋白酶抑制剂 MG-132 或 ALLN 阻断 TNF- $\alpha$  诱导的 I $\kappa$ B 降解过程可以明显降低 NF- $\kappa$ B 活性和 ICAM-1 基因表达. NF- $\kappa$ B 同时可增强 VCAM-1、选择素等黏附分子转录<sup>[50-55]</sup>, 这些黏附分子在白细胞与血管内皮细胞、上皮细胞的稳定黏附, 炎性细胞向炎症部位移行、活化过程中起重要作用。

NF- $\kappa$ B 活化还可促进诱生型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧化酶-2(COX-2)和 5-脂氧化酶等多种酶类表达<sup>[56-62]</sup>. Conner et al<sup>[63]</sup>发现 NF- $\kappa$ B 抑制剂 MG-341 可明显降低肽聚糖诱导的鼠结肠炎中 iNOS 的上升水平; Nakase et al<sup>[64]</sup>的研究显示 NF- $\kappa$ B 抑制剂地塞米松可减轻 TNBS 诱导的大鼠结肠炎中 COX-1、COX-2 表达, 提示 NF- $\kappa$ B 对这些炎性酶类的调节可能是其参与 IBD 发病的机制之一。

NF- $\kappa$ B 同时可增强巨噬细胞炎性蛋白-1 $\alpha$ 、单核细胞趋化蛋白-1, 3(MCP-1, 3)等其他炎性递质表达<sup>[52, 65-66]</sup>, 但 NF- $\kappa$ B 对这些炎性递质的调控是否参与了 IBD 炎症损伤过程, 目前的研究尚不能十分肯定。

### 4 NF- $\kappa$ B 抑制剂与 IBD 治疗

NF- $\kappa$ B 在肠道炎症过程中的中心调控作用, 使其逐渐成为引人注目的新的炎症性肠病治疗靶点. 已证明, 许多 IBD 临床治疗用药如糖皮质激素、柳氮磺胺吡啶的药理作用均与抑制 NF- $\kappa$ B 活性有关. 体外实验发现糖皮质激素可通过以下途径抑制 NF- $\kappa$ B 活化: (1)通过与糖皮质激素受体(GR)结合, 使其活化后在核内与 NF- $\kappa$ B p65 相互作用, 抑制 NF- $\kappa$ B 功能. (2)活化的 GR 激活糖皮质激素反应元件(GRE), 上调 I $\kappa$ B 表达, 从而影响 NF- $\kappa$ B 活化<sup>[12, 28]</sup>. 糖皮质激素对 NF- $\kappa$ B 的抑制正是其发挥广泛抗炎作用的基础. Weber et al<sup>[67]</sup>证实柳氮磺胺吡啶对 NF- $\kappa$ B 的抑制作用是通过抑制 IKK- $\alpha$ 、IKK- $\beta$  的直接抑制而实现的. 有人发现, 在 CD 患者肠活检组织 LPMC 和外周血单核细胞(PBMC)中, 丁酸盐降低前炎性细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 等的产量, 同时发现此作用与阻止 I $\kappa$ B 降解, 抑制 NF- $\kappa$ B 核转位过程及转录活性有关<sup>[68]</sup>. 此外, 其他许多免疫抑制剂、抗氧化剂如 N-乙酰半胱氨酸(NAC)、抗坏血酸等均可阻断 NF- $\kappa$ B 活化的信号途径从而抑制 NF- $\kappa$ B 功能, 但在 IBD 中的应用和疗效观察尚需进一步的研究。

Neurath et al<sup>[69-70]</sup>在 TNBS 诱导和 IL-10 基因敲除导致的大鼠结肠炎模型中局部给予 NF- $\kappa$ B p65 亚单位的反义寡核苷酸治疗后发现, 大鼠组织学表现和症状明显改善, 其疗效优于单独使用糖皮质激素, 为临床上运用 NF- $\kappa$ B 特异性抑制剂治疗 IBD 提供了实验依据。

随着对 I $\kappa$ B 激酶在 NF- $\kappa$ B 活化过程中作用了解的不断深入, 目前很多研究都围绕着如何阻断 I $\kappa$ B 激酶活化及活化后导致 NF- $\kappa$ B 激活的信号传导途径这一问题,

以期寻找到新的更安全有效的 NF- $\kappa$ B 抑制剂。这些抑制剂具有高度选择性,可减少或避免传统用药如糖皮质激素的许多毒副作用,在 IBD 中具有广阔的治疗前景。但值得注意的是, NF- $\kappa$ B 在机体正常免疫反应和细胞生长调节等方面具有重要作用,如 p65 缺失可导致胚胎致命性损害及肝脏退行性变; p50 或 RelB 缺失可出现免疫缺陷<sup>[16]</sup>,过度抑制 NF- $\kappa$ B 活性可能会导致肝功能衰竭及免疫缺陷。

## 5 存在的问题及展望

在 IBD 患者和动物模型中, NF- $\kappa$ B 活性增高,提示 NF- $\kappa$ B 与 IBD 关系密切。但 NF- $\kappa$ B 在 IBD 中的具体作用机制尚不十分清楚,如 NF- $\kappa$ B 在 IBD 中的活化及调节过程, NF- $\kappa$ B 活性改变与疾病复发的关系等,此外, NF- $\kappa$ B 对细胞生长和凋亡的调节作用是否参与了 IBD 的发病过程等也有待进一步的研究。 NF- $\kappa$ B 在其他免疫性疾病如风湿性关节炎和支气管哮喘中的作用已有广泛研究,有理由相信,深入探讨炎症性肠病中 NF- $\kappa$ B 激活的信号传导途径和自身调节过程,寻找和研究阻断 NF- $\kappa$ B 活化的特异性抑制剂,将为阐明 IBD 的发病机制及 IBD 的临床治疗带来新的希望。

## 6 参考文献

- Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986;46:705-716
- Baldwin AS Jr. Series introduction the transcription factor NF- $\kappa$ B and human disease. *J Clin Invest* 2001;107:3-6
- Matsunaga T, Hokari S, Koyama I, Harada T, Komoda T. NF-kappaB activation in endothelial cells treated with oxidized high-density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:313-319
- Huang WC, Chen JJ, Chen CC. c-Src-dependent tyrosine phosphorylation of IKKbeta is involved in tumor necrosis factor-alpha-induced intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Biol Chem* 2003;278:9944-9952
- Chen YG, Zhang C, Chiang SK, Wu T, Tso MO. Increased nuclear factor-kappaB p65 immunoreactivity following retinal ischemia and reperfusion injury in mice. *J Neurosci Res* 2003;72:125-131
- Zaninoni A, Imperiali FG, Pasquini C, Zanella A, Barcellini W. Cytokine modulation of nuclear factor-kappaB activity in B-chronic lymphocytic leukemia. *Exp Hematol* 2003;31:185-190
- Chen YM, Tu CJ, Hung KY, Wu KD, Tsai TJ, Hsieh BS. Inhibition by pentoxifylline of TNF-alpha-stimulated fractalkine production in vascular smooth muscle cells: evidence for mediation by NF-kappaB down-regulation. *Br J Pharmacol* 2003;138:950-958
- Kis A, Yellon DM, Baxter GF. Role of nuclear factor-kappaB activation in acute ischaemia-reperfusion injury in myocardium. *Br J Pharmacol* 2003;138:894-900
- Calder VL, Bondeson J, Brennan FM, Foxwell BM, Feldmann M. Antigen-specific T-cell downregulation by human dendritic cells following blockade of NF-kappaB. *Scand J Immunol* 2003;57:261-270
- Clermont F, Adam E, Dumont JE, Robaye B. Survival pathways regulating the apoptosis induced by tumour necrosis factor-alpha in primary cultured bovine endothelial cells. *Cell Signal* 2003;15:539-546
- Rakoncay Z, Jarmay K, Kaszaki J, Mandi Y, Duda E, Hegyi P, Boros I, Lonovics J, Takacs T. NF-kappaB activation is detrimental in arginine-induced acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 2003;34:696-709
- Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;42:477-484
- Neurath MF. Pathogenesis of inflammatory bowel disease: transcription factors in the spotlight. *Gut* 1998;42:458-459
- Nosti-Escanilla MP, Pena AS. NF-kappa B and inflammatory intestinal diseases. *Rev Esp Enferm Dig* 1998;90:113-119
- Glasgow JN, Wood T, Perez-Polo JR. Identification and characterization of nuclear factor kappaB binding sites in the murine bcl-x promoter. *J Neurochem* 2000;75:1377-1389
- Tak PP, Firestein GS. NF-kB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001;107:7-11
- Schmid RM, Adler G. NF-kappaB/Rel/IkB: implications in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology* 2000;118:1208-1228
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225-260
- Greten FR, Weber CK, Greten TF, Schneider G, Wagner M, Adler G, Schmid RM. Stat3 and NF-kappaB activation prevents apoptosis in pancreatic carcinogenesis. *Gastroenterology* 2002;123:2052-2063
- Zhang G, Ghosh S. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 2001;107:13-19
- May MJ, Ghosh S. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* 1997;8:63-73
- Wang Z, Castresana MR, Detmer K, Newman WH. An IkappaB-alpha mutant inhibits cytokine gene expression and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *J Surg Res* 2002;102:198-206
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621-663
- May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF-kappaB. *Immunol Today* 1998;19:80-88
- Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG, Packer L. Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic Biol Med* 1997;22:1115-1126
- Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G, Karin M. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I kappa B kinase complex. *Nature* 1998;395:297-300
- Nakano H, Shindo M, Sakon S, Nishinaka S, Mihara M, Yagita H, Okumura K. Differential regulation of IkappaB kinases alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinases and mitogen-activated protein kinases/ERK kinase kinase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3537-3542
- Thiele K, Bierhaus A, Autschbach F, Hofmann M, Stremmel W, Thiele H, Ziegler R, Nawroth PP. Cell specific effects of glucocorticoid treatment on the NF-kappaBp65/IkappaBalpha system in patients with Crohn's disease. *Gut* 1999;45:693-704
- Neurath MF, Fuss I, Schurmann G, Pettersson S, Arnold K, Muller-Lobeck H, Strober W, Herfarth C, Buschenfelde KH. Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* 1998;859:149-159
- Yang F, de Villiers WJ, Lee EY, McClain CJ, Varilek GW. Increased nuclear factor-kappaB activation in colitis of interleukin-2-deficient mice. *J Lab Clin Med* 1999;134:378-387
- Jobin C, Hellerbrand C, Licato LL, Brenner DA, Sartor RB. Mediation by NF-kappaB of cytokine induced expression of intercellular adhesion molecule 1(ICAM-1) in an intestinal epithelial cell line, a process blocked by proteasome inhibitors. *Gut* 1998;42:779-787
- Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:158-161
- Xu G, Tian KL, Liu GP, Zhong XI, Tang SL, Sun YP. Clinical significance of plasma D-dimer and von Willebrand factor levels in patients with ulcer colitis. *World J Gastroenterol* 2002;8:575-576
- Cui HF, Jiang XL. Treatment of corticosteroid-resistant ulcerative colitis with oral low molecular weight heparin. *World J Gastroenterol* 1999;5:448-450
- Wu HG, Zhou LB, Shi DR, Liu SM, Liu HR, Zhang BM, Chen



- HP, Zhang LS. Morphological study on colonic pathology in ulcerative colitis treated by moxibustion. *World J Gastroenterol* 2000;6:861-865
- 36 MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000;51:2-9
- 37 Salupere R. Inflammatory bowel disease in Estonia: a prospective epidemiologic study 1993-1998. *World J Gastroenterol* 2001;7:387-388
- 38 Stoyanova II, Gulubova MV. Mast cells and inflammatory mediators in chronic ulcerative colitis. *Acta Histochem* 2002; 104:185-192
- 39 Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001;7:175-184
- 40 Xia B, Guo HJ, Crusius J, Deng CS, Meuwissen S, Pena A. In vitro production of TNF- $\alpha$ , IL-6 and sIL-2R in Chinese patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 1998;4:252-255
- 41 Funakoshi K, Sugimura K, Anezaki K, Bannai H, Ishizuka K, Asakura H. Spectrum of cytokine gene expression in intestinal mucosal lesions of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Digestion* 1998;59:73-78
- 42 Monteleone G, MacDonald TT. Manipulation of cytokines in the management of patients with inflammatory bowel disease. *Ann Med* 2000;32:552-560
- 43 Brown KA, Back SJ, Ruchelli ED, Markowitz J, Mascarenhas M, Verma R, Piccoli DA, Baldassano RN. Lamina propria and circulating interleukin-6 in newly diagnosed pediatric inflammatory bowel disease patients. *Am J Gastroenterol* 2002;97: 2603-2608
- 44 Sasaki M, Jordan P, Houghton J, Meng X, Itoh M, Joh T, Alexander JS. Transfection of IL-10 expression vectors into endothelial cultures attenuates alpha 4 beta 7-dependent lymphocyte adhesion mediated by MAdCAM-1. *BMC Gastroenterol* 2003;3:3
- 45 Tamura K, Fukuda Y, Sashio H, Takeda N, Bamba H, Kosaka T, Fukui S, Sawada K, Tamura K, Satomi M, Yamada T, Yamamura T, Yamamoto Y, Furuyama J, Okamura H, Shimoyama T. IL18 polymorphism is associated with an increased risk of Crohn's disease. *J Gastroenterol* 2002;37(Suppl 14):111-116
- 46 Ito H, Hirotani T, Yamamoto M, Ogawa H, Kishimoto T. Anti-IL-6 receptor monoclonal antibody inhibits leukocyte recruitment and promotes T-cell apoptosis in a murine model of Crohn's disease. *J Gastroenterol* 2002;37(Suppl 14):56-61
- 47 Schmidt C, Marth T, Wittig BM, Hombach A, Abken H, Stallmach A. Interleukin-12 antagonists as new therapeutic agents in inflammatory bowel disease. *Pathobiology* 2002;70: 177-183
- 48 Lochner M, Forster I. Anti-interleukin-18 therapy in murine models of inflammatory bowel disease. *Pathobiology* 2002; 70:164-169
- 49 Brannigan AE, Watson RW, Beddy D, Hurley H, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. Increased adhesion molecule expression in serosal fibroblasts isolated from patients with inflammatory bowel disease is secondary to inflammation. *Ann Surg* 2002; 235:507-511
- 50 Viita H, Sen CK, Roy S, Siljamaki T, Nikkari T, Yla-Herttuala S. High expression of human 15-lipoxygenase induces NF-kappaB-mediated expression of vascular cell adhesion molecule 1, intercellular adhesion molecule 1, and T-cell adhesion on human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 1999;1:83-96
- 51 Kaur J, Woodman RC, Ostrovsky L, Kubes P. Selective recruitment of neutrophils and lymphocytes by thrombin: a role for NF-kappaB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281: H784-795
- 52 Minami T, Aird WC. Thrombin stimulation of the vascular cell adhesion molecule-1 promoter in endothelial cells is mediated by tandem nuclear factor-kappa B and GATA motifs. *J Biol Chem* 2001;276:47632-47641
- 53 Dichtl W, Ares MP, Jonson AN, Jovinge S, Pachinger O, Giachelli CM, Hamsten A, Eriksson P, Nilsson J. Linoleic acid-stimulated vascular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells depends on nuclear factor-kappaB activation. *Metabolism* 2002;51:327-333
- 54 Weber KS, Draude G, Erl W, de Martin R, Weber C. Monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow is inhibited by adenovirus-mediated gene transfer of IkappaB-alpha. *Blood* 1999;93:3685-3693
- 55 Kokura S, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN, Aw TY. Molecular mechanisms of neutrophil-endothelial cell adhesion induced by redox imbalance. *Circ Res* 1999;84:516-524
- 56 Dijkstra G, Moshage H, Jansen PL. Blockade of NF-kappaB activation and donation of nitric oxide: new treatment options in inflammatory bowel disease? *Scand J Gastroenterol Suppl* 2002;236:37-41
- 57 Rafiee P, Johnson CP, Li MS, Ogawa H, Heidemann J, Fisher PJ, Lamirand TH, Otterson MF, Wilson KT, Binion DG. Cyclosporine A enhances leukocyte binding by human intestinal microvascular endothelial cells through inhibition of p38 MAPK and iNOS. Paradoxical proinflammatory effect on the microvascular endothelium. *J Biol Chem* 2002;277:35605-35615
- 58 Grisham MB, Pavlick KP, Laroux FS, Hoffman J, Bharwani S, Wolf RE. Nitric oxide and chronic gut inflammation: controversies in inflammatory bowel disease. *J Invest Med* 2002; 50:272-283
- 59 Naito Y, Takagi T, Ishikawa T, Handa O, Matsumoto N, Yagi N, Matsuyama K, Yoshida N, Yoshikawa T, Kotake Y. alpha-Phenyl-N-tert-butyl nitrone provides protection from dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:195-206
- 60 Cavicchi M, Whittle BJ. Regulation of induction of nitric oxide synthase and the inhibitory actions of dexamethasone in the human intestinal epithelial cell line, Caco-2: influence of cell differentiation. *Br J Pharmacol* 1999;128:705-715
- 61 Schwertschlag US, Trepicchio WL, Dykstra KH, Keith JC, Turner KJ, Dorner AJ. Hematopoietic, immunomodulatory and epithelial effects of interleukin-11. *Leukemia* 1999;13: 1307-1315
- 62 Weaver SA, Russo MP, Wright KL, Kolios G, Jobin C, Robertson DA, Ward SG. Regulatory role of phosphatidylinositol 3-kinase on TNF-alpha-induced cyclooxygenase 2 expression in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2001;120:1117-1127
- 63 Conner EM, Brand S, Davis JM, Laroux FS, Palombella VJ, Fuseler JW, Kang DY, Wolf RE, Grisham MB. Proteasome inhibition attenuates nitric oxide synthase expression, VCAM-1 transcription and the development of chronic colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282:1615-1622
- 64 Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Uose S, Ohana M, Uchida K, Nishi T, Debrececi A, Itoh T, Kawanami C, Iwano M, Ikada Y, Chiba T. An oral drug delivery system targeting immune-regulating cells ameliorates mucosal injury in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297: 1122-1128
- 65 Brueckmann M, Marx A, Martin Weiler H, Liebe V, Lang S, Kaden JJ, Zieger W, Borggrete M, Huhle G, Konstantin Haase K. Stabilization of monocyte chemoattractant protein-1-mRNA by activated protein C. *Thromb Haemost* 2003;89:149-160
- 66 Fietta AM, Morosini M, Meloni F, Bianco AM, Pozzi E. Pharmacological analysis of signal transduction pathways required for mycobacterium tuberculosis-induced IL-8 and MCP-1 production in human peripheral monocytes. *Cytokine* 2002;19:242-249
- 67 Weber CK, Liptay S, Wirth T, Adler G, Schmid RM. Suppression of NF-kappaB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of IkappaB kinases alpha and beta. *Gastroenterology* 2000;119:1209-1218
- 68 Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottiere HM, Galmiche JP. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000;47:397-403
- 69 Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Buschenfelde KH, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* 1996;2:998-1004
- 70 Neurath MF, Pettersson S. Predominant role of NF-kappa B p65 in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation. *Immunobiology* 1997;198:91-98

# 生长抑素对消化道肿瘤的调控作用

陈滢珊, 王承党

陈滢珊, 王承党, 福建医科大学附属第一医院消化科, 福建医科大学消化系病研究室 福建省福州市 350005  
福建省自然科学基金资助课题, No.C9910008  
中国教育部高等学校骨干教师基金课题, No. 00A003  
项目负责人: 王承党, 350005, 福建省福州市茶亭, 福建医科大学附属第一医院消化科, 福建医科大学消化系病研究室. wangcdhl@pub6.fz.fj.cn  
电话: 591-3357199-2719  
收稿日期: 2003-04-07 接受日期: 2003-10-11

## 摘要

生长抑素(SS)普遍存在于人体正常组织, 具有广泛、抑制性生理功能, 目前已用于内分泌肿瘤的诊断及治疗. 越来越多的学者对 SS 对非内分泌性、实体性肿瘤是否具有抑制作用深感兴趣, 本文就近年来 SS 对消化道常见肿瘤的生长调控作用、可能的作用机制, 以及 SS 在消化道肿瘤诊断和治疗中的作用作一综述.

陈滢珊, 王承党. 生长抑素对消化道肿瘤的调控作用. 世界华人消化杂志 2004;12(1):184-189

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/184.asp>

## 0 引言

生长抑素(somatostatin, SS)是 Brazeau et al 于 1973 年从羊下丘脑分离提纯的一种生长激素释放控制因子, 为环状多肽, 有 14 肽(SS-14)和 28 肽(SS-28)两种天然形式. 已经人工合成多种 SS 类似物, 八肽类似物有奥曲肽(octreotide)、lanreotide (BIM2304)、vaptreotide(RC-160), 七肽类似物有 TT-232, 六肽类似物有 seglitide (MK-678)等. SS 有广泛的抑制作用, SS 可以抑制肿瘤的增生, 肿瘤组织自身分泌表达的 SS 可能与肿瘤的发生、发展和预后有密切的关系, 本文就 SS 对消化道肿瘤的调控作用作一综述.

## 1 概述

1.1 SS SS 由神经内分泌细胞、炎症细胞、免疫细胞产生, 主要分布于中枢和周围神经系统、胰腺及胃肠道, 少量分布于甲状腺、肾上腺、肾脏、前列腺、颌下腺及胎盘等各种人体组织. 其合成和释放受多种因素影响, 消化道腔内刺激物(酸、食物等)、神经递质和多肽类激素可诱导 SS 释放, 腺苷酸环化酶/cAMP 依赖系统和蛋白激酶 C/ $Ca^{2+}$  依赖系统等细胞内信号传递系统参与 SS 释放的调控. SS 可抑制多种生理功能, 如抑制胃、胰腺、肝、唾液腺的外分泌功能; 抑制胃泌素、胆囊收缩素、胰泌素等几乎所有胃肠肽类激素的分泌释放; 抑制胃肠道和胆道运动; 抑制肠道对水电解质和营养

成分的转运; 抑制消化道血流及上皮细胞增生.

1.2 SS 受体(SSR) 人们通过分子生物学技术已克隆出 5 种 SS 受体亚型, 他们是由不同染色体上的独立基因编码, 与 G 蛋白偶联的细胞膜受体, 是具有 7 个跨膜  $\alpha$ -螺旋结构的受体(somatostatin seven-transmembrane-domain receptor). 其中 SSR1 主要分布于大脑皮层、杏仁核、胃肠道; SSR2 主要分布于大脑皮层、垂体、肾上腺; SSR3 分布于小脑、垂体; SSR4 分布于大脑、心脏、胰腺; SSR5 分布于下丘脑和垂体. Ammon et al<sup>[1]</sup>发现 SSR3 位于细胞膜上, SSR1 位于胞内囊泡, 他们构成 SSR3 和 SSR1 复合受体, SSR3 的氨基末端引导该复合体定位于细胞膜上. SSR 各亚型的基因序列在跨膜区最为接近, 同源序列为 55-70%, 而整个基因序列的同源性为 39-57%. 根据结构相似性及对 SS 类似物(SSA)的亲合性不同, SSR 可分为两类: 与 SSA 亲和力较强的受体和与 SSA 亲和力较弱的受体, 前者包括 SSR2、SSR3、SSR5, 后者包括 SSR1、SSR4. 受体亚型不同, 与配体的亲和力不同, 所发挥的生理作用也不完全相同: 如 SSR2 抑制胰高血糖素释放, 而 SSR5 抑制胰岛细胞分泌胰岛素<sup>[2]</sup>. 奥曲肽(octreotide)、lanreotide (BIM2304)、vaptreotide (RC-160)、seglitide (MK-678) 只与 SSR2、SSR3、SSR5 结合, 其中与 SSR2、SSR5 的结合力较强, 与 SSR3 结合力较弱. 近年许多学者对 SSR 的激动剂感兴趣, 最近开发的 CH275 是 SSR1、SSR4 特异性激动剂<sup>[3]</sup>; 在已知肽类激动剂的分子模型基础上一系列 SS 的非肽类类似物也已诞生, 其中 L-797591、L-779976、L-796778、L-803087、L-817818 分别对 SSR1、SSR2、SSR3、SSR4、SSR5 有高亲和力<sup>[4]</sup>. 而 Tyr(0)-(cyclo-D-Dab-Arg-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe) (KE108) 对所有 SSR 亚型均表现出极高的亲和力, 在治疗表达几种 SSR 亚型的肿瘤上, SSR 非特异性兴奋剂具有极可观的商业和临床应用价值<sup>[5]</sup>.

目前关于 SSR 基因突变的研究较少, 胰腺癌细胞株 SSR2 编码序列虽未缺失, 但很少表达 SSR2, 主要原因系 SSR2 基因启动子 -83A 突变为 G, 为核因子 1 创造了特异性结合位点, 从而抑制 SSR2 基因转录<sup>[6]</sup>. 如果鼠 SSR3 氨基端 Asn18、Asn31(天门冬酰胺)同时突变为 Thr(苏氨酸), 则与配体的亲和力及抑制腺苷酸环化酶的作用均明显减弱<sup>[7]</sup>. Sharma et al<sup>[8]</sup>认为 SSR5 的截头去尾突变体导致的抗增生信号丢失与删除长度呈比例, 由 SSR5 介导的细胞生长抑制信号可使细胞周期素依赖性激酶抑制剂 p21 微量增加, 该信号是 G 蛋白依赖性

的, 而且需要蛋白质酪氨酸磷酸化酶(protein tyrosine phosphatase, PTP)介导, 奥曲肽可使PTP向膜移动, 但当其直接加入膜时并不能加强PTP的作用, 说明SSR5的C末端区域对PTP依赖的细胞周期停滞是必需的, 该区域可以诱导低磷酸化的Rb和G1期停滞. 人SSR1的C端缺失突变体丧失了内化能力, SSA亦无法诱导其表达上调<sup>[9]</sup>. Petersenn et al<sup>[10]</sup>认为SSR5基因上游启动子的激活具有组织特异性.

## 2 SS及其受体在消化道肿瘤组织中的表达

人胃的SS大部分局限于胃体和幽门部胃黏膜D细胞, 在幽门螺杆菌感染、消化性溃疡等状态下, 胃D细胞的数量、功能及SSR可能发生一定的变化. 正常成人幽门窦黏膜存在着能共同表达胃泌素和SS mRNA及相关肽的细胞<sup>[11]</sup>. Zhang et al<sup>[12]</sup>发现胃癌组织SS mRNA表达明显增加, 分化差的组织表达更高, 临床分期中, III、IV期SS mRNA较I、II期显著增加;但不少研究发现胃癌组织中SS水平明显降低<sup>[13, 15-16]</sup>, 贲门癌组织中SS的阳性率和表达强度都比胃窦癌、胃体癌低, 细胞增殖活性较强, 患者手术后容易复发, 生存期短, 可能与胃底贲门部SS水平较低, SS对肿瘤演进过程中调控作用减弱有关<sup>[13]</sup>. Le Romancer et al<sup>[14]</sup>利用RT-PCR技术首次在人胃癌细胞株HGT1上检测到SSR1-5 mRNA表达. 癌前状态、萎缩性胃炎和胃癌组织的SSR2明显降低, 分化差的胃癌组织SSR2表达更低<sup>[15]</sup>;胃癌组织的SSR2低表达可能与胃癌的腹腔淋巴结转移有关<sup>[16]</sup>, 但亦有研究发现在胃癌、胰腺癌周围的静脉SSR过度表达, 而在动脉却未能检测出SSR<sup>[17]</sup>.

除Miapaca-2外, SW-1990、Panc-1、Capan-1、CFPAC-1、Capan-2胰腺癌细胞株均表达SSR, 如SW1990表达SSR3、SSR5; Panc-1、Capan-1、CFPAC-1、Capan-2表达SSR2、SSR3和SSR5. SS类似物AN-238可显著抑制这些细胞株的生长, 抑制率与SSR表达率成正比<sup>[18]</sup>;但目前很多学者认为胰腺癌SSR2表达明显减少<sup>[20]</sup>. Fisher et al<sup>[19]</sup>证实SSR2的表达明显减少胰腺癌细胞分裂, 这一作用并不依赖SS, 可能通过上调肿瘤抑制蛋白的表达. TGF- $\beta$ 上调鼠SSR2启动子的转录激活, Smad-4参与这一反式激活, Smad-4的缺失可能与胰腺癌SSR2表达减少有关<sup>[20]</sup>.

正常结肠和病变结肠组织中表达最频繁的SSR mRNA亚型是SSR5、SSR1和SSR2, SSR5 mRNA在左结肠癌的表达频率明显高于正常结肠黏膜, 但肿瘤的Dukes分期与SSR mRNA的表达无关, 进展期结肠癌都有SSR2、SSR5表达, 左右结肠组织SSR mRNA的表达频率存在明显不同<sup>[21]</sup>;随后的研究证实人结肠肿瘤中SSR5 mRNA高表达, 是最主要的SSR蛋白亚型<sup>[22]</sup>. 而有研究认为结直肠癌SSR2 mRNA并没有明显过度表达, 相反, 术前CEA浓度升高的患者SSR2 mRNA明显减少<sup>[23]</sup>. 结直肠癌患者SS的表达程度与肿瘤分化程

度、预后成正相关<sup>[24]</sup>.

研究表明胆囊腺癌、肝胆管细胞癌<sup>[25-26]</sup>和原发性肝癌<sup>[25]</sup>都可以表达SSR, 原发性肝癌癌组织中SSR2和SSR3 mRNA的阳性率分别为81.5%和66.7%, 癌旁组织阳性率分别为96.3%和51.9%<sup>[27]</sup>. SS六肽类似物MK-678对人胆管细胞癌上的SSR2有特异性、高亲和力, 而且SS-14和奥曲肽在体内或体外均能抑制胆管细胞癌的生长, 其机制并非通过改变细胞周期腺苷单磷酸和Ca<sup>2+</sup>水平的变化<sup>[26]</sup>. 也有学者发现八肽类似物lanreotide对胆管腺癌和肝胆管细胞癌并没有明显的治疗反应<sup>[25]</sup>.

文献报道的消化系统恶性肿瘤中SSR分布情况差别比较大, 这可能与受体检测技术的准确性、研究样本的选取和样本纳入标准不同等有关. 目前常用的受体检测技术有酶联免疫分析、DCC、放射免疫分析、RT-PCR、免疫组化、流式细胞术等, 规范化、标准化的检测技术是获得激素受体表达及其生物活性的真实信息的关键. 目前, 激素受体的异位表达机制及受体功能特征的研究还比较薄弱, 激素生物效应网络中的许多其他活性分子(如中间分子、效应分子、效应协同或拮抗剂)还了解不多, 尚需进行深入细致的研究.

## 3 SS对肿瘤的抑制作用机制

3.1 直接抗增生作用 SSR与配体结合后被激活, 5个亚型的SSR的信号传导通路是相同的.SS可以通过下列途径实现直接抗增生作用: (1) SSR与腺苷酸环化酶结合, 降低细胞内cAMP浓度<sup>[28]</sup>; (2)激活PTP, 调节有丝分裂激活蛋白激酶MAKP, 导致细胞分裂停止, 并诱导Rb抑癌蛋白和P21的产生; (3)抑制Ca<sup>2+</sup>内流, 降低细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度; (4)磷酸酰肌醇-3-激酶途径: SSA可以抑制磷酸酰肌醇-3-激酶, 提高p21(cip)和p27(kip1)的表达, 抑制pRb磷酸化, 抑制E-细胞周期素依赖激酶-2复合体(Cyclin-E-cdk2)的活性<sup>[29]</sup>, 从而抑制肿瘤细胞增生; (5)SS与SSR2结合后激发胞内SHP-1(酪氨酸磷酸酶)活性上调, SHP-1可使nNOS(神经元NO合酶)酪氨酸迅速去磷酸化而激活, 产生大量NO, 后者激活鸟苷酸环化酶而抑制细胞增生<sup>[30]</sup>, 该作用是肽类有丝分裂原受体有关的酪氨酸的逆向作用, 因为SSR2几乎见于所有人类常见肿瘤, 故这种机制近年来得到广泛重视; Douziech et al<sup>[31]</sup>甚至认为SS对人胰腺癌细胞株的不同作用取决于SHP-1的存在与否.

3.2 间接抗增生作用 SS与非肿瘤细胞表面的SSR结合, 通过抑制其自分泌、旁分泌作用, 减少各种促肿瘤生长的激素或生长因子的释放而起到抗肿瘤增生作用.<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷掺入实验证明胰腺癌细胞DNA的合成率在EGF刺激后增加45.0  $\pm$  5.6%, 奥曲肽作用后DNA合成率降低11.6  $\pm$  2.6%, SS对基础和EGF刺激的胰腺癌生长均有抑制作用, EGF+奥曲肽联合作用可以使<sup>3</sup>H-TDR掺入明显减少<sup>[32]</sup>; SS抑制bFGF的增生效应, 也可增强bFGF对MAPK的刺激作用, 二者协同

作用引起细胞周期素依赖激酶抑制剂 p21cip/WAF1 过度表达, 从而发挥抗增生作用<sup>[33]</sup>; 许多研究亦表明胃泌素可促进肿瘤细胞增生, SS 对其有拮抗作用, 此外, G 细胞的功能受 D 细胞分泌的 SS 旁分泌调控, D 细胞可通过释放 NO 调控 G 细胞凋亡<sup>[34]</sup>.

**3.3 促进肿瘤细胞凋亡** 肿瘤细胞无限增生的很大原因在于凋亡减少, 细胞凋亡机制复杂, 研究手段尚不完善, 国内外学者运用流式细胞分析、凋亡细胞的原位末端标记(TUNEL)、形态学观察等方法, 普遍认为 SS 可促进肿瘤细胞凋亡. SS 可通过抑制各种生长因子的分泌而发挥作用, SS 抗增生作用涉及的传导通路因细胞受体亚型不同而不同, SSR1、SSR4、SSR5 调整 MAP 激酶通路, 诱导细胞周期停滞于 G1 期, SSR3、SSR2 分别通过 p53 依赖和非依赖性机制促进凋亡<sup>[35]</sup>. 在 SS 介导的凋亡中, SHP-1 和 Caspase-8 介导的细胞内酸化发生于原位而非线粒体, 且酸化先于线粒体功能失调, 推测 SS 诱导的凋亡并不依赖于线粒体的功能破坏和 Caspase-9 的活化<sup>[36]</sup>; SSR2 也可以通过上调 TRAIL(TNF 相关的凋亡诱导配体)和 TNF- $\alpha$  受体、DR4、TNFRI 的表达, 使细胞对死亡配体诱导激活剂 caspase-8 的激活敏感化, 并下调抗凋亡线粒体蛋白 bcl-2 的表达, 从而促进凋亡<sup>[37]</sup>; 研究发现 Octreotide 还可显著下调 bcl-2 蛋白表达、上调 bax 蛋白的表达<sup>[38]</sup>, 或者通过激活 JNK(c-Jun 氨基端激酶)和阻断 ERK2(胞外信号调节激酶)激活而诱导细胞凋亡<sup>[39]</sup>; 此外, 奥曲肽可抑制 SGC-7901 细胞株 PCNA 的表达、减少 <sup>3</sup>H-TDR 的掺入、DNA 合成减少, 从而抑制细胞增生<sup>[40]</sup>; SS 对体内体外胃癌 c-fos 和 ERK1/ERK2 的表达均有抑制作用, 并可以抑制激活蛋白 AP-1 的结合活动<sup>[41]</sup>; 奥曲肽可以诱导肝癌细胞株 BEL-7402 染色质浓缩, 凋亡小体形成, 凋亡率与奥曲肽浓度呈正相关<sup>[42]</sup>; 或者通过抑制 DNA 合成, 诱导肝癌细胞株 SMMC-7721 凋亡<sup>[43]</sup>; 还可以明显诱导肝切除术后种植性肝癌细胞凋亡, 且对术后肝再生无影响<sup>[44]</sup>.

**3.4 抑制肿瘤血管形成** 血管内皮生长因子(VEGF)是一种内皮细胞特异性致分裂原, 在新生血管形成中起关键作用, 对于正常组织修复、肿瘤细胞增生及细胞基质浸润和血源性转移都是必需的. 奥曲肽能降低肝癌细胞种植瘤的 VEGF 表达, 使种植瘤的血管密度明显降低<sup>[45]</sup>. 肿瘤周围血管有 SSR 分布, 且越靠近肿瘤的血管 SSR 的表达密度越高, 当奥曲肽与 SSR 特异性结合后, 可引起肿瘤周边血管强烈收缩, 并能抑制新生血管形成, 从而减少肿瘤血供, 导致肿瘤局部缺血坏死. 奥曲肽可降低结直肠癌患者 VEGF-1 水平<sup>[46]</sup>.

**3.5 其他可能机制** SS 可刺激人体 NK 细胞和网状内皮细胞系统、淋巴系统, 提高整个机体免疫功能, 从而抑制肿瘤细胞增生. 令人惊奇的是 Dalm et al<sup>[47]</sup> 发现人体免疫系统均表达 SSR, 但仅胸腺组织表达 SS, 而淋巴组织和免疫细胞均表达 CST (cortistan) mRNA, 且 CST 可以和 SSR2 结合, 说明人体免疫系统中, CST 可以代

替 SS 成为 SSR 的内源性配体. SS 与 SSR1-3 结合, 抑制 carbachol 诱导胰腺 AR42J 细胞的 c-fos mRNA 表达<sup>[48]</sup>. Boros et al<sup>[49]</sup> 体外研究发现 SSA 可抑制胰腺癌细胞葡萄糖 6-磷酸脱氢酶, 使糖耐量减低, 抑制戊糖循环中的转酮醇酶活性(此酶与胰腺癌细胞的核糖合成直接相关), 增强转酮醇酶抑制剂 oxythiamine 诱导肿瘤细胞凋亡作用的活性, 使胰腺癌对葡萄糖中碳的再利用发生障碍. 奥曲肽或 RC-160 可加强胃癌细胞株 HGT1 上 DNA 依赖的蛋白激酶(DNA-PK)活动<sup>[50]</sup>. 此外, 奥曲肽可以通过翻译后修饰诱导肝癌和肠癌细胞株 P53 蛋白 C 端裂解, 产生分子量为 40 KD 的裂解产物, 且这一活动并不依赖蛋白激酶级联反应<sup>[51]</sup>. SS 可缓解疼痛, 减轻化疗药物引起的胃肠道副作用, 如恶心、腹泻、腹痛等. SS 治疗 5-Fu 化疗引起的腹泻比 loperamide 更有效<sup>[52]</sup>; SS 还抑制内脏运动、分泌功能、抑制内脏血流, 用于治疗癌症患者恶液质、腹水和恶性肿瘤引起的难治性上消出血, 肝癌、胃癌合并上消化道出血时奥曲肽治疗可明显提高抢救成功率<sup>[53]</sup>.

#### 4 SS 对消化道肿瘤诊断治疗的研究及临床应用进展

SS 及其类似物已用于治疗胰岛细胞瘤、急性胰腺炎、急性上消化道出血、倾倒综合征、肠外瘘等多种疾病, 也是肿瘤诊断、治疗的辅助方法.

现已采用 SSR 放射自显影技术对几乎所有 SSR 阳性的肿瘤进行实验或临床研究, 原理是肿瘤组织 SSR 密度和对 SS 亲和力远高于正常组织, 结合放射性 SS 后, 通过放射自显影成像, 肿瘤区域扫描信号与正常组织扫描信号形成对比, 即肿瘤/背景比, 根据这个比值可以对肿瘤进行定位和诊断. 有些放射性 SS 与肿瘤 SSR 的某些亚型结合后, 通过受体内化机制将放射性带入细胞内起到靶向放疗作用, 可以减少常规外放疗毒性和副反应. 近年已合成多种放射性 SS 衍生物, 如 <sup>123</sup>I-Tyr-3-奥曲肽、<sup>125</sup>I-Tyr-3-奥曲肽、<sup>125</sup>I-BIM-23027 等, 用于体外组织的 SSR 受体放射配基分析或进行体内瘤体 SSR 放射自显影定位. 目前其放射性核素治疗已进入一期临床试验, SSA 靶向放疗是目前治疗 SSR 阳性肿瘤最具前景的治疗方式<sup>[54]</sup>. 定位于 SSR 阳性细胞上的放射性同位素的交叉放射作用可以杀伤 SSR 阴性肿瘤细胞, 但同样也可以杀伤周围正常组织, 应尽可能浓聚射线, 保护正常组织结构免受损伤. De Jong et al<sup>[54]</sup> 应用 [<sup>117</sup>Lu-DOTA, Tyr-3]-奥曲肽治疗 18 例神经内分泌肿瘤患者, 经 CT 评估, 其中 6% 患者的肿瘤缩小了 25-50%, 39% 患者缩小 50-100%, 11% 肿瘤进展, 44% 无变化. 肾脏吸收 <sup>111</sup>In-DTPA-octreotide 的量是限制 <sup>111</sup>In-DTPA-octreotide 肽受体放射性核治疗(peptide receptor radionuclide therapy, PRRT)用量的关键, LysArg 和 <sup>111</sup>In-DTPA-octreotide 联合灌注, 可明显减少肾吸收, 减轻肾毒性, 提高患者对 <sup>111</sup>In-DTPA-octreotide PRRT 的耐受能力, 改善效果<sup>[55]</sup>. 对于 SSR 阴性肿瘤, PRRT

无效<sup>[56]</sup>. 但 Mearadji et al<sup>[57]</sup>发现 SSR 阴性的结肠癌细胞转染 SSR2 基因后, 经门脉注入老鼠肝脏, 形成肝转移灶, 予<sup>[177 Lu-DOTA0, Tyr3] octreotate PRRT</sup>治疗后, 肝转移灶数目明显减小, 且呈剂量依赖性. 原发和转移的胰腺癌经转染 SSR2 基因后, 肿瘤凋亡增加, 细胞增生减少<sup>[58]</sup>. 运用<sup>[(18)F]FP-Gluc-TOCA</sup>进行 SSR PET 成像, 肿瘤和非肿瘤影像学对比明显, 有助临床识别<sup>[59]</sup>. <sup>111In-DTPA(0)-octreotide PRRT</sup>对部分肝切除老鼠肝内 SSR 阴性肿瘤生长具有抑制作用, 而对假性肝切除老鼠 SSR 阴性肿瘤无效, 可能因肝再生过程中, SSR 阴性肿瘤缩小<sup>[60]</sup>.

目前应用的 SSA 主要与 SSR2、5 结合, 大剂量时也与 SSR3 结合, SSA 主要通过直接抑制肿瘤的激素分泌而发挥作用, 可使 30-70% 患者的临床症状缓解, 其对外周靶器官的间接非肿瘤介导作用也使部分患者症状改善. 奥曲肽持续滴注可使晚期原发性肝癌患者肿瘤供应血管管径迅速缩小、血管阻力指数下降, 8% 患者肿瘤缩小, 67.7% 无变化, 25% 进展, 但同时可能因拮抗生长激素而使血清白蛋白下降<sup>[61]</sup>, 奥曲肽可以显著增加中位生存期、增加累积生存率, AFP 下降<sup>[62]</sup>; Dimitroulopoulos et al<sup>[63]</sup>运用 LAR 治疗进展期原发性肝癌, 生存时间延长, 生存质量有所改善, 但 AFP 无下降, 肿瘤体积亦无缩小. 但也有报道认为不仅治疗前后 AFP 无变化, 生活质量也无改善<sup>[64]</sup>. TT-232 在体内对外分化、未分化, 药物敏感和多药耐药的肝癌细胞株都显示了强大的抗增生作用, 而且不会抑制生长激素的释放<sup>[65]</sup>. 也可以诱导结肠癌细胞 HT-29 凋亡<sup>[66]</sup>. 几个多中心双盲随机对照研究支持奥曲肽或 SS 可以预防胰腺癌切除术后并发症的发生<sup>[67]</sup>, Burch et al<sup>[68]</sup>认为奥曲肽 200-500  $\mu\text{g}$  tid 治疗进展期胰腺癌, 在延缓肿瘤生长及延长生存期方面并不比 5-Fu 或 5-FU+ 叶酸更有效. TT-232 通过激活 PTP 酶, 在体内体外对胰腺癌均有生长抑制作用, 这一作用可被 PTP 酶抑制剂 sodium orthovanadate 逆转<sup>[69]</sup>. 奥曲肽或奥曲肽和 tamoxifen 合用可以抑制 N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine 诱导的鼠胰腺癌生长, 肝转移灶的数目和大小亦明显减少, 且联合治疗并不比单一用药优越<sup>[70]</sup>. RC-160 100  $\mu\text{g}$  s.c qd, 连用 4-5 wk, 对裸鼠 MKN45 胃癌移植瘤具有明显抑制作用, 抑制效果与 SMS201-995 相当, 移植瘤有丝分裂细胞数目明显下降, 血清胃泌素、生长激素水平降低, EGF(表皮生长因子)结合点下调<sup>[71]</sup>. 奥曲肽和阿司匹林合用可显著抑制体内体外胃癌的生长, 机制是通过调节 SSR2 和 SSR3 表达, 抑制环氧化酶-2 的表达<sup>[72]</sup>. 奥曲肽尚有助于食管癌患者食管-支气管瘘的闭合<sup>[73]</sup>. SSA 用在消化道肿瘤临床应用意见不一, 原因有: (1) 肿瘤的生物特性不同, 受体表达不同及受体变异, 都影响对 SSA 的反应. (2) 治疗剂量不同, 奥曲肽的血浆浓度低于 1 200  $\mu\text{g/L}$  (相当于  $1.2 \times 10^{-6}$  mol/L) 时作用不明显, 临床上皮下注射奥曲肽至少应 200  $\mu\text{g}$ , tid 方有可能达到这一浓度.

(3) 治疗方案不同, 间歇使用奥曲肽, 可以避免持续使用出现的去敏感现象, 临床疗效可能会提高. 近来使用药物长效储存作用模式(月贮积模式), 使患者的生存质量得到显著提高. 最优给药方式及剂量的研究, 新的缓慢释放药物模式的发展, 大剂量 SSA 治疗的潜在价值及开发新的 SSR 亚型特异性类似物都是未来 SS 类似物应用的重要方向.

总之, 消化道肿瘤是严重威胁我国人民健康的重要杀手, 目前治疗方案尚不尽人意, SSA 抗肿瘤特性的发现, 为消化道肿瘤的治疗带来一线曙光, 但目前治疗特异性不高, 价格昂贵, 所需剂量大, 患者依从性差, 临床应用受限, 随着对其抗肿瘤机制的进一步阐明, 对肿瘤生物学行为的深刻了解及生物工程技术的提高, SSA 可能成为一种广谱、高效的抗肿瘤药物.

## 5 参考文献

- 1 Ammon C, Schafer J, Kreuzer OJ, Meyerhof W. Presence of a plasma membrane targeting sequence in the amino-terminal region of the rat somatostatin receptor 3. *Arch Physiol Biochem* 2002;110:137-145
- 2 Strowski MZ, Parmar RM, Blake AD, Schaeffer JM. Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice. *Endocrinology* 2000;141:111-117
- 3 Aavik E, Luoto NM, Petrov L, Aavik S, Patel YC, Hayry P. Elimination of vascular fibrointimal hyperplasia by somatostatin receptor 1, 4-selective agonist. *FASEB J* 2002;16:724-726
- 4 Cheng H, Yibchok-anun S, Coy DH, Hsu WH. SSTR2 mediates the somatostatin-induced increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and insulin secretion in the presence of arginine vasopressin in clonal beta-cell HIT-T15. *Life Sci* 2002;71:927-936
- 5 Reubi JC, Eisenwiener KP, Rink H, Waser B, Macke HR. A new peptidic somatostatin agonist with high affinity to all five somatostatin receptors. *Eur J Pharmacol* 2002;456:45-49
- 6 Torrisani J, Bouisson M, Puente E, Capella G, Laurent-Puig P, Berger A, Vaysse N, Susini C, Buscail L. Transcription of SST2 somatostatin receptor gene in human pancreatic cancer cells is altered by single nucleotide promoter polymorphism. *Gastroenterology* 2001;120:200-209
- 7 Nehring RB, Richter D, Meyerhof W. Glycosylation affects agonist binding and signal transduction of the rat somatostatin receptor subtype 3. *J Physiol Paris* 2000;94:185-192
- 8 Sharma K, Patel YC, Srikant CB. C-terminal region of human somatostatin receptor 5 is required for induction of Rb and G1 cell cycle arrest. *Mol Endocrinol* 1999;13:82-90
- 9 Hukovic N, Rocheville M, Kumar U, Sasi R, Khare S, Patel YC. Agonist-dependent up-regulation of human somatostatin receptor type 1 requires molecular signals in the cytoplasmic C-tail. *J Biol Chem* 1999;274:24550-24558
- 10 Petersenn S, Rasch AC, Bohnke C, Schulte HM. Identification of an upstream pituitary-active promoter of human somatostatin receptor subtype 5. *Endocrinology* 2002;143:2626-2634
- 11 Larsson LI, Tingstedt JE, Hougaard DM. Coexpression of the gastrin and somatostatin genes in differentiating and neoplastic human cells. *Histochem Cell Biol* 1995;104:139-144
- 12 Zhang QX, Dou YL, Shi XY, Ding Y. Expression of somatostatin mRNA in various differentiated types of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 1998;4:48-51
- 13 石斌, 李玉民, 周彦明, 冯颖. 生长抑素的表达与胃癌生物学行为相关性研究. *临床肿瘤学杂志* 2002;7:241-243
- 14 Le Romancer M, Cherifi Y, Lévasscur S, Laigneau JP, Peranzi G, Jais P, Lewin MJ, Reyl-Desmurs F. Messenger RNA expression of somatostatin receptor subtypes in human and rat gastric mucosae. *Life Sci* 1996;58:1091-1098

- 15 迟志宏, 孙晓华, 郑文尧, 梁浩. 人胃癌组织中生长抑素2型受体表达的初步研究. *中国肿瘤临床与康复* 2001;8:18-21
- 16 王承党, 陈玉丽, 吴婷, 刘豫瑞. 胃癌组织中生长抑素II型受体基因低表达与淋巴结转移. *世界华人消化杂志* 1999;7:864-866
- 17 Denzler B, Reubi JC. Expression of somatostatin receptors in peritumoral veins of human tumors. *Cancer* 1999;85:188-198
- 18 Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, Sun B, Hebert F, Csernus B, Nagy A. Targeting of cytotoxic somatostatin analog AN-238 to somatostatin receptor subtypes 5 and/or 3 in experimental pancreatic cancers. *Clin Cancer Res* 2001;7:2854-2861
- 19 Fisher WE, Wu Y, Amaya F, Berger DH. Somatostatin receptor subtype 2 gene therapy inhibits pancreatic cancer in vitro. *J Surg Res* 2002;105:58-64
- 20 Puente E, Saint-Laurent N, Torrisani J, Furet C, Schally AV, Vaysse N, Buscail L, Susini C. Transcriptional activation of mouse sst2 somatostatin receptor promoter by transforming growth factor-beta. Involvement of Smad4. *J Biol Chem* 2001;276:13461-13468
- 21 Vuaroqueaux V, Dutour A, Briard N, Monges G, Grino M, Oliver C, Ouafik L. No loss of sst receptors gene expression in advanced stages of colorectal cancer. *Eur J Endocrinol* 1999;140:362-366
- 22 Vuaroqueaux V, Dutour A, Bourhim N, Ouafik L, Monges G, Briard N, Sauze N, Oliver C, Grino M. Increased expression of the mRNA encoding the somatostatin receptor subtype five in human colorectal adenocarcinoma. *J Mol Endocrinol* 2000;24:397-408
- 23 Casini Raggi C, Calabro A, Renzi D, Briganti V, Cianchi F, Messerini L, Valanzano R, Cameron Smith M, Cortesini C, Tonelli F, Serio M, Maggi M, Orlando C. Quantitative evaluation of somatostatin receptor subtype 2 expression in sporadic colorectal tumor and in the corresponding normal mucosa. *Clin Cancer Res* 2002;8:419-427
- 24 Sereti E, Gavril A, Agnantis N, Golematis VC, Voloudakis-Baltatzis IE. Immunoelectron study of somatostatin, gastrin and glucagon in human colorectal adenocarcinomas and liver metastases. *Anticancer Res* 2002;22:2117-2123
- 25 Fiebiger WC, Scheithauer W, Traub T, Kurtaran A, Gedlicka C, Kornek GV, Virgolini I, Raderer M. Absence of therapeutic efficacy of the somatostatin analogue lanreotide in advanced primary hepatic cholangiocellular cancer and adenocarcinoma of the gallbladder despite in vivo somatostatin-receptor expression. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:222-225
- 26 Tan CK, Podila PV, Taylor JE, Nagorney DM, Wiseman GA, Gores GJ, LaRusso NF. Human cholangiocarcinomas express somatostatin receptors and respond to somatostatin with growth inhibition. *Gastroenterology* 1995;108:1908-1916
- 27 区庆嘉, 颜登国. 生长抑素受体亚型SSTR-2和SS-R-3mRNA在原发性肝癌中的表达. *癌症* 2001;20:152-155
- 28 何双梧, 赵言明, 沈康强. 生长抑素对人结肠癌裸鼠移植瘤的作用及机制. *中国普外基础与临床杂志* 1999;6:1-3
- 29 Charland S, Boucher MJ, Houde M, Rivard N. Somatostatin inhibits Akt phosphorylation and cell cycle entry, but not p42/p44 mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in normal and tumoral pancreatic acinar cells. *Endocrinology* 2001;142:121-128
- 30 Lopez F, Ferjoux G, Cordelier P, Saint-Laurent N, Esteve JP, Vaysse N, Buscail L, Susini C. Neuronal nitric oxide synthase: a substrate for SHP-1 involved in sst2 somatostatin receptor growth inhibitory signaling. *FASEB J* 2001;15:2300-2302
- 31 Douziech N, Calvo E, Coulombe Z, Muradia G, Bastien J, Aubin RA, Lajas A, Morisset J. Inhibitory and stimulatory effects of somatostatin on two human pancreatic cancer cell lines: a primary role for tyrosine phosphatase SHP-1. *Endocrinology* 1999;140:765-777
- 32 Burghardt B, Barabas K, Marcsek Z, Flautner L, Gress TM, Varga G. Inhibitory effect of a long-acting somatostatin analogue on EGF-stimulated cell proliferation in Capan-2 cells. *J Physiol Paris* 2000;94:57-62
- 33 Florio T, Thellung S, Arena S, Corsaro A, Bajetto A, Schettini G, Stork PJ. Somatostatin receptor 1 (SSTR1)-mediated inhibition of cell proliferation correlates with the activation of the MAP kinase cascade: role of the phosphotyrosine phosphatase SHP-2. *J Physiol Paris* 2000;94:239-250
- 34 Larsson LI. Developmental biology of gastrin and somatostatin cells in the antropyloric mucosa of the stomach. *Microsc Res Tech* 2000;48:272-281
- 35 Ferjoux G, Bousquet C, Cordelier P, Benali N, Lopez F, Rochaix P, Buscail L, Susini C. Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation. *J Physiol Paris* 2000;94: 205-210
- 36 Liu D, Martino G, Thangaraju M, Sharma M, Halwani F, Shen SH, Patel YC, Srikant CB. Caspase-8-mediated intracellular acidification precedes mitochondrial dysfunction in somatostatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2000;275:9244-9250
- 37 Guillermet J, Saint-Laurent N, Rochaix P, Cuvillier O, Levade T, Schally AV, Pradayrol L, Buscail L, Susini C, Bousquet C. Somatostatin receptor subtype 2 sensitizes human pancreatic cancer cells to death ligand-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:155-160
- 38 唐卓斌, 刘为纹. 奥曲肽对人胃癌细胞株 SGC-7901 生长的影响. *癌症* 2002;21:103-104
- 39 Vantus T, Keri G, Krivickiene Z, Valius M, Stetak A, Keppens S, Csermely P, Bauer PI, Bokonyi G, Declercq W, Vandenabeele P, Merlevede W, Vandenheede JR. The somatostatin analogue TT-232 induces apoptosis in A431 cells: sustained activation of stress-activated kinases and inhibition of signalling to extracellular signal-regulated kinases. *Cell Signal* 2001;13:717-725
- 40 王春晖, 唐承薇, 汤丽平. 奥曲肽抑制胃癌生长的实验研究. *胃肠病学* 2002;7:158-162
- 41 王春晖, 唐承薇. 奥曲肽对胃癌细胞转录活化蛋白-1的抑制作用. *癌症* 2002;21:850-854
- 42 Chen X, Liu Z, Ai Z. Antineoplastic mechanism of Octreotide action in human hepatoma. *Chin Med J (Engl)* 2001;114:1167-1170
- 43 王春晖, 唐承薇, 汤丽平. 奥曲肽抑制肝癌生长的实验研究. *中华医学杂志* 2001;81:1194-1197
- 44 许戈良, 易述红, 徐荣楠. 善宁对大鼠肝部分切除术后种植性肝癌作用的实验研究. *中华外科杂志* 2001;39:948-950
- 45 孙培龙, 刘须才, 汪永录, 郭伟剑, 马晓明, 林万隆, 陈汉. 生长抑素对肝癌细胞血管内皮生长因子表达的影响. *肝胆外科杂志* 2001;9:53-54
- 46 Cascinu S, Del Ferro E, Ligi M, Staccioli MP, Giordani P, Catalano V, Agostinelli R, Mureto P, Catalano G. Inhibition of vascular endothelial growth factor by octreotide in colorectal cancer patients. *Cancer Invest* 2001;19:8-12
- 47 Dalm VA, van Hagen PM, van Koetsveld PM, Langerak AW, van der Lely AJ, Lamberts SW, Hofland LJ. Cortistatin rather than somatostatin as a potential endogenous ligand for somatostatin receptors in the human immune system. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:270-276
- 48 Cowles RA, Segura BJ, Mulholland MW. Regulation of carbachol-induced c-fos mRNA expression in AR42J cells by somatostatin receptor subtypes 1, 2, and 3. *Pancreas* 2002;25:239-244
- 49 Boros LG, Brandes JL, Yusuf FI, Cascante M, Williams RD, Schirmer WJ. Inhibition of the oxidative and nonoxidative pentose phosphate pathways by somatostatin: a possible mechanism of antitumor action. *Med Hypotheses* 1998;50:501-506
- 50 Sadi Z, Le Romancer M, Hervatin F, Lewin MJ, Reyl-Desmars F. Somatostatin analogs stimulate DNA-dependent protein kinase activity in human gastric tumoral cell-line HGT1. *Life Sci* 1999;65:2829-2835
- 51 Sadi-Ouatas Z, Lasfer M, Julien S, Feldmann G, Reyl-Desmars F. Doxorubicin and octreotide induce a 40 kDa breakdown product of p53 in human hepatoma and tumoral colon cell lines. *Biochem J* 2002;364:881-885
- 52 Cascinu S, Fedeli A, Fedeli SL, Catalano G. Octreotide versus loperamide in the treatment of fluorouracil-induced diarrhea: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1993;11:148-151
- 53 缪建华, 杨承健. 生长抑素在恶性肿瘤合并消化道出血的治疗中的应用. *临床肿瘤学杂志* 2001;6:259-260



- 54 De Jong M, Valkema R, Jamar F, Kvols LK, Kwekkeboom DJ, Breeman WA, Bakker WH, Smith C, Pauwels S, Krenning EP. Somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy of tumors: preclinical and clinical findings. *Semin Nucl Med* 2002; 32:133-140
- 55 Rolleman EJ, Valkema R, De Jong M, Kooij PP, Krenning EP. Safe and effective inhibition of renal uptake of radiolabelled octreotide by a combination of lysine and arginine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30:9-15
- 56 Slooter GD, Breeman WA, Marquet RL, Krenning EP, van Eijck CH. Anti-proliferative effect of radiolabelled octreotide in a metastases model in rat liver. *Int J Cancer* 1999;81:767-771
- 57 Mearadji A, Breeman W, Hofland L, van Koetsveld P, Marquet R, Jeekel J, Krenning E, van Eijck C. Somatostatin receptor gene therapy combined with targeted therapy with radiolabeled octreotide: a new treatment for liver metastases. *Ann Surg* 2002;236:722-728
- 58 Vernejoul F, Faure P, Benali N, Calise D, Tiraby G, Pradayrol L, Susini C, Buscail L. Antitumor effect of in vivo somatostatin receptor subtype 2 gene transfer in primary and metastatic pancreatic cancer models. *Cancer Res* 2002;62:6124-6131
- 59 Wester HJ, Schottelius M, Scheidhauer K, Meisetschlager G, Herz M, Rau FC, Reubi JC, Schwaiger M. PET imaging of somatostatin receptors: design, synthesis and preclinical evaluation of a novel (18)F-labelled, carbohydrate analogue of octreotide. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30:117-122
- 60 Slooter GD, Aalbers AG, Breeman WA, Hiemstra CA, Marquet RL, Krenning EP, van Eijck CH. The inhibitory effect of (111) In-DTPA(0)-octreotide on intrahepatic tumor growth after partial hepatectomy. *J Nucl Med* 2002;43:1681-1687
- 61 吴培, 顾晓怡, 姜藻, 王彩莲, 张琳, 朱宁. 奥曲肽持续滴注治疗晚期原发性肝癌的临床研究. *中华肝胆外科杂志* 2001;7:766-768
- 62 Kouroumalis E, Skordilis P, Thermos K, Vasilaki A, Moschandrea J, Manousos ON. Treatment of hepatocellular carcinoma with octreotide: a randomised controlled study. *Gut* 1998;42:442-447
- 63 Dimitroulopoulos D, Xinopoulos D, Tsamakidis K, Zisimopoulos A, Andriotis E, Markidou S, Panagiotakos D, Chrysohoou C, Bazinis A, Paraskevas E. The role of sandostatin LAR in treating patients with advanced hepatocellular cancer. *Hepatogastroenterology* 2002;49:1245-1250
- 64 Yuen MF, Poon RT, Lai CL, Fan ST, Lo CM, Wong KW, Wong WM, Wong BC. A randomized placebo-controlled study of long-acting octreotide for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;36:687-691
- 65 Diaconu CC, Szathmari M, Keri G, Venetianer A. Apoptosis is induced in both drug-sensitive and multidrug-resistant hepatoma cells by somatostatin analogue TT-232. *Br J Cancer* 1999;80:1197-1203
- 66 Szegedi Z, Takacs J, Szende B, Vadasz Z, Horvath A, Gulyas E, Toth G, Petak I, Bocsi J, Keri G. A specifically radiolabeled somatostatin analog with strong antitumor activity induces apoptosis and accumulates in the cytosol and the nucleus of HT29 human colon carcinoma cells. *Endocrine* 1999;10:25-34
- 67 Halloran CM, Ghaneh P, Bosonnet L, Hartley MN, Sutton R, Neoptolemos JP. Complications of pancreatic cancer resection. *Dig Surg* 2002;19:138-146
- 68 Burch PA, Block M, Schroeder G, Kugler JW, Sargent DJ, Braich TA, Mailliard JA, Michalak JC, Hatfield AK, Wright K, Kuross SA. Phase III evaluation of octreotide versus chemotherapy with 5-fluorouracil or 5-fluorouracil plus leucovorin in advanced exocrine pancreatic cancer: A north central cancer treatment group study. *Clin Cancer Res* 2000;6:3486-3492
- 69 Lee JU, Hosotani R, Wada M, Doi R, Koshihara T, Fujimoto K, Miyamoto Y, Tsuji S, Nakajima S, Hirohashi M, Uehara T, Arano Y, Fujii N, Imamura M. Antiproliferative activity induced by the somatostatin analogue, TT-232, in human pancreatic cancer cells. *Eur J Cancer* 2002;38:1526-1534
- 70 Wenger FA, Kilian M, Mautsch I, Jacobi CA, Schimke I, Saul GJ, Guski H, Muller JM. Influence of octreotide and tamoxifen on tumor growth and liver metastasis in N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced pancreatic cancer in Syrian hamsters. *Horm Res* 2000;54:74-77
- 71 Pinski J, Halmos G, Yano T, Szepeshazi K, Qin Y, Ertl T, Schally AV. Inhibition of growth of MKN45 human gastric-carcinoma xenografts in nude mice by treatment with bombesin/gastrin-releasing-peptide antagonist (RC-3095) and somatostatin analogue RC-160. *Int J Cancer* 1994;57:574-580
- 72 Tang C, Wang C, Tang L. Effects of combined octreotide and aspirin on the growth of gastric cancer. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:373-377
- 73 Nylen ES, Hall JL, Krasnow SH, Becker KL, Wadleigh RG. Nonsurgical closure of esophago-respiratory fistulas: role for the somatostatin analogue octreotide acetate? *Am J Med Sci* 1994;308:152-156

# 异种肝细胞移植研究现状

何念海, 赵文利, 陈耀凯, 王宇明

何念海, 赵文利, 陈耀凯, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038  
项目负责人: 王宇明, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. wym417@mail.tmmu.com.cn  
电话: 023-68754141 传真: 65334998  
收稿日期: 2003-04-03 接受日期: 2003-05-17

## 摘要

uPA/RAG-2小鼠的发现为异种肝细胞移植研究提供了一个有效的动物模型. 在 uPA/RAG-2 转基因小鼠脾内注入大鼠、土拨鼠、人肝细胞后, 均能部分或完全取代小鼠肝细胞. 文章主要介绍了大鼠、土拨鼠、人肝细胞在 uPA/RAG-2 转基因小鼠内的增生、对肝功能影响等情况, 同时探讨了该模型体系存在问题及应用前景.

何念海, 赵文利, 陈耀凯, 王宇明. 异种肝细胞移植研究现状. 世界华人消化杂志 2004;12(1):190-193

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/190.asp>

## 0 引言

异种肝细胞移植动物模型的成功建立对肝脏细胞生物学理论的建立和发展具有重大推动作用, 为肝炎病毒感染动力学及病毒性肝炎的演变研究提供了坚实的技术支持, 也为异种肝细胞移植用于治疗重型肝炎肝衰竭患者提供了理论基础, 更为生物人工肝的肝细胞来源提供了可靠的途径保障. 尽管动物模型对肝脏生物学的理解和发展发挥了关键作用, 然而并不是所有从动物模型中获得的观察结果都可直接用于人类肝脏生物学. 为了研究人类嗜肝病毒的黏附、复制和转录, 研究人员已经尝试使用组织培养系统. 不幸的是, 人肝细胞并不能像在肝脏原位的肝细胞一样维持相同的遗传程序. 许多不同的功能, 包括细胞色素基因表达和病毒进入及复制等必要的功能在植入组织培养体系中短期内都丢失了. 因此, 培养人肝细胞通常还不能完全代替灵长类大体动物. 研究中使用灵长类动物在伦理和经济上都有许多限制. 缺乏可靠的观察人肝细胞行为的模型已经成为人类病毒性肝炎、肝脏直接基因治疗、药物遗传学和许多其他领域研究中的主要障碍. 继多年前 Kamel-Reid et al<sup>[1]</sup>和 Lapidot et al<sup>[2]</sup>在多伦多儿童医院率先成功开展将造血细胞植入免疫缺陷小鼠建立了含大部分骨髓的嵌合鼠之后, 肝脏学家也尝试将人肝细胞植入免疫缺陷小鼠. 但直到最近, 才有人肝细胞在小鼠体内成功植入的报道. Alb-uPA(albumin urokinase-type plasminogen activator, 白蛋白-尿激酶型血浆素原激活剂)转

基因小鼠的出现为肝细胞的异种移植提供了可能.

## 1 Alb-uPA 转基因小鼠

Alb-uPA 转基因小鼠是将肝毒性基因 Alb-uPA 转入 B6SJL F1/J 小鼠构建成转基因小鼠. 该小鼠大部分肝细胞中含有 Alb-uPA 基因, 该基因表达可导致肝细胞功能缺陷、进行性死亡, 小鼠凝血时间延长、血浆尿激酶型血浆素原激活剂(PLAU)活动度增高, 而少数不含 Alb-uPA 基因肝细胞会发生慢性增生, 形成少量“红色结节”(red nodules). 从大体观察, 相应的肝脏组织呈灰白色或接近白色, 3-5 周龄时红色结节直径从 1 mm 到 1 cm, 点缀在肝组织间; 8-12 周龄时肝脏有较多红色结节, 最终不含 Alb-uPA 基因的正常肝细胞完全重建肝脏, 使整个肝脏呈现红色, 同时凝血时间和血浆 PLAU 活动度随着不含 Alb-uPA 基因肝细胞的大量增生而逐步恢复, 至 1-2 月龄时达到完全正常<sup>[3]</sup>. 肝细胞移植一般应用于 10 天龄 Alb-uPA 转基因小鼠, 移植后肝细胞经过 12 次以上的分裂增生, 可占全肝细胞的 80% 以上. 该品系小鼠来自 Jaxson 实验室, 由宾夕凡尼亚大学 Brinster et al<sup>[4]</sup>构建, 其基因型为半合子(Hemizygote), 分为 a、A、p、Tyr<sup>c</sup> 和 Pde6b<sup>rd1</sup> 等类型. 喂以 NIH-36% 脂肪饮食(Lab Diet 5K52). 一般通过冷藏胚胎保种, 活体保种时通过将半合子携带者与 B6SJL F1/J 小鼠交配保种, 子代中近 50% 的半合子后代于生后 4 d 内死于出血, 一般每窝小鼠中 6-8 只子鼠可存活至断奶期, 这些存活子鼠中仅部分是 uPA 基因半合子携带者, 3 wk 龄断奶, 4 wk 龄确定基因型, 5-6 wk 龄将 Alb-uPA 基因型小鼠配对. 妊娠周期通常为 18-21 d<sup>[5-6]</sup>. Nicolet et al<sup>[7]</sup>报道了应用组织学和免疫组织化学方法研究 uPA 和非转基因小鼠的肝再生差异, 以 5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)和增生细胞核抗原(PCNA)为细胞增生标志. 结果第 14 d 即可见增生结节, 之后结节继续生长、融合, 至第 8 wk 完全构成整个肝脏. 第 7 d 时半定量显示 BrdU 和 PCNA 达最大量. 结节出现时, 60-80% 的增生细胞呈现 BrdU 和 PCNA 标志, 之后增生下降, uPA 小鼠肝增生可持续到第 56 d, 明显长于非转基因小鼠(28 d), 且增生细胞比例高于非转基因小鼠. Currier et al<sup>[8]</sup>报道了血浆素原在肝损伤和修复过程中引导 uPA 产生多向性效应, 即肝损伤效应和修复特性. Locaputo et al<sup>[9]</sup>报道了尿激酶转基因小鼠肝再生过程中基因表达的带状调节. uPA 小鼠肝脏出现的再生结节与病变周围的再生不同, 肝细胞再生因子(HGF)mRNA 表达则明显低于

病变周围部分, 但肝再生反而更丰富, 疾病周围的肝再生抑制因子明显增高, 细胞表现为凋亡. 结论是肝损伤时基因表达呈带状特异性调节, 病变微环境对再生过程中肝细胞的命运起重要作用. Weglarz et al<sup>[10]</sup>报道了用建立的uPA小鼠研究移植肝细胞重新入住的过程. 结果经脾注入的肝细胞平均21%灌输到肝实质, 灌入肝脏的肝细胞约1/3增生, 增生点的移植细胞倍增时间为28 h, 平均持续增生12个细胞倍增时间. 从幼龄和老龄鼠分离的肝细胞有相似的重新入住动力学. 重新入住肝实质的程度在受体鼠一生中保持稳定, 四倍体和八倍体肝细胞支持克隆增生.

## 2 异种肝细胞移植进展

肝脏学工作者多年来尝试着将人肝细胞植入免疫缺陷小鼠以构建含人肝细胞的人鼠嵌合肝动物模型. 早期将人肝细胞通过脾内注射, 使注入的人肝细胞通过门静脉进入肝脏而植入免疫缺陷小鼠肝内, 可能由于人与小鼠肝脏微环境不同, 未能成功. 改变植入位置从小鼠肾囊内进行移植, 部分肝细胞存活. 继uPA转基因小鼠出现后, 通过将uPA小鼠与nu/nu小鼠或RAG-2(recombinase activating 2 gene, 重组激活因子2)敲除小鼠交配后构建出既有uPA转基因表达又有免疫缺陷小鼠模型, 先后将大鼠或北美土拨鼠等与小鼠亲缘关系较近的异种肝细胞移植入该小鼠模型, 获得成功. Funkhouser et al<sup>[11]</sup>报道了用人互补于 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶基因为引物的“实时”PCR方法检测人肝细胞移植入免疫耐受RAG-1<sup>-/-</sup>小鼠的灌输效应. PCR循环与人细胞百分比呈线性关系. 结果稳定. 可检出10 000个鼠细胞中的1个100 ng DNA样本的人肝细胞. 人肝细胞移植入RAG-1<sup>-/-</sup>小鼠脾脏的百分比在移植后1 d为0.23%. Guo et al<sup>[12]</sup>报道了用逆千里光碱和四氯化碳处置小鼠进行细胞移植后的肝重新入住. 结果发现移植后1-7 mo内肝细胞重新入住率平均为20%, 而只用一次剂量四氯化碳处置小鼠的肝细胞重新入住率仅为10%, 单用逆千里光碱或四氯化碳处置小鼠的肝细胞重新入住率则分别为0.5%和1%, 对照组小鼠则仅有0.05%. 结论是细胞周期抑制剂和化学性肝损伤为移植细胞提供了增生优势. 最近将人肝细胞植入该小鼠模型构建人鼠嵌合肝动物模型已取得初步成功.

**2.1 大鼠肝细胞植入小鼠体内** 1995-05, Rhim et al<sup>[13]</sup>首次报道了将大鼠肝细胞移植至Alb-uPA nu/nu小鼠肝内获得成功, Alb-uPA nu/nu小鼠表达Alb-uPA基因肝细胞出现功能减退并呈进行性死亡, 表达nu基因而具有免疫耐受性, 结果植入的大鼠肝细胞增生并完全重建了小鼠肝脏, 大鼠源性肝细胞基因表达高达100%. 植入的大鼠肝细胞的表面蛋白能够对Alb-uPA小鼠肝脏微环境(如相似的可溶性小鼠因子、细胞外基质和其他小鼠肝细胞表面蛋白等)产生反应, 其生成的大-小鼠嵌合肝与小鼠对照组肝脏大小相似, 大-小鼠嵌合

肝小鼠和纯合子转基因小鼠的肝功能均正常, 大小鼠嵌合肝动物总血清蛋白和血清白蛋白水平与小鼠对照组相似, 提示了大小鼠嵌合肝其他重要的肝细胞功能如介导代谢、器官废物的解毒均能发挥正常作用, 大鼠肝细胞分泌的蛋白在小鼠体内也能发挥其功能. 该实验证明移植异种肝细胞可以建立功能性肝脏, 提示Alb-uPA小鼠肝脏可以用于广泛物种肝细胞的重建, 也为人肝细胞进行小鼠嵌合肝动物模型构建提供了有力的实验依据.

**2.2 土拨鼠肝细胞植入小鼠体内** 继大鼠肝细胞植入小鼠肝脏成功后, 1998-01, Petersen et al<sup>[14]</sup>成功地将北美土拨鼠肝细胞植入uPA/RAG-2转基因小鼠肝脏内. uPA/RAG-2转基因小鼠系Alb-uPA转基因小鼠与RAG-2基因敲除小鼠杂交而成, uPA基因表达导致小鼠肝细胞进行性死亡, 形成肝细胞增生需求, RAG-2基因敲除导致不能启动V(D)J重排, 小鼠体内不能形成成熟的T细胞及B细胞, 因而处于免疫缺陷状态, 对异种细胞不产生排斥反应. 通过脾内注射北美土拨鼠肝细胞植入受体小鼠, 发现土拨鼠肝细胞在受体小鼠肝内以微型结节克隆样生长, 并能恢复成肝脏的正常索状结构, 正常成熟北美土拨鼠肝细胞增生并重建uPA/RAG-2小鼠肝脏的90%. 用肝炎病毒(woodchuck hepatitis virus, WHV)感染已植入受体小鼠的正常北美土拨鼠肝细胞而形成的嵌合肝小鼠显示WHV复制持续至少10mo, 外周血病毒浓度达 $1 \times 10^{11}$ 病毒体/mL<sup>[15]</sup>, 用慢性携带WHV的北美土拨鼠肝细胞植入受体小鼠而形成的嵌合肝小鼠, 经8-12 wk病毒血症期后也能建立起持续感染动物模型.

通过将异种基因土拨鼠肝细胞移植入具有免疫耐受性的uPA/RAG-2小鼠体内建立起肝炎病毒小鼠模型. 该实验系统具有用于研究肝DNA病毒属感染和发病机制动物模型的理想特征. 土拨鼠动物模型使我们可以在遗传学上相对难达到的异种动物体内完全清除病毒的自然宿主模式中进行WHV感染研究. 尽管转基因HBV小鼠已经提供了关于病毒发病机制的重要新信息, 但在其肝细胞核内检测不到cccDNA, 表明其已耐受HBV编码抗原并且不能完全再现病毒生活周期.

由于uPA/RAG-2嵌合小鼠是研究B和T细胞介导免疫反应缺乏下自然宿主肝细胞内病毒持续存在机制的唯一的模型, 该模型的建立能够加深对肝DNA病毒复制的了解, 进行静止期和增生期肝细胞内肝DNA病毒感染和复制动力学研究, 为将来预防和治疗持续感染提供依据.

**2.3 人肝细胞植入小鼠体内** 人体细胞异种移植已有很多成功范例. 人体许多部位的细胞都能够稳定植入免疫缺陷动物中. 多年来, 一些研究小组一直尝试将人肝细胞植入免疫缺陷小鼠肝内, 但未取得成功, 故不能将失败原因归结为对人肝细胞的免疫排斥反应. 目前其他种属如大鼠、北美土拨鼠均成功地开展肝细胞异种移

植,推测失败原因可能和小鼠肝脏微环境与人肝细胞间不相容相关.已有研究者将人肝细胞植入微环境更适于肝细胞生长的肝外位置,1992年,Sacci et al<sup>[16]</sup>将人肝细胞植入SCID(severe combined immunodeficiency,严重联合免疫缺陷)小鼠肾囊中用于疟疾的研究;1999年Ilan et al<sup>[17]</sup>将人肝切片植入肾囊下也有肝细胞存活,进而将感染乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的人肝组织碎片植入免疫缺陷小鼠肾囊内,1 mo后85%的受体小鼠体内有人肝细胞存活,这一模型目前用于HBV复制研究;2000年,Ohashi et al<sup>[18]</sup>将人肝细胞植入免疫缺陷小鼠肾囊中获得少量肝细胞存活,用于丁型肝炎病毒(HDV)生物学特性研究.最近,将人肝细胞移植到异种动物体内研究取得了实质性进展,2000年,Sierra et al<sup>[19]</sup>报道了胎儿肝细胞移植入无白蛋白血症小鼠(突变影响白蛋白mRNA)体内的肝基因表达和白蛋白合成增加.移植后24 h受体鼠脾脏红髓中仅有少量肝细胞簇,移植后肝细胞立即移入肝脏,并可在门静脉分支中看到.15 d后受体鼠肝内即可检测到白蛋白 mRNA,并在3 mo研究期持续表达,未检测到AFP,细胞增生不明显,但增生率有增加趋势.结论是胎肝细胞移植入脾脏后可移行到肝脏,并定植于肝脏,获得成年表型且没有恶性转化.2001-01,Dandri et al<sup>[20]</sup>报道将成人肝细胞植入uPA/RAG-2转基因小鼠脾脏内,2 mo后经免疫组化及人特异性DNA基因组分析显示,植入的成人肝细胞已嵌入小鼠肝组织内,其数量占小鼠肝细胞的15%,形成所谓“人鼠嵌合肝”.这是高度分化的正常成人肝细胞成功植入异种动物肝内的首次报道,也是迄今惟一的研究报道.该报道中人肝细胞能够嵌入小鼠正常肝结构中,说明细胞-细胞接触和解剖学定位功能是部分保存的,这与人肝细胞移植入肝外位置和生长因子刺激下构建动物模型有着显著差异.资料中没有显示鼠肝微环境与人肝细胞间存在着不相容性(incompatibility).进一步研究显示采用HBV阳性人血清感染该模型,植入的人肝细胞能被人类HBV感染,该模型也能用于人类嗜肝病毒致病机制研究.Cantz et al<sup>[21]</sup>通过定量实时逆转录聚合酶链反应动态观察了植入uPA/RAG-2转基因小鼠的胎肝祖细胞在体内向成熟肝细胞分化过程,进一步了解了肝祖细胞分化的分子生物学机制.

### 3 应用前景和存在的问题

目前人肝细胞异种移植重组体的应用前景是广泛的:(1)进行人类嗜肝病毒、病毒性肝炎研究,建立肝炎病毒感染模型;(2)进行基因治疗研究,避免肝细胞种属不同造成药效差异.例如腺病毒5对小鼠肝细胞亲和性低于对人肝细胞亲和性;(3)构建人类遗传性肝脏疾病转基因动物模型,如将因UDP-半乳糖基转移酶缺陷所致半乳糖血症(galactosemia)或Z-等位基因 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶缺陷患者肝细胞植入该种小鼠内;(4)比较人和啮齿类动物肝细胞在代谢途径、速度、代谢产物上的差异,评估人

源性鼠肝的代谢状况;(5)研究药物代谢;(6)研究人类肝干细胞的生物学,例如人造血干细胞向肝细胞转变.由于在这种人鼠嵌合肝模型中,现在报道移植成功的肝细胞比例最大为15%,我们需要进行的下一步工作是提高嵌合肝中人肝细胞的比例、产生足够实验用的异种肝内人肝细胞群.

尽管相关研究工作取得了较大进展,但肝细胞移植研究仍存在诸多问题:(1)目前研究中采用人肝细胞或肝组织块来源于成人肝脏,细胞处于高度分化状态,增生能力有限,移植成功率不高,移植成功者人肝细胞数量在小鼠嵌合肝实质内所占比例不高;(2)在Alb-uPA转基因小鼠肝内,部分肝细胞会发生转基因缺失,这些转基因缺失的小鼠肝细胞同样会增生,与植入的异种肝细胞形成竞争性生长,客观上抑制了植入肝细胞的生长优势;(3)在“人鼠嵌合肝”中仅有人类肝实质细胞存在而无人肝非实质细胞嵌入,后者对肝细胞特异性功能表达是至关重要的.

因此,利用肝干细胞替代成熟肝细胞进行肝细胞移植工作似乎更有优势:(1)以成熟肝细胞重建肝脏,必须有广泛肝损害、肝实质减少或自身肝细胞增生缺陷,从而使外来肝细胞处于优势地位,而不少肝病并不具备此条件;(2)相对而言,肝干细胞植入体内后增生能力更强;(3)动物实验证实,细胞移植后植入的成熟肝细胞可长期(长达1 a)维持活性,但此结果尚未能在人类再现;(4)将外源性基因导入成熟肝细胞较为困难,而利用肝干细胞则较容易,经基因工程改造的肝细胞就可用于纠正某些肝代谢缺陷疾病.

总之,人鼠嵌合肝模型在肝脏学的许多方面具有广泛应用前景,从该研究领域目前的发展水平看,改进实验设计,提高人肝细胞在“人鼠嵌合肝”中的比例,甚至完全以人肝细胞在小鼠体内重建人肝组织将是今后研究重点.

### 4 参考文献

- 1 Kamel-Reid S, Letarte M, Doedens M, Greaves A, Murdoch B, Grunberger T, Lapidot T, Thorner P, Freedman MH, Phillips RA. Bone marrow from children in relapse with pre-B acute lymphoblastic leukemia proliferates and disseminates rapidly in scid mice. *Blood* 1991;78:2973-2981
- 2 Lapidot T, Kollet O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia* 2002;16:1992-2003
- 3 Heckel JL, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. Neonatal bleeding in transgenic mice expressing urokinase-type plasminogen activator. *Cell* 1990;62:447-456
- 4 Brinster RL. Embryo culture, stem cells and experimental modification of the embryonic genome. An interview with Professor Ralph Brinster. Interview by Juan Arechaga. *Int J Dev Biol* 1998;42:861-878
- 5 Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, Daugherty CC, Brinster RL, Degen JL. Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* 1991;66:245-256
- 6 Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell

- transplantation. *Science* 1994;263:1149-1152
- 7 Nicolet J, Lorient MA, Bonte E, Capron F, Franco D, Brechot C. Characterization of liver regeneration in the albumin-urokinase transgenic mouse. *Chirurgie* 1998;123:47-53
  - 8 Currier AR, Sabla G, Locaputo S, Melin-Aldana H, Degen JL, Bezerra JA. Plasminogen directs the pleiotropic effects of uPA in liver injury and repair. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G508-515
  - 9 Locaputo S, Carrick TL, Bezerra JA. Zonal regulation of gene expression during liver regeneration of urokinase transgenic mice. *Hepatology* 1999;29:1106-1113
  - 10 Weglarz TC, Degen JL, Sandgren EP. Hepatocyte transplantation into diseased mouse liver. Kinetics of parenchymal repopulation and identification of the proliferative capacity of tetraploid and octaploid hepatocytes. *Am J Pathol* 2000;157:1963-1974
  - 11 Funkhouser AW, Vahed S, Soriano HE. A "real time" PCR assay to detect transplanted human liver cells in RAG-1<sup>-/-</sup> mice. *Cell Transplant* 2001;10:91-99
  - 12 Guo D, Fu T, Nelson JA, Superina RA, Soriano HE. Liver repopulation after cell transplantation in mice treated with retrorsine and carbon tetrachloride. *Transplantation* 2002;73:1818-1824
  - 13 Rhim JA, Sandgren EP, Palmiter RD, Brinster RL. Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4942-4946
  - 14 Petersen J, Dandri M, Gupta S, Rogler CE. Liver repopulation with xenogenic hepatocytes in B and T cell-deficient mice leads to chronic hepadnavirus infection and clonal growth of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:310-315
  - 15 Dandri M, Burda MR, Gocht A, Torok E, Pollok JM, Rogler CE, Will H, Petersen J. Woodchuck hepatocytes remain permissive for hepadnavirus infection and mouse liver repopulation after cryopreservation. *Hepatology* 2001;34(4 Pt1): 824-833
  - 16 Sacci JB Jr, Schrieffer ME, Resau JH, Wirtz RA, Detolla LJ Jr, Markham RB, Azad AF. Mouse model for exoerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3701-3705
  - 17 Ilan E, Burakova T, Dagan S, Nussbaum O, Lubin I, Eren R, Ben-Moshe O, Arazi J, Berr S, Neville L, Yuen L, Mansour TS, Gillard J, Eid A, Jurim O, Shouval D, Reisner Y, Galun E. The hepatitis B virus-trimera mouse: a model for human HBV infection and evaluation of anti-HBV therapeutic agents. *Hepatology* 1999;29:553-562
  - 18 Ohashi K, Marion PL, Nakai H, Meuse L, Cullen JM, Bordier BB, Schwall R, Greenberg HB, Glenn JS, Kay MA. Sustained survival of human hepatocytes in mice: a model for in vivo infection with human hepatitis B and hepatitis delta viruses. *Nat Med* 2000;6:327-231
  - 19 Sierra E, Maganto P, Codesal J, Mula N, Cubero J, Arza E, Castillo-Olivares JL, Arahuetes RM. Liver gene expression and increase in albumin synthesis by fetal hepatocytes transplanted into analbuminemic rats. *Life Sci* 2000;67:2417-2432
  - 20 Dandri M, Burda MR, Torok E, Pollok JM, Iwanska A, Sommer G, Rogiers X, Rogler CE, Gupta S, Will H, Greten H, Petersen J. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology* 2001;33: 981-988
  - 21 Cantz T, Zuckerman DM, Burda MR, Dandri M, Goricke B, Thalhammer S, Heckl WM, Manns MP, Petersen J, Ott M. Quantitative gene expression analysis reveals transition of fetal liver progenitor cells to mature hepatocytes after transplantation in uPA/RAG-2 mice. *Am J Pathol* 2003;162:37-45

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 2002年度医疗机构SCI收录论文数量排名

排名	单位	论文篇数	排名	单位	论文篇数
1	解放军总医院	59	13	中国协和医科大学北京协和医院	24
2	上海第二医科大学瑞金医院	46	13	武汉大学口腔医院	21
3	北京大学附1院	44	15	医科院阜外医院	20
4	第四军医大学西京医院	41	16	南京医科大学附1院	18
5	华中科技大学同济医院	39	17	北京大学附2院	16
6	南京大学南京总医院	34	18	北京大学附3院	15
6	中山大学附1院	34	18	上海第一人民医院	15
8	复旦大学中山医院	32	20	第三军医大学西南医院	14
9	四川大学华西医院	30	20	上海第二医科大学第九人民医院	14
10	复旦大学华山医院	27	20	上海第二医科大学新华医院	14
10	第一军医大学南方医院	27	20	浙江大学附2院	14
12	浙江大学附1院	26			

中国科学技术信息研究所 2003-12-09 发布 2002 年度中国科技论文统计结果

# 自杀基因治疗恶性肿瘤的载体效率及基因表达

杨文宇, 黄宗海

杨文宇, 黄宗海, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院普通外科  
广东省广州市 510280  
广东省自然科学基金重点资助项目, No. 013072  
国家 863 计划项目, No. 2001AA217171  
项目负责人: 黄宗海, 510280, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院普通外科. yangwenyugang@vip.sina.com  
电话: 020-61643213  
收稿日期: 2002-08-13 接受日期: 2002-08-29

## 摘要

如何利用基因载体选择性转移治疗基因, 并促使治疗基因在靶细胞中充分表达是自杀基因治疗恶性肿瘤的关键所在. 随着研究的深入发展, 各种基因载体的多方面特性逐渐展现在人们面前, 其携带外源基因进入靶细胞, 并在靶细胞中表达的过程也逐步被更清楚了解. 这些新认识指导科学者们在选择及改造载体, 调整各种影响因素等方面作了大量尝试, 取得诸多新认识, 大大加强了自杀基因针对肿瘤细胞的靶向性、高效性表达.

杨文宇, 黄宗海. 自杀基因治疗恶性肿瘤的载体效率及基因表达. 世界华人消化杂志 2004;12(1):194-198

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/194.asp>

## 0 引言

随着临床试验的深入开展, 基因治疗显然没有显示出当初人们所预期的高效神奇的疗效, 理论与实践的差距使这一技术在临床应用中仍然不能成功的满足实际需要, 相当程度上归因于载体应用上所面临的困难. 外源基因进入靶细胞基因组中须经历多个步骤: 体内传递至靶细胞、进入细胞、细胞内传递、进入细胞核; 因此也有多道屏障: 细胞外各种反应成分、细胞膜、细胞内环境以及核包膜. 理想载体要求能顺利高效的通过各道障碍, 在各个步骤中保持稳定、不激起不良反应, 且最有利于外源基因的高效、稳定或可控性表达. 对于应用自杀基因治疗恶性肿瘤来说, 载体的基因转移效率与外源基因的表达显得尤为重要. 正因为如此, 这一领域的研究近几年来在各国学者的努力下, 开展得如火如荼, 取得了丰富的经验与成果.

## 1 载体的基因转移能力

病毒载体基因转移能力与其滴度及转染率有关. 常用的载体中, 逆转录病毒载体转染率高, 但滴度不高( $10^6$ - $10^8$ ), 而且只能感染分裂期细胞; 腺病毒载体滴度比较高( $10^8$ - $10^{10}$ ), 但转染率中等; 腺相关病毒滴度较低, 各家报道不一致, 大致为  $10^4$ - $10^5$ cfu/mL, 但具有较

高的转染率: Fukui et al<sup>[1]</sup>应用腺相关病毒载体体外转运自杀基因治疗口腔鳞状细胞癌时观测到: 当 MOI=10 时, 该载体对 LacZ 基因的转移效率为 20-50%, 当 MOI=100 时, 几乎为 100%. 慢病毒(lentivirus)载体仍是具有争议的一种载体, 但其高效的基因转移能力却是非常可观的: Barry et al<sup>[2]</sup>采用鼠逆转录病毒(murine retroviral)载体对 T 细胞进行 CD40 配基基因转染, 在采用巨细胞病毒启动子等强启动子的情况下, 转染效率仍然很低, 相同条件下, 低 MOI (0.5-2) 的 lentivirus 载体即可取得 40-93% 的靶细胞被转染的效果. Loimas et al<sup>[3]</sup>比较了多种不同的病毒载体携带 TK 基因、绿色荧光蛋白基因融合基因转染 3 种人前列腺癌细胞系(DU-145, LNCaP, PC-3)的有效性, 结果表明: 腺病毒载体和 lentiviral 载体对所有 3 种细胞系均具有高效转染作用, 而塞姆利基森林病毒载体(semliki forest virus vectors)和辛德毕斯病毒载体(sindbis virus vectors)仅产生百分之几的转基因阳性细胞.

一般认为非病毒载体的转移效率低, 限制了其在实际操作中的应用, Wright et al<sup>[4]</sup>比较了裸 DNA、DNA/阳离子脂质体、DNA/转铁蛋白-阳离子脂质体、腺病毒载体重组子、腺相关病毒载体重组子、单纯疱疹病毒载体重组子对心肌的基因转移能力, 结果也证实了这一点. 但也有报道<sup>[5]</sup>指出: 在转载 TK 基因体内治疗腹膜恶性肿瘤动物试验中, DNA/脂质体复合体与逆转录病毒产生细胞的基因转移效率没有显著差异; 在转运 TK 基因体内治疗胶质母细胞瘤动物试验中, 脂质体与腺病毒载体具有效果相当但优于逆转录病毒的杀瘤作用<sup>[6]</sup>. 各种阳离子脂质体、分子共轭聚合物具有相对较高的基因转移能力; 裸 cDNA 在进入胞质后易被胞质核酸酶消化<sup>[7]</sup>, 转化能力较低.

## 2 载体效率的提高

载体携带外源基因, 在一定的反应环境中作用于靶细胞, 完成基因转移, 这一过程中, 无论是载体、环境因素还是靶细胞的改变都影响基因转移效率.

2.1 通过载体的改变 改良载体的某些特征可以大大提高基因转移效率. 研究者们在这方面作了大量的工作, 相关报道也最多.

### 2.1.1 病毒载体

2.1.1.1 特殊糖蛋白包裹 某些病毒包膜蛋白对肿瘤具有特殊的亲和力, 取之包被载体, 载体便也被赋予了这种特性. 如 Galipeau et al<sup>[8]</sup>利用水泡性口炎病毒 G 蛋白



(vesicular stomatitis virus G, VSV-G)包装逆转录病毒载体, 产生的新载体既具有非常广泛的亲嗜性又能被超速离心浓聚而不变性, 达到  $2.3 \times 10^{10}$  cfu/mL, 用之携带TK基因和绿色荧光蛋白基因瘤内转染脑胶质瘤大鼠模型, 随后系统注射 GCV 10 d, 对照组(不用 GCV)大鼠全部死亡, 平均存活 38 d. 尸检发现巨大肿瘤被逆转录病毒高效转染, 荧光局限于肿瘤组织. 实验组 12 只大鼠中 8 只存活大于 120 d. Howard et al<sup>[9]</sup>在构建了这种 VSV-G 假型逆转录病毒载体(VSV-G-pseudotyped retrovirus vector)的基础上还构建了两其他病毒糖蛋白包裹的逆转录病毒载体: Moloney 鼠白血病病毒 4070A (MLV 4070A)和猫内源病毒 RD114 (CEV RD114)假型载体, 对胰腺癌细胞的体外以及动物体内试验表明, 这类假型逆转录病毒载体的确大大增强了转染效率, 提高了自杀基因对肿瘤的疗效, 而其中尤以 VSV-G 假型逆转录病毒载体显著.

**2.1.1.2 改变其配基特性** 许多病毒载体通过自身配基与肿瘤细胞表面相应的受体结合而进入肿瘤细胞, 但这一作用受肿瘤细胞表面受体表达情况影响. 改变载体的配基特征, 使之能与肿瘤细胞表面高表达的受体结合则能很好的解决这一问题. Nakamura et al<sup>[10]</sup>的研究证实: 腺病毒的低转染效率与其主要受体柯萨奇-腺病毒受体(coxsackievirus-adenovirus receptor, CAR)缺乏具有高度相关性, 因此对决定腺病毒基因改变方向的腺病毒 5 型纤维蛋白(Adenovirus type 5 fiber protein)进行了改造, 在其结区(knob domain)HI 环插入一段含 Arg-Gly-Asp(RGD)的肽序列, 使病毒在进入细胞时能利用整合素受体, 改造后的载体对整合素高表达的肿瘤细胞转染力大大增强.

**2.1.1.3 辅以特异的配基或抗体** 恶性肿瘤细胞往往表现出受体表达异常. 因此, 不难理解, 将与其高表达或特异表达的受体相对应的配基与载体相连, 能有效的提高病毒载体的转染效率. 转铁蛋白(transferrin)<sup>[11-12]</sup>是常用的配基, 再如胰岛素<sup>[13]</sup>、叶酸盐(folate)<sup>[11]</sup>、血管内皮生长因子<sup>[14]</sup>、雌激素<sup>[15]</sup>、4-羟甲基莫昔芬<sup>[16]</sup>、成纤维细胞生长因子<sup>[17]</sup>等. 同样, 肿瘤细胞往往也表达特异的肿瘤抗原, 将对应的抗体连接到载体上, 既有利于自杀基因的靶向转导, 也无疑能增加转染效率. 抗肿瘤相关抗原抗体<sup>[18]</sup>、抗转铁蛋白受体抗体<sup>[19]</sup>等为常用的抗体.

**2.1.1.4 保留复制能力** 采用具有复制能力的腺病毒载体可以显著的提高其基因转移能力<sup>[20-21]</sup>. 但也报道认为: 保留腺病毒载体的复制能力在体外试验中明显地增强了目的基因的转移作用, 在应用于体内时和传统腺病毒载体并没有显著性差异<sup>[22]</sup>. Puhlmann et al<sup>[23]</sup>应用携带萤光素酶, 具有复制能力的 TK-VV 重组子载体进行体外及动物体内多种肿瘤细胞系或皮下、腹腔、肝内多种移植瘤、转移瘤的转染试验, 并采用腹腔内、静脉内、瘤体内注射等多种方法, 结果表明这种保存了复制能力

的载体具有高效的基因转移及表达能力, 若灭活其复制能力, 瘤内外源基因的转染与表达则甚微.

**2.1.1.5 载体小型化** 载体的大小是否也影响转染效率? 理论上应该是这样, 近年来有人构建删除了TK基因的 VV 载体(thymidine kinase-deleted recombinant vaccinia virus, TK-VV)<sup>[23-25]</sup>, 这种小型化的 VV 载体突变体不仅具有高效的外源基因转移效率, 而且其转染的外源基因在靶细胞内具有高效的表达能力. Mangeot et al<sup>[26]</sup>构建的小型 lentivirus 载体、Cui et al<sup>[27]</sup>构建的能自我失活型 lentivirus 载体等, 在转染试验中都取得了非常好的效果. 但这只是经验与猜测, 重组子大小与转染效率之间的确切关系仍待进一步研究.

**2.1.1.6 提高载体滴度** 提高载体滴度一直是研究者们努力的方向, 其对载体基因转移的影响是不言而喻的. 纯化载体也不失为提高滴度的一种有效方法: 如 Kruse et al<sup>[28]</sup>使用纯化 Re.TK 颗粒进行脑瘤治疗动物试验, 取得了可观的效果.

## 2.1.2 非病毒载体

**2.1.2.1 载体的选择** 一般来说, 带电荷的阳离子脂质体、多聚体比普通脂质体、裸 DNA 质粒基因转移效率高; 低分子量的多聚体比对应的高分子量多聚体效率高, 如: 低分子壳聚糖转运效率高于高分子壳聚糖<sup>[29]</sup>; 低分子量、分支程度低的分支聚氮丙啶载体的转移效率更高<sup>[30]</sup>. 壳聚糖由于其天然的高电荷性, 且在特定条件下可以浓缩 DNA, 形成不连续小颗粒<sup>[31]</sup>, 因此具有较高的效率; 线形聚氮丙啶也被认为是和裸 DNA、分支氮丙啶、脂质体 GL-67/DOPE、DOTAP/胆固醇相比效率最高的一种<sup>[32]</sup>.

**2.1.2.2 辅以多种有效成分** 可以与特异性配基、抗体相连, 也可以表面被特种糖蛋白包膜提高肿瘤细胞亲嗜性, 或电中性物质以减少阳离子载体在血液中的非特异性反应<sup>[33-34]</sup>; 同时, 最好既具有阳离子成分又有油脂成分, 前者使 DNA 凝缩, 有利于减少胞质内 DNA 酶解, 提高核膜透过能力; 后者能提高细胞膜亲嗜性, 有利于穿过细胞膜.

**2.1.2.3 合适的 DNA/多聚载体比例** DNA/多聚体分子摩尔比与 DNA 转化效率也有明显关系. 如 Dizhe et al<sup>[35]</sup>报道: 聚赖氨酸半乳糖[poly(L-Lys)Gal]d 的基因转移效率有赖于复合物内 DNA/半乳糖基聚赖氨酸摩尔比.

**2.1.2.4 DNA 的大小和构型** 线性 DNA 的广泛微注射研究显示, 大小是影响其胞质内移动、进入细胞核的主要因素<sup>[36]</sup>. 但是质粒 DNA 和经载体复合物运送的 DNA 是否也受其大小限制仍不清楚. 如果质粒 DNA 和载体复合物-DNA 进入细胞核是一个被动的弥散过程, 则显然 DNA 大小是重要的影响因素; 但超过 1.5 kb 的 DNA 片断很难透过核膜<sup>[37-38]</sup>, 大分子 DNA 进入细胞核主要是通过主动摄取而不是被动渗透. 另一方面, 我们知道: 阳离子等促使 DNA 凝缩的物质能提高 DNA 转化效率, 环状和超螺旋的 DNA 也被认为具有更高的转化效率, 因此,

DNA的构型影响其转染效率则是显然的。

2.1.2.5 与病毒载体联合构建融合载体 将非病毒载体和某些病毒联合构建的融合载体具有良好的基因转运性能: 如HJV-脂质体融合载体<sup>[39]</sup>; HJV-阳离子脂质体<sup>[39]</sup>; EBV复制子/PAAD融载体<sup>[40-41]</sup>。

2.2 通过反应环境因素的改变 载体的基因转移效率与多种转染环境因素有关。如壳聚糖的转运效率与血清pH值等因素有关<sup>[42, 31]</sup>; 聚赖氨酸半乳糖[poly(L-Lys)Gal]d的基因转移效率有赖于DNA-聚赖氨酸半乳糖复合物在不同离子强度下形成的结构<sup>[35]</sup>等。因此, 可以通过调整这些因素来增强转染效率。另外, 采用什么样的给药方式使体外制备的重组子载体进入肿瘤体内也是不可忽视的影响因素, 具体的临床考虑应涉及多方面问题(如载体的靶向性如何? 毒副作用如何? 在体液内的稳定性如何? 肿瘤的解剖位置、血运状况、转移情况、瘤体大小以及个体特征等)。单就基因转移的效率而言, 则与弥散丢失, 非特异反应失活以及整合入非肿瘤细胞等相关。一般来说, 越是精确地, 小范围地局部注射越能减少丢失, 提高效率。若重组载体具有良好的靶向性与在体液环境中的稳定性, 则这一效应有所缓解。

2.3 通过靶细胞的改变 理论上, 既然外源基因的转染与靶细胞膜表面受体、蛋白质及多糖分子等的分布、胞质内环境、核膜、染色体等的状态有关, 则可以通过调整这些物质的性状来增强转染效率。体外试验中也经常利用各种物理或化学方法来实现这一目的, 但临床试验中这方面的报道较少。

### 3 自杀基因的表达

自杀基因作为一种外源基因, 在肿瘤细胞中的表达, 既与其本身特点, 如与之相连并共转染的载体类型、自身所带顺式作用元件的数量及在肿瘤细胞中的活性等相关, 也与被转染的肿瘤细胞的数量、肿瘤细胞类型等相关。为了增强自杀基因在肿瘤细胞中的表达, 除了针对不同的肿瘤细胞选择最佳载体外, 还常通过插入在肿瘤细胞中具有高活性的启动子、增强子以及可诱导性元件等实现这一目的。

3.1 载体本身对外源基因表达的影响 载体对所转运的

外源基因的表达具有重要影响, 各种载体转导的外源基因具有不同的表达特性(表1)。如逆转录病毒可整合宿主染色体, 外源基因可在宿主内稳定表达, 并随细胞分裂而传代。而且, Narita et al<sup>[43]</sup>报道多腺苷酸信号(polyA)能增强定位于逆转录病毒长末端重复序列反方位的内源增强子介导的外源基因的表达: 他们将3种自杀基因置于midkine基因增强子的调控下, 内源转录单位的方向设计得与病毒长末端重复序列相反, 每种自杀基因在带有polyA的重组载体感染的包装细胞中的表达比在不带有polyA的重组载体感染的包装细胞中的表达明显增加, 由这种逆转录病毒携带TK基因转染后的肺癌细胞对GCV的敏感性获得显著的提高, 较之野生型载体转染的肺癌细胞也有显著性差异。一般来说, 腺病毒不能整合染色体, 外源基因较难长期表达, 不利于遗传病的治疗, 对自杀基因治疗也有不利影响。可同时应用两个腺病毒重组载体来增强外源基因的表达<sup>[44]</sup>; 同时应用腺病毒和逆转录病毒载体重组子, 也有相似效果<sup>[45]</sup>。腺相关病毒载体能整合入染色体, 外源基因能稳定表达。Xiao et al<sup>[46]</sup>在小鼠基因转移试验中, 将腺相关病毒载体注射入骨骼肌组织后, 外源基因在小鼠体内1a之后仍有表达。据Qing et al<sup>[47]</sup>的报道, 三羟(基)异黄酮能促进其所介导的外源基因在转染细胞内的表达。痘苗病毒载体不能整合染色体, 外源基因不能长期稳定表达, 且本身具有免疫原性, 不能多次反复使用。小型化的TK-VV载体, 在减小免疫原性、提高外源基因稳定性与高效性上有明显效果<sup>[24-25, 48]</sup>。经Lentivirus载体转运的外源基因也能在宿主细胞中长期高效的表达<sup>[49, 27]</sup>。

3.2 插入启动子、增强子、可诱导性元件 基因表达受多级调控, 因此外源基因的表达调控可以通过多途径、多环节的干预实现。其中, 利用特异性启动子、增强子等转录调控元件增强外源基因在肿瘤中的表达是最常用的方法。在外源基因中插入肿瘤中普遍高表达的基因启动子, 如端粒酶基因启动子<sup>[50]</sup>; 或某一肿瘤特异表达的基因启动子, 如前列腺特异性膜抗原启动子<sup>[51]</sup>、卵巢肿瘤的OSP1启动子<sup>[52]</sup>; 或易在特定肿瘤环境中激活的可诱导性元件, 如在实体瘤高热瘤体中高活性的热休克蛋白70启动子<sup>[53]</sup>; 或特定人工条件下激活的可诱导性元件, 如放射敏感性c-IAP2启动子<sup>[54]</sup>等, 既加强

表1 各种载体基因转移特点

	逆转录病毒载体	腺病毒载体	腺相关病毒载体	痘苗病毒载体	慢病毒载体	非病毒载体
滴度	低	高	低	高	中等	-
基因导入效率 <sup>*</sup>	高	中等	高	高	高	低
稳定性	稳定	不稳定	稳定	不稳定	稳定	不稳定
基因表达水平	可变 <sup>+</sup>	可变 <sup>+</sup>	可变 <sup>+</sup>	高	高	可变 <sup>+</sup>
特点	只转染分裂期细胞	免疫原性强	需要辅助病毒滴度难以提高	具有溶细胞性免疫原性强		安全, 容量大生产经济

\* 因细胞类型及反应条件而变化; + 基因表达与多种相关作用元件及反应因素有关。

了自杀基因的靶向性, 又大大增强自杀基因在肿瘤细胞中的表达。

整个转基因的过程是为了自杀基因在肿瘤细胞中表达, 但能否让自杀基因长期稳定表达往往并不是应用自杀基因治疗恶性肿瘤所考虑的重点, 适当时期内的高效表达却至关重要。大部分载体转染的外源基因的表达, 来不及走向衰减, 其导致的细胞毒性作用便已经将宿主细胞灭活。因此, 载体及其转移的自杀基因的细胞毒性往往成了影响表达持续时间的最重要因素, 由于自杀基因对肿瘤细胞的杀伤作用, 除了对转基因细胞的直接细胞毒性作用外, 更主要的往往有赖于旁杀伤作用, 载体的细胞毒性便直接影响着自杀基因治疗恶性肿瘤的最终疗效<sup>[55]</sup>。

如上所述, 近些年来, 研究者在如何提高自杀基因针对肿瘤细胞的基因转移、基因表达效率上做了大量的工作, 并取得了丰硕的经验与成果。尽管如此, 目前的技术离人们所期望的还有一定距离, 还存在大量问题有待解决, 主要表现在: (1)机制不清 对于重组载体在细胞内的转运、进入细胞核等知之甚少, 而这个过程也许包含基因转移的某些关键点; (2)有待标准化载体构建细节、培养环境各参数值、各反应条件参数值、数据获取及分析的程序等的量化和统一, 以及标准化构建和培养的各型载体在明确有针对性的细胞分型和标准化反应环境、统计方式等条件下各方面性能的比较和量化; (3)应以临床应用为目标 各实验室都能成功的完成体外、体内试验, 但临床应用却久滞不前, 体外实验、动物实验与临床应用之间存在显著差别, 这要求我们更多的着眼于直接的临床数据而非单纯的实验室结果等。

在解决自杀基因的转移与表达效率的问题上, 还存在大量的工作要做。再有与之密不可分的靶向性问题、安全性问题、免疫原性问题等, 若这些问题都合理解决了, 自杀基因便能普遍应用于临床肿瘤的治疗, 造福于广大恶性肿瘤患者。

#### 4 参考文献

- Fukui T, Hayashi Y, Kagami H, Yamamoto N, Fukuhara H, Tohnai I, Ueda M, Mizuno M, Yoshida J. Suicide gene therapy for human oral squamous cell carcinoma cell lines with adeno-associated virus vector. *Oral Oncol* 2001;37:211-215
- Barry SC, Seppen J, Ramesh N, Foster JL, Seyama K, Ochs HD, Garcia JV, Osborne WR. Lentiviral and murine retroviral transduction of T cells for expression of human CD40 ligand. *Hum Gene Ther* 2000;11:323-332
- Loimas S, Toppinen MR, Visakorpi T, Janne J, Wahlfors J. Human prostate carcinoma cells as targets for herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2001;8:137-144
- Wright MJ, Wightman LM, Lilley C, de Alwis M, Hart SL, Miller A, Coffin RS, Thrasher A, Latchman DS, Marber MS. In vivo myocardial gene transfer: optimization, evaluation and direct comparison of gene transfer vectors. *Basic Res Cardiol* 2001;96:227-236
- Princen F, Lechanteur C, Lopez M, Gielen J, Bours V, Merville MP. Similar efficiency of DNA-liposome complexes and

- retrovirus-producing cells for HSV-tk suicide gene therapy of peritoneal carcinomatosis. *J Drug Target* 2000;8:79-89
- von-Eckardstein KL, Patt S, Zhu J, Zhang L, Cervos-Navarro J, Reszka R. Short-term neuropathological aspects of in vivo suicide gene transfer to the F98 rat glioblastoma using liposomal and viral vectors. *Histol Histopathol* 2001;16:735-744
- Pollard H, Toumaniantz G, Amos JL, Avet-Loiseau H, Guihard G, Behr JP, Escande D. Ca<sup>2+</sup>-sensitive cytosolic nucleases prevent efficient delivery to the nucleus of injected plasmids. *J Gene Med* 2001;3:153-164
- Galipeau J, Li H, Paquin A, Sicilia F, Karpati G, Nalbantoglu J. Vesicular stomatitis virus G pseudotyped retrovector mediates effective in vivo suicide gene delivery in experimental brain cancer. *Cancer Res* 1999;59:2384-2394
- Howard BD, Boenicke L, Schniewind B, Henne-Bruns D, Kalthoff H. Transduction of human pancreatic tumor cells with vesicular stomatitis virus G-pseudotyped retroviral vectors containing a herpes simplex virus thymidine kinase mutant gene enhances bystander effects and sensitivity to ganciclovir. *Cancer Gene Ther* 2000;7:927-938
- Nakamura T, Sato K, Hamada H. Effective gene transfer to human melanomas via integrin-targeted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 2002;13:613-626
- Xu L, Pirollo KF, Chang EH. Tumor-targeted p53-gene therapy enhances the efficacy of conventional chemo/radiotherapy. *J Control Release* 2001;74:115-128
- Xu L, Pirollo KF, Tang WH, Rait A, Chang EH. Transferrin-liposome-mediated systemic p53 gene therapy in combination with radiation results in regression of human head and neck cancer xenografts. *Hum Gene Ther* 1999;10:2941-2952
- Yanagihara K, Cheng H, Cheng PW. Effects of epidermal growth factor, transferrin, and insulin on lipofection efficiency in human lung carcinoma cells. *Cancer Gene Ther* 2000;7:59-65
- Fisher KD, Ulbrich K, Subr V, Ward CM, Mautner V, Blackey D, Seymour LW. A versatile system for receptor-mediated gene delivery permits increased entry of DNA into target cells, enhanced delivery to the nucleus and elevated rates of transgene expression. *Gene Ther* 2000;7:1337-1350
- Brady H, Doubleday M, Gayo-Fung LM, Hickman M, Khammungskhune S, Kois A, Lipps S, Pierce S, Richard N, Shevlin G, Sutherland MK, Anderson DW, Bhagwat SS, Stein B. Differential response of estrogen receptors alpha and beta to SP500263, a novel potent selective estrogen receptor modulator. *Mol Pharmacol* 2002;61:562-568
- Putzer BM, Stiewe T, Crespo F, Esche H. Improved safety through tamoxifen-regulated induction of cytotoxic genes delivered by Ad vectors for cancer gene therapy. *Gene Ther* 2000;7:1317-1325
- Printz MA, Gonzalez AM, Cunningham M, Gu DL, Ong M, Pierce GF, Aukerman SL. Fibroblast growth factor 2-retargeted adenoviral vectors exhibit a modified biolocalization pattern and display reduced toxicity relative to native adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 2000;11:191-204
- Durrbach A, Angevin E, Poncet P, Rouleau M, Chavanel G, Chapel A, Thierry D, Gorter A, Hirsch R, Charpentier B, Senik A, Hirsch F. Antibody-mediated endocytosis of G250 tumor-associated antigen allows targeted gene transfer to human renal cell carcinoma in vitro. *Cancer Gene Ther* 1999;6:564-571
- Xu L, Tang WH, Huang CC, Alexander W, Xiang LM, Pirollo KF, Rait A, Chang EH. Systemic p53 gene therapy of cancer with immunolipoplexes targeted by anti-transferrin receptor scFv. *Mol Med* 2001;7:723-748
- Lee YJ, Galoforo SS, Battle P, Lee H, Corry PM, Jessup JM. Replicating adenoviral vector-mediated transfer of a heat-inducible double suicide gene for gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2001;8:397-404
- Morris JC, Wildner O. Therapy of head and neck squamous cell carcinoma with an oncolytic adenovirus expressing HSV-tk. *Mol Ther* 2000;1:56-62
- Lambright ES, Amin K, Wiewrodt R, Force SD, Lanuti M, Probert KJ, Litzky L, Kaiser LR, Albelda SM. Inclusion of the herpes simplex thymidine kinase gene in a replicating adenovirus does not augment antitumor efficacy. *Gene Ther* 2001;8:946-953

- 23 Puhlmann M, Brown CK, Gnant M, Huang J, Libutti SK, Alexander HR, Links HR, Bartlett DL. Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy: biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant. *Cancer Gene Ther* 2000;7:66-73
- 24 Gnant MF, Puhlmann M, Alexander HR, Bartlett DL Jr. Systemic administration of a recombinant vaccinia virus expressing the cytosine deaminase gene and subsequent treatment with 5-fluorocytosine leads to tumor-specific gene expression and prolongation of survival in mice. *Cancer Res* 1999;59:3396-3403
- 25 Gnant MF, Puhlmann M, Bartlett DL, Alexander HR Jr. Regional versus systemic delivery of recombinant vaccinia virus as suicide gene therapy for murine liver metastases. *Ann Surg* 1999;230:352-360
- 26 Mangeot PE, Negre D, Dubois B, Winter AJ, Leissner P, Mehtali M, Kaiserlian D, Cosset FL, Darlix JL. Development of minimal lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for gene transfer into human dendritic cells. *J Virol* 2000;74:8307-8315
- 27 Cui Y, Golob J, Kelleher E, Ye Z, Pardoll D, Cheng L. Targeting transgene expression to antigen-presenting cells derived from lentivirus-transduced engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood* 2002;99:399-408
- 28 Kruse CA, Lamb C, Hogan S, Smiley WR, Kleinschmidt-Demasters BK, Burrows FJ. Purified herpes simplex thymidine kinase retroviral particles. II. Influence of clinical parameters and bystander killing mechanisms. *Cancer Gene Ther* 2000;7:118-127
- 29 Lee M, Nah JW, Kwon Y, Koh JJ, Ko KS, Kim SW. Water-soluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery. *Pharm Res* 2001;18:427-431
- 30 Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsasser HP, Kissel T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res* 1999;16:1273-1279
- 31 Erbacher P, Zou S, Bettinger T, Steffan AM, Remy JS. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm Res* 1998;15:1332-1339
- 32 Uduehi AN, Stammberger U, Frese S, Schmid RA. Efficiency of non-viral gene delivery systems to rat lungs. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001;20:159-163
- 33 Shi N, Boado RJ, Pardridge WM. Receptor-mediated gene targeting to tissues in vivo following intravenous administration of pegylated immunoliposomes. *Pharm Res* 2001;18:1091-1095
- 34 Kircheis R, Wightman L, Kursu M, Ostermann E, Wagner E. Tumor-targeted gene delivery: an attractive strategy to use highly active effector molecules in cancer treatment. *Gene Ther* 2002;9:731-735
- 35 Dizhe EB, Akifiev BN, Missul BV, Orlov SV, Kidgotko OV, Links Sukonina VE, Denisenko AD, Perevozchikov AP. Receptor-mediated transfer of galactosylated poly-L-lysine complexes DNA- into mammalian cells in vitro and in vivo. *Biochemistry (Mosc)* 2001; 66:55-61
- 36 Lukacs GL, Haggie P, Seksek O, Lechardeur D, Freedman N, Verkman AS. Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* 2000;275:1625-1629
- 37 Ludtke JJ, Zhang GF, Sebestyen MG, Wolff JA. A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA. *J Cell Sci* 1999;112(Pt 12):2033-2041
- 38 Lonetti JP, Mecht N, Degols G, Gabor C, Lebleu B. Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2702-2706
- 39 Kaneda Y. Improvements in gene therapy technologies. *Mol Urol* 2001;5:85-89
- 40 Harada Y, Iwai M, Tanaka S, Okanoue T, Kashima K, Maruyama-Tabata H, Hirai H, Satoh E, Imanishi J, Mazda O. Highly efficient suicide gene expression in hepatocellular carcinoma cells by epstein-barr virus-based plasmid vectors combined with polyamidoamine dendrimer. *Cancer Gene Ther* 2000;7:27-36
- 41 Maruyama-Tabata H, Harada Y, Matsumura T, Satoh E, Cui F, Iwai M, Kita M, Hibi S, Imanishi J, Sawada T, Mazda O. Effective suicide gene therapy in vivo by EBV-based plasmid vector coupled with polyamidoamine dendrimer. *Gene Ther* 2000;7:53-60
- 42 Ishii T, Okahata Y, Sato T. Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1514:51-64
- 43 Narita M, Takanaga K, Yoshida Y, Kadomatsu K, Muramatsu T, Matsubara S, Hamada H, Goto S, Saisho H, Sakiyama S, Tagawa M. Polyadenylation signal facilitates the expression of foreign gene that is driven by an internal promoter located in the reverse orientation to long terminal repeat of retrovirus. *Anticancer Res* 2000;20:279-282
- 44 Sakai Y, Kaneko S, Sato Y, Kanegae Y, Tamaoki T, Saito I, Kobayashi K. Gene therapy for hepatocellular carcinoma using two recombinant adenovirus vectors with alpha-fetoprotein promoter and Cre/lox P system. *J Virol Methods* 2001; 92:5-17
- 45 Carrio M, Romagosa A, Mercade E, Mazo A, Nadal M, Gomez-Foix AM, Fillat C. Enhanced pancreatic tumor regression by a combination of adenovirus and retrovirus-mediated delivery of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Gene Ther* 1999;6:547-553
- 46 Xiao X, Li J, Samulski RJ. Efficient long term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol* 1996;70:8098-8108
- 47 Qing K, Khuntirat B, Mah C, Kube DM, Wang XS, Ponnazhagan S, Links Zhou S, Dwarki VJ, Yoder MC, Srivastava A. Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: correlation of tyrosine phosphorylation of the cellular single-stranded D sequence-binding protein with transgene expression in human cells in vitro and murine tissues in vivo. *J Virol* 1998;72:1593-1599
- 48 Puhlmann M, Brown CK, Gnant M, Huang J, Libutti SK, Alexander HR, Bartlett DL. Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy: biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant. *Cancer Gene Ther* 2000;7:66-73
- 49 Kafri T. Lentivirus vectors: difficulties and hopes before clinical trials. *Curr Opin Mol Ther* 2001;3:316-326
- 50 Plumb JA, Bilsland A, Kakani R, Zhao J, Glasspool RM, Knox RJ, Evans TR, Keith WN. Telomerase-specific suicide gene therapy vectors expressing bacterial nitroreductase sensitize human cancer cells to the pro-drug CB1954. *Oncogene* 2001; 20:7797-7803
- 51 Uchida A, O'Keefe DS, Bacich DJ, Molloy PL, Heston WD. In vivo suicide gene therapy model using a newly discovered prostate-specific membrane antigen promoter/enhancer: a potential alternative approach to androgen deprivation therapy. *Urology* 2001;58(2 Suppl 1):132-139
- 52 Bao R, Selvakumaran M, Hamilton TC. Targeted gene therapy of ovarian cancer using an ovarian-specific promoter. *Gynecol Oncol* 2002;84:228-234
- 53 Lee YJ, Galoforo SS, Battle P, Lee H, Corry PM, Jessup JM. Replicating adenoviral vector-mediated transfer of a heat-inducible double suicide gene for gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2001;8:397-404
- 54 Ueda T, Akiyama N, Sai H, Oya N, Noda M, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S. c-IAP2 is induced by ionizing radiation through NF-kappaB binding sites. *FEBS Lett* 2001;491:40-44
- 55 Moriuchi S, Krisky DM, Marconi PC, Tamura M, Shimizu K, Yoshimine T, Cohen JB, Glorioso JC. HSV vector cytotoxicity is inversely correlated with effective TK/GCV suicide gene therapy of rat gliosarcoma. *Gene Ther* 2000;7:1483-1490

# 自膨式金属内支架治疗胃十二指肠梗阻

孙 龙, 官泳松

孙龙, 官泳松, 四川大学华西医院放射科 四川省成都市 610041  
项目负责人: 官泳松, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院放射科.  
yongsongGuan@yahoo.com  
电话: 028-85421008 传真: 028-85421008  
收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-09-12

## 摘要

自膨式金属内支架置入术治疗胃十二指肠梗阻的适应证有: 无法手术切除的胃十二指肠原发肿瘤与邻近器官恶性肿瘤浸润、局部淋巴结肿大压迫造成的胃十二指肠梗阻, 还包括胃十二指肠恶性肿瘤术后吻合口狭窄及不能手术的良性胃出口部狭窄等病因造成的胃十二指肠梗阻. 治疗不仅安全有效, 而且能免除手术创伤, 并发症有疼痛、出血、假性和真性再狭窄、支架移位或脱落、支架误入旁道及穿孔等.

孙龙, 官泳松. 自膨式金属内支架治疗胃十二指肠梗阻. 世界华人消化杂志 2004;12(1):199-201

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/199.asp>

## 0 引言

胃十二指肠恶性梗阻病因包括: 胃十二指肠原发肿瘤、恶性肿瘤的浸润与转移、局部肿大的淋巴结压迫等. 40% 的胃癌及 80-95% 的胰腺癌不能手术切除. 十二指肠梗阻是胰腺癌常见并发症之一, 也是患者加速死亡的原因. 外科分流并发症较多, 发生率达 20-30%. 姑息性胃空肠吻合术或胃空肠造瘘术是最常见的缓解梗阻症状的方法. 然而, 对于有广泛转移及短期预后差的患者来说, 外科手术不是首选的方法. 其他姑息性疗法包括腔内照射放疗、激光消融、化学药物灌注等, 这些方法通常只适用于腔内隆起型病例, 而且需多次重复治疗, 可能引起严重的并发症. 鼻胃插管、静脉补液等姑息性治疗方法, 由于患者痛苦大、护理人员负担重、代价高, 不适用于大多数患者<sup>[1-3]</sup>. 自 1993 年 Song et al<sup>[4]</sup>报道使用金属内支架治疗胃出口部梗阻的经验以来, 自膨式金属内支架置入术已成为非手术治疗胃十二指肠梗阻方法中不可缺少的一部分.

## 1 适应证和禁忌证

1.1 适应证 胃十二指肠原发肿瘤中, 手术无法切除者所致胃出口部位梗阻. 这类患者多因不能耐受手术或已处终末阶段, 而不能接受手术治疗. 自膨式金属内支架置入术能非常有效地缓解这类胃出口部位梗阻. 胃十二指肠邻近器官恶性肿瘤浸润(如胰腺癌、肝癌)所致胃出口部位梗阻. 主要有胰头癌和胃癌, 一旦出现胃十二

指肠梗阻, 绝大多数患者已丧失根治性治疗(胃大部切除术、全胃切除术)的机会. 自膨式金属内支架置入术能有效缓解梗阻. 局部淋巴结肿大压迫引起的胃出口部位梗阻(如恶性淋巴瘤). 自膨式金属内支架置入术与放疗联合运用有助于改善患者一般情况, 提高疗效和患者生存质量. 胃十二指肠恶性肿瘤切除术后吻合口狭窄、胃出口部良性狭窄但因患者合并有心肺功能障碍, 不能接受外科手术的患者. 自膨式金属内支架置入术同样适用, 能有效解除梗阻, 使患者避免手术痛苦, 节省医疗费用.

1.2 禁忌证 存在胃十二指肠穿孔是自膨式金属内支架置入术的主要禁忌证<sup>[5-8]</sup>.

## 2 方法和并发症

2.1 方法 术前检查或活检明确诊断及完成术前准备. 过度充盈扩张的胃腔不利于手术操作, 需放置胃肠减压管行胃肠减压引流. 在 X 线电视监视下或 / 和经内镜引导下, 经口将直径 0.97 mm (0.038 in) 的超长超滑导丝插送过十二指肠狭窄段至远端小肠, 如不能通过狭窄段, 则在 X 线监视下经胃镜行微波烧灼, 形成小通道后再将导丝插至远端, 还是不能通过可考虑行经皮胃造口术. 导丝插入后引入双腔导管造影观察狭窄段情况以选择适宜长度的支架, 支架长度应较狭窄段长 30-40 mm. 将导管进一步深入至小肠并替换软头硬导丝, 借助硬导丝引入推送器, 使支架远端超过狭窄段约 20 mm 左右缓慢释放, 并逐步调整使支架处于适当位置. 支架释放完毕后退出推送器, 最后退出导丝及扩张导管. 术后口服庆大霉素 16 万 U(Bid/dx2 d), 观察梗阻改善情况及有无并发症发生, 3 h 后可少量饮水、缓慢进食少量流质<sup>[9-13]</sup>.

2.2 并发症 由于消化道管腔具有特殊的组织结构和功能特点, 因而消化道支架治疗中并发症类型较多, 发生率也相对较高. 其中较为常见的并发症包括: 疼痛、出血、假性(食物或异物嵌顿)和真性(肉芽或肿瘤组织增生)再狭窄、支架移位或脱落、支架误入旁道等, 但发生穿孔的概率不大<sup>[13]</sup>. 发生并发症的主要原因包括: 选用支架的构型和管径、患者心理因素以及原发病变和胃肠动力因素的影响. 手术医师操作经验不足, 支架选择不当或放置不到位, 狭窄严重、邻近肠袢盘曲多、成角大, 导丝导管等难以通过等因素都直接影响治疗效果<sup>[9-11]</sup>. 因此, 术前应进行详细的消化道造影检查, 必要时在胃镜下直视观察, 弄清狭窄程度、长度以及

远端肠袢开通情况,以初步确定支架类型、长度和直径。带膜支架可以防止肿瘤继续向腔内生长造成的再发梗阻,比较适合肠袢弯曲少而小或已形成瘻道的病例,但稳定性和硬度欠佳,不仅推送困难,而且置入后容易发生滑动。不带膜支架柔软性好,置入后不易滑动,但是随时间延长由于肿瘤继续向腔内生长易再发梗阻。发生食物嵌顿只需用探条、球囊或扩张管疏通。应嘱患者进食细嚼慢咽,以液体和固体食物伴饮则可避免和减少食物嵌顿。支架误入气道一般发生在非X线监视下的内镜引导时发生。另外,消除患者心理顾虑并配合病因治疗及应用胃肠动力药剂可有助于减少并发症的发生率<sup>[12-13]</sup>。

### 3 临床应用

在技术操作成功率、症状缓解率、并发症发生率及临床应用范围和治疗效果等方面,自膨式金属内支架置入术治疗恶性胃十二指肠梗阻明显优于外科分流术与其他姑息性治疗方法。1992年, Song et al 报道经皮胃造口术放置带膜金属内支架姑息性治疗1例胃窦恶性梗阻获得成功<sup>[4]</sup>。十多年来随着投送系统不断改近及临床操作经验的积累,自膨式金属内支架置入术受到越来越多的介入放射、内镜和外科医师的青睐。

程英升 et al<sup>[12]</sup>在293例良恶性消化道狭窄或阻塞病例中安放带膜或部分带膜金属支架金属支架与暂时性部分带膜金属支架共301只。所有病例支架置入成功率100%。并发症发生率为疼痛27.6%(81/293)、反流15.7%(46/293)、出血15%(44/293)、支架移位4.4%(13/293)。茅爱武 et al<sup>[13]</sup>报道62例胃十二指肠梗阻病例中3例支架放置未成功,余59例共放置支架78枚。59例胃十二指肠支架置入者中55例恢复正常饮食,4例梗阻症状减轻仅可维持进食流质,技术成功率及临床有效率为95%。

Lee et al<sup>[14]</sup>在X线透视下,对13例不宜手术切除肿瘤和7例外科术后胃肠吻合口复发胃癌造成的胃出口梗阻患者行自膨式金属内支架置入术。18(90%)例技术操作成功,2例失败是因联合运用X线透视和内镜引导也无法使导丝通过狭窄部位。自膨式金属内支架置入术后,15例患者呕吐发生率显著降低可进流食,临床有效率75%。在平均6 wk的随访中除1例发生两枚支架发生移位外,所有患者未发生如支架再狭窄及危及生命的严重并发症。Jeong et al<sup>[15]</sup>在X线透视下应用带膜支架治疗18例不能手术切除的肿瘤导致的胃出口梗阻获得成功。所有患者均伴有严重的恶心和呕吐症状,支架置入术均获成功,2例同时应用胃造口术、3例应用球囊扩张术。支架置入后除1例患者因存在近端回肠另一处狭窄外,所有患者的症状均获缓解。在连续2-7 wk的随访中,3例患者在1-41 d内发生支架移位(16.7%),均应用另一枚带膜支架治疗获得成功。2例在随访超过30 wk后因支架机械原因发生再狭窄,其中1例同轴释放另一枚带膜支架治疗后,获得满意的临床效果。Park et al<sup>[16]</sup>

应用支架姑息性连续治疗22例胃出口部位与2例十二指肠梗阻患者。14例晚期贲门或幽门癌,8例胃结肠吻合口处梗阻。利用直径6 mm和8 mm导入器,24例中在18例患者体内共放置21枚支架,支架释放技术成功率为75%。平均随访时间3.4 mo(1 wk-9 mo),12例(67%)术后症状缓解,5例患者症状无改善,1例加重。20例患者在随访期中死亡,中位生存时间4.3 mo。6例发生并发症,占患者总人数的25%,其中5例发生支架移位、2例支架断裂。Aviv et al<sup>[17]</sup>回顾性研究分析了自1998-03/1999-12接受支架置入术的恶性上消化道梗阻患者的临床资料共15例,共放置21枚支架,技术成功率及临床有效率为93%(14/15)。其中1例胃癌术后胃空肠吻合口处肿瘤复发,需在内镜协助下释放支架。2例在术后2 wk、5 wk分别因支架移位和肿瘤向支架内生长而需再次干预。18枚支架经口、2枚经肝、1枚经胃壁释放。2例术后3d内发生疼痛,后期并发症包括肿瘤向支架内成长、肿瘤生长过度、支架移位等。中位存活时间2.4 mo。

自膨式金属内支架置入术以非外科手术的方法,应用微创技术使狭窄阻塞的消化道管腔再通,方便、安全、有效和快速地缓解胃十二指肠恶性梗阻,为不能手术的胃十二指肠恶性梗阻的姑息性治疗开辟了一条新的途径,也为治疗部分良性胃十二指肠梗阻的治疗提供更多的选择<sup>[18-20]</sup>。总体看,该方法治疗胃十二指肠梗阻近期疗效满意,但术后生存时间有限是单纯支架置入治疗胃十二指肠恶性梗阻的主要缺陷。如何选择有效的治疗方法抑制恶性肿瘤快速扩展,有效控制恶性肿瘤其他相关并发症以进一步延长患者的生存时间,提高胃十二指肠恶性梗阻自膨式金属内支架置入术的综合疗效,是一个亟待解决的问题<sup>[21-25]</sup>。

### 4 参考文献

- 1 Mergener K, Kozarek RA. Stenting of the gastrointestinal tract. *Dig Dis* 2002;20:173-181
- 2 Shand AG, Grieve DC, Brush J, Palmer KR, Penman ID. Expandable metallic stents for palliation of malignant pyloric and duodenal obstruction. *Br J Surg* 2002;89:349-350
- 3 Espinel J, Vivas S, Munoz F, Jorquera F, Olcoz JL. Palliative treatment of malignant obstruction of gastric outlet using an endoscopically placed enteral Wallstent. *Dig Dis Sci* 2001;46:2322-2324
- 4 Song HY, Yang DH, Kuh JH, Choi KC. Obstructing cancer of the gastric antrum: palliative treatment with covered metallic stents. *Radiology* 1993;187:357-358
- 5 Pinto Pabon IT, Diaz LP, Ruiz De Adana JC, Lopez Herrero J. Gastric and duodenal stents: follow-up and complications. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2001;24:147-153
- 6 Lopera JE, Alvarez O, Castano R, Castaneda-Zuniga W. Initial experience with Song's covered duodenal stent in the treatment of malignant gastroduodenal obstruction. *J Vasc Interv Radiol* 2001;12:1297-1303
- 7 Razzaq R, Laasch HU, England R, Marriott A, Martin D. Expandable metal stents for the palliation of malignant gastroduodenal obstruction. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2001;24:313-318



- 8 Jung GS, Song HY, Kang SG, Huh JD, Park SJ, Koo JY, Cho YD. Malignant gastroduodenal obstructions: treatment by means of a covered expandable metallic stent-initial experience. *Radiology* 2000;216:758-763
- 9 Mauro MA, Koehler RE, Baron TH. Advances in gastrointestinal intervention: the treatment of gastroduodenal and colorectal obstructions with metallic stents. *Radiology* 2000; 215:659-669
- 10 Kaw M, Singh S, Gagneja H, Azad P. Role of self-expandable metal stents in the palliation of malignant duodenal obstruction. *Surg Endosc* 2003;17:646-650
- 11 Acunas B, Poyanli A, Rozanes I. Intervention in gastrointestinal tract: the treatment of esophageal, gastroduodenal and colorectal obstructions with metallic stents. *Eur J Radiol* 2002; 42:240-248
- 12 程英升, 杨仁杰, 李明华, 方淳, 尚克中. 消化道恶性狭窄或梗阻的介入治疗. *世界华人消化杂志* 2002;10:1111
- 13 茅爱武, 高中度, 杨仁杰, 江伟骏, 程英升, 范红, 蒋霆辉. 金属支架治疗消化道恶性梗阻 198 例. *世界华人消化杂志* 2000;8:369-371
- 14 Lee JM, Han YM, Kim CS, Lee SY, Lee ST, Yang DH. Fluoroscopic-guided covered metallic stent placement for gastric outlet obstruction and post-operative gastroenterostomy anastomotic stricture. *Clin Radiol* 2001;56:560-567
- 15 Jeong JY, Han JK, Kim AY, Lee KH, Lee JY, Kang JW, Kim TJ, Shin SH, Choi BI. Fluoroscopically guided placement of a covered self-expandable metallic stent for malignant antroduodenal obstructions: preliminary results in 18 patients. *Am J Roentgenol* 2002;178:847-852
- 16 Park KB, Do YS, Kang WK, Choo SW, Han YH, Suh SW, Lee SJ, Park KS, Choo IW. Malignant obstruction of gastric outlet and duodenum: palliation with flexible covered metallic stents. *Radiology* 2001;219:679-683
- 17 Aviv RI, Shyamalan G, Khan FH, Watkinson AF, Tibballs J, Caplin M, Winslett M. Use of stents in the palliative treatment of malignant gastric outlet and duodenal obstruction. *Clin Radiol* 2002;57:587-592
- 18 Profili S, Meloni GB, Bifulco V, Conti M, Feo CF, Canalis GC. Self-expandable metal stents in the treatment of antro-pyloric and/or duodenal strictures. *Acta Radiol* 2001;42:176-180
- 19 Nassif T, Prat F, Meduri B, Fritsch J, Choury AD, Dumont JL, Auroux J, Desaint B, Boboc B, Ponsot P, Cervoni JP. Endoscopic palliation of malignant gastric outlet obstruction using self-expandable metallic stents: results of a multicenter study. *Endoscopy* 2003;35:483-489
- 20 Adler DG, Baron TH. Endoscopic palliation of malignant gastric outlet obstruction using self-expanding metal stents: experience in 36 patients. *Am J Gastroenterol* 2002;97:72-78
- 21 Kim JH, Yoo BM, Lee KJ, Hahm KB, Cho SW, Park JJ, Kim SS, Park HC, Kim JH. Self-expanding coil stent with a long delivery system for palliation of unresectable malignant gastric outlet obstruction: a prospective study. *Endoscopy* 2001;33: 838-842
- 22 Kaw M, Singh S, Gagneja H. Clinical outcome of simultaneous self-expandable metal stents for palliation of malignant biliary and duodenal obstruction. *Surg Endosc* 2003;17: 457-461
- 23 Wong YT, Brams DM, Munson L, Sanders L, Heiss F, Chase M, Birkett DH. Gastric outlet obstruction secondary to pancreatic cancer: surgical vs endoscopic palliation. *Surg Endosc* 2002;16:310-312
- 24 Wai CT, Ho KY, Yeoh KG, Lim SG. Palliation of malignant gastric outlet obstruction caused by gastric cancer with self-expandable metal stents. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2001;11:161-164
- 25 Yim HB, Jacobson BC, Saltzman JR, Johannes RS, Bounds BC, Lee JH, Shields SJ, Ruymann FW, Van Dam J, Carr-Locke DL. Clinical outcome of the use of enteral stents for palliation of patients with malignant upper GI obstruction. *Gastrointest Endosc* 2001;53:329-332

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 2002年度医疗机构国内论文数量排名

排名	单位	论文篇数	排名	单位	论文篇数
1	第四军医大学西京医院	1264	11	第四军医大学唐都医院	579
2	解放军总医院	1024	12	中山大学附 1 院	577
3	四川大学华西医院	933	13	北京大学附 1 院	561
4	第三军医大学西南医院	862	14	华中科技大学协和医院	535
5	第二军医大学长海医院	811	15	第二军医大学长征医院	521
6	华中科技大学同济医院	782	16	中南大学湘雅二医院	514
7	第一军医大学南方医院	741	17	上海第二医科大学瑞金医院	505
8	中南大学湘雅医院	673	18	武汉大学人民医院	483
9	中国协和医科大学北京协和医院	582	19	第三军医大学大坪医院	480
10	南京军区南京总医院	581	20	复旦大学华山医院	466

中国科学技术信息研究所 2003-12-09 发布 2002 年度中国科技论文统计结果

# 慢性功能性便秘与生物反馈

杨柳明, 林济宝, 赵延龙, 林红, 钟智, 陈荣伟, 谢俊芳, 吴志荣

杨柳明, 林济宝, 赵延龙, 林红, 钟智, 陈荣伟, 谢俊芳, 吴志荣, 广东省廉江市人民医院消化内科 广东省廉江市 524400  
广东省卫生厅科学技术研究基金资助课题, No.990112  
项目负责人: 杨柳明, 524400, 广东省廉江市人民大道 160 号, 廉江市人民医院消化内科. zjylm68@163.net  
电话: 0759-6607943 传真: 0759-6628166  
收稿日期: 2002-01-11 接受日期: 2002-01-23

## 摘要

肌电图指导下的生物反馈训练技术对肛直肠动力异常所致的便秘、便失禁及肛门疼痛等具有较好的治疗效果; 该技术可以改善盆底肌的耐力、压力及肌电活动异常等达到治疗目的, 国外报道有较高的成功率和很低的复发率, 并做为一种常规方法逐渐取代了外科手术及药物; 国内有少数学者应用EMG-生物反馈治疗仪治疗慢性功能性便秘取得了初步的临床效果及相应肛直肠动力学指标改善, 我们初步的研究观察亦取得了相近的结果. 该方法为非侵入性, 无痛苦的, 对于长期依赖药物维持正常排便的患者来说, 不仅避免了药物的副作用和耐药性, 同时又节省药费, 值得应用和探讨.

杨柳明, 林济宝, 赵延龙, 林红, 钟智, 陈荣伟, 谢俊芳, 吴志荣. 慢性功能性便秘与生物反馈. 世界华人消化杂志 2004;12(1):202-204  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/202.asp>

## 0 引言

在发展中国家, 消化系统胃肠功能障碍性便秘人群中发病率为 30-40%<sup>[1]</sup>. 直肠肛门运动疾患导致的排便异常, 通常表现为慢性便秘(chronic constipation, CC)和功能性排便失禁(functional incontinence, FIC), 且随年龄增加而增加<sup>[2]</sup>. 严重影响人们的正常生活, 特别是老年人. 肌电图指导下的生物反馈对直肠动力异常所致的排便障碍进行治疗在目前是一种新的诊疗手段; 国外在这方面的研究已积累了丰富的经验, 并逐渐取代了外科手术及药物的一种常规方法<sup>[3-10]</sup>. 美国产Bio-LAB动力学参数监测系统及 SANDHILL 胃肠道监测系统 - OrionPC/4EMG 生物反馈治疗仪, 是采用纵向插入式肛管电极及腹壁电极进行直肠肌电和盆底肌(EMG)电描记分析, 评估肌电活动, 是非侵入性, 无痛苦的, 对于长期依赖药物维持正常排便的患者来说, 不仅避免了药物的副作用和耐药性, 同时又节省药费. 国外报道有较高的成功率和很低的复发率, 值得应用和探讨<sup>[11-20]</sup>.

## 1 肛直肠运动病理生理与临床

### 1.1 粪便排出机制 肛直肠运动功能主要是维持自制和

排便, 并通过以下机制来完成: (1)肛管高压带对控制粪便起重要作用. 肛门内括约肌(IAS)对抗直肠肠内压的压差, 称肛管静息压(IASP). 阻止稀便和肠腔内气体在非排便状态下外溢. 当腹压增加时, IAS 关闭, 起机械屏障作用; 当粪便刺激直肠扩张时, 直肠括约肌反射使 IAS 松弛. (2)肛门外括约肌(EAS)由 3 个分别独立的 U 形肌群组成(肌束方向相反和不同神经支配), 各自交替收缩引起蠕动性排便. (3)肛门内括约肌抑制反射和直肠收缩反射. 排便时直肠收缩, IAS 松弛, 随后 EAS 松弛, 粪便排出; 随意终止排便时, EAS 随意收缩, 压缩松弛的 IAS, 反射性抑制直肠收缩, 粪便停留. (4)肛管直肠角为直肠下端与肛管二者轴线向前形成的夹角, 约 80-90°, 距肛门上方 3-4 cm, 对粪便下降起机械屏障作用和活瓣作用, 排便时此角度变大(正常人约 137°). 排便是由神经反射引起的复杂的协调动作来完成, 是直肠重要的生理功能.

1.2 功能性排便异常的病理与临床 引起排便异常有器质性, 继发性 and 功能性三种. 器质性病变致排便异常, 有先天性如肛门闭锁, 继发性如周围神经病变, 脊髓神经中枢神经损害, 产科挫伤致肌肉撕裂, 息肉和肿瘤致机械性梗阻等. 这些属原发性直肠运动障碍或功能失调导致的排便异常, 不在本研究范围内.

1.2.1 功能性失禁(FIC) 指持续性或反复发作性排便失控至少 1 mo 以上, 且无明显的神经原结构异常. 主要由以下几方面影响: (1)EAS 协调运动异常: 由于 EAS 收缩强度随腹压增加而增加, 帮对节制粪便仅起一定作用, 而排便时 EAS 的这种收缩被抑制. 当 EAS 的这种协调性运动缺乏或障碍时可导致大便失禁. (2)耻骨直肠肌无力: 由于耻骨直肠肌无力, 使肛门直肠角无论静息状态或腹压增加时, 均呈钝角, 失去其屏障及活瓣作用, 使大便失禁. (3)直肠顺应性降低. (4)肛直肠感觉运动功能失调(5)肛管静息压(IASP)降低, 不能维持正常的肛管高压带, 致大便失禁. (6)肛管自发性松弛频率增加.

1.2.2 功能性肛直肠疼痛(FAP) 频发性或间歇性发作的肛门钝痛, 由盆底肌痉挛引起, 包括提肛综合征和肛门疼痛两种类型.

1.2.3 排便困难 指粪便排出困难或排便不畅或需用手指挤压肛门等协助排便, 症状持续 3 mo 以上, 排除肠壁神经节细胞缺如或直肠脱垂、肿瘤等器质性肛直肠病变. 包括盆底肌协调障碍和 IASP 功能障碍两类型, 心理障碍也是发病原因之一. (1)盆底肌协调障碍(PFD): 是由于盆底肌的不协调收缩, 主要是 EAS 呈反向性收

缩或松弛不良, 盆底肌电活动增加导致排便困难或排便不畅。(2)肛门内括约肌功能障碍(IASD): 由于IAS抑制反射缺失或不完整, IASP持续增高不松弛, 或二者同时存在导致排便困难, 但需排除神经节细胞缺失所致的IASP。

## 2 生物反馈疗法与功能性排便异常

生物反馈是通过两个非损伤性电极分别置于体表腹前斜肌和肛门外括约肌内, 就可在系统的显示屏上实时地显示在排便过程中的肌电信号变化的波形, 使患者可以直观地从电视屏幕上看到自己排便时肌肉收缩与舒张顺序是否正确, 收缩和舒张的幅度是否合适, 进而在医生指导下调整和训练排便的动作和过程, 从而达到治愈功能性排便异常之目的。特点是该疗法将肌肉活动转变成易于理解和识别的信号图形, 再自我调节, 最终改变肌肉的力量和协调性。

2.1 治疗对象的选择 (1)功能性排便失禁; (2)功能性肛门直肠疼痛; (3)排便困难。

2.2 动力学检查 (1)IAS抑制反射缺失或不完整, 伴有或不伴有IASP增高。(2)IASP增高, 伴有正常的IAS抑制反射(3)排便时PAS呈反向性收缩或松弛不良。盆底肌电活动: 盆底肌EMG增加。做电子结肠镜检查除外器质性疼痛。

2.3 方法及步骤 肌电图生物反馈治疗设备包括1个直径12 mm, 长45 mm的肛管内肌电感受器, 一个腹前斜肌的体表电极, 和与之相连的生物反馈治疗主机, 计算机屏幕可显示及测量腹前斜肌、耻骨直肠肌和肛门外括约肌的电活动, 并将其作为患者反应变化的指标。

首先向患者解释治疗过程及目的, 指导患者学会收缩和放松肛门肌肉, 学会观察屏幕显示的肌电活动, 然后指导患者排便时放松肛门肌肉, 同时收缩腹肌。理想的盆底肌收缩为向心性收缩(向头的方向收缩), 而腹肌极少活动, 进行向心性收缩后指导患者“挤压和提高收缩肌”, 并鼓励其用力, 再用力, 然后嘱其保持力度, 再慢慢放松(离心性收缩)。值得注意的是盆底肌通常不如肢体的随意肌那样曲伸灵活。生物反馈治疗仪也能观察到肌肉的松弛状态, 在生物反馈帮助下, 应用此项技术能改善肌痉挛所致的某些排便困难。现代的肌电图指导下的生物反馈治疗仪能提供每组肌肉用力训练时应达到的指标以得到患者的配合, 同时鼓励患者反复进行较长时间的肌收缩锻炼, 以提高肌肉的耐力。生物反馈治疗通常在门诊进行, 1 h/次, 1-2次/wk, 并要求患者治疗期间回家再练习同样动作。4-12 wk不等。

2.4 疗效评估方法 治疗前后功能评估可分为主观感觉(症状和粪便情况记录)和客观检查两大类, 症状记录包括每周自发排便次数, 药物辅助排便次数及灌肠排便次数, 也可将患者的满意程度作为一种主观评估方法。客观检查中常用的有肛门直肠测压, 肌电图, 结肠转运时间等, 并由医护人员进行治疗后随访。

## 3 生物反馈技术应用现状及评价

生物反馈治疗在国外已进行了数十年的研究, 并且作为功能性排便异常的首选的可接受的有效治疗方法<sup>[21]</sup>。1985年欧美一些国家地区的外科医生取得共识: 应先使用EMG肌电生物反馈系统训练患者放松肛门括约肌来治疗便秘, 既往处理这类“出口梗阻”性肛门括约肌异常收缩问题只能采用外科手术的方法。同时在针对那些肛门括约肌松弛导致的大便失禁病例采用同样手段进行训练及自我调节, 同样可达到增强盆底肌力量而治愈大便失禁。应用于先天性肛门闭锁的小孩在外科手术后引起的便失禁也非常有效<sup>[5]</sup>。在这方面积累了丰富的经验。同样机制应用生物反馈技术可以治疗尿失禁。

美国佛罗里德州学者Ferrara et al 于1992-10/1997-10对188例患者进行生物反馈治疗, 其中116例为慢性便秘患者或盆底肌功能障碍患者, 年龄从28个月-88岁不等, 进行了平均8 wk的训练; 72个便失禁患者, 年龄从29 mo-83岁不等, 进行了平均7 wk的训练。经治疗后, 84%的便秘患者和85%的便失禁患者症状得到了明显的改善, 患者感觉非常满意。便秘组患者自主大便次数由原来平均0.8次/wk提高到6.5次/wk, 便失禁患者便失禁次数由11.8次/wk降至2次/wk。该州的另一学者Spat et al 亦于1993-07/1995-07对55例患者进行生物反馈治疗, 其中30例为慢性便秘患者, 年龄从33-86岁不等, 25例为便失禁患者, 年龄从34-85岁不等, 进行平均7 wk的训练。经治疗后, 55例患者有53例主观感觉症状明显改善, 所有病例盆底肌的耐受时间均明显延长, 其中便秘组的耐受力时间由原来的6.39 s延长至10.77 s, 便失禁组的耐受力时间由原来的7.5 s延长至13.06 s。由此可见生物反馈治疗通过提高盆底肌的耐受性来起作用。

国内近年来已引进该技术并应用于临床, 并取得了初步的可喜的效果。南京医科大学第一附属医院赵志泉报道20例慢性功能性便秘患者, 用生物反馈训练治疗, 从临床症状观察: 18例显效, 5例有效, 1例无效, 1例未能坚持训练, 有效率达90%; 从EMG评估: 20例患者EMG显示盆底肌与腹前斜肌的矛盾运动消失, 且运动幅度增加, 有效率达100%; 从肛直肠感知试验观察: 有16例感知阈值或最大容积耐受力均有所下降。李爱萍 et al<sup>[22]</sup>对40例CIC患者进行肛门直肠压力测定, 并与40例正常人进行对比, 观察CIC患者肛门直肠动力学改变的特点及生物反馈训练的作用。结果: 便秘组肛管静息压、最大收缩压、最大收缩间期及收缩指数均低于对照组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ); 模拟排便动作时肛管剩余压高于对照组( $P < 0.001$ ), 肛管松弛率、排便指数均低于对照组, 具有显著性意义。有73%(29/40)的患者直肠收缩无力, 42%(17/40)的患者直肠收缩压低于肛管剩余压, 28%(11/40)的患者出现反常的肛管括约肌收缩; 生物反馈治疗可以调整便秘患者肛门直肠的协调性运动。认为慢性特发性便秘患者存在

肛门直肠的动力学异常, 直肠收缩无力、肛管松弛不良和肛门括约肌的反常收缩导致排便功能的障碍, 生物反馈训练可以调整这些异常的动力改变. 对肛痉挛、小儿便失禁、尿失禁及肠套叠等治疗也取得了一定的疗效<sup>[23-30]</sup>; 我院从 1999-08 至今已为 200 例患者进行评估及治疗, 功能性便秘的检出率达 62%, 生物反馈治疗有效率达 79%.

总之, 肌电图指导下的生物反馈训练对直肠肛门动力异常所致的排便障碍进行治疗是一种新的医疗模式. 国外报道有较高的成功率和较低的有效率, 而且比其他疗法更经济. 目前国内只有少数医疗单位拥有这种技术. 初步的临床应用及效果已令人鼓舞. 尽管目前对这种技术的应用已经成熟, 但是对国人的治疗观察, 还没有统一的指标, 如疗效、疗程、适应证、禁忌证等方面. 加强多中心的, 大样本的协作观察, 探索出一套适合我国人群特点的较完善的治疗方案是下一步研究的方向.

#### 4 参考文献

- 1 罗金燕, 龚均. 胃肠运动与疾病. 第1版, 西安: 陕西科技出版社, 1996:1
- 2 Campbell AJ. Incontinence in the elderly: prevalence and prognosis. *Ageing* 1985;14:65
- 3 Wexner SD, Cheape JD, Jorge JMN. Prospective assessment of biofeedback for treatment of paradoxical puborectalis contraction. *Dis Colon Rectum* 1992;35:145
- 4 Ferrara A, De-Jesus S, Gallagher JT, Williamson PR, Larach SW, Pappas D, Mills J, Sepulveda JA. Time-related decay of the benefits of biofeedback therapy. *Tech Coloproctol* 2001;5:131-135
- 5 McGrath ML, Mellon MW, Murphy L. Empirically supported treatments in pediatric psychology: constipation and encopresis. *J Pediatr Psychol* 2000;25:225-254
- 6 Chin-Peuckert L, Salle JL. A modified biofeedback program for children with detrusor-sphincter dyssynergia: 5-year experience. *J Urol* 2001;166:1470-1475
- 7 Wiesel PH, Dorta G, Cuypers P, Herranz M, Kreis ME, Schnegg JF, Jornod P. Patient satisfaction after biofeedback for constipation and pelvic floor dyssynergia. *Swiss Med Wkly* 2001;131:152-156
- 8 Fucini C, Ronchi O, Elbetti C. Electromyography of the pelvic floor musculature in the assessment of obstructed defecation symptoms. *Dis Colon Rectum* 2001;44:1168-1175
- 9 Emmanuel AV, Kamm MA. Response to a behavioural treatment, biofeedback, in constipated patients is associated with improved gut transit and autonomic innervation. *Gut* 2001;49:214-219
- 10 van-Ginkel R, Buller HA, Boeckxstaens GE, van-Der-Plas RN, Taminiau JA, Benninga MA. The effect of anorectal manometry on the outcome of treatment in severe childhood constipation: a randomized, controlled trial. *Pediatrics* 2001;108:E9
- 11 Rao SS. Dyssynergic defecation. *Gastroenterol Clin North Am* 2001;30:97-114
- 12 Rotholtz NA, Werner SD. Surgical treatment of constipation and fecal incontinence. *Gastroenterol Clin North Am* 2001;30:131-166
- 13 Brown SR, Donati D, Seow-Choen F, Ho YH. Biofeedback avoids surgery in patients with slow-transit constipation: report of four cases. *Dis Colon Rectum* 2001;44:737-739
- 14 Choi JS, Hwang YH, Salum MR, Weiss EG, Pikarsky AJ, Nogueras JJ, Werner SD. Outcome and management of patients with large rectoanal intussusception. *Am J Gastroenterol* 2001;96:740-744
- 15 Roy AJ, Emmanuel AV, Storrie JB, Bowers J, Kamm MA. Behavioural treatment (biofeedback) for constipation following hysterectomy. *Br J Surg* 2000;87:100-105
- 16 Werner SD. Identification of patients likely to benefit from biofeedback for outlet obstruction constipation. *Br J Surg* 1999;86:1484
- 17 Wong PW, Kadakia S. How to deal with chronic constipation. A stepwise method of establishing and treating the source of the problem. *Postgrad Med* 1999;106:199-200
- 18 Heymen S, Werner SD, Vickers D, Nogueras JJ, Weiss EG, Pikarsky AJ. Prospective, randomized trial comparing four biofeedback techniques for patients with constipation. *Dis Colon Rectum* 1999;42:1388-1393
- 19 Griffiths P, Dunn S, Evans A, Smith D, Bradnam M. Portable biofeedback apparatus for treatment of anal sphincter dysfunction in childhood soiling and constipation. *J Med Eng Technol* 1999;23:96-101
- 20 McKee RF, McEnroe L, Anderson JH, Finlay IG. Identification of patients likely to benefit from biofeedback for outlet obstruction constipation. *Br J Surg* 1999;86:355-359
- 21 Allen ML. Biofeedback for fecally incontinent children with repaired imperforate anus. *Practical Gastroenterol* 1990;14:353-362
- 22 李爱萍, 程留芳, 郭荣斌, 杨德利. 肛门直肠运动协调性障碍与慢性特发性便秘的关系. *世界华人消化杂志* 2000;8(特刊 8):2
- 23 黄显凯, 张胜本, 张连阳. 特发性便秘 197 例临床分析. *大肠肛门病外科杂志* 1998;4:69-71
- 24 Rao SSC, Pate RS, Gu CM. How useful are manometric tests of anorectal function in the management of defecation disorders. *American J Gastroenterol* 1997;92:469-475
- 25 牛虹. 生物反馈法治疗盆底痉挛综合征: 附 6 例报告. *中国肛肠病杂志* 1998;18:18-19
- 26 丁曙晴, 丁义江, 余苏萍. 盆底失弛缓综合征 70 例临床分析. *江苏医药* 2001;27:515-516
- 27 李玉兰. 7 例小儿便失禁的生物反馈疗法及护理. *天津护理* 2000;8:67-68
- 28 李侠, 尹燕兰, 徐华. 小儿便秘及其生物反馈治疗. *空军总医院学报* 2000;16:50-51
- 29 李萍, 师松年. 直肠肛管纵切心型吻合术治疗先天性巨结肠远期疗效观察. *河南外科学杂志* 2001;7:255-256
- 30 王军, 齐清会, 董作亮. 生物反馈治疗功能性便秘. *中国肛肠病杂志* 2001;21:25-26

# 成体干细胞可塑性及对肝脏的重建作用

何念海, 赵文利, 王宇明

何念海, 赵文利, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038  
项目负责人: 王宇明, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街 29 号, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. wym417@mail.tmmu.com.cn  
电话: 023-68754141 传真: 023-65334998  
收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-09-18

## 摘要

成体干细胞有多向分化潜能, 可以横向分化为不同类型的特化细胞, 甚至逆分化为更原始的干细胞. 本文介绍了近年来成体干细胞“横向分化”潜能、分化机制, 对成体干细胞横向分化为肝脏细胞的研究进展及存在问题进行了讨论.

何念海, 赵文利, 王宇明. 成体干细胞可塑性及对肝脏的重建作用. 世界华人消化杂志 2004;12(1):205-208

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/205.asp>

## 0 引言

干细胞研究因其在理论和实践上的重要意义, 近年来成为生物学领域研究的热点. 干细胞是一种未分化细胞, 其基本特性为: 具有自我复制能力, 产生出与自己完全相同的子细胞; 分化为超过一种以上的功能细胞. 根据分化阶段不同可分为来源于受精束、胚胎内细胞团细胞或早期胚胎原始的胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)和来源于成年动物或未成年动物组织的成体干细胞(adult stem cells, ASC). 目前 ESC 的研究由于受伦理学争议、免疫排斥、实验技术限制以及其本身的成瘤性等影响, 阻碍了其在临床治疗中的应用. 同时 ASC 的研究异军突起, 成为近年来研究的热点, 本文介绍了 ASC “可塑性”、分化机制、关于 ASC 向肝脏细胞分化的研究进展及其在肝脏疾病方面的潜在应用, 并对目前研究中存在问题进行了讨论.

## 1 ASC 的可塑性

ASC 普遍存在于人体的各种器官, 如造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)、肝干细胞、神经干细胞(neural stem cells, NSC)、肌肉干细胞、骨髓间质干细胞(marrow mesenchymal stem cells, MMSC)和表皮干细胞等. 这类细胞在自然条件下倾向于分化成所在组织的各种细胞, 但最近一些研究结果显示, 即使干细胞已经定向分化, 在某些条件下, ASC 仍有多向分化潜能, 甚至可以打破胚层界限, 横向分化(transdifferentiation)为无关类型的成熟细胞或在特定环境下发生逆分化, 也称为 ASC 的可塑性(plasticity). 1999 年 Bjornson et al<sup>[1]</sup>将

从成年小鼠前脑分离出的 NSC 输入丧失了造血功能的小鼠体内可以产生造血细胞; HSC 可以进入脑内, 分化为神经细胞, 进入肌肉组织中可以分化为具有成熟肌肉细胞表型的细胞; 2001 年 Toma et al<sup>[2]</sup>从鼠皮肤分离获得的皮肤干细胞可转化为神经元细胞、神经胶质细胞、平滑肌细胞和脂肪细胞等; 2002 年 Fukuda et al<sup>[3]</sup>报道 MMSC 除了分化为肌细胞、肝细胞、成骨细胞、软骨细胞、神经细胞、脂肪细胞等, 在一定条件下还可以分化为 HSC、形成肌小管和肌腱.

ASC 横向分化实验中也可能存在的错误. 2000 年 Wagers et al<sup>[4]</sup>将取自绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)转基因小鼠纯化的骨髓 HSC(c-kit<sup>+</sup>Thy1.1<sup>low</sup>Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>)输给受照射受体鼠, 使受体鼠造血重建, 造血细胞为供体标志. 但在肌肉、肺、小肠、上皮细胞、肾及脑中未发现来源于供体的特异性细胞, 如肌肉中的 GFP<sup>+</sup> 细胞不表达肌肉特异性标记  $\alpha$ -actin, 肾组织中发现的 GFP<sup>+</sup> 细胞不表达 WGA, 脑组织中 GFP<sup>+</sup> 细胞不表达神经元标记 MAP-2 等. 2002 年 Morshead et al<sup>[5]</sup>报道了他重复 Bjornson et al<sup>[1]</sup>关于神经干细胞具有向 HSC 分化实验的情况, 将培养的 C57BL/6-ROSA26lacZ 转基因鼠的神经干细胞输给 C57BL/6 小鼠, 经检查 104 只小鼠 31 990 个造血集落, 未发现 lacZ<sup>+</sup> 的造血集落. 再将从 C57BL/6J-Gpila/a 小鼠制备的神经干细胞注入 C57BL/6J-Gpila/b 小鼠, 亦未发现受体鼠造血细胞带有供体标记. 这些资料表明 ASC 是否具有可塑性分化的特性, 尚有待更多的论证.

## 2 ASC 可塑性的机制

由于 ASC 发育分化的基因机制还不清楚, 当一类 ASC 跨谱系分化产生另一类组织细胞时, 究竟是先去分化(de-differentiation)进入一个更加原始可塑的状态, 然后再分化(re-differentiation), 还是不经过去分化而直接通过横向分化(trans-differentiation)变为另一类细胞, 目前尚无定论. 干细胞分化的过程包括多重复杂的反馈调节和细胞间的相互作用, 内部信号和外部信号都可以调节干细胞的分化, 其中一些信号现已被识别. 目前有关 ASC 可塑性调控机制主要有细胞融合学说和基因程序重组学说两种观点.

2.1 细胞融合学说 细胞融合可能导致 ASC 具有横向分化潜能, 向其他类型细胞分化. Terada et al<sup>[6]</sup>报道小鼠骨髓细胞与 ESC 融合后具有多系分化的能力. 骨髓细胞来自  $\text{♀}$  TgN(GFPU)5Nagy 转基因鼠, 与  $\text{♂}$  来源的 ESC

共培养, 培养体系中加入全能HSC集落刺激因子(IL-3)和白细胞抑制因子(LIF), 分别支持HSC和ESC生长. 第7 d撤去IL-3, 使HSC的生长失去支持, 加入嘌呤霉素, 杀死ESC. 3 wk后, 分离出GFP<sup>+</sup>、抗嘌呤霉素的ESC样细胞. 这些细胞在体外可分化为心肌细胞, 注入重症联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠可形成畸胎瘤, 检查DNA倍体型时, 11/13个类似ESC细胞系显示大约四倍体DNA, 其他两个显示近似六倍体DNA基因型. 认为HSC与ESC融合后, 使HSC具有向非造血细胞分化的能力. Pells et al<sup>[7]</sup>证明来自大脑的ASC与ESC共处于同一培养皿时会发生融合. Ying et al<sup>[8]</sup>将NSC与小鼠ESC共同培养. NSC来自ZIN40转基因小鼠[结构性表达lacZ基因和新霉素(neo)抗性基因]和oct4-GiP转基因小鼠(在多能干细胞和生殖系细胞中oct4作启动子时选择性表达GFP基因和嘌呤霉素抗性基因). ESC含有通过同源重组插入oct4位点的潮霉素抗性-单纯疱疹病毒胸腺嘧啶激酶融合基因. 在含有G418或嘌呤霉素(pac)的选择性培养基中培养2-4 wk后杀死ESC, 其他细胞表达lacZ(neo)或GFP(pac). 进一步研究显示细胞对潮霉素耐药, 可见到四倍体或近似四倍体核型. 这些研究提示NSC去分化回到类ESC状态是通过融合细胞自然发生的, 而不是通过固有的信号通道激活所致. Wang et al<sup>[9]</sup>进行了一系列骨髓移植重建肝脏的实验, 通过DNA印迹分析证实移植前供体细胞独有的等位基因为纯合子, 而重建的受体肝脏内肝细胞是杂合子; 通过细胞遗传学分析显示从♀鼠供体骨髓移植重建的♂鼠受体肝细胞核型为80, XXXY(二倍体和二倍体的融合)和120, XXXXY(二倍体和四倍体的融合)核型, 证实重建肝脏细胞是供体和受体细胞融合后分化而来. 上述研究提示移植的成体细胞可能通过与体内原位组织细胞融合, 表现出靶组织的表型.

**2.2 基因程序重组学说** Reik et al<sup>[10]</sup>认为细胞分化过程是基因按程序的开放与关闭的过程: 胚胎向前发育的每一个阶段, 都关闭了前一个发育阶段的一批基因, 开放了新发育阶段的一批基因. 结果是像囊胚内细胞团这样的未分化细胞, 最后分化为肌细胞、B细胞等特化细胞. Surani et al<sup>[11]</sup>用ASC在特定的微环境下背离其既定分化方向而横向分化为其他特化细胞时, 成体细胞核内诸多基因的程序, 也存在关和开的调节, 以便逐步表达特化细胞的基因, 引进计算机术语, 就是基因的程序重组(reprogramming).

ASC移植后对环境中外信号产生反应, 通过基因程序重组而激活相应的分化通路, 产生出与植入部位相称的特定结构和代谢的细胞. 2000年Yan et al<sup>[12]</sup>从第6 d的鸡胚中分离的视网膜色素上皮细胞在neuroD诱导下发生程序重排转录光感受器基因, 表达光感受器视黄醛结合蛋白、视蛋白基因编码的视紫红质、视色素等, 从而分化为感光细胞; Kondo et al<sup>[13]</sup>发现少突胶质细胞的前体在体外特定培养条件下可发生重新程序化

而形成多能神经干细胞, 后者则可分化成为神经元细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞; 2002年Beerheide et al<sup>[14]</sup>发现将人脐带血干细胞移植入严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠肝脏后发生程序重排, 下调作为主要组织相容性复合物(MHC)的重要组成部分 $\beta$ 2-微球蛋白的表达, 使宿主免疫耐受, 从而存活下来; Petrova et al<sup>[15]</sup>在血管内皮细胞内将基因重新编程, 使转录因子prox-1过度表达可诱导淋巴管内皮细胞特异基因的转录, 同时抑制将近40%的血管内皮细胞特异基因的表达, 使其向淋巴管内皮细胞分化.

最近Dean et al<sup>[16]</sup>研究认为: 程序重组是通过对基因组的修饰实现的. 一系列复杂的修饰包括DNA甲基化、染色质修饰(如核小体核心组蛋白广泛改变: 在组蛋白和其他染色质蛋白的氨基酸尾端进行特殊氨基酸残基修饰, 影响转录)、组蛋白共价修饰(乙酰化、甲基化、磷酸化作用). 通过上述修饰调节染色质结构, 对基因组程序重组、对组织特异基因的表达起决定性作用. Li et al<sup>[17]</sup>研究发现染色质修饰的失败能导致发育过程调节障碍(如X染色体失活、基因组印迹)和各种疾病.

### 3 ASC向肝细胞横向分化的研究进展

ASC的横向分化潜能为肝脏疾病的治疗提供了一条新的思路. 多种供体细胞被用于肝脏重建移植试验或在体外诱导向肝细胞分化, 如胰腺上皮祖细胞、HSC、骨髓细胞、多潜能成人祖细胞(multipotent adult progenitor cells, MAPCs)、MMSC等. 尽管迄今的研究结果表明, 这种转化后的细胞增生能力有限, 尚不具备实际应用价值, 但却提供了一条重建肝细胞功能的重要思路.

**3.1 胰腺上皮祖细胞** 1997年Dabeva et al<sup>[18]</sup>首次报道采用不同来源的上皮细胞分化为肝细胞, 从Fischer大鼠胰腺中分离上皮祖细胞, 移植至近亲大鼠肝脏, 以二肽二酰酶IV(DPP IV)及白蛋白基因的表达作为鉴定指标, 发现来自胰腺的上皮祖细胞在肝内分化成肝细胞, 并可整合到肝小叶结构中表达特异性蛋白. 2001年Shen et al<sup>[19]</sup>在体外采用地塞米松、制瘤素M将分泌性胰腺肿瘤细胞诱导为表达肝细胞表型的细胞. 2002年Tosh et al<sup>[20]</sup>将小鼠胚胎期胰腺细胞或者分泌胰多肽的胰腺细胞系AR42J-B13诱导分化为肝细胞, 后者表达白蛋白、运铁蛋白、甲状腺运载蛋白等肝细胞标志.

**3.2 骨髓/血液干细胞** 大量研究显示骨髓细胞或纯化后的HSC均可在体内转化为肝细胞. 1999年Petersen et al<sup>[21]</sup>将Y染色质Sry标志的♂供体骨髓细胞, 移植给经2-乙酰氨基苄和四氯化碳处理后的♀大鼠, 或以二肽二酰酶IV(DPP IV)为鉴定标志, 将阳性的骨髓细胞移植给DPP IV缺损的受体大鼠, 在其肝中可见供体来源的肝卵圆细胞和肝细胞. 2000年Theise et al<sup>[22]</sup>分别将♂小鼠骨髓细胞和纯化的CD34(+)lin(-)的HSC移植入经致死剂量射线照射后的B6D2F1♀小鼠体内, 在肝内均可找到Y染色体阳性的供体细胞分化来的肝细胞, 新



生肝脏中供体来源的细胞占 2.2%。同年 Lagasse et al<sup>[23]</sup>也分别将骨髓细胞和纯化的 HSC 通过静脉注入 I 型酪氨酸血症 FAH(-/-)小鼠体内, 从而重建肝脏功能, 并可见供体来源的肝细胞再生, 在 6 mo 后供体来源的重建部分达到 30% 以上。同年 Theise et al<sup>[24]</sup>和 Alison et al<sup>[25]</sup>在人体内进行了类似研究, 给予男性骨髓细胞后可在女性患者肝内检测到 Y 染色体阳性的肝细胞, 分析表明, 他们是由捐赠骨髓中的 HSC 发育而成的, 同样在男性患者移植入女性供体肝脏后, 可在肝内检测到由自体 HSC 发育来的 Y 染色体阳性肝细胞, 同时也发现了供体来源的胆管细胞, 其中 1 例由 HSC 来源的肝细胞高达 5-40%。2001 年 Krause et al<sup>[26]</sup>移植纯化 HSC 给小鼠后在肝脏胆管中还发现受体来源的上皮细胞。

现已从动物体内分离出骨髓细胞, 在体外定向分化培养发育成肝细胞。2000 年 Oh et al<sup>[27]</sup>分离成年大鼠骨髓细胞, 在含表皮细胞生长因子(EGF)的无血清 DF(DMEM/F12)培养基中培养, 前 5 d 加入剂量达 1  $\mu\text{g/mL}$  的肝细胞生长因子(HGF)诱导分化, 共培养 21 d 后采用 RT-PCR 可检测到分化后的类肝细胞内 AFP、Alb 和 HGF 的受体 c-met 的 mRNA 表达, 组化染色亦可见到细胞内 AFP、Alb、CK8 和 CK18 的表达。2 a 后 Miyazaki et al<sup>[28]</sup>改用优化后的更适于向肝细胞分化的 HGM 培养基代替 Oh et al<sup>[27]</sup>采用的 DF 培养基培养 Wistar 大鼠骨髓细胞, 再次诱导出类肝细胞, 且分化程度较诱导的肝细胞更成熟, RT-PCR 监测到肝细胞分化终末阶段标志色氨酸-2, 3-二氧合酶(tryptophan-2, 3-dioxygenase)和酪氨酸氨基转移酶(tyrosine aminotransferase)的 mRNA。最近 Yamazaki et al<sup>[29]</sup>改用氮胞苷刺激小鼠骨髓细胞 12 h 后再置于肝脏非实质细胞的滋养细胞层上培养, 并以肝衰竭患者血清、制瘤素 M、地塞米松、50 ng/mL 肝细胞生长因子刺激诱导, 2 wk 后对细胞进行组化染色和 RT-PCR 均显示类肝细胞集落中可见肝细胞白蛋白、CK8、CK18 和 CK-19 的表达。

此外将流产胎儿体内的 MMSC 干细胞植入人为诱发病变的实验鼠肝脏内, 发现干细胞在实验鼠体内生长为肝细胞, 病鼠肝脏恢复正常功能。

3.3 多潜能成人祖细胞 随着研究的深入, 美国明尼苏达大学医学院 Reyes et al<sup>[30]</sup>领导的实验室于 2001 年首先报道从人和小鼠骨髓中纯化和扩增出多潜能成人祖细胞(multipotent adult progenitor cells, MAPCs), 该细胞具有如下特点: (1)数量少, 状态原始; (2)增生能力强, 可长期稳定传代; (3)更强的分化潜能。可分化为间充质来源的细胞(骨、软骨、脂肪、基质细胞、肌肉), 也可诱导分化为神经外胚层表型和功能细胞, 也可以分化为具有功能的血管内皮和肝细胞。2002 年 Schwartz et al<sup>[31]</sup>报道在体外成功地将 MAPCs 诱导分化为肝细胞, 将 MAPCs 接种于以纤维结合素、胶原蛋白、Matrigel 为基质的无血清培养基(600 mL/L 低糖 DMEM、400 mL/L MCDB-201)中, 先给予 20 mL/L

FCS、EGF、LIF 和血小板衍生生长因子(PDGF-BB)培养 8-12 h 后换液, 再加入 5-50 ng/mL HGF、酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、纤维母细胞生长因子(FGF-4)、FGF-7, 或者制瘤素 M、DMSO、丁酸钠等诸多细胞因子、化学药品协同作用下诱导培养, 最后约 60% 细胞有上皮细胞样表型, 先后表达不同分化时期的肝细胞标志, 还具有成熟肝细胞的功能。第 7 d 时表达肝细胞核因子-3 $\beta$  (hepatocyte nuclear factor-3 $\beta$ , HNF-3 $\beta$ )、锌指转录因子家族成员(a family member of zinc finger transcription factors)-GATA4、细胞角蛋白 19(CK19)、甲状腺运载蛋白(transferrin)、甲胎球蛋白(AFP); 第 14-28 d 时细胞表达 CK18、HNF-4 和 HNF-1 $\alpha$ 。MAPCs 诱导后, 定量的 RT-PCR 分析显示诱导后细胞的早期分化标志(HNF-3 $\beta$ 、GATA4、CK19、AFP)和后期标志(CK18、HNF-4 和 HNF-1 $\alpha$ 、细胞色素 P450), 都证明了 MAPCs 向肝细胞分化。诱导分化的肝细胞, 可以合成和分泌尿素, 具有细胞色素 P450 的活性, 可以摄取低密度脂蛋白、合成糖原和糖异生等功能。2002 年 Jiang et al<sup>[32]</sup>将 MAPCs 植入致死剂量射线照射的受体内可重建造血并分化为肝脏上皮组织。

#### 4 ASC 横向分化潜在在肝脏疾病治疗中的应用

ASC 诱导分化产生肝实质细胞的研究具有广阔的应用前景, 对于我们这样一个病毒性肝炎高发的国家更具有特殊的意义。对肝硬化、肝坏死疾病的治疗采用生物人工肝辅助治疗或者对病变部位实行细胞替代、对遗传性肝脏疾病采用基因转移治疗是新发展起来并极有前景的肝脏病学治疗战略。ASC 诱导分化产生肝实质细胞为肝脏疾病的细胞治疗提供了另一个选择。

适合肝脏疾病细胞治疗的供体细胞应具有以下特点:

(1)易于获得、培养、增生, 或建立细胞系; (2)能定向分化为所需的肝细胞或胆管上皮细胞; (3)具有成熟细胞所有的代谢功能, 移植入体内能长期存活; (4)人源性, 表型正常, 不诱发免疫反应, 对宿主无害; (5)如果用于基因治疗, 目的基因可高效转染供体细胞。对于不易获得同类干细胞来源的组织, 假若能从存在于自身其他部位的成体细胞分化为受损部位的细胞, 是一种十分令人鼓舞的前景。从患者或供者的骨髓、脐带血或外周血中分离 MMSC、HSC、MAPC 等干细胞比获取肝干细胞相对要容易得多, 因此具有多向分化潜能的骨髓、脐带血、外周血等来源的干细胞将为肝细胞移植和生物人工肝提供一种新的干细胞来源, 同时借助现有脐带血库、骨髓库等可在肝脏疾病的治疗中发挥更大的作用。

我们也应注意到, 虽然 ASC 的研究已经取得较大进展, 但在临床上应用还有许多问题: 目前的多数实验结果来自动物体内实验, 而且许多是群体细胞研究, 并未在克隆细胞水平得到证实; 有些 ASC 是多能干细胞,

ASC 分化的可塑性, 还需要有更多的论证和深入研究; 人 ASC 的特性是否与动物一致, 体外结果是否与体内一致还不知道; ASC 的分化潜能到底有多大; 干细胞横向分化时微环境中生长因子、细胞周期动力学、细胞黏附和基因表达的改变、启动横向分化的遗传和细胞机制还不十分清楚; ASC 的应用研究刚刚起步, 在临床上应用还存在体外分离、扩增、诱导及移植后增生调控等技术问题。但现代生物技术在 ASC 相关研究中的应用必将加快其在临床移植修复治疗中的应用进程。

## 5 参考文献

- Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999;283:534-537
- Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001;3:778-784
- Fukuda K. Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *C R Biol* 2002;325:1027-1038
- Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002;297:2256-2259
- Morshead CM, Benveniste P, Iscove NN, van der Kooy D. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nat Med* 2002;8:268-273
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002;416:542-545
- Pells S, Di Domenico AI, Callaghan EJ, McWhir J. Multipotentiality of neuronal cells after spontaneous fusion with embryonic stem cells and nuclear reprogramming in vitro. *Cloning Stem Cells* 2002;4:331-338
- Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002;416:545-548
- Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003;422:897-901
- Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001;293:1089-1093
- Surani MA. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 2001;414:122-128
- Yan RT, Wang SZ. Expression of an array of photoreceptor genes in chick embryonic retinal pigment epithelium cell cultures under the induction of neuroD. *Neurosci Lett* 2000;280:83-86
- Kondo T, Raff M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 2000;289:1754-1757
- Beerheide W, von Mach MA, Ringel M, Fleckenstein C, Schumann S, Renzing N, Hildebrandt A, Brenner W, Jensen O, Gebhard S, Reifenberg K, Bender J, Oesch F, Hengstler JG. Downregulation of beta2-microglobulin in human cord blood somatic stem cells after transplantation into livers of SCID-mice: an escape mechanism of stem cells? *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:1052-1063
- Petrova TV, Makinen T, Makela TP, Saarela J, Virtanen I, Ferrell RE, Finegold DN, Kerjaschki D, Yla-Herttuala S, Alitalo K. Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *EMBO J* 2002;21:4593-4599
- Dean W, Santos F, Reik W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin Cell Dev Biol* 2003;14:93-100
- Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2002;3:662-673
- Dabeva MD, Hwang SG, Vasa SR, Hurston E, Novikoff PM, Hixson DC, Gupta S, Shafritz DA. Differentiation of pancreatic epithelial progenitor cells into hepatocytes following transplantation into rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:7356-7361
- Shen CN, Slack JM, Tosh D. Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nat Cell Biol* 2000;2:879-887
- Tosh D, Shen CN, Slack JM. Conversion of pancreatic cells to hepatocytes. *Biochem Soc Trans* 2002;30:51-55
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-1170
- Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000;31:235-240
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1229-1234
- Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-16
- Alison MR, Poulosom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000;406:257
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105:369-377
- Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:500-504
- Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, Huh NH. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:24-30
- Yamazaki S, Miki K, Hasegawa K, Sata M, Takayama T, Makuuchi M. Sera from liver failure patients and a demethylating agent stimulate transdifferentiation of murine bone marrow cells into hepatocytes in coculture with nonparenchymal liver cells. *J Hepatol* 2003;39:17-23
- Reyes M, Verfaillie CM. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2001;938:231-235
- Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109:1291-1302
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-49

# DC-SIGN对丙型肝炎病毒扩散的影响

冯志华, 卢丙仑, 李 军, 张 岩, 贾战生, 白宪光

冯志华, 卢丙仑, 李军, 张岩, 贾战生, 白宪光, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038  
国家自然科学基金资助课题, No. 30170822  
项目负责人: 冯志华, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心, fengzh@fmmu.edu.cn  
电话: 029-3377752 传真: 029-3737377  
收稿日期: 2003-08-23 接受日期: 2003-10-07

## 摘要

树突状细胞(dendritic cell, DC)是功能最强的抗原呈递细胞, 他可以有效地处理和呈递抗原的结构, 是免疫系统的哨兵。然而近年发现的表达于DC表面的特异性细胞间黏附因子3结合非整合素分子(dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin, DC-SIGN), 则可能通过其对靶细胞的捕捉, 将病毒直接带到靶细胞附近, 增加感染机会, 使DC成为病毒的传播者。阻断DC-SIGN捕获和呈递HCV病毒有望成为HCV传播感染的较有前景的治疗策略。

冯志华, 卢丙仑, 李军, 张岩, 贾战生, 白宪光. DC-SIGN对丙型肝炎病毒扩散的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(1):209-211  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/209.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)的感染, 不仅能够引起急、慢性病毒性肝炎, 而且能够引起肝纤维化和肝细胞癌, 严重危害人民的生命健康。与其他病毒性肝炎感染的结局不同, HCV感染具有较高的慢性化比例, 有时高达80%以上, 因而具有更大的危害性<sup>[1]</sup>。目前尚无有效的预防和治疗措施。主要是由于对HCV感染路径及慢性化机制的研究相对滞后<sup>[2]</sup>。虽然有较多关于丙型肝炎慢性化机制研究的报道, 但除了病毒变异外, 其他因素了解甚少。最近发现的树突状细胞表面特异性细胞间黏附因子3结合非整合素分子(dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin, DC-SIGN, 已命名为CD209)介导的艾滋病病毒(HIV)传播机制<sup>[3-4]</sup>, 可能为揭示HCV体内扩散路径提供了新的思路。

## 1 DC-SIGN生物学特点

DC-SIGN是由美国斯坦福大学科学家于2000年首先发现的<sup>[4]</sup>, 他们在了解HIV如何攻击细胞时查明, HIV患者毛细血管表层和淋巴结中树突状细胞(dendritic cell, DC)的表面具有一种特异性HIV-1结合蛋白, 这种蛋白由于自身结构的特点很容易使病毒渗入, 从而将这种蛋白命名为DC-SIGN。

业已证实, DC-SIGN是一种具有外源C型植物凝集素的II型膜蛋白, 他专一地、大量地表达于成熟与未成熟的DC表面, 在免疫系统DC识别模式中起重要作用。DC-SIGN的天然配体为ICAM-3<sup>[5-6]</sup>, 因此T淋巴细胞上表达的ICAM-3为早期的DC-T细胞相互作用奠定了基础, 使加工提呈的抗原可以被大量的T细胞受体(TCR)所识别。同时他也与ICAM-2、HIVgp120和埃博拉病毒的受体发生功能上的相互作用, 从而介导DC通过血管内皮细胞。DC-SIGN包含一个Ca<sup>2+</sup>依赖性的碳水化合物识别结构域, 他与ICAM-3的结合是Ca<sup>2+</sup>依赖性的, 能被甘露糖抑制, 这是C型植物凝集素的特点。

DC-SIGN的基因组结构定位于染色体19p13。DC-SIGN具有胞质尾的内化基序, 当其与可溶性配体结合后, 迅速内化, 表明是一种胞内受体, 具有选择性识别各类抗原并将其提呈T细胞的功能。

成熟和非成熟单核细胞源性及CD34<sup>+</sup>骨髓细胞源性DC都表达DC-SIGN, DC强大的抗原呈递功能除了与其独特的抗原处理功能有关, 还与他们通过DC-SIGN与静止/初始T细胞接触的功能有关。原位检测发现, DC-SIGN表达于扁桃体、淋巴结和脾的T细胞亚群, 与其作为一个重要的DC-T细胞结合中介及激活T细胞的功能有关; DC-SIGN在易暴露于HIV-1的黏膜组织如直肠、子宫和阴道高表达, 处于防御病毒和抗原的第一防线。DC-SIGN是一种特异性表达于IL-4刺激单核细胞的分子, 其表达受许多细胞因子和生长因子的调节。

与此相同, 有学者发现了表达于肝窦状隙、胎盘毛细血管及淋巴结内皮细胞表面的DC-SIGN的受体DC-SIGNR, 且与DC-SIGN是同源异构体。DC-SIGNR在氨基酸序列上与DC-SIGN有77%相似, 也定位于染色体19p13.2-3的30kb区域内。鼠类DC-SIGN类似物为DC-SIGNR1, DC-SIGNR1表达于皮肤和脾, 编码C型植物凝集素, 与人DC-SIGNR和DC-SIGN高度相关。恒河猴Mac-DC-SIGN与人DC-SIGN有92%同源性, 具有人DC-SIGN的病毒传播功能。

众所周知, DC是功能最强的抗原呈递细胞, 他可以有效地处理和呈递抗原的结构, 是免疫系统的哨兵<sup>[7-22]</sup>。DC表面分子DC-SIGN则提示: DC是一把双刃剑, 一方面可以呈递抗原, 诱导免疫应答, 清除病毒; 另一方面, 通过DC-SIGN对靶细胞的捕捉, 将病毒直接带到靶细胞附近, 增加感染机会, 成为病毒的传播者<sup>[4]</sup>。因此有人评论, 假若DC是皇冠的话, DC-SIGN就是皇冠上的明珠<sup>[23]</sup>。

业已证实, DC-SIGN 参与了 DC 的迁移和与 T 淋巴细胞的相互作用. DC-SIGN 是 HIV-1 膜蛋白 gp120 与 DC 结合的受体, 能特异性捕获 HIV-1 病毒, 增强表达 CD4 和辅受体的靶细胞被感染, 在 HIV-1 感染中起着非常重要的作用. HIV-1 感染启动位置的 DC 可通过 DC-SIGN 有效捕获抗原 gp120<sup>[24]</sup>, 并在体内起库存 HIV 的作用, 使 HIV 在转移并寻找 T 细胞的旅途中不受免疫系统的任何盘查和打击. DC 对 HIV-1 的捕获完全是 DC-SIGN 依赖性的, DC-SIGN 抗体可以阻断这一过程的发生, 从而抑制 HIV-1 感染.

DC-SIGN 再通过一种 IN TRANS 机制, 将捕捉到的 HIV 传递给允许病毒复制的靶细胞 – 表达 ICAM-3 的 T 细胞<sup>[3, 25]</sup>. DC-SIGN 与 HIV gp120 和 T 细胞表面 ICAM3 的结合不在同一位点上. 而且, 在病毒滴度较低条件下, 只有 DC-SIGN 存在时 T 细胞才被感染. 这一发现解释了以前报道的, 对感染的敏感性与 DC 摄取病毒能力之间的矛盾<sup>[26]</sup>. DC 捕获黏膜部位的 HIV-1 病毒颗粒并将其呈递给 CD4<sup>+</sup> Th 细胞的过程涉及 DC-SIGN 与 HIVgp120 的高亲和性相互作用及病毒内化.

研究还发现, 表达于胎盘毛细血管内皮细胞的 DC-SIGN 受体(DC-SIGNR), 也能与 HIV 膜蛋白 gp120 结合, 因此, 能使 HIV 很容易由母体传给胎儿, 可有效地促进病毒感染 T 细胞. DC-SIGN 也可与 CMV、登革热病毒、埃波拉病毒等结合<sup>[27-31]</sup>, 在这些病毒的传播中起重要的作用.

## 2 DC-SIGN 与 HCV 感染

值得注意的是, 2003 年 2 月法国科学家 Lozach et al<sup>[32]</sup> 的最新研究发现, DC-SIGN 也是 HCV 的受体, 即 HCV E2 蛋白可通过其甘露聚糖成分与 DC-SIGN 结合. 而 DC-SIGN 的受体(DC-SIGNR)是在肝脏、毛细管和淋巴结中的内皮细胞的表面发现的<sup>[3]</sup>. 表明这些受体可能与负载病毒的 DC-SIGN 相互作用, 促进该病毒感染靶细胞和 / 或通过毛细管穿越母婴界限. Bain et al<sup>[33]</sup> 先前的研究也发现 DC 本身可能储存病毒. 这些均提示: 在 HCV 感染中, 可能也存在通过 DC-SIGN 进行的病毒保护、病毒转运以及促进病毒感染靶细胞的路径. DC 也可能是 HCV 感染的传播者. DC 的这种通过 DC-SIGN 或类似 DC-SIGN 的分子将其他病原体传递给靶细胞的作用是以以前所没有考虑到的. 弄清上述问题, 将有助于阐明 HCV 感染靶细胞的路径和慢性化的机制, 可望为丙型肝炎的防治提供新的思路 and 理论依据.

近期, 美国学者 Gardner et al<sup>[34]</sup> 也在肝脏淋巴结内发现了与 DC-SIGN 同源的细胞内黏附分子 3 结合整合素(L-SIGN). 他们进一步的实验表明, L-SIGN 和 DC-SIGN 能够地与 HCV 感染者血清特异性结合, 这种结合由 HCV 外膜糖蛋白 E2 介导, 能被特异性抑制因子阻断, 如: 甘露聚糖、钙螯和剂以及针对 SIGN 分子的外源凝集素决定簇抗体等. 因此, L-SIGN 代表 HCV 肝内特异

性受体, L-SIGN 和 DC-SIGN 可能在 HCV 感染和免疫中起重要的作用.

与此同时, 美国宾夕法尼亚大学 Pohlmann et al<sup>[35]</sup> 也证实 DC-SIGN 和 DC-SIGNR 是两个有关联的 C 型凝集素相关膜分子, DC-SIGN 表达在一些 DC 上, DC-SIGNR 通常存在于某些内皮细胞, 包括肝脏窦状间隙内皮细胞. 他们还发现: 可溶性 HCV E2 糖蛋白和表达 HCV E1、E2 嵌合形式的假型逆转录病毒可与表达 DC-SIGN 和 DC-SIGNR 的细胞系和最初的人内皮细胞有效结合, 但不与其他 C 型凝集素结合. 而且可溶性 E2 可与人类成熟或未成熟单核细胞来源的树突状细胞(monocyte-derived dendritic cells, MDDCs)结合. E2 与未成熟的 MDDCs 的结合依赖于 DC-SIGN 的存在, 而与成熟的 MDDCs 的结合不完全依赖于 DC-SIGN. 这些结果支持: 其他细胞表面分子可能也与 HCV 糖蛋白(E1, E2)相互作用. 从而他们推测, 可能通过 DC-SIGN、DC-SIGNR 捕捉并传递病毒到肝脏以及调整 DC 功能, 促进了 HCV 感染的持续存在.

总之, DC-SIGN 是 DC 研究领域又一新热点, 也是 HCV 感染机制研究的一个意外收获. 有关 DC-SIGN 的基础研究已很深入, DC-SIGN 单抗被研制开发, 这些研究将有助于进一步阐明 DC-SIGN 在 HCV 传播和感染病理中的作用. DC-SIGN 为 HCV 治疗措施和预防性疫苗的研究提供了新的思路, 针对 DC-SIGN 的抗 HCV 治疗尚处于实验室研究阶段, 阻断 DC-SIGN 捕获和呈递 HCV 病毒有望成为 HCV 传播感染的较有前景的治疗策略.

## 3 参考文献

- 1 Mondelli MU. Natural history of hepatitis C virus infection. *J Biol Regul Homeost Agents* 2003;17:128-132
- 2 Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2003;7:89-105
- 3 Colmenares M, Puig-Kroger A, Pello OM, Colmenares M, Kröger AP, Pello OM, Corbi AL, Rivas L. Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *leishmania* amastigotes. *J Biol Chem* 2002;277:36766-36769
- 4 Feinberg H, Mitchell DA, Drickamer K, Weis WI. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* 2001;294:2163-2166
- 5 Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duynhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000;100:587-597
- 6 Geijtenbeek TB, van Duynhoven GC, van Vliet SJ, Krieger E, Vriend G, Figdor CG, van Kooyk Y. Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *J Biol Chem* 2002;277:11314-11320
- 7 邢利和, 王福生, 刘明旭, 朱传琳, 李捍卫, 雷周云, 王慧芬. 慢性乙型肝炎患者树突状细胞的分离培养. *世界华人消化杂志* 2001; 9:591-593
- 8 Zhang J, Zhang JK, Zhuo SH, Chen HB. Effect of a cancer vaccine prepared by fusions of hepatocarcinoma cells with dendritic cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:690-694
- 9 李明松, 袁爱力, 张万岱. 肝癌患者外周血树突状细胞免疫功能

- 低下. 华人消化杂志 1998;6:240-241
- 10 冯志华, 王全楚. 疫苗新概念及新型疫苗的研制. 世界华人消化杂志 2003;11:819-822
- 11 王全楚, 冯志华, 周永兴. 抗 HCV 树突状细胞疫苗的制备及功能研究. 世界华人消化杂志 2003;11:815-818
- 12 冯志华, 王全楚, 周永兴, 郝春秋, 聂青和. HCV-Fc 融合基因疫苗真核表达载体的构建及表达. 世界华人消化杂志 2003;11:697-700
- 13 王全楚, 冯志华, 周永兴, 聂青和, 郝春秋, 王九平. 小鼠骨髓树突状细胞改良培养及体外生物学特性的比较. 世界华人消化杂志 2003;11:219-223
- 14 刘剑勇, 张力图, 李挺, 赵荫农, 张春燕, 陈建思, 张丽生, 覃宇周, 吴飞翔, 唐凯, 唐朝晖. 树突状细胞诱导肿瘤浸润性淋巴细胞抗胃癌免疫的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:467-469
- 15 Ding CL, Yao K, Zhang TT, Zhou F, Xu L, Xu JY. Generation of cytotoxic T cell against HBcAg using retrovirally transduced dendritic cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:1512-1515
- 16 Xu MQ, Yao ZX. Functional changes of dendritic cells derived from allogeneic partial liver graft undergoing acute rejection in rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:141-147
- 17 Xu MQ, Wang W, Xue L, Yan LN. NF-kappaB activation and zinc finger protein A20 expression in mature dendritic cells derived from liver allografts undergoing acute rejection. *World J Gastroenterol* 2003;9:1296-1301
- 18 Zhang JK, Li J, Chen HB, Sun JL, Qu YJ, Lu JJ. Antitumor activities of human dendritic cells derived from peripheral and cord blood. *World J Gastroenterol* 2002;8:87-90
- 19 Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001;7:537-541
- 20 Zhang JK, Li J, Zhang J, Chen HB, Chen SB. Antitumor immunopreventive and immunotherapeutic effect in mice induced by hybrid vaccine of dendritic cells and hepatocarcinoma in vivo. *World J Gastroenterol* 2003;9:479-484
- 21 Tang ZH, Qiu WH, Wu GS, Yang XP, Zou SQ, Qiu FZ. The immunotherapeutic effect of dendritic cells vaccine modified with interleukin-18 gene and tumor cell lysate on mice with pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:908-912
- 22 Zhang JK, Sun JL, Chen HB, Zeng Y, Qu YJ. Influence of granulocyte macrophage colony stimulating factor and tumor necrosis factor on anti-hepatoma activities of human dendritic cells. *World J Gastroenterol* 2000;6:718-720
- 23 Steinman RM. DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell* 2000;100:491-494
- 24 Turville SG, Arthos J, Donald KM, Lynch G, Naif H, Clark G, Hart D, Cunningham AL. HIV gp120 receptors on human dendritic cells. *Blood* 2001;98:2482-2488
- 25 Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duinhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000;100:587-597
- 26 Pohlmann S, Leslie GJ, Edwards TG, Macfarlan T, Reeves JD, Hiebenthal-Millow K, Kirchhoff F, Baribaud F, Doms RW. DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus: virus binding and transfer are dissociable functions. *J Virol* 2001;75:10523-10526
- 27 Halary F, Amara A, Lortat-Jacob H, Messerle M, Delaunay T, Houles C, Fieschi F, Arenzana-Seisdedos F, Moreau JF, Dechanet-Merville J. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* 2002;17:653-664
- 28 Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birs DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 2003;197:823-829
- 29 Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Despres P. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep* 2003;4(7 Suppl):1-6
- 30 Simmons G, Reeves JD, Grogan CC, Vandenberghe LH, Baribaud F, Whitbeck JC, Burke E, Buchmeier MJ, Soilleux EJ, Riley JL, Doms RW, Bates P, Pohlmann S. DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology* 2003;305:115-123
- 31 Baribaud F, Doms RW, Pohlmann S. The role of DC-SIGN and DC-SIGNR in HIV and Ebola virus infection: can potential therapeutics block virus transmission and dissemination? *Expert Opin Ther Targets* 2002;6:423-431
- 32 Lozach PY, Lortat JH, De LD, Lavalette A. DC-SIGN and L-SIGN are high-affinity binding receptors for hepatitis C Virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 2003;278: 20358-20366
- 33 Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski JP, Trepo C, Inchauspe G. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* 2001;120:512-524
- 34 Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, Donovan GP, Maddon PJ, Dragic T, Olson WC. L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4498-4503
- 35 Pohlmann S, Zhang J, Baribaud F, Chen Z, Leslie GJ, Lin G, Granelli-Piperno A, Doms RW, Rice CM, McKeating JA. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 2003;77:4070-4080

# 幽门螺杆菌与非甾体抗炎药在上胃肠疾病中的相互作用及其研究进展

纪开宇, 胡伏莲

纪开宇, 胡伏莲, 北京大学第一医院消化内科 北京市 100034  
项目负责人: 胡伏莲, 100034, 北京市, 北京大学第一医院消化内科.  
hufu@263.net  
收稿日期: 2003-08-04 接受日期: 2003-09-02

## 摘要

幽门螺旋杆菌(Hp)和非甾体抗炎药(NSAID)是两种重要的胃黏膜损害因子. 他们是造成消化性溃疡及其并发症的主要原因. 临床上二者经常同时存在. 因此阐明二者间可能的相互关系和相互作用有很重要的临床价值. 然而, 以往的研究并没有得出一致的结论; 有关二者关系的研究还存在着矛盾. Hp 与 NSAID 共用某些相同的机制造成胃黏膜的损伤, 但是无证据表面二者间有明显的协同作用. 如果没有考虑其他因素的影响而将二者的关系简单地总结为无关、相加、协同或拮抗是不切实际的, 因为有关研究在方法学, 包括 NSAID 使用者的定义及其种类、剂量、疗程和适应证都存在着差异; 并且在试验终点、消化不良的定义和根除 Hp 的治疗方案等诸多方面都有不同; 这可能是造成相关研究结果不一致的原因. 尽管如此, 从相关研究的结果大致可以得出一些结论. 第一, 正在应用 NSAID 的十二指肠溃疡现患或既往有十二指肠溃疡者, 应检测 Hp 并对阳性者予以根除, 因为临床上不能判定溃疡是 Hp、或 NSAID 或二者共同所致. 如果患者需继续应用 NSAID, 则应用 PPI 或选择性 COX-2 NSAID 以预防溃疡的复发. 对现患胃溃疡或既往有胃溃疡病史且正应用 NSAID 者, 应用铋剂为中心的根除 Hp 的治疗方案较以 PPI 为中心的根除方案在 NSAID 相关性胃溃疡的治疗和预防中有更好的疗效. 第二, 对 Hp 阳性的有胃肠症状的阿司匹林应用者, 如果继续应用阿司匹林, 根除 Hp 会减少患者溃疡出血的危险性; 如果无消化不良症状或无溃疡病史, 则没有必要检测 Hp 或根除 Hp 治疗. 第三, 如果患者即将应用 NSAID, 检测并根除 Hp 将肯定会减少溃疡的危险性. 第四, 应用选择性 COX-2 NSAID 的患者, 有关 Hp 根除的建议与未应用 NSAID 者相同. 第五, 毫无疑问, 在长期应用 NSAID 者, 根除 Hp 和随后的 PPI 预防疗法将肯定减少溃疡的发生和复发, 促进溃疡的愈合. 未来有关 Hp 与 NSAID 相互关系相互作用的研究必须要考虑以下几个重要问题: 有关二者间相互作用机制的深入研究; Hp 相关性胃肠损伤及 NSAID 所致损伤的特点以及二者间的区别等等; 所有这些进展将有助于我们更好地理解 Hp 或 NSAID 或二者共同引发溃疡及其并发症的细节; 评估新一代的 NSAID, 选择性 COX-2 NSAID, 更好的

阐明其作用机制; 他们能完全取代传统的 NSAID 吗? 他们能改变 Hp 与 NSAID 间的相互关系吗? 必须采用多中心、大样本, 实行统一方法学标准的随机双盲对照的临床研究才会帮助我们得出一致的客观的结论.

纪开宇, 胡伏莲. 幽门螺杆菌与非甾体抗炎药在上胃肠疾病中的相互作用及其研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12(1):212-215

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/212.asp>

## 0 引言

Hp 与 NSAID 是两种相互独立的胃黏膜损害因子, 二者主要通过不同的机制造成胃黏膜的损害. 越来越多的学者认识到 Hp 与 NSAID 之间的相互作用、相互影响以及由此导致的其在消化系疾病的发生、发展、治疗及预后中的重要作用.

任何弥漫性组织损害均与 Hp 有关, 而 NSAID 不会<sup>[1]</sup>, Stolte et al<sup>[2]</sup> 评估了病理组织学 NSAID/阿司匹林病损诊断标准, 认为当均质性嗜酸细胞性缺血性坏死进入邻接的黏膜固有层时被认为是 NSAID 相关性黏膜损害的特点, 其敏感性为 72%, 特异性为 79.6%. Lauwer et al<sup>[3]</sup> 对比细胞骨架的变化和不同的增生方式可以区分 NSAID 与 Hp 所致胃病理损害的不同, 有可能反应出不同的损伤途径. Menges et al<sup>[4]</sup> 发现 MMP-1 表达与胃溃疡病因有关, 在 NSAID 相关溃疡中, MMP-1 的合成会因 NSAID 相关性前列腺素浓度的下降而受到抑制. 所有这些都预示也许在不远的将来我们会有更好的方法将 Hp 与 NSAID 相关性胃肠黏膜损害区分开来. 虽然 NSAID 与 Hp 共享一些病理机制, 但无公认的证据表明两个危险因子之间有协同作用<sup>[5]</sup>. 那么, Hp 与 NSAID 在胃肠黏膜损伤中到底是协同、相加、拮抗还是没有相互作用, 各家的观点不一. 十多年的研究与实践并没有确立一致的意见; 有的研究甚至得出相反的结论.

1.1 支持 Hp 与 NSAID 没有相互作用的证据 一些流行病学的调查发现 NSAID 的使用不影响患者对 Hp 的易感性<sup>[6-8]</sup>. 在 NSAID 使用者中, Hp 感染者与非感染者的消化不良症状的发生率无明显区别<sup>[9]</sup>. 血清 Hp 阳性与阴性相比, 应用阿司匹林无更多的胃肠不适<sup>[10]</sup>. 有些相关的基础研究表明 NSAID 不影响 Hp 的定植<sup>[11]</sup>. Hp 的感染不影响应用阿司匹林前后胃黏膜对蔗糖的渗透性. 临床也有证据支持 Hp 感染不影响 NSAID 急性胃黏膜损害的程度和类型<sup>[7, 12]</sup>; Hp 感染不增加长期应用 NSAID 患者消化



性溃疡的危险性<sup>[9]</sup>. NSAID也不增加Hp感染患者的胃肠毒性作用<sup>[13]</sup>. 持以上观点者大多认为Hp与NSAID之间无相互作用; 不主张NSAID使用者均做Hp筛查与根除治疗<sup>[14]</sup>; 对待NSAID使用者的Hp感染应与不使用者一致<sup>[15]</sup>.

1.2 支持Hp与NSAID有协同作用的证据 有更多的研究支持Hp与NSAID的相互作用. 在没有应用NSAID的患者中, NUD, 男性, 年龄, 贫血和Hp均是PUD的独立的危险因素; 而在NSAID使用者中, Hp是PUD惟一的独立危险因素<sup>[16]</sup>, Hp在有明显胃黏膜损害者的检出率要比无黏膜损害者高, Hp感染的频率随病理改变的严重程度而明显增加, Hp与慢性活动性胃炎相关, 这提示Hp可能是NSAID相关性胃黏膜病变的危险因子<sup>[17]</sup>. NSAID的应用使Hp阳性者的PUD危险性增加了3倍, 使Hp阴性者的PUD危险性增加了5倍<sup>[16]</sup>. 有研究表明应用NSAID前根除Hp可以减少溃疡的发生<sup>[7, 18]</sup>; 而有Hp感染的NSAID使用者的十二指肠溃疡更易复发<sup>[19]</sup>. 当Hp阳性胃炎存在时, 与Hp阴性胃炎相比, 长期小剂量阿司匹林的应用会导致更严重的胃黏膜损害<sup>[20]</sup>. 流行病学的资料显示, 消化性溃疡更易在有黏膜糜烂或Hp感染或二者均有的长期使用NSAID者发生<sup>[21]</sup>. 还有许多研究资料支持Hp与NSAID在胃黏膜损伤中的协同作用. 持这一观点者大多主张对NSAID使用者及即将使用者给予积极的Hp筛查和根除治疗; 这将会减轻Hp及NSAID对胃肠黏膜的进一步损害.

1.3 支持Hp与NSAID有拮抗作用的证据 就目前的理论而言, Hp感染能够刺激胃黏膜COX-2的高表达, 进而促进前列腺素的合成, 从而增强胃黏膜的修复机制; 在理论上Hp似乎可以拮抗NSAID对前列腺素合成的抑制. 也有一些基础与临床的研究支持这一理论. Hawkey<sup>[22]</sup>就提出Hp与NSAID通过不同的机制导致胃黏膜损害, 是各自独立的危险因素; 二者之间无协同作用; 相反, Hp感染减轻了NSAID相关性溃疡和损害以及并发症的发生率, 这可能是二者对前列腺素的相反作用或其他原因所致. 有研究表明, 续用NSAID的Hp阳性的PUD患者根除Hp后会导致胃溃疡的愈合不良, 根除后6mo内并没有减少溃疡和消化不良的发生率<sup>[23-24]</sup>. 相关的动物实验也观察到Hp与NSAID共同作用比单独应用NSAID有更轻的胃黏膜炎症反应, 前者的炎症积分低于后者, 二者间差异有显著性<sup>[25]</sup>. 且有数据显示, 在NSAID使用者中, 其胃黏膜前列腺素的合成在Hp阳性者显著高于Hp阴性者<sup>[26-27]</sup>. Hp的定植减轻了NSAID对前列腺素合成的抑制. 以上证据表明Hp可能是NSAID相关性胃肠损害的拮抗与保护因子<sup>[27]</sup>; 持这一观点者大多主张对NSAID使用者或NSAID相关性胃肠损害不做Hp的根除治疗.

1.4 Hp与NSAID关系需进一步明确 有些学者回顾分析了自己与他人的研究结果, 对比分析了各自实验与研究的异同, 结果发现这方面研究在定义与方法上的诸多不同<sup>[5]</sup>. 这包括, 实验对象或调查人群的背景不同; Hp感染的菌株各异, 确诊的方法不同, 如: BUT排除

Hp感染并不理想<sup>[29]</sup>; NSAID的种类, 剂量, 剂型, 用法, 疗程不同; 根除Hp的方案不同; 随访复诊的期限, 条件不同; 还未阐明的机制等等. 所有这些都可能造成研究结果结论的不一致. 因此Hp与NSAID在PUD中的相互作用还值得进一步探讨; Hp是否加重NSAID使用者的消化不良症状还不清楚; 对NSAID使用者根除Hp并不能证明有利于溃疡的愈合, 其在溃疡发生中的保护作用还值得怀疑<sup>[28]</sup>. 有些实验条件等各方面相仿的研究却得出相矛盾的结果, 这些不一致的结果可能反应了Hp感染与NSAID在胃肠疾病中的复杂关系.

## 2 Hp与NSAID相互作用的临床意义

2.1 关于治疗的困惑 由于对Hp与NSAID在胃肠黏膜损害中的相互作用的争论, 那么关于NSAID使用者的Hp是否需要根除自然也存在许多不一致的意见. 有人认为感染Hp的NSAID使用者的溃疡发生中, 无法确定其溃疡是Hp, NSAID还是二者共同造成的, 因此给予Hp的根除治疗是符合逻辑的<sup>[28]</sup>. 但另有研究表明根除Hp后6mo内并不能预防NSAID相关溃疡的复发, 对消化不良的预防作用也不能被证实<sup>[30]</sup>. 无明显证据说明意在保护胃肠损害的Hp根除治疗是有效的<sup>[28]</sup>.

PPI被证明是Hp阳性的NSAID使用者溃疡出血的有效二级预防<sup>[31]</sup>, 其在Hp阴性NSAID使用者中预防溃疡并发症的有效性有待进一步验证<sup>[32]</sup>. 抑酸治疗对Hp阳性NSAID使用者较Hp阴性者更有效, 因为Hp的存在加强了PPI对NSAID相关损害的抑酸效果<sup>[31]</sup>, 但这并不能说明Hp在NSAID相关胃肠黏膜损害中的保护作用<sup>[33]</sup>. 有证据表明, 感染Hp的应用小剂量阿司匹林的上消化道出血者, 奥美拉唑与根除Hp预防复发性出血的疗效一致; 在其他非阿司匹林的NSAID使用者, 奥美拉唑的预防疗效比根除Hp的效果好<sup>[34]</sup>; 有人应用潘托拉唑40mg 1次/d, 连续1mo比PPI三联1wk根除Hp更有效地防止了Hp阳性的NSAID使用者的胃肠黏膜损害<sup>[35]</sup>; 这提示对需继续应用NSAID者, 根除Hp后还是需维持PPI的预防治疗. 有资料显示Hp感染的NSAID使用者, 抑酸治疗对其十二指肠溃疡的预防效果显著高于胃溃疡<sup>[19]</sup>; 而铋剂方案比PPI方案根除Hp能更好地防止NSAID相关胃溃疡的发生和复发<sup>[36]</sup>.

有人主张根除Hp会使阿司匹林的使用者和开始应用NSAID受益; 而对长期应用NSAID者, 根除Hp并未表现出加速溃疡愈合, 减少复发或预防溃疡并发症的目的, 而这些都能通过长期的PPI维持治疗而达到<sup>[37]</sup>. 由于对Hp与NSAID致病机制认识的不断深入以及新型NSAID研究的发展, 应用选择性COX-2抑制剂代替传统的NSAID表现出了相同的疗效以及非常小的胃肠副作用; 那么其是否能够或是否有必要完全替代传统的NSAID, 以及其在心血管和肾脏方面的副反应也是值得我们注意与继续探讨的问题<sup>[38]</sup>.

2.2 现在的观点 我们通过动物实验证实了Hp与吲哚美

辛在 Balb/c 小鼠胃黏膜损伤中有协同作用. Hp 与吲哚美辛共同作用下所造成的胃黏膜损害炎症积分显著高于 Hp 或吲哚美辛单独作用组, 二者间差异有显著性<sup>[39]</sup>. 而就 Hp 与 NSAID 的相互作用而言, NSAID 不影响群体对 Hp 的易感性及其定植, 但先在的 Hp 感染对 NSAID 相关性胃黏膜损害有一定的保护作用. 其机制可能是 Hp 引发 COX-2 的高表达与相应升高的黏膜前列腺素拮抗了部分 NSAID 对前列腺素合成的抑制; 可能的其他机制有待进一步明确. 尽管如此, Hp 的这种保护作用与其造成的危害相比还是微不足道的.

2.3 当今对 Hp 与 NSAID 相互作用的处理意见<sup>[40]</sup> (1)对有症状的感染 Hp 的阿司匹林的使用者, 如续用阿司匹林, 给予根除 Hp 治疗会减少溃疡出血的危险性; 如无症状和溃疡史, 无需根除 Hp<sup>[41-42]</sup>; (2)既往有胃溃疡病史, 感染 Hp 现需长期应用 NSAID 者, 铋剂为中心的根除治疗能更好地防止 NSAID 相关胃溃疡的发生与复发<sup>[36]</sup>; (3)既往有十二指肠溃疡病史, 现感染 Hp 需长期应用 NSAID, PPI 为中心的根除治疗及随后的抑酸治疗对防止十二指肠溃疡的复发效果更显著<sup>[41, 43]</sup>; (4)现患十二指肠溃疡的感染 Hp 的 NSAID 使用者, 无论是否续用 NSAID, 根除 Hp 会预防十二指肠溃疡的复发; 如续用 NSAID, 应予 PPI 预防胃肠黏膜的损害或改为选择性 COX-2 抑制剂<sup>[41]</sup>; (5)现患胃溃疡的感染 Hp 的 NSAID 使用者, 铋剂为中心的根除治疗能更好地预防 NSAID 相关性胃溃疡的发生与复发<sup>[41]</sup>; 如续用 NSAID, 应给予 PPI 维持治疗或换用选择性 COX-2 抑制剂以预防溃疡及其并发症的发生<sup>[41]</sup>; (6)对于应用选择性 COX-2 抑制剂者的 Hp 应与非使用者一样, 其 Hp 的根除不应普遍进行, 而应遵行现行的 Hp 根除适应证<sup>[41]</sup>; (7)将要使用 NSAID 者, 检测并根除 Hp 感染可能会减少潜在溃疡出血的危险性<sup>[37, 41]</sup>; (8)长期应用 NSAID 者, 根除 Hp 并给予 PPI 的维持治疗将会肯定地促进溃疡的愈合, 减少复发及预防其并发症的发生<sup>[37]</sup>.

### 3 研究方向

有关 Hp 与 NSAID 致病机制的更加全面更加深入的阐明将会帮助我们更好地分析 Hp 与 NSAID 之间的相互作用, 找到更好的实验与分析方法. 用多中心大样本的基础与临床研究, 将 Hp 与 NSAID 相互作用研究的方法, 定义等统一化, 标准化, 使其具可比性. 定 Hp 与 NSAID 在胃肠疾病中二者所占比重, 进一步分析 Hp 与 NSAID 相关性胃肠黏膜损害特点性质的不同, 找到辨别二者的客观指标, 以利于区分胃肠黏膜损害的病因. 如有关细胞骨架的变化和不同的增生方式的研究, MMP-1 表达的病因学阐述, 等等这些均使辨别病因成为可能, 从而有利于进一步评价 Hp 与 NSAID 在胃肠黏膜损害中的地位和作用. 开发并评估新一代 NSAID, 减少或消除其副作用的发生, 积累基础与临床数据以确立其在临床病理生理过程中的意义.

### 4 参考文献

- Laine L, Cominelli F, Sloane R, Casini-Raggi V, Marin-Sorensen M, Weinstein WM. Interaction of NSAIDs and *Helicobacter pylori* on gastrointestinal injury and prostaglandin production: a controlled double-blind trial. *Aliment Pharmacol Ther* 1995;9:127-135
- Stolte M, Panayiotou S, Schmitz J. Can NSAID/ASA-induced erosions of the gastric mucosa be identified at histology? *Pathol Res Pract* 1999;195:137-142
- Lauwer GY, Furman J, Michael LE, Balis UJ, Kubilis PS. Cytoskeletal and kinetic epithelial differences between NSAID gastropathy and *Helicobacter pylori* gastritis: an immunohistochemical determination. *Histopathology* 2001;39:133-140
- Menges M, Chan CC, Zeitz M, Stallmach A. Higher concentration of matrix-metalloproteinase 1(interstitial collagenase) in *H pylori*-compared to NSAID-induced gastric ulcers. *Z Gastroenterol* 2000;38:887-891
- Lazzaroni M, Porro GB. Review article: *Helicobacter pylori* and NSAID gastropathy. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15(Suppl 1):22-27
- Graham DY, Lidsky MD, Cox AM, Evans DJ Jr, Evans DG, Alpert L, Klein PD, Sessoms SL, Michaletz PA, Saeed ZA. Long-term nonsteroidal antiinflammatory drug use and *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 1991;100:1653-1657
- Barkin J. The relation between *Helicobacter pylori* and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998;105:22S-27S
- Wilcox CM. Relationship between nonsteroidal anti-inflammatory drug use, *Helicobacter pylori*, and gastroduodenal mucosal injury. *Gastroenterology* 1997;113(6 Suppl):S85-89
- Kim JG, Graham DY. *Helicobacter pylori* infection and development of gastric or duodenal ulcer in arthritic patients receiving chronic NSAID therapy. The misoprostol study group. *Am J Gastroenterol* 1994;89:203-207
- Laheij RJ, Jansen JB, Verbeek AL, Verheugt FW. *Helicobacter pylori* infection as a risk factor for gastrointestinal symptoms in patients using aspirin to prevent ischaemic heart disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1055-1059
- Maxton DG, Srivastava ED, Whorwell PJ, Jone DM. Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs or smoking predispose to *Helicobacter pylori* infection. *Postgrad Med J* 1990;66:717-719
- Lanza FL, Evans DG, Graham DY. Effect of *Helicobacter pylori* infection on the severity of gastroduodenal mucosal injury after the acute administration of naproxen or aspirin to normal volunteers. *Am J Gastroenterol* 1991;86:735-737
- Rybar I, Masaryk P, Mateicka F, Kopecky S, Rovinsky J. Nonsteroidal antiinflammatory drug-induced mucosal lesions of the upper gastrointestinal tract and their relationship to *Helicobacter pylori*. *Int J Pharmacol Res* 2001;21:119-125
- Kanji S, Dumo P. The effect of *Helicobacter pylori* eradication on NSAID-induced gastrointestinal toxicity. *Ann Pharmacother* 2001;35:249-254
- Hawkey CJ. What consideration should be give to *Helicobacter pylori* in treating nonsteroidal anti-inflammatory drug ulcers? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12(Suppl 1):S17-20
- Voutilainen M, Mantynen T, Farkkila M, Juhola M, Sipponen P. Impact of non-steroidal anti-inflammatory drug and aspirin use on the prevalence of dyspepsia and uncomplicated peptic ulcer disease. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:817-821
- Heresbach D, Raoul JL, Bretagne JF, Minet J, Donnio PY, Ramee MP, Siproudhis L, Gosselin M. *Helicobacter pylori*: a risk and severity factor of non-steroidal anti-inflammatory drug induced gastrpthy. *Gut* 1992;33:1608-1611
- Bazzoli F, De Luca L, Graham DY. *Helicobacter pylori* infection and the use of NSAIDs. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2001;15:775-785
- Graham DY. Critical effect of *Helicobacter pylori* infection on the effectiveness of omeprazole for prevention of gastric or duodenal ulcers among chronic NSAID users. *Helicobacter* 2002;7:1-8
- Feldman M, Cryer B, Mallat D, Go MF. Role of *Helicobacter pylori* infection in gastroduodenal injury and gastric prostaglandin synthesis during long term/low dose aspirin therapy: a prospective placebo-controlled, double-blind randomized trail. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1751-1757

- 21 Taha AS, Sturrock RD, Russell RI. Mucosal erosions in longterm non-steroidal anti-inflammatory drug users: predisposition to ulceration and relation to *Helicobacter pylori*. *Gut* 1995;36: 334-336
- 22 Hawkey CJ. Personal review: *Helicobacter pylori*, NSAIDs and cognitive dissonance. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:695-702
- 23 Yeomans ND, Garas G, Hawkey CJ. The nonsteroidal anti-inflammatory drugs controversy. *Gastroenterol Clin North Am* 2000;29:791-805
- 24 Hawkey CJ, Tulassay Z, Szczepanski L, van Rensburg CJ, Filipowicz-Sosnowska A, Lanas A, Wason CM, Peacock RA, Gillon KR. Randomised controlled trial of *Helicobacter pylori* eradication in patients on non-steroidal anti-inflammatory drugs: HELP NSAIDs study. *Helicobacter* eradication for lesion prevention. *Lancet* 1998;352:1016-1021
- 25 Schraier M, Petrelli L, Bonfanti M, Di Bella A, Pest P, Man F, Adami J, Tokumoto M. Experimental model of infection of *Helicobacter pylori* in the mouse. A study of gastric damage caused by indomethacin. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2001; 31:115-121
- 26 Bhang CS, Lee HS, Kim SS, Song HJ, Sung YJ, Kim JI, Chung IS, Sun HS, Park DH, Lee YS. Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor and non-selective NSAIDs on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2002;7: 14-21
- 27 Hudson N, Balsitis M, Filipowicz F, Hawkey CJ. Effect of *Helicobacter pylori* colonization on gastric mucosal eicosanoid synthesis in patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gut* 1993;34:748-751
- 28 Gisbert JP, Boixeda D, Martin de Argila C, Garcia Plaza A. Gastroduodenal lesions and non-steroidal anti-inflammatory agents. What role does *Helicobacter pylori* play in this relationship? *Rev Esp Enferm Dig* 1998;90:655-664
- 29 Chan HL, Wu JC, Chan FK, Chio CL, Ching JY, Lee YT, Leung WK, Lau JY, Chung SC, Sung JJ. Is non-*Helicobacter pylori*, non-NSAIDS peptic ulcer a common cause of upper GI bleeding? A prospective study of 977 patients. *Gastrointest Endosc* 2001; 53:438-442
- 30 Chan FK, Sung JJ. Role of acid suppressants in prophylaxis of NSAIDs damage. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2001;15: 433-445
- 31 Hawkey CJ. Is *Helicobacter pylori* eradication useful in patients taking NSAIDs? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11 ( Suppl 2):S47-50+
- 32 Graham DY. *Helicobacter pylori* and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: interaction with proton pump inhibitor therapy for prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug ulcers and ulcer complications-future research needs. *Am J Med* 2001;110:58S-61S
- 33 Malfertheiner P, Labenz J. Does *Helicobacter pylori* status affect nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated gastroduodenal pathology? *Am J Med* 1998;104:35S-40S
- 34 Chan FK, Chung SC, Suen BY, Lee YT, Leung WK, Leung VK, Wu JC, Lau JY, Hui Y, Lai MS, Chan HL, Sung JJ. Preventing recurrent upper gastrointestinal bleeding in patients with *Helicobacter pylori* infection who are taking low-dose aspirin or naproxen. *N Engl J Med* 2001;344:967-973
- 35 Pilotto A, Di Mario F, Franceschi M, Leandro G, Battaglia G, Germana B, Marin R, Valerio G. Pantoprazole versus one-week *Helicobacter pylori* eradication therapy for the prevention of acute NSAID-related gastroduodenal damage in elderly subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:1077-1082
- 36 Taha AS. Non-steroidal anti-inflammatory drug gastropathy and *Helicobacter pylori* infection. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31(Suppl 1):S23-S26
- 37 McCarthy DM. *Helicobacter pylori* and NSAIDs-What interaction. *Eur J Surg Suppl* 2001;586:56-65
- 38 Rainsford KD. The ever-emerging anti-inflammatories. Have there been any real advances? *J Physiol Paris* 2001;95:11-19
- 39 纪开宇, 胡伏莲, 李爱东, 李江. 幽门螺杆菌与吲哚美辛在 Balb/c 小鼠胃黏膜损伤中的相互作用. *中华医学杂志* 2003;83:726-730
- 40 胡伏莲. 重视幽门螺杆菌与非甾体抗炎药在上胃肠疾病中关系的研究. *中华医学杂志* 2003;83:722-723
- 41 Chan FK. *Helicobacter pylori* and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Gastroenterol Clin North Am* 2001;30:937-952
- 42 Barr M, Buckley M, O' Morain C. Review article: non-steroidal anti-inflammatory drugs and *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14(Suppl 3):43-47
- 43 Schoenfeld P, Kimmey MB, Scheiman J, Bjorkman D, Laine L. Review article: nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated gastrointestinal complications-guidelines for prevention and treatment. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:1273-1285

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 2002年度医疗机构国内论文被引用次数排名

排名	单位	被引次数	排名	单位	被引次数
1	解放军总医院	1602	11	南京军区南京总医院	822
2	中国协和医科大学北京协和医院	1151	12	上海第二医科大学瑞金医院	754
3	第二军医大学长海医院	1036	13	华中科技大学同济医院	646
4	北京大学附 1 院	1004	14	复旦大学华山医院	610
5	第四军医大学西京医院	965	15	中日友好医院	589
6	第二军医大学长征医院	920	16	复旦大学中山医院	579
7	第三军医大学西南医院	866	17	第四军医大学唐都医院	543
8	四川大学华西医院	857	18	解放军 304 医院	515
9	中山大学附 1 院	837	19	北京大学附 3 院	510
10	第一军医大学南方医院	825	20	医科院阜外医院	508

# MRI、CT 三维重建肝脏管道系统的灌注和铸型的建模

方驰华, 钟世镇, 吴坤成, 张刚庆, 虞春堂, 王兴海

方驰华, 张刚庆, 虞春堂, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院肝胆外科 广东省广州市 510282  
钟世镇, 吴坤成, 王兴海, 中国人民解放军第一军医大学临床解剖研究所 广东省广州市 510515  
项目负责人: 方驰华, 510282, 广东省广州市工业大道中 253 号, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院肝胆外科. fch58520@sina.com  
电话: 020-84360607  
收稿日期: 2003-05-14 接受日期: 2003-06-04

## 摘要

目的: 建立 MRI、CT 三维重建肝脏管道系统的灌注和铸型的模型, 研究灌注管道肝脏的薄层 CT、MRI 扫描。

方法: 取肝门部保留完好的完整肝脏, 经预处理后, 分别以不同配方的灌注材料对各管道灌注, 再经固定和铸型, 置于模拟腹腔模具内, 在接近肝脏的解剖位置状态下, 行 CT、MRI 薄层扫描, 所得图像和数据进行肝脏管道结构的三维重建。

结果: 肝脏标本灌注、铸型方法科学, 灌注材料不影响标本的扫描。肝脏标本 CT 扫描的层面管道结构清晰, 三维重建, 各管道的立体感强, 在标本扫描的中间部位, 分别可见肝右、肝中和肝左静脉, 左、右肝段的门静脉分支。

结论: 肝脏管道系统的灌注和铸型是研究肝脏管道结构的较理想的方法。

方驰华, 钟世镇, 吴坤成, 张刚庆, 虞春堂, 王兴海. MRI、CT 三维重建肝脏管道系统的灌注和铸型的建模. 世界华人消化杂志 2004;12(1):216-217  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/216.asp>

## 0 引言

肝脏外科学, 现代肝癌(尤其是巨块复杂型)外科和肝移植的发展是以肝脏的管道结构为基础的<sup>[1]</sup>。但传统的肝脏解剖学研究主要针对尸体固定标本, 由于肝脏管道塌陷, 肝脏本身的立体结构和空间构象的改变, 所获得的管道数据与活体肝脏管道不符, 有时是一种误导。为此我们在世界上首次建立了 MRI、CT 三维重建肝脏管道系统的灌注和铸型的模型, 研究了灌注管道肝脏的薄层 CT、MRI 扫描。

## 1 材料和方法

1.1 材料 肝脏标本来自第一军医大学临床解剖研究所。灌注材料<sup>[2]</sup>: 自凝牙托粉; 自凝牙托水; 过氯乙烯; 乙酸乙酯; 1 000 g/L 银珠粉; 180-220 mL/L 邻苯二甲酸二丁酯; 油画颜料。

### 1.2 方法

1.2.1 材料的采集<sup>[3]</sup> 取肝脏时, 首先剪断肝圆韧带,

镰状韧带, 左、右冠状韧带, 左、右三角韧带, 肝肾韧带。于十二指肠球部水平切断肝动脉、门静脉、胆总管, 于右肾静脉水平之上切断肝下腔静脉, 切开膈肌腔静脉裂孔, 切断肝上下腔静脉, 将肝脏连同肝上、下腔静脉, 肝动脉, 门静脉, 胆总管完整取下。1.2.2 标本预处理<sup>[3]</sup> 肝脏取出后立即用生理盐水或洁清水经门静脉灌注, 直到肝脏颜色发生变化, 或部分变白。连续锁边缝合肝脏下腔静脉的断端。选择小口径的插管入肝动脉和胆总管, 直接用线结扎, 门静脉和肝上下腔静脉则用大口径的插管, 结扎。将肝门部区域的小血管用丝线结扎, 以免灌注时灌注液外漏。

1.2.3 灌注方法<sup>[4]</sup> (1) 肝动脉灌注: 过氯乙烯、乙酸乙酯加 1 000 g/L 银珠粉和红色油画颜料适量, 调和均匀。经肝动脉插管注入肝内动脉。(2) 胆道灌注: 过氯乙烯填充剂, 1 000 g/L 银珠粉和黄色油画颜料适量, 调和均匀, 经胆总管插管注入胆道系统。(3) 下腔静脉灌注(先经标本固定): 自凝牙托粉和自凝牙托水按 1:1 方法配制, 自凝牙托粉 60 g, 自凝牙托水 60 mL, 银珠粉 12 g, 邻苯二甲酸二丁酯 12-15 mL, 加蓝色油画颜料适量。先将自凝牙托水、银珠粉、邻苯二甲酸二丁酯、蓝色油画颜料搅拌均匀, 再将自凝牙托粉加入一起搅拌均匀, 进行下腔静脉灌注。(4) 门静脉灌注(先经标本固定): 将油画颜料换为棕色, 其他成分及配制同下腔静脉灌注液的配制, 然后进行门静脉灌注。

1.2.4 标本的固定和铸型<sup>[3]</sup> (1) 标本的固定: 将肝脏放入盛水的容器里, 用大块湿纱布从不同部位、不同方向支撑、固定, 容器中盛水量以能将肝脏浮起为宜。经门静脉灌注 100-200 mL/L 甲醛, 直至肝脏变硬为止。(2) 肝脏的铸型: 实际上是下腔静脉和门静脉的灌注过程。

1.2.5 CT、MRI 薄层扫描 采用美国 GE 公司 Hispeed CT, Advantage Window's 2.0 三维工作间处理图像和美国 GE 公司 1.5T 超导磁共振扫描仪。将已灌注的肝脏标本置于模具内, 模拟腹腔状态下肝脏的解剖位置进行扫描, 螺距 1.2-1.3, kV: 120, mA: 150。MRI 采用 2.5 mm 薄层扫描。根据 CT、MRI 薄层扫描的图像和数据, 进行肝脏管道结构的三维重建。

## 2 结果

肝脏管道灌注顺利, 管道充盈良好, 灌注材料不影响肝脏的 CT、MRI 扫描。肝脏标本 CT 扫描的层面管道结构清晰, 在标本扫描的中间部位, 分别可见门腔静脉、肝右、肝中和肝左静脉, 左、右肝段的门静脉分支。

### 3 讨论

肝脏外科的发展得益于肝脏管道结构的研究,现代影像技术(螺旋CT、MRI)的出现,将肝脏外科推向了一个新的阶段,许多累及第一、二、三肝门和门静脉、下腔静脉癌栓的巨块复杂性肝癌获得手术治疗<sup>[5]</sup>。右半肝或扩大右肝的活体肝移植获得成功<sup>[6]</sup>。但肝脏管道的复杂性和变异性仍然是肝癌手术大出血和肝脏移植术后管道并发症的关键。因此,本文用肝脏管道灌注铸型技术,进行螺旋CT、MRI薄层扫描,采用图像技术进行管道分析和对肝动脉、门静脉、胆管进行三维重建。

肝动脉和胆道系统的管径相对细小,灌注时应用较低浓度的填充剂,第一次灌注时,应先将胆汁从胆总管开口处挤出,然后进行灌注。肝动脉、胆道系统的填充灌注一次不一定就灌注好,可在第2-3 d补灌注。防腐固定十分重要,应维持好肝脏的自然外形,避免受压变形。在铸型大管道灌注时以粗疏为佳。防腐时注意肝脏周围的血管是否有灌注液外漏,如果发现应用止血钳或用线结扎。由于门静脉和下腔静脉管道比较粗,在铸型灌注时应选用较硬的填充剂,以便于支撑肝脏的

重力,我们选用自凝牙托粉、自凝牙托水作为填充剂,铸型效果十分满意。

肝脏标本的位置不同,可获得各种各样的肝脏管道结构,我们采用玻璃钢纤维制作人体模型、膈肌、腹腔,将肝脏放入腹腔,近似人体肝脏位置,进行薄层CT、MRI扫描获得清晰的肝脏管道结构,各种管道到三维重建的立体感强烈。

### 4 参考文献

- 1 Heriot AG, Karanjia ND. A review of techniques for liver resection. *Ann R Coll Surg Engl* 2002;84:371-380
- 2 王兴海,付群武,刘畅,唐雷,洪辉文,原林,黄文华,钟世镇. “虚拟中国人”建模的动脉灌注研究. *中国临床解剖学杂志* 2002;20:327-329
- 3 李中华,黄兴海. 解剖学技术. 第2版. 北京:人民卫生出版社,1996:97-183
- 4 付群武,王兴海,刘畅,洪辉文,唐雷,原林,黄文华,钟世镇. “虚拟中国人”建模动脉灌注浓度的选择. *中国临床解剖学杂志* 2002;20:332-333
- 5 Wu MC, Chen H, Shen F. Surgical treatment of primary liver cancer: report of 5524. *Chin J Surg* 2001;39:417-421
- 6 Fan ST, Lo CM, Liu CL. Donor hepatectomy for living-donor liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 1998;45:34

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 四组复方中药对实验性肝损伤大鼠肝纤维化状态的影响比较

王育强, 蒋书勤, 李茹

王育强, 蒋书勤, 武警医学院附属医院传染科 天津市 300162  
李茹, 武警医学院基础部 天津市 300162  
武警医学院资助课题, No.9646  
项目负责人: 王育强, 300162, 天津市, 天津武警医学院附属医院传染科.  
wangyuqiang12356@sohu.com  
电话: 022-60578766  
收稿日期: 2002-10-07 接受日期: 2002-10-18

### 摘要

目的: 观察4组复方中药对四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)所致肝损伤大鼠肝病理状态的影响。

方法: 40%CCl<sub>4</sub>油溶液注射于大鼠皮下对其肝脏进行损害, 中药灌服, 观察中药对大鼠的肝保护作用。

结果: 各组中药对大鼠肝病理状态均有影响, 与模型组比较, 均能在一定程度上减轻肝损害, 减轻肝纤维化程度, 但各组间在在护肝效果上有差异。另外, 与模型组比较, 中药对转氨酶ALT降低的影响不明显, 但对AST有一定降低作用。

结论: 中药多种组方, 均能达一定程度的减轻肝纤维化效

果, 阻止肝组织进一步损害。但应进一步研究各组中药对肝脏保护差异的原因。

王育强, 蒋书勤, 李茹. 四组复方中药对实验性肝损伤大鼠肝纤维化状态的影响比较. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):217-220  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/217.asp>

### 0 引言

为观察按不同中医机制和不同药物组方的4组复方中药对CCl<sub>4</sub>所致肝损伤大鼠的肝保护作用, 比较药物疗效, 为临床合理选药提供借鉴, 我们观察了按中医“活血化瘀, 养血柔肝”组方的两组药物“人参四物汤”、“桃红四物汤”和一组按“清热解毒, 行气散结”理论组方的药物“复方鳖甲四黄丸”、及市售治肝中药“益肝草”对CCl<sub>4</sub>所致肝损伤大鼠肝纤维化状态的影响, 现报告如下:

### 1 材料和方法

1.1 材料 药物组成: 方1 人参四物汤含 白人参、丹参



熟地 当归、赤芍 川芎; 方<sub>2</sub> 含桃仁 红花、熟地 当归、赤芍 川芎; 方<sub>3</sub> 含麝香、当归、鳖甲、黄芩、枝子、神曲、龙胆草、黄连、大黄、柴胡、砂仁、青黛、芦荟、丹皮、黄柏、由大枣、生姜、核仁、黑豆等调其性味; 方<sub>4</sub>市售中成药 益肝草 贵洲特色药业有限责任公司生产 批号: 960815. 动物分组: SD 大鼠 56 只, 随机分为 4 组, 模型组 8 只; 正常对照组 8 只; 实验 1 组 10 只; 实验 2 组 10 只; 实验 3 组 10 只; 实验 4 组 10 只; 药物配制: 方<sub>1</sub> 和方<sub>2</sub> 药物每 10 付水煮, 制成 600 mL 浓缩药液, 冰箱贮藏. 方<sub>3</sub> 中 麝香、鳖甲研成细粉, 余药温火熬制, 去渣, 将药溶合制成 3 : 1 药液, 即 20 g 溶质配成 60 mL 药液. 方<sub>4</sub> 按说明每袋 5 g 加水 10 mL 配成药液应用.

1.2 方法 大鼠分组后, 除正常对照组外, 其余动物给 40% CC1<sub>4</sub> 油溶液皮下注射 2 次 /wk, 注射 CC1<sub>4</sub> 时精确计算剂量. 同时实验各组均分别灌服各自药物, 即 1 mL 原液 /100 g 体重. 每 3 d 根据鼠体重变化调整 1 次给予 CC1<sub>4</sub> 的量和灌服药物的剂量. 8 wk 后处死动物, 测定

肝功能, 剖取大鼠肝脏做病理检查.

## 2 结果

2.1 40%CC1<sub>4</sub> 油溶液皮下注射 8 wk 后各组动物之间肝功能的比较(表 1)

表 1 实验各组动物 8 wk 时肝功能指标与正常对照的比较( $\bar{x} \pm s$ )

分组	<i>n</i>	ALT( $\mu$ g/L)	AST ( $\mu$ g/L)
正常对照组	8	18.7 $\pm$ 7.3	73.3 $\pm$ 17.2
模型组	8	178.4 $\pm$ 45.4 <sup>a</sup>	262.0 $\pm$ 162.4 <sup>a</sup>
人参四物汤	10	213.6 $\pm$ 133.2 <sup>a</sup>	120.4 $\pm$ 25 <sup>b</sup>
桃红四物汤	10	190.4 $\pm$ 59.9 <sup>a</sup>	184.8 $\pm$ 74.72 <sup>b</sup>
鳖甲四黄丸	10	161.6 $\pm$ 31.5 <sup>a</sup>	145.5 $\pm$ 50.6 <sup>b</sup>
益肝草	10	240.8 $\pm$ 49.4 <sup>a</sup>	160 $\pm$ 48.72 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P <0.01 vs 对照组; <sup>b</sup>P <0.05 vs 模型组.

2.2 40%CC1<sub>4</sub>油溶液皮下注射8wk后各组动物与正常对照组的肝病理状态比较, 见表 2.

表 2 各组动物肝脏外观及镜下病理状态比较

项目	<i>n</i>	肝脏外观	周围组织粘连	镜下病理改变
正常对照	8	红润光滑	无周围组织粘连	肝细胞未见变性坏死, 肝小叶结构正常, 见图 1-2.
模型组	10	质灰暗, 有结节	和周围组织粘连较重	肝细胞呈灶、片状坏死, 广泛的纤维组织增生, 部分或全部的肝小叶结构被破坏, 假小叶形成, 见图 3-4.
实验 1~2 组	20	润滑有光泽, 无结节	有周围组织粘连且 4 只出现腹水	肝细胞中心性脂肪变性
实验 3~4 组	20	质红滑有光泽 无结节	无周围组织粘连 无腹水	轻度肝坏死纤维组织增生较重但无假小叶形成, 见图 5-6. 肝细胞中心性脂肪变性轻度肝坏死, 一般纤维组织增生, 无假小叶形成, 见图 7-8

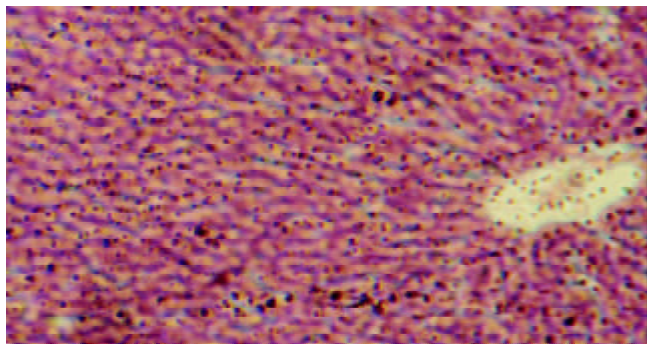


图 1 正常对照低倍镜肝切片.

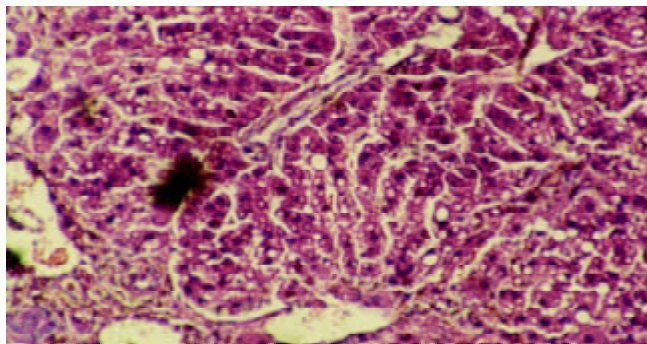


图 3 模型组低倍镜肝病理.

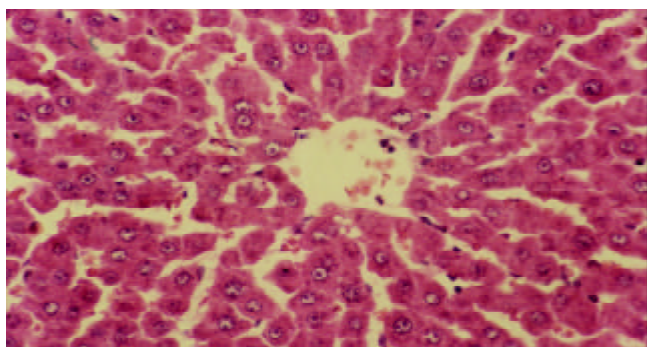


图 2 正常对照中倍镜肝切片.

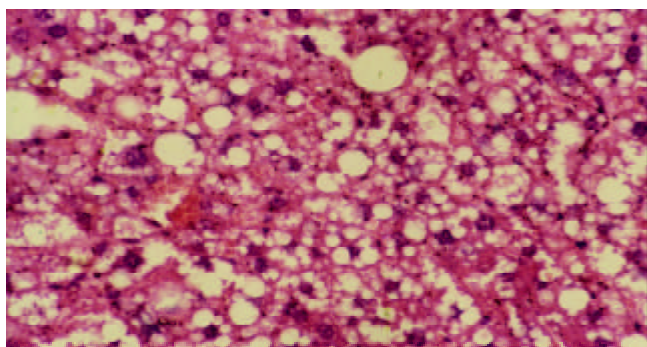
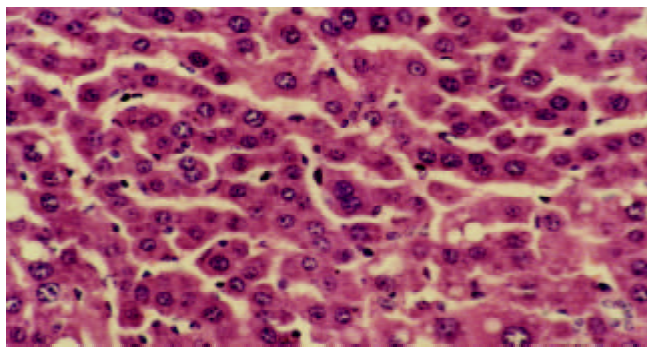
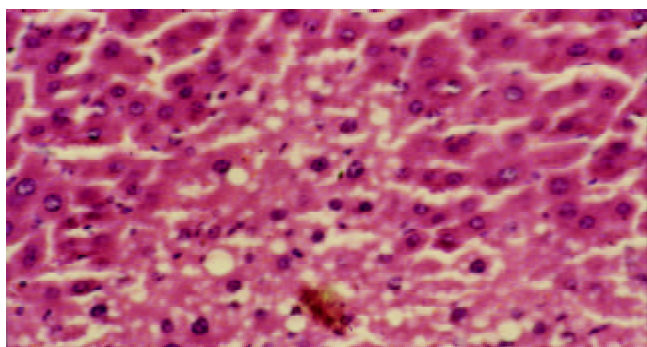
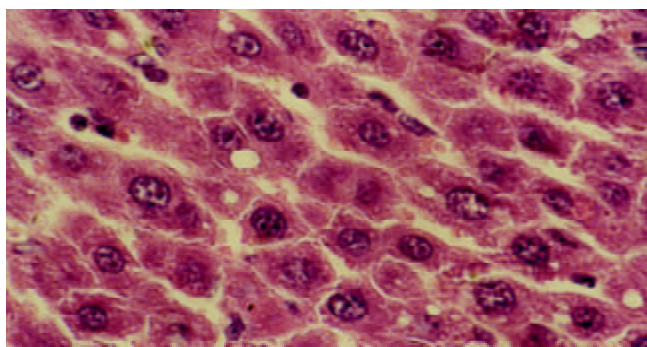
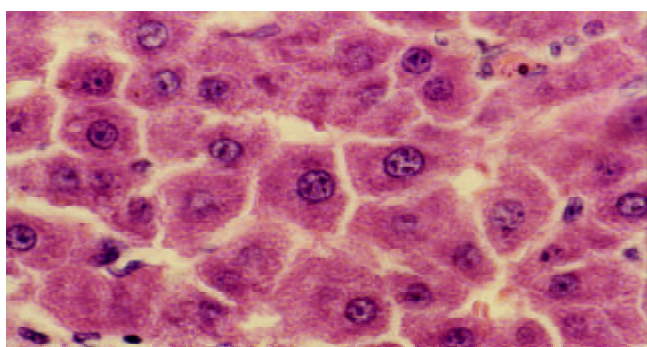


图 4 模型组中倍镜肝病理.



图5 服方<sub>1</sub>药物的大鼠中倍镜肝病理.图6 服方<sub>2</sub>药物的大鼠中倍镜肝病理.图7 服方<sub>3</sub>药物的大鼠中倍镜肝病理.图8 服方<sub>3</sub>药物的大鼠高倍镜肝病理.

### 3 讨论

近些年, 中药治疗肝纤维化的研究较多<sup>[1-29]</sup>, CC1<sub>4</sub> 动物肝纤维化模型的建立较简便, 病变典型, 被广泛应用. 本文所述的4组药物, 前2组为古方药, 第3组为中医经验方, 第4组是随机选取的1个成药. 4组药物均曾在临床上用于病毒性肝损害患者, 各家报道认为有

减轻肝损害作用. 本次实验显示, 各实验组动物在用中药予以保护后转氨酶仍很高, 这可能是CC1<sub>4</sub>对肝脏的破坏作用较强而呈急性损害, 中药难以逆转CC1<sub>4</sub>造成的肝细胞破坏, 但AST较模型组降低, 也在一定程度上说明中药对阻止肝细胞进一步损害有作用. 模型组大鼠肝脏有广泛的纤维组织增生甚至部分或全部的肝小叶结构被破坏, 有假小叶形成或形成趋势, 说明造模成功. 用中药的各治疗组大鼠肝脏多数仅见肝细胞的中心性脂肪变性及轻度的肝坏死, 纤维组织增生较模型组明显减轻, 肝脏未见假小叶形成. 这提示, 中药对阻断肝损伤动物的肝脏纤维化有一定作用. 但从病理切片看各组中药组方的合理与否对动物肝保护作用还是有较大差别. 因此, 选择有效的方剂, 进行长期观察和改进, 并就其机制进行分析是以后中药治疗肝病的一项任务.

### 4 参考文献

- 程明亮, 刘三都. 肝纤维化基础研究与临床. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1996:228-271
- Liu P, Hu YY, Liu C, Zhu DY, Xue HM, Xu ZQ, Xu LM, Liu CH, Gu HT, Zhang ZQ. Clinical observation of salvianolic acid B in treatment of liver fibrosis in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2002;8:679-685
- Liu P, Liu CH, Wang HN, Hu YY, Liu C. Effect of salvianolic acid B on collagen production and mitogen-activated protein kinase activity in rat hepatic stellate cells. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:733-738
- Liu P, Hu Y, Liu C, Liu C, Zhu D. Effects of salvianolic acid A (SA-A) on liver injury: SA-A action on hepatic peroxidation. *Liver* 2001;21:384-390
- Yao L, Yao ZM, Yu T. Influence of BOL on hyaluronic acid, laminin and hyperplasia in hepatofibrotic rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:872-875
- Liu CH, Hu YY, Wang XL, Liu P, Xu LM. Effects of salvianolic acid-A on NIH/3T3 fibroblast proliferation, collagen synthesis and gene expression. *World J Gastroenterol* 2000;6:361-364
- Liu P, Liu C, Xu LM, Hu YY, Xue HM, Liu CH, Zhang ZQ. Effects of Fuzheng Huayu 319 recipe on liver fibrosis in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 1998;4:348-353
- Cai DY, Zhao G, Chen JC, Ye GM, Bing FH, Fan BW. Therapeutic effect of Zijin capsule in liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 1998;4:260-263
- Huang Z, Li Q, Wang Z. Observation on dynamic changes of serum procollagen III, hyaluronic acid and laminin in rats with hepatic fibrosis treated with Hujin pill. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2000;20:447-449
- Wu J, Zhang L. Study on essence of syndrome of traditional Chinese medicine in liver cirrhotic patients. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 1999;19:279-281
- Liu C, Chen W, Liu P, Wang Z, Hu Y, Liu C. Changes of lipid peroxidation in liver fibrogenesis induced by dimethylnitrosamine and drugs' intervention. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001;9(Suppl):18-20
- Liu CH, Liu P, Hu YY, Xu LM, Tan YZ, Wang ZN, Liu C. Effects of salvianolic acid-A on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen production in culture. *Acta Pharmacol Sin* 2000;21:721-726
- Yang H, Chen Y, Xu R, Shen W, Chen G. Clinical observation on the long-term therapeutic effects of traditional Chinese medicine for treatment of liver fibrosis. *J Tradit Chin Med* 2000;20:247-250
- Hu Y, Wang R, Zhang X, Liu C, Liu C, Liu P, Zhu D. Effects of carbon tetrachloride-injured hepatocytes on hepatic stellate cell activation and salvianolic acid A preventive action in vitro. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2000;8:299-301

- 15 Chen JC, Tsai CC, Chen LD, Chen HH, Wang WC. Therapeutic effect of gypenoside on chronic liver injury and fibrosis induced by CCl<sub>4</sub> in rats. *Am J Chin Med* 2000;28:175-185
- 16 Chang FC, Huang YT, Hong CY, Lin JG, Chen KJ. Haemodynamic effects of chronic tetramethylpyrazine administration on portal hypertensive rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:1027-1031
- 17 Zhang Z, Dong Y. Clinical manifestations and immunological features of primary Sjogren's syndrome with liver involvement: analysis of thirty cases. *Chin Med J (Engl)* 1998; 111:220-223
- 18 Hu YY, Liu P, Liu C, Xu LM, Liu CH, Zhu DY, Huang MF. Actions of salvianolic acid A on CCl<sub>4</sub>-poisoned liver injury and fibrosis in rats. *Zhongguo Yaoli Xuebao* 1997;18:478-480
- 19 Xia H, Xia Y, Lo J. Analysis of the curative effect on ascites in liver cirrhosis by integrated traditional Chinese and Western medicine. *Hunan Yike Daxue Xuebao* 1997;22:212-214
- 20 Li CX, Li L, Lou J, Yang WX, Lei TW, Li YH, Liu J, Cheng ML, Huang LH. The protective effects of traditional Chinese medicine prescription, han-dan-gan-le, on CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats. *Am J Chin Med* 1998;26:325-332
- 21 Tang ZM, Ru QJ, Zhang ZE. Clinical study on relationship between liver-blood stasis and liver fibrosis. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 1997;17:81-83
- 22 Ryu N, Gao W, Yan M. Evaluation of brain evoked potentials in the detection of subclinical hepatic encephalopathy in cirrhotics. *No To Shinkei* 1997;49:887-892
- 23 Xu LM, Liu P, Liu C, Hong JH, Lu G, Xue HM, Zhu JL, Hu YY. Observation on the action of extractum semen Persicae on anti-fibrosis of liver. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 1994;19:491-494
- 24 Deng YQ. Correlation between serum adenosine deaminase, peripheral T lymphocyte subsets and syndrome types of traditional Chinese medicine in liver-cirrhosis patients. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 1994;14:148-149
- 25 Cheng ZM. The national symposium on the digestive diseases treated by traditional Chinese medicine combined with Western medicine. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 1992;12:381-384
- 26 Wang QM, Shi JZ. Hemorrheological changes in chronic hepatitis and liver cirrhosis and their relations to the syndromes differentiated by traditional Chinese medicine. *Chin Med J (Engl)* 1990;103:939-944
- 27 He J, Wang C, Xu J. Relation of changes in plasma cAMP, cGMP and the clinical conditions, pathology and the type of traditional Chinese medicine in 50 cases of chronic severe icteric hepatitis. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 1990;10:75-77
- 28 Gu WX. Comparative study of the therapeutic effect of Western medicine and traditional Chinese medicine combined with Western medicine in 517 cases of liver cirrhosis. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 1988;8:410-413
- 29 Wang QM. The relation between blood rheology and the differential diagnosis of chronic hepatitis and liver cirrhosis in Chinese medicine. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 1984;4:528-532

# CA19-9在胰腺癌诊断与随访中的价值

薛刚, 程莹, 孙志勇, 周庆贤, 姚榛祥

薛刚, 周庆贤, 中国人民解放军成都军区总医院普外科 四川省成都市 610083  
程莹, 中国人民解放军成都军区总医院内分泌科 四川省成都市 610083  
孙志勇, 中国人民解放军成都军区总医院核医学科 四川省成都市 610083  
姚榛祥, 重庆医科大学临床学院普外科 重庆市 400016  
项目负责人: 薛刚, 610083, 四川省成都市天回镇, 中国人民解放军成都军区总医院全军普通外科中心.  
电话: 028-86570356  
收稿日期: 2003-04-08 接受日期: 2003-10-11

## 摘要

目的: 探讨CA19-9在胰腺癌诊断及随访中的价值.

方法: 检测胰腺癌及结直肠癌患者血清CA19-9的水平, 并比较胰腺癌患者术前和术后血清CA19-9水平的变化, 在术后随访中再定期进行检测.

结果: 胰腺癌与结直肠癌患者血清CA19-9水平具有显著差异( $t=3.297$ ,  $P=0.003$ ); 胰腺癌患者术后血清CA19-9水平较术前有显著降低( $t=7.175$ ,  $P=0.001$ ); CA19-9越高的胰腺癌患者预后越差; 而术后CA19-9下降越明显的胰腺癌患者预后越好.

结论: CA19-9可作为胰腺癌辅助诊断的一个比较特异和敏感的检测指标, 对其检测和随访有助于判定胰腺癌患者的预后.

薛刚, 程莹, 孙志勇, 周庆贤, 姚榛祥. CA19-9在胰腺癌诊断与随访中的价值. 世界华人消化杂志 2004;12(1):221-222

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/221.asp>

## 0 引言

检测胰腺癌、结直肠癌患者血清中CA19-9的水平, 评价CA19-9在胰腺癌诊断和随访中的价值.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2000-03/2001-10我科收治的胰腺癌患者16例, 男11例, 女5例, 年龄35-72岁, 平均56.38岁, 其中手术10例(包括胰头十二指肠切除、肿瘤姑息切除+术中多弹头射频治疗、单纯开腹多弹头射频治疗), 占62.50%; 同期收治的结直肠癌患者12例, 男11例, 女1例, 年龄38-77岁, 平均59.83岁.

1.2 方法 试剂盒购自中国医学科学院核医学技术中心, 以免疫放射分析法(immunoradiometric assay, IRMA)进行检测, 测定值大于或等于37 U/mL为阳性. 经手术治疗的10例胰腺癌患者, 术后15d复查CA19-9, 以后每月复查1次, 同时行腹部B超检查, 必要时作腹部CT检查.

统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用SPSS10.0统计软件处理, 各组之间的比较均用成组设计资料 $t$ 检验.

## 2 结果

胰腺癌与结直肠癌患者就诊时平均年龄分别为 $56.38 \pm 10.37$ 岁和 $59.83 \pm 12.74$ 岁, 经检验二者之间的差异无显著性意义( $t=0.792$ ,  $P=0.436$ ); 术前胰腺癌患者的血清CA19-9水平为 $154.16 \pm 148.69$  U/mL, 而结直肠癌患者为 $11.81 \pm 8.38$  U/mL, 二者之间的差异具有显著性意义( $t=3.297$ ,  $P=0.003$ ); 手术治疗的胰腺癌患者术前血清CA19-9水平平均为 $298.18 \pm 111.04$  U/mL, 而术后15d复查为 $93.81 \pm 57.65$  U/mL, 经检验二者之间的差异有显著性意义( $t=7.175$ ,  $P=0.001$ ).

## 3 讨论

细胞表面的糖脂或糖蛋白在细胞的信息传递、生长和分化中起着重要的作用. 细胞在恶变时, 由于糖基转化酶的失活或某些胚胎期活跃而成熟期趋于静止的转化酶被激活, 引起了细胞表面糖类的变化, CA(carbohydrate antigen)类抗原被认为是这些变化的结果, 它们以神经节糖苷或结合于糖蛋白中的形式出现在细胞上, 并可由肿瘤进入血液, 因此, 测定血液中这些肿瘤结合抗原可作为恶性肿瘤的辅助诊断指标.

1979年Koprowski et al以体外培养的人结肠癌细胞系SW116为免疫原, 经杂交瘤技术制备出了抗消化道肿瘤的单克隆抗体CA19-9, 其抗原决定簇为唾液酸化乳-N-岩藻戊糖, 能识别血中Lewis  $\alpha$  族的唾液多聚己糖. Hamori et al<sup>[1]</sup>检测胰腺癌和慢性胰腺炎患者血清中CA19-9、CEA、CA125三种肿瘤标记物的水平, 发现CA19-9对胰腺癌最敏感, 其敏感性为77.4%, 而有一半的慢性胰腺炎患者血清中CEA和CA125的水平均升高, 它们均不能作为胰腺癌的敏感标记物. 我们发现, 胰腺癌患者血清CA19-9水平明显高于结直肠癌患者, 并且CA19-9在胰腺癌中的阳性率为68.75%, 而在所检测的12例结直肠癌患者中无1例大于或等于37 U/mL, 说明CA19-9在胰腺癌的诊断中是一个具有较高特异性和敏感性的检测指标. 经手术治疗的10例胰腺癌患者, 术后15d复查CA19-9较术前有明显下降, 平均下降了68.54%, 下降幅度为204.37 U/mL, 进一步证实血清CA19-9的升高与胰腺癌有关.

我们对手术治疗的10例患者进行随访, 有3例在术后8mo内死亡, 其术前血清CA19-9水平平均超过310 U/mL, 其中有1例患者在术后3mo死亡, 该患者术后15d CA19-9仅下降了43.62%, 术后45d再度明显升高, 并超过术前水平. 术后存活期超过8mo的患者, 其术前CA19-9水平均低于310 U/mL, 其中有2例已存活16mo,

其术前 CA19-9 水平均低于 170 U/mL, 并且术后 15 d 复查 CA19-9 水平下降超过了 80%. 另有 1 例患者术后 4 mo 血清 CA19-9 水平再度明显升高, 同时 B 超和 CT 均发现肝门部出现复发包块, 肠系膜上动脉根部也发现明显肿大的淋巴结, 以后在随访中发现其 CA19-9 水平持续上升, 肝门部包块和肿大淋巴结也进行性增大. 综上所述, 我们认为, CA19-9 可作为胰腺癌患者一个重要的预后指标, 其测定值越高, 则患者预后越差; 术后 CA19-9 水平下降越明显, 则患者存活期越长. Gattani et al<sup>[2]</sup> 研究发现, 在 III 期胰腺癌中, CA19-9 水平低于或等于 2 000 U/mL 者, 中位生存时间为 12.8 mo, 而高于此值者的中位生存时间仅为 8 mo. Katz et al<sup>[3]</sup> 发现, 通过治疗(包括术前放疗+手术切除、术前放疗+姑息切除、手术切除+术后放疗、单纯放疗), CA19-9 水平下降超过 75% 的患者, 其中位生存时间明显超过 CA19-9 水平下降低于或等于 75% 的患者, 分别为 23 mo 和 8 mo. 这些研究结果均证实 CA19-9 在判断胰腺癌患者预后中起着重要的作用.

影响胰腺癌预后的潜在因素有很多, 包括: 年龄、性别、患者体重下降的程度、肿瘤的部位、大小、TNM 分期、血管浸润、瘤体倍增时间<sup>[4]</sup>、能否切除等等. 但我们认为, 检测患者血清中 CA19-9 的水平不失为一种更加简单、直接、独立和客观的胰腺癌辅助诊断指标及预后判断因子, 也可作为判断胰腺癌手术疗效的一种指标.

#### 4 参考文献

- 1 Hamori J, Arkosy P, Lenkey A, Sapy P. The role of different tumor markers in the early diagnosis and prognosis of pancreatic carcinoma and chronic pancreatitis. *Acta Chir Hung* 1997;36:125-127
- 2 Gattani AM, Mandeli J, Bruckner HW. Tumor markers in patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 1996;78:57-62
- 3 Katz A, Hanlon A, Lanciano R, Hoffman J, Coia L. Prognostic value of CA19-9 levels in patients with carcinoma of the pancreas treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;41:393-396
- 4 Furukawa H, Iwata R, Moriyama N. Growth rate of pancreatic adenocarcinoma: initial clinical experience. *Pancreas* 2001; 22:366-369

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

## 经导管动脉栓塞术在急性消化道大出血急救中的临床应用

张秋丽, 贾云英

张秋丽, 贾云英, 河南省濮阳市人民医院优二科 河南省濮阳市 457000  
项目负责人: 张秋丽, 457000, 河南省濮阳市人民路 89, 濮阳市人民医院优二科.

电话: 0393-4402789

收稿日期: 2003-05-14 接受日期: 2003-06-27

### 摘要

目的: 探讨经导管动脉栓塞术在急性消化道大出血急救中的疗效和操作要点.

方法: 回顾性分析急性消化道大出血患者 12 例, 男 8 例, 女 4 例, 其中上消化道出血 7 例, 下消化道出血 5 例, 所有患者经内科常规治疗或/及内镜下止血治疗无效, 出现休克症状. 急诊行动脉栓塞治疗. 以聚乙烯醇微球(PVA)、明胶海绵为栓塞材料.

结果: 12 例中 11 例栓塞成功, 即时止血成功率 91.7% (11/12). 随访未出现严重栓塞并发症. 1 例经留置导管小剂量泵入善宁止血成功.

结论: 应用 PVA 或明胶海绵对急性消化道大出血栓塞是急诊抢救中安全、有效的方法, 对于即时不能发现的出血

灶予留置动脉导管药物注入可以作为补充治疗措施, 靶血管的选择及栓塞剂的用量是栓塞成功及避免严重栓塞并发症的关键.

张秋丽, 贾云英. 经导管动脉栓塞术在急性消化道大出血急救中的临床应用. 世界华人消化杂志 2004;12(1):222-223

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/222.asp>

### 0 引言

急性消化道大出血是临床常见的急症, 尽管现代药物及治疗内镜的发展能够使绝大多数的上消化道及结肠出血得到控制, 但仍有一小部分效果不佳; 而小肠出血因部位及性质不易诊断, 治疗更为棘手. 随着血管介入治疗的广泛应用, 一些难治的消化道大出血患者得到了有效救治. 我们自 1999-04 以来采用经导管对出血动脉进行栓塞治疗 12 例患者, 疗效满意, 总结报道如下:

### 1 材料和方法

1.1 材料 急性消化道大出血患者 12 例, 男 8 例, 女 4 例.

年龄 37-72 岁, 平均 46.3 岁. 5 例表现为呕血及便血, 7 例单纯为便血, 出血量均在 1 000 mL 以上, 均有不同程度的血压下降, 3 例入院时即处于休克状态. 急诊胃镜检查, 确诊为 Mallory-Weiss 综合征 2 例, 胃癌 1 例, 胃 Dieulafoy 病 1 例, 十二指肠 Dieulafoy 病 3 例, 2 例在球腔, 1 例在降段. 5 例为下消化道出血. 所有病例均给予止血药物、补液、输血治疗, 个别病例经内镜下注射肾上腺素治疗, 血压继续下降, 临床出现休克表现, 在治疗休克的同时, 急诊行动脉栓塞术.

1.2 方法 采用 Seldinger 技术行股动脉穿刺插管, 因术前出血部位基本明确, 分别以 5F Cobra 导管针对预先估计的出血动脉进行造影, 12 例患者中 11 例有对比剂外溢, 位于胃左动脉食管支 2 例, 胃左动脉胃体支 2 例, 胃十二指肠动脉 3 例, 肠系膜上动脉 4 例. 上消化道出血的供血血管栓塞剂为 PVA 加明胶海绵, 导管尽可能深入出血动脉近端, 缓慢注入栓塞剂, 直至造影无对比剂外溢时止. 下消化道先以 5F 导管行肠系膜上下动脉造影, 共发现 4 例对比剂外溢, 均为肠系膜上动脉供血. 采用微导管技术, 将其插入末级弓状动脉内造影, 如显示远端仅有直动脉方以明胶海绵微粒进行栓塞, 栓塞剂用量至无对比剂外溢为止, 尽可能少用. 术后处理及随访: 密切观察生命体征, 继续予抗休克治疗, 血压平稳 24 h 后, 有手术指征的转外科, 并进行跟踪随访.

## 2 结果

本组共进行 12 例造影, 11 例可见明显动脉期对比剂外溢, 外溢处静脉期显示不清. 如上述, 均给予相应剂量的栓塞剂栓塞, 即时止血成功率 100%, 手术时间均在 1 h 之内, 2 h 内即可见血压逐渐回升, 呕血、便血停止. 1 例患者经腹腔动脉、肠系膜上下动脉、肾动脉造影, 均未见对比剂外溢, 临床存在进行性血压下降, 连续便血, 术前已检查上消化道正常, 估计出血部位仍在小肠, 给予肠系膜上动脉近端留置导管, 经导管缓慢泵入善宁 0.4  $\mu\text{g}/\text{min}$ , 1 h 后血压稳定, 便血次数明显减少至停止, 临床治愈, 随访 2 a 未再出血, 亦无其他症状. 2 例肠系膜上动脉造影时可见肿瘤血管, 手术证实为空肠淋巴瘤, 另 1 例经肠镜证实为回肠末端 Dieulafoy 病. 所有患者无近期再发出血, 也无肠穿孔、肠坏死并发症.

## 3 讨论

急性消化道大出血是内科临床常见的急症, 血容量在短时间内急剧减少致使患者出现血压下降甚至休克, 危及生命. 尽管静脉曲张破裂、急性胃黏膜病变、溃疡出血占绝大多数, 止血药物及内镜下治疗措施一般对上述疾病有效, 但动脉出血更凶险, 出血速度更快, 内镜下往往可见血呈水柱样喷射, 这种情况药物及内镜治疗往往难以奏效. 对于小肠出血, 因内镜一般难以观察到, 为盲区, 诊断治疗更加困难. 而介入栓塞治疗急性消化道大出血创伤小, 效果迅速可靠, 对此类患者往往可以起到挽救生命的作用<sup>[1]</sup>. 一般来说, 动脉出血患者有大部分可见到对比剂外溢, 栓塞治疗的关键是迅速、准确. 超选择性栓塞具有直接阻断出血动脉血流, 避免误栓其他动脉而引起并发症的优点, 故如操作顺利应优先选用. 但出血动脉往往有痉挛, 插管困难. 上消化道血供丰富, 侧支循环多, 故也不必强求严格超选择性栓塞以免延长手术时间. 卢武胜 et al<sup>[2]</sup>认为以 5F Cobra 导管在出血动脉近端栓塞是安全、有效的. 下消化道大出血栓塞治疗应为首选, 但栓塞时应采用微导管技术, 要求准确定位到末级弓状动脉<sup>[3]</sup>. 本组 4 例下消化道出血均按此原则栓塞. 栓塞剂均采用明胶海绵颗粒. 有报道明胶海绵不是永久性栓塞剂, 易再发出血<sup>[4]</sup>. 本组 4 例无 1 例再出血, 这可能与 2 例患者于短期内手术有关. 上消化道我们选用 PVA 加明胶海绵作为栓塞材料, 因其对血管畸形栓塞更可靠, 又无栓塞并发症风险. 为了避免栓塞并发症加之肿瘤最终要外科切除, 下消化道我们仅给明胶海绵进行栓塞, 未出现肠坏死栓塞并发症. Guy et al<sup>[5]</sup>报道 PVA 颗粒栓塞下消化道是安全的, 我们还有待进一步尝试.

## 4 参考文献

- 1 黎雪琴, 郭玉鑫, 王巧兮. 急性下消化道大出血的栓塞治疗. 临床放射学杂志 2000;19:384
- 2 卢武胜, 黄明亮, 杨四海, 费泽军, 刘文秀. 消化道出血血管造影及介入治疗价值. 介入放射学杂志 2001;10:138-140
- 3 冯耀良, 李麟荪, 王杰. 不明原因消化道出血的血管造影诊断及介入治疗. 介入放射学杂志 2001;10:141-142
- 4 高斌, 徐圣德, 陈兵, 彭琼, 洪慈, 许国忠, 汪涛. 介入栓塞治疗急性消化道大出血的临床应用. 介入放射学杂志 2002;5:345-347
- 5 Guy EG, Shetty PC, Sharma RP, Burke MW, Burke TH. Acute lower gastrointestinal hemorrhage: Treatment by superselective embolization with polyvinyl alcohol particles. Am J Roentgenol 1992;159:521-526



# 溃疡性结肠炎 126 例

林 王莹, 朱兆华, 夏忠胜, 洪 华

林 王莹, 朱兆华, 夏忠胜, 洪华, 中山大学附属第二医院消化内科 广东省广州市 510120  
项目负责人: 林王莹, 510120, 广东省广州市沿江西路 107 号, 中山大学附属第二医院消化内科. libralin@21cn.com  
电话: 020-81332309  
收稿日期: 2003-06-10 接受日期: 2003-07-24

## 摘要

目的: 总结在本院住院的溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者的临床特点、误诊情况及抗菌药使用状况, 供临床参考。

方法: 分析1991-01-01/2002-12-31在本院住院确诊为UC患者的各类临床资料, 比较不同病情程度分型患者的临床特点。

结果: 126例UC有4.8%在病程中出现了UC的肠外表现, 16.7%患者伴有其他重要伴发病。被误诊的病例达到48.4%。本组轻型病例占11.9%, 中型占54.8%, 重型占33.3%, 此三型患者在误诊例数、结肠镜下的病变分布和抗菌药使用情况方面分别具有统计学差异( $P < 0.05$ )。

结论: UC患者的临床表现无特异性, 导致误诊率较高, 以轻型病例较容易误诊; 结肠镜下的病变分布可影响UC的病情程度分型; 本院趋向于对中、重型UC患者给予抗菌药辅助治疗, 以甲硝唑和喹诺酮类抗菌药为主。

林王莹, 朱兆华, 夏忠胜, 洪华. 溃疡性结肠炎126例. 世界华人消化杂志 2004; 12(1):224-225

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/224.asp>

## 0 引言

目前溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的病因及发病机制尚未完全明确, 使用各种手段治疗本病仍存在一定的失败率和复发率, 因此, 识别本病临床特点对于病因的探索将有重要意义。本文拟对在本院住院的126例UC患者的临床特点、误诊率以及抗菌药使用状况作回顾性总结和分析, 以供今后临床参考。

## 1 材料和方法

1.1 材料 依据我国《溃疡性结肠炎的诊断及疗效标准》<sup>[1]</sup>, 收集1991-01-01/2002-12-31在本院住院经临床、结肠镜及病理活检诊断为UC患者的病历, 共126份。

1.2 方法 登记每例患者的一般资料、主要症状、体征、入院诊断、实验室检查结果、结肠镜及病理活检结果、并发症和伴发病, 按Edwards和Truelove综合分类法<sup>[2]</sup>将患者的病情程度分为轻、中、重三型。记录

每例患者的治疗方案和手术情况。

统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料以率或构成比表示。组间计量资料比较采用ONE-WAY ANOVA 检验或Kruskal-Wallis 秩和检验, 组间计数资料比较采用R×C表 $\chi^2$ 检验, 以 $P = 0.05$ 为显著性水平。统计学计算使用SPSS for Windows 10.0 软件包完成。

## 2 结果

126例UC患者的平均年龄为 $44.4 \pm 14.9$ 岁, 最小15岁, 最大78岁。其中男58例, 女68例, 平均住院日 $26.7 \pm 8.5$  d。

首发症状为血便或黏液脓血便的有83.3%, 腹泻73.0%, 腹痛61.9%, 消瘦50.8%, 发热32.5%, 里急后重22.2%。

本组患者有6例(4.8%)在病程中出现了UC的肠外表现, 其中骶髂关节炎、强直性脊柱炎、肝硬化、慢性丙型肝炎各1例, 口腔复发性溃疡2例。

根据综合分类法<sup>[2]</sup>, 轻型患者有15例(11.9%), 中型69例(54.8%), 重型42例(33.3%)。其中病变分布与轻、中、重型溃疡性结肠炎的关系详见表1。

表1 UC患者的病情程度分型与临床特点

病情程度分型	轻型	中型	重型	P
n	15	69	42	
年龄(岁)	$47.1 \pm 14.1$	$45.5 \pm 14.3$	$42.6 \pm 15.8$	>0.05
性别(男:女)	0.88:1	0.56:1	0.82:1	>0.05
误诊例数	12	30	19	<0.05
确诊时中位病程(mo)	5	16.5	12	>0.05
结肠镜下病变分布(例)				
直肠	7	15	5	
直肠+乙状结肠	5	27	9	
左半结肠 <sup>a</sup>	2	21	12	
右半结肠 <sup>b</sup>	1		1	<0.05
横结肠			1	
全结肠		5	14	
末端回肠+右半结肠		1		
抗菌药治疗例数	5	38	39	<0.05

<sup>a</sup> 左半结肠指结肠肝曲以下部位的结肠, 包括横结肠、降结肠和乙状结肠

<sup>b</sup> 右半结肠指结肠肝曲以上部位的结肠, 包括盲肠和升结肠

有21例(16.7%)患者伴有其他重要伴发病, 包括原发性高血压3例, 冠心病2例, 糖尿病3例, 胆囊结石4例, 十二指肠溃疡2例, 以及慢性支气管炎、



肾结石、单纯性甲状腺肿、肝吸虫病、反流性食管炎、食管贲门黏膜撕裂综合征、系统性红斑狼疮各1例。轻、中、重型患者伴发病的例数之间无统计学差异( $P > 0.05$ )。

126例UC患者中,被误诊的有61例,其中82.7%被误诊为痔疮、菌痢、急性胃肠炎、大肠癌、肠结核,其余17.3%被误诊为克隆病、结肠淋巴瘤、肛裂、结肠息肉病、缺铁性贫血、钩虫病。

本组患者确诊时的病程最长20 a,最短1 d,中位病程12 mo。

在病程经过分型方面,属于初发型的占19.8%,慢性复发型55.6%,慢性持续型21.4%,急性暴发型3.2%。

本组UC患者的治疗基本沿用传统治疗方案,其中使用抗菌药的有82例,主要是甲硝唑和喹诺酮类抗菌药,占81.4%,其他还有头孢类、青霉素类、大环内酯类、氨基糖甙类和万古霉素。轻、中、重型病例使用抗菌药治疗的例数之间有显著性差异( $P < 0.05$ ,表1)。

在本组126例UC患者中,分别有1例中型和1例重型患者发生肠穿孔,1例中型患者并发了结肠癌变并广泛转移。上述2例并发肠穿孔的患者进行了手术治疗。126例患者在住院期间均无死亡。

### 3 讨论

UC是一种病因未明的慢性肠道炎症性疾病,可发生于任何年龄,多见于中年人,男女发病率无明显差别。本组病例平均住院26.7 d,较本院消化科患者总体平均住院日19 d长1 wk,提示本病相对于消化科其他常见疾病具有一定的难治性。

值得注意的是,本研究126例UC患者有4.8%在病程中出现了肠外表现,与传统认为我国患者肠外表现罕见不一致,可能与近年对UC的关注进一步提高有关。本组患者16.7%伴有其他重要伴发病,但在轻、中、重三型患者伴发病的例数之间并无显著性差异,因此认为伴发病不影响病情的轻重。此外,本组UC患者的首发症状并无特异性,而多种肠道炎症性疾病亦可出现与UC相似的内镜表现,这可能是造成误诊率较

高的原因。在本组病例中,以轻型UC患者的误诊率较高,达80%,与中、重型的误诊率有显著性差异( $P < 0.05$ ),可能与轻型患者临床表现较轻,难以与一般胃肠道疾病区分有关。

由于本组是住院病例,因此多以中、重型病例为主。在不同的病情程度分型的病例组中,结肠镜下的病变分布具有显著性差异( $P < 0.05$ ),提示病变的分布可影响病情程度分型。

UC的发病一直被认为与免疫、感染、遗传等因素有关。许多细菌、病毒所致的肠炎能产生与UC相似的症状和病理变化,因此多年来研究者们一直致力于寻找感染性致病因子,并尝试使用多种抗菌药治疗本病。值得一提的是,本组病例使用抗菌药治疗的占65.1%,而且轻、中、重型病例使用抗菌药治疗的例数之间具有显著性差异( $P < 0.05$ )。由此可见,本院对于中、重型UC患者,尤其是重型患者,趋向于使用抗菌药辅助治疗。这与近期一个关于抗菌药辅助治疗UC疗效的Meta分析<sup>[3]</sup>结果相对应。在抗菌药的选择方面,有学者<sup>[4-5]</sup>提出最好选择作用于肠道,且不被肠道吸收的口服抗菌药治疗本病。而本组病例主要选择甲硝唑和喹诺酮类抗菌药,采用口服和静脉两种途径给药。由于本研究是一个病例回顾分析,故未能对本组病例抗菌药辅助治疗UC的疗效作进一步追踪。

### 4 参考文献

- 1 全国慢性非感染肠道疾病学术研讨会. 溃疡性结肠炎的诊断及疗效标准. 中华消化杂志 1993;13:354
- 2 叶任高, 陆再英. 内科学. 第5版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 428-434
- 3 林王莹, 朱兆华. 抗菌药物治疗活动期慢性溃疡性结肠炎的Meta分析. 中山医科大学学报 2002;23:158-160
- 4 Campieri M, Bertinelli E, Gionchetti P, Belluzzi A, Tampieri M, Brignola C, Miglioli M, Barbara L. Requirements for the use of intestinal action antibiotics in the treatment of ulcerative colitis. *Ital J Gastroenterol* 1992;24(9 Suppl 2):2-3
- 5 Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Ugolini F, Rossi M, Brigidi P, Johansson R, Ferrieri A, Poggioli G, Campieri M. Review-antibiotic treatment in inflammatory bowel disease: rifaximin, a new possible approach. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 1999;3: 27-30

# 个性及心理因素与消化性溃疡发病的关系

张玲霞, 张 沥, 张 欣, 韩 坤, 陶 梅, 左利平, 庄 坤

张玲霞, 张沥, 张欣, 韩坤, 陶梅, 左利平, 庄坤, 陕西省西安市中心医院消化科 陕西省西安市 710003

项目负责人: 张玲霞, 710003, 陕西省西安市后宰门185号, 西安市中心医院. 电话: 029-7268355-3061

收稿日期: 2003-05-14 接受日期: 2003-06-04

张玲霞, 张沥, 张欣, 韩坤, 陶梅, 左利平, 庄坤. 个性及心理因素与消化性溃疡发病的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(1):226-227

http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/226.asp

## 0 引言

早在1950年, 美国学者Alexander提出心身疾病的概念时, 就将消化性溃疡列为典型的7个心身疾病之一<sup>[1]</sup>. 作为一种公认的心身疾病, 半个多世纪以来国内外学者对消化性溃疡与个性及心理因素之间的关系进行了大量的研究. 尽管绝大多数学者普遍认可心理因素在消化性溃疡发生发展中的作用, 但心理因素在消化性溃疡发病中的病因学地位仍难定论<sup>[2]</sup>. 而且由于国内外学者在研究时采用的心理评估手段不同, 所以研究结果也不尽相同. 本研究采用国内外应用广泛, 且经大量研究证实具有良好信度与效度的艾森克人格问卷(EPQ)和症状自评量表(SCL-90)作为人格与心理状态评定工具<sup>[3]</sup>, 以提高研究的可比性与一致性, 进一步探讨国人消化性溃疡患者与个性及心理因素之间关系.

## 1 材料和方法

对经胃镜及病理证实为胃溃疡或十二指肠溃疡、排除脑器质性病变和智能障碍的门诊/病房患者及健康志愿者进行艾森克人格问卷(EPQ)和症状自评量表(SCL-90)测试. EPQ由四个量表组成, 主要调查内外向(E)、神经质或情绪的稳定性(N)、精神质(P)三个个性维度. SCL-90包含90个项目, 按5级分对精神症状进行评定. SCL-90有10个因子, 其定义及所含项目为躯体化、强迫症状、人际关系敏感、忧郁、焦虑、敌对、恐怖、偏执、精神病性及其他. 溃疡组与对照组进行配对, 共检测46对, 其中男性28对, 女性1对, 年龄 $42 \pm 3.8$  a. 两组检测者在性别、年龄、职业上相比较, 差异无显著意义( $P > 0.05$ ).

采用第四军医大学航空航天医学系生产的DXC系列心理测评仪, 对所有测试者进行检测. 由一位特殊培训的医师利用计算机操作程序直接询问患者, 进行评定和记录, 最后采用SPSS 10.0软件进行t检验统计学分析.

## 2 结果

### 2.1 消化性溃疡患者SCL-90测试结果 见表1.

表1 消化性溃疡患者和对照组SCL-90测试结果

测试因子	溃疡组	对照组	t值	P
躯体	$2.74 \pm 0.62$	$1.37 \pm 0.48$	2.71	<0.05
强迫	$1.78 \pm 0.53$	$1.62 \pm 0.58$	1.708	>0.05
人际	$1.67 \pm 0.55$	$1.65 \pm 0.61$	1.71	>0.05
抑郁	$1.56 \pm 0.52$	$1.5 \pm 0.59$	1.68	>0.05
焦虑	$2.58 \pm 0.68$	$1.39 \pm 0.42$	2.68	<0.05
敌对	$1.66 \pm 0.48$	$1.46 \pm 0.55$	1.62	>0.05
恐怖	$2.32 \pm 0.49$	$1.23 \pm 0.41$	2.89	<0.05
偏执	$1.47 \pm 0.45$	$1.43 \pm 0.57$	1.58	>0.05
精神	$1.42 \pm 0.37$	$1.29 \pm 0.42$	1.52	>0.05
阳性数	$43.9 \pm 20.53$	$24.9 \pm 18.41$	2.76	<0.05
均分	$1.96 \pm 0.48$	$1.36 \pm 0.59$	2.08	<0.05

### 2.2 消化性溃疡患者EPQ测试结果 见表2.

表2 消化性溃疡患者和对照组EPQ测试结果

测试因子	检测组	对照组	t值	P
P	$48.37 \pm 5.07$	$46.37 \pm 4.91$	1.44	>0.05
E	$37.51 \pm 6.53$	$47.29 \pm 7.37$	2.47	<0.05
N	$49.48 \pm 4.29$	$40.08 \pm 4.77$	2.19	<0.05
L	$48.17 \pm 4.50$	$46.38 \pm 5.12$	1.54	>0.05

## 3 讨论

本研究结果显示, 研究组与对照组不论在个性特征还是在心理反应上均有所不同, 存在着明显的差异.

消化性溃疡患者很早即被认为是一组具有一定人格特征的群体<sup>[1,4]</sup>, 但由于研究者采取的人格评定工具不同, 故而研究显示的人格特征也不一致. 如有学者使用明尼苏达多项人格调查表(minnesota multiphase personality inventory MMP)测评, 结果显示消化性溃疡患者存在压抑、抑郁与自我中心的人格特征<sup>[5]</sup>. 近年来国内学者使用EPQ进行人格测定的几项研究结果均显示<sup>[2,6-7]</sup>, 消化性溃疡患者具有的一个共同的人格特征是, 内-外项(E量表)分值低于正常人, 而神经质(N量表)分值高于正常人. 本研究EPQ测定结果也显示, 研究组患者的E量表分值明显低于正常对照组, 而N量表分值则明显高于正常对照组, 且差异具有显著性意义( $P < 0.05$ ), 与国内学者的研究结果一致. 目前认为在EPQ人格测定中, E量表与高级神经活动的兴奋与抑制过程有关, 量表分值低表明中枢神经抑制过程占优; N量表与植物神经系统活动有关, 量表分值高表明植物神经系统稳

定性较差<sup>[8]</sup>。这种个性特征使得个体在对事件的评价、反应与对应方式均与正常人有所不同,评价趋于消极、反应更加压抑、常常缺乏积极有效的对应方式<sup>[1, 8]</sup>。由此,在通常情况下较常人更易遭受应激。实验心理学研究已经证实,紧张、焦虑、过分压抑等心理应激反应,可通过下丘脑-垂体-肾上腺通路而影响消化系统功能,与消化性溃疡的发生高度相关<sup>[1, 2, 6, 9-10]</sup>。

本研究 SCL-90 评定结果显示,研究组在躯体化、焦虑、恐怖三个因子上分值明显高于对照组,差异具有显著性意义( $P < 0.05$ ),且分值的均数均大于 2 分,即达到中等严重程度以上<sup>[3]</sup>,表明研究组患者存在明显的心理问题。此外,阳性项目数与总均分也明显高于对照组( $P < 0.05$ ),说明研究组患者的心理健康水平低于正常对照组。在对消化性溃疡患者心理状况的研究中,比较一致的观点和研究结果是,消化性溃疡患者存在着较多心理问题<sup>[1-7]</sup>。此与本研究结果相同。但在心理问题的种类上则结果不尽相同,有些研究显示患者存在焦虑、抑郁障碍<sup>[2, 4]</sup>;有些研究则显示患者存在敌对、猜疑、人际关系敏感,甚至强迫症状<sup>[6, 7]</sup>。在本研究中,研究组存在有三方面的心理问题,一是躯体化障碍,由于本研究的研究对象为躯体疾病患者,本身即存在着大量的躯体症状,因此,此结果意义不大。另二个症状是焦虑和恐怖,心理学研究证明,焦虑和恐怖情绪有其共同的心理学与病理心理学基础,恐怖可以看做是一种具有特定指向的严重焦虑反应<sup>[1, 8, 11]</sup>。因此,本研究结果显示,患者的心理问题突出表现为焦虑障碍。结合 EPQ 结果分析, N 量表分值高者本身即较易体验到焦虑与紧张情绪。那么,在消化性溃疡的患者中,其表现出的心理问题是人格因素所致,还是患者对躯体疾

病的心理反应,抑或是二者相互影响相互作用的结果,尚难以定论。其实,这也正是在消化性溃疡与心理因素之间的关系研究中需要澄清的问题。

总之,仅就本研究结果而言,似乎更倾向于消化性溃疡有其特定不良人格基础,这种人格使患者易遭受应激,产生不良的情绪反应,进而影响消化系统功能,诱发或促进溃疡的发生,患病后又使患者再次经历应激反应,形成恶性循环。此种理论推测是否成立,仍需更多试验、更大样本的前瞻性研究来证实。

#### 4 参考文献

- 1 胡佩诚. 医学心理学. 第1版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000: 92-94
- 2 肖水源, 杨德森, 凌奇荷. 消化性溃疡的心理因素研究. 中华神经精神科杂志 1991;24:282-284
- 3 张明园. 精神科评定量表手册. 第1版. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1993:20-48
- 4 Creed F, Guthrie E. Psychological factors in the irritable bowel syndrome. *Gut* 1987;28:1307-1312
- 5 Talley NJ, Phillips SF, Bruce B, Twomey CK, Zinsmeister AR, Melton LJ. Relation among personality and symptoms in nonulcer dyspepsia and the irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1990;99:327-332
- 6 李鸣, 何慕陶. 心理中介因素在消化性溃疡发病中的作用. 中国心理卫生杂志 1992;6:149-151
- 7 卢宁, 朱昌明. 几种心身疾病患者的心理卫生状况与个性特征. 中国心理卫生杂志 1995;9:60-63
- 8 杨德森. 基础精神医学. 第1版. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1994: 501-506
- 9 McRae S, Younger K, Thompson DG, Wingate DL. Sustained mental stress alters human jejunal motor activity. *Gut* 1992; 23:404-409
- 10 Valori RM, Kumar K, Wingate DL. Effect of different types of stress and of pointier drug on the control of the fasting motor complex in humans. *Gastroenterology* 1986;90:1890-1900
- 11 郝伟. 精神病学. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:15-190

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

## 肠套叠的超声诊断 31 例

文晓蓉, 邱 邈, 张 梅

文晓蓉, 邱邈, 张梅, 四川大学华西医院超声科 四川省成都市 610041  
项目负责人: 文晓蓉, 610041, 四川省成都市武侯区国学巷 37 号, 四川大学华西医院超声科. wenxr@sina.com  
电话: 028-85422304  
收稿日期: 2003-04-15 接受日期: 2003-06-02

### 摘要

目的: 探讨肠套叠的发病原因及声像图特征。

方法: 回顾性分析了 31 例肠套叠的发病原因、类型及声像

图表现。

结果: 31 例肠套叠患者中儿童 24 例, 成人 7 例, 继发性肠套叠 13 例, 儿童占 6 例, 7 例成人肠套叠均为继发性。肠套叠的病理原因是良恶性肿瘤、炎症等。肠套叠的类型以回结型最多。油炸面圈征 或 靶环征 是肠套叠的特征性超声表现。本组 31 例中有 28 例得到确诊。

结论: 肠套叠以儿童多见, 成人肠套叠多有病理因素存在。

超声是诊断肠套叠较好的方法。

文晓蓉, 邱邈, 张梅. 肠套叠的超声诊断 31 例. 世界华人消化杂志 2004;12(1):227-229

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/227.asp>

## 0 引言

随着超声在临床的广泛应用, 超声在某些胃肠道疾病方面的应用已得到认可, 本文复习了 31 例肠套叠患者的资料, 对其病因及声像图特征进行分析, 提示了超声检查是诊断肠套叠的一种较为可靠的无创方法。

## 1 材料和方法

1.1 材料 本组 31 例患者均为 1995/2001 我院经超声检查后非手术治疗失败再手术证实的患者, 男 22 例, 女 9 例, 年龄 3 mo-65 岁, 儿童 24 例, 其中小于 2 岁的 20 例, 病程最短的几个小时, 最长的几年. 本组患者中有腹痛或哭闹的占 77%, 血便占 68%, 39% 的患者有呕吐, 55% 的患者腹部可扪及包块, 同时具有腹痛、血便、腹块者占 55%。

1.2 方法 患者取仰卧位, 采用 RTFINO (探头频率 3.5 MHz) 及 DIAOSONICS (探头频率 5-12 MHz) 等仪器, 在腹部横向及斜向连续扫查, 了解有无肠梗阻、梗阻的大约位置及肿块的范围等。

## 2 结果

2.1 本组资料中大部份是儿童(儿童 24 例, 成人仅 7 例) 肠套叠的类型如下: 回盲型 2 例, 回盲结型 4 例, 回结型 18 例, 小肠型 3 例, 回回型 3 例, 结结型 1 例, 从资料显示, 回结型最多, 占 58% 以上, 小肠型及结肠型较为少见. 引起肠套叠的病因、病理及相应的部位见表 1。

表 1 31 例肠套叠的病因、病理及相应部位

病因病理	空肠	回肠 结肠
良性淋巴组织增生		1
阑尾炎术后回盲部粘连		1
肠系膜淋巴结炎		2
乳头状腺瘤性息肉	1	
恶性淋巴瘤		5
多发 P-J 息肉	1	
恶性黑色素瘤	1	
回肠脂肪瘤		1
无明显病因		18

2.2 声像图表现 本组 31 例中, 仅 1 例漏诊, 有 28 例超声明确诊断肠套叠, 2 例由恶性肿瘤引起者超声仅提示肠道肿瘤, 未提示肠套叠. 沿着与肠道纵轴垂直方向扫查, 大多数患者在右下腹或右上腹结肠肝曲区域可见肠套叠所致的“油炸面圈征”或“靶环征”

图像, 见图 1、图 2, 肠套叠鞘部呈一个完整的大圆轮廓, 其内侧是一层较厚的水肿肠管壁的环形低回声, 在该低回声带的中心部, 又包绕一个呈高低相间混合回声或者较高回声的圆形结构. 沿着与肠道纵轴平行的方向扫查, 肠套叠呈“套筒征”(图 3)或“假肾征”(图 4)图像, “靶环”的上段肠管可以有扩张, 积气、积液等, 有少数病例腹腔内有少许渗出液. 由肿瘤引起者, 当肿瘤较大, 累及范围较广, 肠管壁增厚粘连较重, 声像图特征不典型, 仅呈“假肾征”。

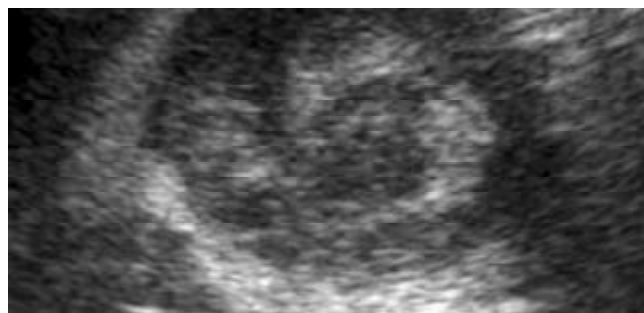


图 1 小儿肠套叠“靶环征”。



图 2 成人肠套叠“靶环征”。



图 3 成人肠套叠“套筒征”。



图 4 小儿肠套叠“假肾征”。

### 3 讨论

肠套叠为一段肠管套入其远端的肠腔内, 使该段肠壁重叠并堵塞于肠腔引起的肠道梗阻, 其发生常与肠管壁的解剖学特点(如盲肠的活动度过大)、病理因素(如息肉、肿瘤)以及肠功能失调、蠕动异常有关。

按病因可分为原发性与继发性肠套叠, 肠套叠多见于婴幼儿<sup>[1-3]</sup>。成人肠套叠较少, 且多为继发性。本组31例肠套叠中儿童有24例(77%), 其中继发性有6例; 成人有7例(23%), 全部为继发性肠套叠。引起肠套叠的病理因素是良性肿瘤、恶性肿瘤、炎性损伤等, 本组原因见表1。

按发病的部位, 肠套叠分为回肠-结肠型、回肠盲肠-结肠型、小肠-小肠型、结肠-结肠型等, 其中以回结型最多(本组16例)。

肠套叠在声像图上有较为特征性的声像图表现, 尤其是水肿的肠管壁及套入的系膜及肠管的油炸面圈征或靶环征。强弱交错排列的环带图像, 而假肾征则不为其专有的声像图表现, 肠道肿瘤、肠道明显炎性水肿均可导致肠管壁增厚回声减弱, 肠腔内容物为强回声, 就形如肾脏的回声。肠套叠的声像图具有特征性, 但在其病因的判断方面还较困难, 这可能与肠气干扰, 使一部份较小的肠道肿瘤漏诊有关; 此外超声在判断肠套叠的发生部位方面也有待提高。目前国内普遍采用X线监视下空气或钡剂灌肠诊治肠套叠, 但X线对复位时间长的患者有一定的影响, 在国外超声这种无创的检查不仅用来诊断肠套叠, 还可在超声引导下钡剂或水灌肠治疗肠套叠<sup>[4-15]</sup>。总之, 超声在肠套叠方面的进一步应用还有待我们去探讨。

### 4 参考文献

- 1 易习之, 谢仕庭, 张冬. 婴幼儿肠套叠的平片诊断. 新消化病学杂志 1996;4:316-318
- 2 张冬, 易习之, 徐晔. 儿童肠套叠空气灌肠整复141例. 新消化病学杂志 1997;5:450-451
- 3 王秀英. 先天性回肠囊肿并肠套叠1例. 新消化病学杂志 1996;4:308
- 4 Shanbhogue RL, Hussain SM, Meradji M, Robben SG, Vernooij JE, Molenanr JC. Ultrasonography is accurate enough for the diagnosis of intussusception. *J Pediatr Surg* 1994;29:324-327
- 5 Crystal P, Hertzanu Y, Farber B, Shabshin N, Barki Y. Sonographically guided hydrostatic reduction of intussusception in children. *J Clin Ultrasound* 2002;30:343-348
- 6 Mirilas P, Koumanidou C, Vakaki M, Skandalakis P, Antrpas S, Kakavakis K. Sonographic features indicative of hydrostatic reducibility of intestinal intussusception in infancy and early childhood. *Eur Radiol* 2001;11:2576-2580
- 7 Sofia S, Casali A, Bolondi L. Sonographic diagnosis of adult intussusception. *Abdom Imaging* 2001;26:483-486
- 8 Gu L, Zhu H, Wang S, Han Y, Wu X, Miao H. Sonographic guidance of air enema for intussusception reduction in children. *Pediatr Radiol* 2000;30:339-342
- 9 Hanquinet S, Anooshiravani M, Vunda A, LeCoultrre C, Bugmann P. Reliability of color Doppler and power Doppler sonography in the evaluation of intussuscepted bowel viability. *Pediatr Surg Int* 1998;13:360-362
- 10 Stanley A, Logan H, Bate TW, Nicholson AJ. Ultrasound in the diagnosis and exclusion of intussusception. *Ir Med J* 1997;90:64-65
- 11 Kong MS, Wong HF, Lin SL, Chung JL, Lin JN. Factors related to detection of blood flow by color Doppler ultrasonography in intussusception. *J Ultrasound Med* 1997;16:141-144
- 12 Chan KL, Saing H, Peh WC, Mya GH, Cheng W, Khong PL, Lam C, Lam WW, Leong LL, Low LC. Childhood intussusception: ultrasound-guided Hartmann's solution hydrostatic reduction or barium enema reduction? *J Pediatr Surg* 1997;32:3-6
- 13 LamPeh WC, Khong PL, Chan KL, Lam C, Cheng W, Lam WW, May GH, Saing H, Leong LL, Low LC. Sonographically guided hydrostatic reduction of childhood intussusception using Hartmann's solution. *Am J Roentgenol* 1996;167:1237-1241
- 14 Wright JE, Slater S. Suspected intussusception: is ultrasound a reliable diagnostic aid? *Aust N Z J Surg* 1996;66:686-687
- 15 Choi SO, Park WH, Woo SK. Ultrasound-guided water enema: an alternative method of nonoperative treatment for childhood intussusception. *J Pediatr Surg* 1994;29:498-500

## 肝内胆管结石的系统化治疗 110 例

吴一武, 周志伟, 梁建深, 梁 辉, 殷 放

吴一武, 殷放, 中山大学附属第五医院普外科 广东省珠海市 519000  
周志伟, 梁建深, 梁辉, 暨南大学医学院附属第三医院普外科 广东省珠海市 519000  
项目负责人: 吴一武, 519000, 广东省珠海市梅华东路52号, 中山大学附属第五医院普外科. zdwywyw@vip.sina.com  
电话: 0756-2528711 传真: 0756-2528300  
收稿日期: 2003-06-05 接受日期: 2003-07-24

### 摘要

目的: 探讨和总结肝内胆管结石的系统化治疗的方法和经验。

方法: 系统化治疗即外科手术+术中或术后纤维/电子胆道

镜检查取石+术后中药对结石复发的预防/治疗, 我们对1993-01/2003-03间应用系统化治疗的110例肝内胆管结石患者进行总结并随访10a。同时用胆道镜对结石局部胆管的胆管炎和对服用中药排石的效果进行观察。

结果: 系统化治疗使术后肝内胆管结石的取净率99.09%。残石率降至0.91%、再手术率为3.75%, 结石复发率为8.75%, 疗效优良率为92.5%。胆道镜观察到有结石发生的胆管壁同时存在胆管炎且会存在一段较长时间, 甚至数月。胆道镜观察到服用中药排石汤可使胆管炎减轻, 结石松动和小结

石排出. 肝内胆管结石术后患者不存在全身性意义上胆管炎, 但可能存在局部性意义上胆管炎.

结论: 重视局部胆管炎和净化肝胆道的感染, 采用系统化的治疗方案, 发挥各自优势, 能有效提高肝内胆管结石的治疗效果.

吴一武, 周志伟, 梁建深, 梁辉, 殷放. 肝内胆管结石的系统化治疗 110 例. 世界华人消化杂志 2004;12(1):229-232

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/229.asp>

## 0 引言

1993-01/2003-03我们采用系统化方案治疗肝内胆管结石 110 例并随访 10 a, 取得了较好的疗效.

## 1 材料和方法

1.1 材料 本组 110 例, 男 34 例, 女 76 例, 年龄 18-79 岁. 急诊手术 8 例, 择期手术 102 例.

1.2 方法 择期手术患者除了术前常规作各项实验室检查、B 超检查外, 还作 ERCP 或 PTC 或 CT 检查, 外科手术术式是根据术前检查、术中胆道探查和术中纤维/电子胆道镜检查情况而决定. 我们应用日本 olympus CHF-P10 型纤维胆道镜和 PENTAX ECN-1530 电子胆道镜, 在手术中或手术后配合治疗. 手术中或手术后胆道镜应用方法作者已有论述, 这里不再赘述<sup>[1-2]</sup>. 术后每月服肝胆结石片或消炎利胆片 5-7 d, 或服中药排石汤 3-5 剂, 持续 1-3 a, 同时每 6 mo-1 a 定期作 B 超检查, 若发现肝内胆管有泥沙样结石或小结石及时采用中药排石治疗. 定期追踪随访 10 a, 疗效判断标准<sup>[3]</sup>, 优: 无任何症状, 能从事正常工作或劳动者; 良: 有时上腹痛, 可有发冷发热, 经一般治疗有效, 尚能坚持一般工作或劳动者; 差: 急性胆管炎症状较重或发作频繁, 需住院治疗或再次手术者.

## 2 结果

本组 110 例, 行胆总管切开取石 T 管引流术 72 例, 肝左外叶切除 16 例, 肝右后叶切除 1 例, 行左、右肝管或肝门部胆管切开整形、胆肠吻合 16 例, 肝左外叶切除加胆肠吻合 5 例, 全部病例都进行术中或术后纤维/电子胆道镜检查或取石, 治疗后仅 1 例肝内胆管结石未取净, 肝内胆管结石取净率 99.09%(109/110), 残石率 0.91%(1/110). 经系统化治疗获得随访 80 例(随访率 72.73%), 随访 6 mo-10 a, 平均随访 5 a, 疗效优良率 92.5%(74/80 例), 差 7.7%(6/80), 结石复发 8.75%(7/80), 再手术率 3.75%(3/80).

肝内胆管结石患者残留胆管结石在手术后 3-4 wk 体温和血常规正常的情况下进行胆道镜取石, 我们观察到没有结石的肝内胆管无胆管炎的表现, 而有结石的肝内胆管有胆管炎的表现, 表现为胆管壁的充血、水肿、溃疡, 同时可见胆管开口的狭窄和狭窄后的胆管

扩张, 如果该段胆管内的结石塞得越多, 胆管炎和胆管的狭窄和扩张就越严重. 当我们将该段胆管的结石取净, 在 1 wk 后进行第 2 次胆道镜取石时, 我们可以发现取净结石的该胆管的胆管炎会有所减轻, 我们曾经给 1 例患者做 6 次术后胆道镜检查历时两个多月, 在最后一次取石时发现最早取净结石的胆管仍存在胆管炎的表现, 只是胆管炎程度的不同. 我们观察到, 最先一次进行胆道镜取石时当有结石的胆管其胆管炎较严重时, 该处的胆汁偏绿色较浑浊, 随着取石次数增多胆管炎减轻, 胆汁逐渐变清成金黄色, 而在其他无结石的正常胆管内的胆汁是比较清呈金黄色.

我们对肝内胆管残石多而取石困难需多次取石的患者, 每次取石后服中药排石汤 3-5 剂(主要中药是柴胡、木香、桔壳、茵陈、鸡内金、金钱草、大黄、青皮、陈皮、黄芩等), 在隔 1 wk 进行第 2 次胆道镜取石时发现, 胆汁较上次取石时清了, 胆管内结石会有所松动, 小结石会排到较大的胆管甚至一部分排出体外, 原有结石的胆管的胆管炎的表现会较未服中药的病例减轻得更明显.

## 3 讨论

肝内胆管结石病是胆道外科的难题. 文献[4]报道其手术死亡率为 5.24%, 残石率为 30.7%, 再手术率高达 37.1-74%. 目前治疗方法主要归纳为三方面: 非手术治疗手术治疗及胆道镜治疗; 开始我们提出“外科手术和纤维胆道镜联合治疗肝内胆管结石”<sup>[5]</sup>, 外科手术和胆道镜联合治疗大大降低了残石率, 提高了治疗的效果<sup>[5-6]</sup>, 但是, 外科手术和胆道镜只解决了部分结石形成和发展的局部因素, 消除了那些导致症状发作、痛苦的机械因素, 而原已存在的代谢、生理病理基础及改变还在, 使得肝内胆管结石术后的复发率高可达 27.13%<sup>[7]</sup>, 手术后对结石复发的预防和治疗十分重要. 因此, 我们在总结外科和内镜治疗肝内胆管结石的基础上, 根据我们应用胆道镜对肝内胆管结石并存胆管炎和对中药排石效果的观察结果, 我们主张对肝内胆管结石的治疗采取“系统化”治疗的方案, 即外科手术 + 术中或术后纤维/电子胆道镜 + 术后中药预防/治疗, 三种治疗方法互补, 发挥各自优势, 以达到降低手术死亡率、残石率和再手术率及复发率的目的, 提高了肝内胆管结石治疗的近远期效果.

3.1 外科手术 肝内胆管结石的治疗目前仍以手术治疗为主, 遵从“取净结石、去除病灶、解除狭窄和通畅引流”的手术原则, 手术术式归纳为肝外胆管切开探查取石术; 肝部分切除术和肝胆管狭窄切开整形胆肠吻合术三类. 在众多的术式中, 没有一种术式能够同时满足上述原则要求, 临床应用中需选一组或一套手术, 才能完成治疗上的要求. 肝叶(段)切除术已成为外科治疗肝内胆管结石同时清除病灶的最主要手段<sup>[8]</sup>, 对肝左外叶结石几乎已成为常规手术, 优良率达 80-90%, 但肝叶(段)切除主要是左肝病灶, 右肝病灶的切除率只有 27-38%,



左右肝内胆管结石的切除率只有0-3%<sup>[9]</sup>。因此,还有一半以上的肝内胆管结石患者需要寻求其他有效的治疗方法。我们对右肝内胆管的结石多倾向于胆总管和肝内胆管切开取石并配合术中或术后纤维胆道镜取石将结石取净,对左肝内胆管的结石则多考虑采用肝叶(段)切除术。

**3.2 术中和术后纤维/电子胆道镜的检查和取石** 纤维/电子胆道镜能直视肝内I-IV级胆管的全貌,鉴别胆管内的血块、蛔虫、肿物、气泡、结石等,哪里有结石和胆管狭窄就能到达哪里取石和进行胆管扩张治疗,起到外科手术所起不到的作用<sup>[10-11]</sup>。尤其电子胆道镜,他是胆道镜制造技术上划时代的进步,他是用被称为电子眼睛的固体摄像器件代替纤维胆道镜的导像束,他显著提高了胆道镜的技术性能和操作性能以及图像的清晰度、亮度,利于提高胆道疾病的诊断和治疗及科研水平。胆道镜的应用,可大大降低肝内胆管结石的残留率,还为手术术式的选择提供指导。而术后胆道镜的优点是不需住院,可多次反复取石,取石疗效高,结石取净率达97%-99.23%<sup>[2,10]</sup>。胆道镜还可对肝内胆管的狭窄进行微波治疗<sup>[12]</sup>。

**3.3 术后结石复发的预防和治疗措施** 肝内胆管结石术后除应用胆道镜取净残石和治疗胆管狭窄外,我们认为应重视局部胆管炎和净化肝胆道的感染,应强调术后中药对结石复发的预防/治疗,这是提高肝内胆管结石远期治疗效果的关键。

**3.4 重视局部胆管炎** 急性胆管炎<sup>[13]</sup>是指由细菌感染所致的胆道系统的急性炎症,主要表现为发热、畏寒、腹痛、有或无黄疸等。患者术后体温、血常规正常、无腹痛在临床诊断方面是表明未存在胆道感染(胆管炎),这是一个全身性意义上的胆管炎的概念。我们为患者在手术后3-4 wk体温、血常规正常和无腹痛的情况下进行胆道镜取石时发现,没有结石的肝内胆管无胆管炎的表现,而有结石的肝内胆管有胆管炎的表现(图1)。胆道镜所见的胆管炎是局部性意义上胆管炎的概念<sup>[14]</sup>。胆道镜观察证明:肝内胆管结石术后患者不存在全身性意义上的胆管炎,但可能存在局部性意义上胆管炎。我们将这种胆管炎称为局部胆管炎,与全身性意义上的胆管炎分开,使同行引起对局部胆管炎的重视,认识术后抗感染治疗以净化肝胆道的感染的重要性和必要性。

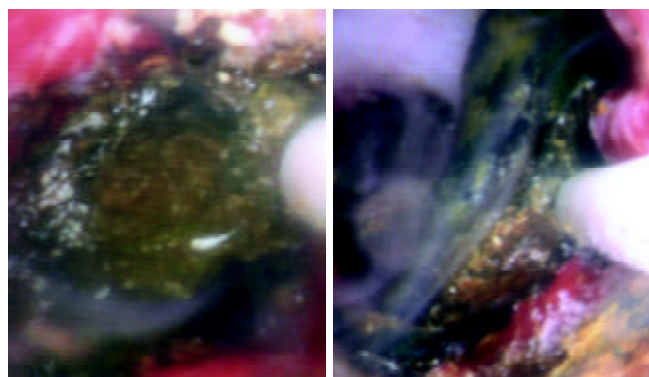


图1 胆道手术3 mo后体温、血常规正常、无腹痛,行电子胆道镜取石,见结石处胆管壁明显充血、水肿、糜烂-局部胆管炎。

**3.5 重视净化肝胆道的感染** 对于净化肝胆道的感染的新观点,目前国内外还未引起足够的重视<sup>[15]</sup>,对肝内胆管结石的术后患者需较长期时间的抗感染治疗很多学者都会提出质疑,目前国内外都没有这方面的研究观察报告作理论依据和指导。我们应用胆道镜对胆管炎的观察研究结论是有结石发生的胆管存在胆管炎且会存在一段较长时间,甚至数月。众所周知,胆道感染(胆管炎)是肝内胆管结石发生和复发的主要原因,因此,我们认为有必要对术后患者进行较长时间的抗感染治疗,以达到净化肝胆道的感染的目的和要求。

**3.6 强调术后中药对结石复发的预防与治疗** 由于结石的成因至今仍未完全阐明,所以,目前也就没有预防结石复发的特效方法,根据我们研究结果,在现阶段对肝内胆管结石术后结石复发的预防与治疗方面应重视局部胆管炎和要对术后患者进行较长时间的抗感染治疗。抗生素只有抗感染作用无利胆作用,且较长时间服用副作用大。中药排石汤、肝胆结石片等既有抗感染也有利胆排石作用,且较长时间服用的副作用较小。根据实验观察,中药排石汤具有明显增加排石频率,松弛Oddi括约肌及促进十二指肠蠕动的作用,以达到消炎和促进排胆功能。在胆道手术前后应用,有利于排出残留的小结石和防止结石再形成。同时还可起到调节术后胆道功能,减少复发及后遗症等作用<sup>[16]</sup>,我们通过胆道镜对服用中药排石汤效果的观察结果也证明了服用中药排石汤的上述作用。我们要求术后患者每月服肝胆结石片或消炎利胆片5-7 d,或服中药排石汤3-5剂,持续1-3 a,同时每6 mo-1.0 a定期作B超检查,若发现肝内胆管有泥沙样结石或小结石及时采用中药排石治疗,以提高肝内胆管结石治疗的远期效果。

#### 4 参考文献

- 1 吴一武,高焱明. 肝内胆管结石术中应用纤维胆道镜取石方法的改进. 实用外科杂志 1991;11:579-580
- 2 吴一武. 纤维胆道镜在治疗肝内胆管残石中的困难和对策. 中国实用外科杂志 1996;16:356-357
- 3 吴一武,高焱明,彭强,叶永红,肖桂元. 原发性胆管结石复发原因的研究. 中华消化杂志 1994;14:159-161
- 4 黄志强. 黄志强胆道外科手术学. 第1版. 北京:人民军医出版社,1995:84-95
- 5 吴一武. 外科手术和纤维胆道镜联合治疗肝内胆管结石. 中国内镜杂志 1999;5:32-33
- 6 Sato M, Watanabe Y, Tokui K, Yasshima A, Murakami M, Hirose M, Kawachi K. A case of complex hepatolithiasis successfully treated with a systematic approach. *Hepatogastroenterology* 1999; 46:3083-3086
- 7 周泽民,李朝龙,喻讷勇,廖彩仙. 肝内胆管结石手术后复发的研究. 腹部外科 1999;12:267-268
- 8 黄志强. 肝内胆管结石治疗的现状与展望. 中国普外基础与临床杂志 2001;8:65-66
- 9 周孝思. 肝内胆管结石防治方法评介. 中华实验外科杂志 2001; 18:200-202
- 10 张宝善. 肝内残余结石的胆镜治疗. 实用外科杂志 1991;11:566-567
- 11 Cheung MT. Postoperative choledochoscopic removal of intrahepatic stones via a T tube tract. *Br J Surg* 1997;84:1224-1228
- 12 吴一武,李绵,梁晖,梁建深,郑梅兰,杨欢珍. 应用微波经纤维胆道镜治疗肝内胆管狭窄的实验和临床应用. 中国内镜杂志 2000; 6:33-35

- 13 黄志强. 现代腹部外科学. 第1版. 湖南: 湖南科学技术出版社, 1994:475
- 14 吴一武. 纤维胆道镜理论与实践. 第1版. 山西: 山西科学技术出版社, 2000:69-70

- 15 冉瑞图. 肝内胆管结石病外科治疗沿革. 中国普外基础与临床杂志 2000;7:103-104
- 16 贺瑞麟. 胆系结石的排石疗法. 见:《中国实用外科杂志》编辑部编著. 中国外科专家经验文集. 第1版. 沈阳: 沈阳出版社, 1993:593-595

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

## 肝豆状核变性临床误诊 24 例

周 兰, 孙桂华, 黄小让, 宋 鸿

周兰, 孙桂华, 黄小让, 宋鸿, 广州军区广州总医院消化内科 广东省广州市 510010

项目负责人: 周兰, 510010, 广东省广州市, 广州军区广州总医院消化内科. 电话: 020-84360607

收稿日期: 2003-03-05 接受日期: 2003-03-24

### 摘要

目的: 对肝豆状核变性24例临床误诊进行分析.

方法: 24例肝豆状核变性患者(男16例, 女8例, 年龄4-27岁, 平均16.3岁) 分析找出误诊原因.

结果: 24例患者中均有误诊, 起病至确诊时间为6 mo-18 a.

结论: 肝豆状核变性临床容易误诊.

周兰, 孙桂华, 黄小让, 宋鸿. 肝豆状核变性临床误诊 24 例. 世界华人消化杂志 2004;12(1):232-233

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/232.asp>

### 0 引言

肝豆状核变性(又称Wilson病)是一种可治的铜代谢障碍引起脑、肝病变为主的全身性疾病, 系一种常染色体隐性遗传性疾病. 本病少见, 多为隐匿起病, 临床表现多样, 诊断困难, 易漏诊、误诊, 为加深对本病的认识, 现将我院1990-1997年收治的肝豆状核变性24例临床资料分析如下

### 1 临床资料

本组共24例, 占同时期住院人数的11.2人/10万, 其中男16例, 女8例, 男:女=2:1, 发病时年龄4-27(平均16.3)岁其中41.7%的发病在15岁前. 有肝豆状核变性家族史14例(58.3%), 其中有一患者姐姐及其2个儿子均患本病. 主要临床表现包括高热19例, 震颤和肌强直17例, 眼黄尿黄15例, 共济失调12例, 行走不稳10例, 腹胀、腹水8例, 双下肢水肿6例, 血尿、尿少13例, 脾大5例. 儿童神经系统症状少见, 而成人以神经症状为主, 神经症状主要是震颤和肌强

直, 语言障碍、精神症状. 根据Scov与Iange分型为: 脑神经型或称肝状型8例(33.3%)肝型或腹型6例(25.0%)神经型或假性硬化型10例(46.6%). 首发症状为神经系统, 锥体外系统12例(50%), 肝功异常者9例(33.3%), 另3例以浮肿尿常规改变为首发. 角膜色素环(Kayser-Feischer环): K-F环阳性20例(83.3%). 仅4例未见到. 实验室检查: 尿异常17例(66.6%), 肝功能异常12例(50%), 有4例出现异常的脑电图, 2例患者头颅CT有脑萎缩改变, B超或CT示肝大的有4例. 所有病例均作2次以上血铜蓝蛋白检查, 均明显低于正常值(0-13 mg/dl), 平均值为7.4±0.3 mg/dl. 1.7起病至确诊时间: 6 mo-18 a, 中位确诊时间5.5 a, 超过10 a者7例(29.9%). 误诊主要疾病: 震颤麻痹11例, 肝炎、肝硬化10例, 共济失调4例, 急慢性肾炎3例, 癫痫及植物N功能紊乱各1例, 肾结石, IgA肾病, 乙肝肾, 蛛网膜炎及恶性淋巴瘤各1例, 甲状脉机能亢进症2例.

### 2 讨论

各地发病率差异较大, 本组为11.2/10万人, 德国为3/10万人, 英国为2/10万人, 美国为1/10万, 我国缺乏流行病学资料, 北京协和医院53 a间(1921-1980, 1942-1948除外)收治80例, 占同时期住院患者0.02%和神经科住院患者0.52%, 而后10 a即1980-1990年收治56例. 可能与医师诊治水平提高有关. 以往认为本病系肝-基底神经节-角膜三联征. 近来随着人们对本病认识的不断深入, 现在已认识到本病几乎可累及全身各个系统, 所以临床表现复杂, 尤其是早期症状多样化, 缺乏特异性易致误诊, 本组中期误诊时间为5.5 a, 说明本病的早期确诊比较困难, 误诊的主要疾病可归纳以下3类: 锥体外系疾病, 最为常见, 其中以震颤麻痹及共济失调最为多见; 其次为肝脏疾病, 包括肝炎和肝硬化; (3)泌尿系统及其他系统的病. 包括癫痫, 植物神经功能紊乱, 恶性淋巴瘤、甲亢、蛛网膜炎等. 误诊的主要原因: (1)本病为少见病, 医生对本病认识不足; (2)本病早期临床表现多样化, 例如本组1

例以腹痛为首发症状的患者,被误诊为肾结石,以肝脏损害为首发症状因精神、神经疾病出现较晚而长期被误诊为肝炎、肝硬化,部分患者合并肝炎、肝硬化更容易被误诊。本组1例因合并肝硬化长期被误诊为肝硬化长达18a,直至出现共济失调后才被确诊。还有1例因反复癫痫大发作为主要临床表现长期被误诊,直至出现肝硬化腹水才被确诊。(3)询问病史不详细。本组3例肝硬化患者均伴有神经或精神症状,而且均有角膜K-F环,血铜蓝蛋白均低于正常,由于医生临床经验不足,尽管出现较为典型的临床表现,但仍被多次误诊。所以我们认为青少年肝损害、锥体外系或精神症状者应警惕本病的可能,若有本病家族史者,应高度怀疑本病,及时查角膜K-F环及血清铜蓝蛋白等。目前国内研究已达到基因诊断水平,可以早期诊断,早期治疗。

本病治疗包括3个方面:(1)低铜饮食;1961年以来,schouwink报道用硫酸锌200mg 3次/d口服,治疗肝豆状核变性的患者,收到良好效果,主要作用是降低

胃肠道吸收铜,并使铜从粪便中排除,长期服用可使体内铜达到负平衡。此种方法已被多数学者认可,长期服用,无明显副作用;目前与D-青霉胺是可供选择的两种有效方法。(2)排铜治疗;二巯基丙醇,二巯基丙磺酸钠;(3)对症治疗。目前仍以D-青霉胺效果最佳为首选药。应予以长期治疗,中途停药可能导致病情恶化,以至死亡。本组1例患者坚持服药6a后自行停药,结果病情恶化,于次年死亡。对本药过敏者,不应轻易放弃此药,可予脱敏疗法。若因严重的副作用而不能坚持治疗的患者可改用乙烯四胺或乙烯二胺四醋酸治疗<sup>[1-3]</sup>。

### 3 参考文献

- 1 王丽娟,刘萍.应用PCR-SSCP技术检测肝豆状核变性基因突变及多态.中华神经内科学杂志 1997;30:8
- 2 许月芳,张琳.PCR直接测序在wilson病基因第8外显子检出一个突变热点.中华医学遗传学杂志 1978;15:284
- 3 梁扩寰.肝脏病学.第3版.北京:人民卫生出版社,1994:P907

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

## 老年SARS患者41例消化系统损害的临床分析

田耕,张泰昌,杨惠青

田耕,张泰昌,杨惠青,首都医科大学宣武医院消化内科 北京市 100053  
项目负责人:田耕,100053,北京市长椿街45号,首都医科大学消化内科.  
tg3030330@sina.com  
电话:010-63013355-2432  
收稿日期:2003-08-07 接受日期:2003-09-24

### 摘要

目的:探讨老年SARS患者消化系统损害的临床特点,加深对该疾病的认识。

方法:我院2003-05-06/2003-06-26住院SARS患者215例,对患者的基础疾病构成、消化系统临床症状和体征、实验室检查的肝功能、并发症和预后进行统计。

结果:老年SARS患者消化系统损害的主要表现为腹泻(19.5%)、腹痛(7.3%),较中青年组腹泻(15.5%)、腹痛(5%)常见,部分老年患者表现为恶心、呕吐、呕血和血便。在老年组ALT( $764 \pm 730$  nka<sup>+</sup>/L),AST( $563 \pm 813$  nka<sup>+</sup>/L),TBIL( $7.3 \pm 14.8$  umol/L),DBIL( $6.9 \pm 6.9$  umol/L)和TBA( $3.9 \pm 3.2$  umol/L)和中青年组ALT( $959 \pm 813$  nka<sup>+</sup>/L),AST( $583 \pm 578$  u/L),TBIL( $12.6 \pm 7.2$  umol/L),DBIL( $4.8 \pm 4.6$  umol/L)和TBA( $4.9 \pm 6.1$  umol/L)水平无显著性差异,其中两组患者ALT均数水平高于正常。老年SARS患者的并发症为MODS(17.1%)、感染(17.1%)高于中青年

组患者MODS(1.72%)和感染(4.02%)。老年组SARS患者的死亡率为26.8%,中青年患者的死亡率为4%( $P < 0.0005$ )。

结论:老年SARS患者存在消化系统的损害且有自身的特点,而老年患者较高的死亡率可能与SARS病毒的直接作用、其基础疾病和并发症有关。

田耕,张泰昌,杨惠青.老年SARS患者41例消化系统损害的临床分析.世界华人消化杂志 2004;12(1):233-235

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/233.asp>

### 0 引言

严重急性呼吸道综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)由一种新的冠状病毒引起<sup>[1-3]</sup>,主要以近距离空气飞沫和密切接触传播,其传染性强,病情较重,进展快<sup>[4-6]</sup>,在家庭和医院有显著的聚集现象。老年SARS患者消化系统损害的临床特点国内外少有报道,我们对2003-05-06/2003-06-26在我院诊治的SARS病例215例进行回顾性分析,探讨老年SARS患者消化系统损害的临床特点如下。

### 1 临床资料

在215例SARS患者中,老年(大于或等于60岁)41例,

占19.1%;男19例,女22例,年龄61-86(平均71岁).中青年患者174例,男85例,女89例,年龄15-58(平均35岁).两组伴发高血压24.4%( $n=10$ )和3.5%( $n=6$ ),冠心病29.3%( $n=12$ )和0%,糖尿病19.5%( $n=8$ )和4.0%( $n=7$ ),脑血管病14.6%( $n=6$ )和0.6%( $n=1$ ),其他24.4%( $n=10$ )和5.2%( $n=9$ ).

统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用SPSS10.0统计处理软件,对数据进行t或 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性.

## 2 结果

老年患者中消化系统损害主要表现为腹泻(19.5%)和腹痛(7.3%),明显高于中青年患者(腹泻15.5%,腹痛5%).老年患者中表现为呕血、血便的患者各1例,恶心、呕吐3例.

老年组与中青年组患者反映肝功能的指标ALT,AST,TBIL,DBIL及TBA无显著性差异.但老年组患者ALT( $764 \pm 730$  nka<sup>+</sup>/L),中青年组患者ALT( $959 \pm 813$  nka<sup>+</sup>/L),高于正常水平.老年组患者常见的并发症为感染7例(17.1%),MODS(17.1%);较中青年组感染7例(4.0%)、MODS3例(1.7%)高,ARDS两组各1例.老年组治愈率70.7%,较中青年组治愈率84.2%低,而老年组患者的死亡率为26.8%较中青年组患者死亡率4%明显增高,两组的治愈率和死亡率均存在显著差异( $P < 0.005$ ).

## 3 讨论

老年SARS患者除呼吸道和肺部表现之外,消化系统损害也有其特点,主要表现为腹泻、腹痛,部分患者还表现为恶心、呕吐、呕血和血便有报道.Timothy et al<sup>[7]</sup>发现,发热、寒战、全身不适、腹泻和颈部疼痛在确诊的97例SARS患者表现较呼吸道症状显著.Zhao et al<sup>[8]</sup>发现,24%的患者出现腹泻症状.Peiris et al<sup>[9]</sup>发现55/75例存在腹泻症状,且在发病7.5 d后出现.老年SARS患者出现腹泻、腹痛等胃肠道症状,可能与冠状病毒侵入肠道黏膜上皮有关.流行病学的研究发现SARS病毒在粪便中至少存活2 d,在腹泻患者的粪便中,由于PH值较高该病毒可以存活4 d,在塑料物品的表面可以存活48 h<sup>[10-11]</sup>.

老年SARS患者肝功能各项检测指标与中青年SARS患者无显著差异,但两组中ALT的均数水平均高于正常.Tsang et al<sup>[12]</sup>发现多数SARS患者转氨酶水平增高,在SARS死亡患者的尸检中,除发现存在肺部的病变外,还存在肝细胞的脂肪变性、浑浊肿胀、凋亡和点状坏死,同时伴有Kuffer细胞的增生和中央静脉周围淋巴细胞的浸润,以及肝内小血管壁淋巴细胞浸润<sup>[13]</sup>.用SARS病毒感染乳鼠,乳鼠发生肝损害,但在肝细胞内并没有发现类似冠状病毒颗粒<sup>[14,15]</sup>.提示SARS病毒致肝损害可能通过其他途径,而非病毒的直接作用,但确切

的机制仍需进一步研究.

老年SARS患者的死亡率显著高于中青年组患者,这可能与老年患者较多的基础疾病及并发症有关.而老年SARS患者消化系统损害的严重程度可能与其疾病的严重程度有关,深入认识其机制和特点,对提高老年SARS患者的治愈率,降低死亡率是有益的.

## 4 参考文献

- 1 Zhang JZ. Severe acute respiratory syndrome and its lesions in digestive system. *World J Gastroenterol* 2003;9:1135-1138
- 2 Nie QH, Luo XD, Hui WL. Advances in clinical diagnosis and treatment of severe acute respiratory syndrome. *World J Gastroenterol* 2003;9:1139-1143
- 3 Nie QH, Luo XD, Zhang JZ, Su D. Current status of severe acute respiratory syndrome in china. *World J Gastroenterol* 2003;9:1635-1645
- 4 Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee WK, Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, Yuen KY. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003; 361:1319-1325
- 5 Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith C, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *New Engl J Med* 2003; 348:1953-1966
- 6 Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikowa L, Fouchier RA, Berger A, Burguier AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Muller S, Rickerts V, Strrmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmita H, Doerr HW. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *New Engl J Med* 2003; 348:1967-1976
- 7 Timothy HR, Peter AC, Devilliers S, Kin LO, Alex NW. Evaluation of WHO criteria for identifying patients with severe acute respiratory syndrome out of hospital:prospective observational study. *BMF* 2003;326:1354-1358
- 8 Zhao Z, Zhang F, Xu M, Huang K, Zhong W, Cai W, Yin Z, Huang S, Deng Z, Wei M, Xiong J, Hawkey PM. Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China. *J Med Microbiol* 2003;52(Pt 8):715-720
- 9 Peiris JS, Chu CM, Cheng VC, Chan KS, Hung IF, Poon LL, Law KI, Tang BS, Hon TY, Chan CS, Chan KH, Ng JS, Zheng BJ, Ng WL, Lai RW, Guan Y, Yuen KY. HKU/UCH SARS Study Group. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 2003;361:1767-1772
- 10 Donnelly CA, Ghani AC, Leung GM, Hedley AJ, Fraser C, Riley S, Abu-Raddad LJ, Ho LM, Thach TQ, Chau P, Chan KP, Lam TH, Tse LY, Tsang T, Liu SH, Kong JH, Lau EM, Ferguson NM, Anderson RM. Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *Lancet* 2003;24:1761-1766
- 11 Lee N, Hui D, Wu A, Chan P, Cameron P, Joynt GM, Ahuja A, Yung MY, Leung CB, To KF, Lui SF, Szeto CC, Chung S, Sung JJ. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003;348:1986-1994
- 12 Tsang KW, Ho PL, Ooi GC, Yee WK, Wang T, Chan-Yeung M, Lam WK, Seto WH, Yam LY, Cheung TM, Wong PC, Lam B, Ip MS, Chan J, Yuen KY, Lai KN. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003; 348:1977-1985
- 13 Ding Y, Wang H, Shen H, Li Z, Geng J, Han H, Cai J, Li X, Kang W, Weng D, Lu Y, Wu D, He L, Yao K. The clinical pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a report from China. *J Pathol* 2003;200:282-289

- 14 Ng ML, Tan SH, See EE, Ooi EE, Ling AE. Early events of SARS coronavirus infection in vero cells. *J Med Virol* 2003;71: 323-331

- 15 李宁, 王巍, 陈红兵, 余琦, 王一平, 许燕杰, 韩勇, 宋晶莹, 王德文, 王翠娥, 陆江阳. SARS 多脏器穿刺组织病理学及超微结构的研究. *解放军医学杂志* 2003;10:881-883

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

## 门奇静脉断流术前后血中胆囊动力相关激素的水平

金红旭, 吴硕东, 陈宪英

金红旭, 吴硕东, 中国医科大学第二临床学院普外二科 辽宁省沈阳市 110004  
陈宪英, 沈阳军区总医院核医学科 辽宁省沈阳市 110016  
项目负责人: 金红旭, 110004, 沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学第二临床学院普外二科. hongxujin@hotmail.com  
电话: 024-83955058  
收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-09-24

### 摘要

目的: 研究肝硬化门静脉高压症患者行门奇静脉断流术前后血中胆囊动力相关激素水平的变化, 探讨切断迷走神经对肝硬化患者胆囊运动的影响。

方法: 肝硬化门静脉高压症患者 14 例, 行脾切除、贲门周围血管离断术, 术中切断迷走神经前后干。用放射免疫法检测术前及术后 7 d 清晨空腹血中胆囊收缩素(CCK)、P 物质(SP)、胃泌素(Gas)、血管活性肠肽(VIP)、生长抑素(SS)、胃动素(MTL), 同时检测正常对照组 10 例。

结果: 与对照组比较, 肝硬化患者 CCK( $6.7 \pm 3.9$  对  $2.0 \pm 0.5$  pmol/L,  $P < 0.01$ ), SP( $73.3 \pm 10.5$  对  $43.3 \pm 15.1$  ng/L,  $P < 0.01$ ), Gas ( $85 \pm 41$  对  $27 \pm 17$  ng/L,  $P < 0.01$ ), VIP ( $39.2 \pm 8.9$  对  $29.2 \pm 5.6$  ng/L,  $P < 0.05$ ) 显著增高, 门奇静脉断流术的术前与术后比较差异无显著性; 肝硬化患者 SS 和 MTL 水平与对照组相比略有升高, 但差异无统计学意义, 门奇静脉断流术的术前与术后比较差异无显著性。

结论: 肝硬化患者 CCK, SP, Gas, VIP 水平高于正常人, 门奇静脉断流术对上述激素无明显影响。肝硬化患者迷走神经在消化间期对胆囊动力相关的激素影响不大。

金红旭, 吴硕东, 陈宪英. 门奇静脉断流术前后血中胆囊动力相关激素的水平. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):235-237  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/235.asp>

### 0 引言

肝硬化患者胆囊结石的发病率明显增加<sup>[1]</sup>。研究发现肝硬化患者有明显的胆道动力学异常, 目前认为胆囊运动功能异常是胆囊结石形成的重要因素之一<sup>[2-6]</sup>。胆囊运动功能

的调节因素很多且相互影响, 机制尚不十分清楚<sup>[3, 6-11]</sup>。我们首次利用肝硬化患者行门奇静脉断流术时切断迷走神经这一特点, 用放免法测定手术前后血中胆囊收缩素(CCK)、P 物质(SP)、胃泌素(Gas)、血管活性肠肽(VIP)、生长抑素(SS)及胃动素(MTL)等与胆囊动力相关的激素水平, 为揭示人迷走神经及激素在调节胆囊运动过程中的相互作用提供佐证。

### 1 材料和方法

1.1 材料 肝硬化门静脉高压症患者 14 例, 男 9 例, 女 5 例, 平均年龄 50 岁。明确诊断为肝硬化门静脉高压症, 术前肝功能 Child 分级均为 A 级。行脾切除、贲门周围血管离断术, 即 Hassab 手术。方法为行脾切除后离断及结扎上自贲门上 6 cm, 下至胃大小弯上 1/2 的周围动静脉, 游离食管下段时切断迷走神经前后干。对照组 10 例, 符合下列条件: 无肝胆疾病病史; 排除肝胆疾病和门静脉高压症; 无影响肝胆胃肠运动的全身性疾病; 无严重的心、肺及肾疾病。

1.2 方法 肝硬化患者均在术前及术后 7 d 清晨空腹抽静脉血, 分别分离血清及血浆,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存待检测。用放射免疫法检测, 试剂盒由北京华英生物技术研究所以提供, 具体测定方法分别按各说明书进行, 所有标本一次检测。

统计学处理 术前与对照组进行 t 检验, 术前术后进行配对 t 检验, 全部统计分析用 SPSS11.5 软件完成。

### 2 结果

肝硬化患者 CCK, SP, Gas 水平显著高于对照组( $P < 0.01$ ), 门奇静脉断流术的术前与术后比较差异无显著性; 肝硬化患者 VIP 水平显著高于对照组( $P < 0.05$ )、门奇静脉断流术的术前与术后比较差异无显著性; 肝硬化患者 SS 和 MTL 水平与对照组相比略有升高, 但差异无统计学意义, 门奇静脉断流术的术前与术后比较差异无显著性(表 1)。



表1 肝硬化患者门奇静脉断流术前胆囊动力相关激素的改变 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/L)

分组	CCK(pmol/L)	SP	SS	MTL	Gas	VIP
对照	2.0 ± 0.5	43.4 ± 15.1	15.3 ± 5.3	429 ± 268	27 ± 17	29.2 ± 5.6
术前	6.7 ± 3.9 <sup>a</sup>	73.3 ± 10.5 <sup>b</sup>	18.5 ± 6.0	583 ± 295	85 ± 41 <sup>b</sup>	39.2 ± 8.9 <sup>a</sup>
术后	6.0 ± 3.4	77.4 ± 10.7	23.6 ± 9.9	656 ± 215	148 ± 110	34.0 ± 6.4

<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01, vs 对照组.

### 3 讨论

肝硬化患者胆囊结石的发病率明显增加与肝脏病变时胆色素代谢异常有关<sup>[1]</sup>. 随着对胆道动力学研究的深入<sup>[12-13]</sup>, 发现肝硬化门静脉高压症患者有明显的胆囊充盈速率减慢、胆囊排空指数下降, 而且与肝功能损伤程度有关<sup>[2]</sup>. 因此认为胆囊动力的异常也是胆囊结石形成的重要因素之一. 调节胆囊动力的因素很多, 除神经调节外, CCK, SP, Gas, VIP, SS, MTL 等激素均与胆囊动力有关<sup>[13-14]</sup>. CCK 无疑是胆囊收缩最重要的激素, 脂餐后胆囊收缩的同时血中 CCK 水平升高, 静脉持续灌注 CCK 时胆囊持续收缩, 停止灌注后胆囊收缩停止<sup>[13]</sup>. 肝硬化患者有胆囊运动功能障碍, 但血浆 CCK 浓度显著升高, 可能与肝硬化时胆囊充血水肿, 导致 CCK 受体减少等有关<sup>[15]</sup>. 也有学者推测肝硬变时 CCK 调节胆囊运动的神经通路可能发生异常, 导致 CCK 不能正常发挥作用<sup>[16]</sup>. 在肝硬化患者空腹血清中 SP 与 Gas 水平显著升高, 且与肝功能下降、门体分流增大成正相关<sup>[17-21]</sup>. 其原因可能为肝硬化时肝脏清除能力下降和门体分流增大, 使 SP 与 Gas 肝脏灭活减少. VIP 对基础情况下和由 CCK 引起的胆囊运动具有强烈的拮抗作用, 肝硬化时血中 VIP 水平明显升高, 可能与门静脉高压使胃肠道黏膜血流量降低, 引起 VIP 释放增加有关<sup>[22]</sup>. SS 可显著降低胆囊压力但不能对抗 CCK 及迷走神经的作用<sup>[13]</sup>, 有报道肝硬化时血中 SS 显著增高<sup>[18]</sup>, 本研究结果显示肝硬化患者与对照组无显著差异, 与徐军全 et al<sup>[23]</sup>的报道相符. 报道肝硬化患者血中 MTL 显著升高的且与肝功能状态有关者较多<sup>[20, 21]</sup>, 与本研究结果不符, 可能与本组病例均为肝功能 Child A 级有关.

迷走神经在胆囊运动中起着重要的调节作用, 电刺激狗变性迷走神经外周段能引起胆囊收缩, 完全切断两侧迷走神经出现胆囊收缩弛缓, 胆囊容积增大<sup>[24]</sup>. 在切断迷走神经引起胆囊张力减低的基础上给予脂餐仍能引起胆囊收缩, 因此认为迷走神经在维持胆囊的张力的过程中起主要作用, 而胆囊的收缩主要受激素调节<sup>[25]</sup>. 胆囊的运动是神经和激素共同参与的结果, 但神经与激素之间的相互作用研究很少, 大多为推测. 本组病例在手术过程中均切断迷走神经, 测定空腹血中与胆囊动力相关的激素水平, 结果术前与术后无明显变化. 说明迷走神经在消化间期对胆囊动力相关的激素影响不大, 二者的调节可能是相对独立的机制. 迷走神经在消化间期可能是通过释放乙酰胆碱等神经递质直

接作用于胆碱能受体来维持胆囊的张力<sup>[26-27]</sup>, CCK 诱发平滑肌收缩可能也不通过胆碱能受体介导<sup>[28]</sup>. 当胆囊失去迷走神经的作用时, 仍能够通过激素的调节维持部分动力, 但切断迷走神经后消化间期激素水平变化不大, 因此会出现胆囊容积增大等表现.

### 4 参考文献

- 陈晓芳, 赵俊普, 于桂萍. 肝硬变与胆囊病变的关系. 华人消化杂志 1998;6:828
- Wang J, Luo J, Yu X. Study on biliary motility in cirrhotic patients with portal hypertension. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2000;8:35-36
- 陈仕珠. 胆道系统运动调节及功能性胆道运动异常的诊治. 世界华人消化杂志 2003;11:613-618
- 马桓, 杨成奎. 胆囊结石 100 例的胆囊排空功能. 新消化病学杂志 1996;4:299-300
- 赵景涛, 齐桂英, 高伯山, 梁惠宾, 张彩群. 胆结石患者胆囊运动功能的研究. 新消化病学杂志 1996;4:249-250
- 吴培俊. 胆道系统运动功能及障碍. 世界华人消化杂志 1999;7:603-604
- 王青, 韩海城, 邓崇高, 王育敏. 胆石症患者血清 CGRP PYY CCK 和 PG 的变化. 新消化病学杂志 1996;4:264-265
- 陈仕珠, 冯少华, 邢保华, 郭志刚. 急性病毒性肝炎患者胆囊排空功能研究. 华人消化杂志 1998;6:204-206
- 陈仕珠, 赵红, 吴春艳, 傅卫红, 陈旭春. 胆汁反流性胃炎患者胆囊排空功能研究. 华人消化杂志 1998;6:427-429
- 陈仕珠, 步雪, 侯成才, 李莎, 陈旭春. 硝苯吡啶改善肠易激综合征患者胆囊排空不良的机制. 华人消化杂志 1998;6:423-426
- 陈仕珠, 沙建萍, 陈旭春, 侯成才, 傅卫红, 刘望. 胆汁反流性胃炎患者 Oddi 括约肌松弛不良: 硝苯吡啶改善胆囊排空作用研究. 世界华人消化杂志 1999;7:1020-1023
- Wei JG, Wang YC, Liang GM, Wang W, Chen BY, Xu JK, Song LJ. The study between the dynamics and the X-ray anatomy and regularizing effect of gallbladder on bile duct sphincter of the dog. *World J Gastroenterol* 2003;9:1014-1019
- Zhou JH, Liu CY, Zhang RH, Wang HR, Liu KJ. Effects of octreotide on gallbladder pressure and myoelectric activity of Oddi sphincter in rabbits. *World J Gastroenterol* 1998;4:238-241
- 张宗英, 侯振江, 郭金英. 胃肠激素及临床应用. 华人消化杂志 1998;6:447-448
- Shuai J, Zhang S, Han T, Jiang Y, Lei R, Chen S. Correlation between gene expression of CCK-A receptor and gallbladder emptying in gallstone patients. *Zhonghua Waike Zazhi* 1999;37:292-294
- 胡望明, 尹朝礼, 吴华, 赖世英. 肝硬变患者胆囊运动功能与血浆胆囊收缩素、胃动素水平的关系. 中华外科杂志 1997;35:764
- Li CP, Hwang SJ, Lee FY, Chang FY, Lin HC, Lu RH, Chu CJ, Lee SD. Evaluation of gallbladder motility in patients with liver cirrhosis: relationship to gallstone formation. *Dig Dis Sci* 2000;45:1109-1114
- 梁丕霞, 杨昭徐, 张绍东, 吴建忠. 上消化道出血患者血中胃泌素胰高血糖素生长抑素的变化. 新消化病杂志 1997;5:172-173
- 贾林, 莫耀涛, 吴惠生, 李瑜元. 肝硬化患者血清胃泌素与肝功能和门体分流指数关系的探讨. 中华核医学杂志 1996;16:39-40
- 许昌泰, 闰秋枫, 李玲, 潘伯荣. 肝硬化患者血清胃液素胃动素和亮 - 脑啡肽的研究. 新消化病杂志 1996;4:25-27



- 21 李秋萍, 徐军全, 邢志华, 胡彩萍. 胃肠激素在肝硬变胃黏膜病变发病机制中的作用. 华人消化杂志 1998;6:789-790
- 22 李秋萍, 徐军全, 胡彩萍. 肝硬变患者血浆血管活性肠肽的变化及意义. 世界华人消化杂志 1999;7:437-438
- 23 徐军全, 李秋萍, 胡彩萍. 肝硬变患者血浆生长抑素的变化意义. 华人消化杂志 1998;6:140-141
- 24 Muramatsu S, Sonobe K, Tohara K, Tanaka T, Mizumoto A, Ibuki R, Suzuki H, Itoh Z. Effect of truncal vagotomy on gallbladder bile kinetics in conscious dogs. *Neurogastroenterol Motil* 1999;11:357-364
- 25 Wang X, Luo S, Liu Y. Effects of changes of plasma motilin level on the motility of gallbladder in patients with chronic renal failure. *Zhonghua Neike Zazhi* 1996;35:86-88
- 26 Parkman HP, Pagano AP, Ryan JP. Investigation of endogenous neurotransmitters of guinea pig gallbladder using nicotinic agonist stimulation. *Dig Dis Sci* 1998;43:2237-2243
- 27 Liu CY, Liu JZ, Zhou JH, Wang HR, Li ZY, Li AJ, Liu KJ. TRH microinjection into DVC enhances motility of rabbits gallbladder via vagus nerve. *World J Gastroenterol* 1998;4:162-164
- 28 Li W, Zheng TZ, Qu SY. Effect of cholecystokinin and secretin on contractile activity of isolated gastric muscle strips in guinea pigs. *World J Gastroenterol* 2000;6:93-95

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

## MRI 在肝海绵状血管瘤诊断中的应用

廖翠薇, 孙清荣, 梁开运

廖翠薇, 孙清荣, 梁开运, 中国人民解放军第三军医大学新桥医院放射科 重庆市 400037

项目负责人: 廖翠薇, 400037, 重庆市沙坪坝区新桥, 中国人民解放军第三军医大学新桥医院放射科. lcw15@mail.163.com

电话: 023-68774676 传真: 023-68752119

收稿日期: 2003-08-23 接受日期: 2003-10-07

### 摘要

目的: 分析肝海绵状血管瘤的MRI征象以明确MRI在肝海绵状血管瘤中的诊断价值。

方法: 使用美国GE公司0.5T signa contour型磁共振成像仪对80例肝海绵状血管瘤患者进行MRI检查, 扫描序列为SE序列T1WI, FSE序列T2WI、PDWI、T2\*WI, 并对56例患者进行了动态及一般增强检查。

结果: 80例病例共发现112个病灶, 其中108个病灶在T1WI上为低信号, 4个为稍低信号; T2WI上病灶均有高信号表现, 并且随着回波时间的延长, 病灶的高信号越来越强, 形成所谓的“灯泡征”; 56例进行了增强检查的病例中37个病灶强化不均匀, 且有自边缘向中央推进的强化特点, 余小病灶为均匀强化。

结论: 肝海绵状血管瘤在MRI图像中有其特征性表现, MRI是诊断肝海绵状血管瘤不可缺少的方法。

廖翠薇, 孙清荣, 梁开运. MRI在肝海绵状血管瘤诊断中的应用. 世界华人消化杂志 2004;12(1):237-239

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/237.asp>

### 0 引言

海绵状血管瘤是肝脏最常见的良性肿瘤, 临床上多无症状, 其发生率约为0.4-7.3%<sup>[1]</sup>, 过去对肝海绵状血管

瘤的诊断主要依靠超声和CT, 而磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)技术以其优良的组织分辨率、多参数、多方位、多层面成像的特点为肝海绵状血管瘤的诊断提供了一种重要的新方法。本文通过收集总结经手术病理或介入检查证实的80例肝海绵状血管瘤的MRI表现特点, 探讨MRI对肝海绵状血管瘤的诊断价值。

### 1 材料和方法

1.1 材料 收集了1996年以来经手术病理或介入检查证实的80例病例, 男33例, 女47例。年龄32-75岁, 平均46岁。临床表现有不同程度的上腹疼痛、不适及腹胀的39例(48.8%), 无症状体征通过体检B超发现的35例(43.8%), 6例可扪及肝区包块。本组资料中3例甲胎蛋白检查为阳性, 16例乙肝五项检查为阳性。所有病例均进行了MRI平扫, 56例进行了MRI增强检查。

1.2 方法 采用美国GE公司生产的signa contour 0.5T超导型磁共振成像仪, 并使用体部线圈, 配合呼吸门控和预饱和技术, 常规进行MRI轴位扫描, 用自旋回波(spin echo, SE)序列获得T1加权像, TR/TE=600/10 ms, 用快速自旋回波(fast spin echo, FSE)序列获得T2加权像和质子加权像, TR/TE=5 000/105、15 ms, 层厚为8 mm, 间隔2 mm, 矩阵为256 × 160, 采集次数为4次, 所有病例在常规轴位扫描结束后均进行了重T2加权成像, TR/TE=5 000/120、150、180 ms。同时对32例进行了冠状位扫描, 获得了T2加权像, TR/TE=5 000/105 ms。56例进行了动态及一般增强检查, 获取T1加权像, 所用造影剂为Gd-DTPA, 剂量为12 mL, 肘静脉手动团注。动态扫描前先选取病灶明显的相邻两层, 再在注药的同时进行扫描, 连续扫描3 min后进行全肝的一般增强检查。

## 2 结果

在MRI图像中共发现80例患者的112个病灶,单发57例(71.3%),多发23例(28.7%),多发病例中病灶最多有6个。病灶形态多为圆形或类圆形,余13例表现为不规则形。位于肝右叶的病灶有75个(66.9%),肝左叶37个(33.1%)。所有病灶边界清楚锐利,其周围未见异常信号影。病灶大小不一,最大者约为 $10.3 \times 6.5$  cm,最小者约0.7 cm。

112个病灶中108个在T1WI上呈低信号,4个为稍低信号,信号均匀。质子加权像上所有病灶均表现为稍高于肝组织的信号,常规T2WI上107个病灶为明显高信号,5个为较高信号,13个(11.6%)病灶信号不均匀,其内可见条索状、小片状低信号影或更高信号影。在多回波扫描中,随着回波时间的延长,瘤灶的高信号越来越强,形成所谓的“灯泡征”(图1、2)。在56例进行了增强检查的病例中,较小病灶呈均匀一致性强化,较大者约37个强化不均匀,先出现边缘结节状强化,并逐渐向中央推进直至整个病灶强化。增强检查比平扫多发现7个病灶。

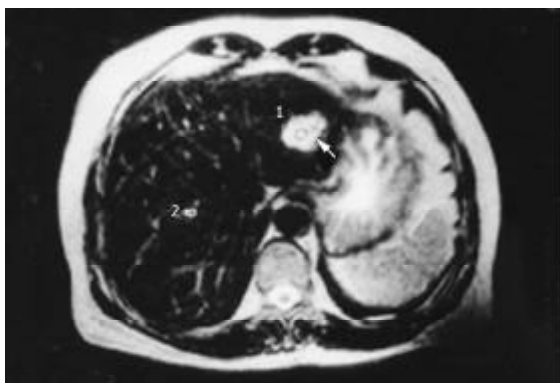


图1 肝左叶海绵状血管瘤,轴位像FSE序列T2WI(TR/TE=5 000/120 ms),病灶为高信号,边界清楚,周围未见异常信号影。

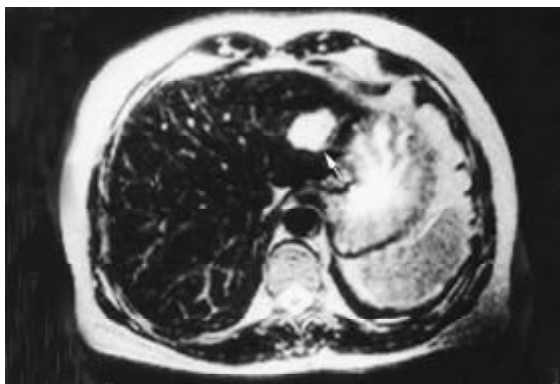


图2 同1病例,TR/TE=5 000/180 ms,病灶的高信号越来越强,形成“灯泡征”。

## 3 讨论

肝脏血管瘤在组织学上分为海绵状血管瘤,硬化性血管瘤,血管内皮细胞瘤和毛细血管瘤4型<sup>[2]</sup>。以海绵状血管瘤最多见,约占肝血管瘤的95-98%。海绵状血管瘤

又可分为厚壁型及薄壁型两类<sup>[3]</sup>,厚壁型的壁内有较多的胶原纤维和纤维细胞,血管腔很小,甚至呈裂隙状;薄壁型的壁内只有少量胶原纤维和纤维细胞,血管腔隙很大。在病理上肝海绵状血管瘤主要由血池或血窦组成,血液在其中缓慢流动,多由瘤体边缘向中心流动。

MRI作为一种新型的检查技术,以其优良的组织分辨率、多方位、多参数成像的特点,为肝海绵状血管瘤的诊断提供了不可缺少的影像检查方法。文献报道,MRI对肝海绵状血管瘤的诊断敏感性为100%,特异性为93%,准确性为95%<sup>[4]</sup>,而CT扫描对其诊断敏感性为87.5%,特异性为84.6%,准确性为86.9%<sup>[5]</sup>,从某种意义上讲MRI可替代尸体解剖。肝海绵状血管瘤形态多规则,边界清楚,其周围无异常信号影,临床可无症状,因而常漏诊。MRI能检出的最小病灶约为0.3-0.5 cm,我们发现的最小病灶为0.7 cm,与文献报道基本一致。肝海绵状血管瘤主要由扩大、充盈血液的血管腔隙即血窦构成<sup>[2]</sup>,而血液含水量高(约81%),因此海绵状血管瘤的T2值很长,本组病例所有病灶在T2加权像上均呈明显高信号,并且随着回波时间的延长,病灶的信号强度越来越高,形成所谓的“灯泡征”,据此可同肝癌等占位性病变鉴别,这也是MRI的优越性所在。在T1WI上肝海绵状血管瘤表现为低信号。少数瘤灶内可因出血、坏死、钙化、纤维化及血栓形成等而信号不均匀,本组13个(11.6%)病灶有此表现。由于肝海绵状血管瘤瘤体内血液是从边缘向中心缓慢流动,故增强扫描很有特征性,表现为边缘结节样强化,并逐渐向中心推进,直至完全强化,这是本病的另一重要征象,据此可与其他实质性病变鉴别,但如果病灶较小,增强扫描则呈均匀一致性强化,以上两种增强形式在我们统计的病例中均有表现。由于瘤体内血流缓慢,对造影剂的清除较慢,因而延时扫描病灶信号仍比肝组织高,此征象与肝癌的增强表现有明显不同。

在肝海绵状血管瘤的诊断中,还应注意其与原发性肝癌、肝囊肿及肝转移瘤等肝占位性病变的鉴别诊断。原发性肝癌是肝脏最常见的恶性肿瘤,在MRI平扫中也可表现为T2WI上的高信号和T1WI上的低信号,多回波扫描及增强检查对他们的鉴别诊断具有非常重要的意义。肝海绵状血管瘤随着回波时间的延长病灶的信号越来越亮,而肝癌无此征象;增强扫描中肝海绵状血管瘤可出现边缘结节状强化并逐渐向中央推进,且强化消退慢,而肝癌强化均匀,消退也快;小的血管瘤也可出现均匀强化,但其强化时间比肝癌长。肝囊肿也是较为常见的良性肿瘤,他的T1值及T2值比血管瘤更长,因而T1WI上信号更低,T2WI上信号更亮;同时肝囊肿没有强化征象,借此二者不难鉴别。肝转移瘤常为多发病灶,多出现中心坏死及囊变,故其信号不均,呈现为“牛眼征”或“靶征”,而海绵状血管瘤常信号均匀。增强扫描时肝转移瘤依强化方式可分为动脉期强化型和静脉期强化型,其强化方式常不同于海绵状血管瘤,

多回波扫描对二者的鉴别诊断也有一定的作用。

总之, MRI 以其成像上的优越性在肝海绵状血管瘤的诊断中起着不可替代的作用。

#### 4 参考文献

1 Ferrucci JT. Liver tumor imaging: current concepts. *Am J*

*Roentgenol* 1990;155:473-484

2 陈星荣, 沈天真, 段承祥, 施增儒. 全身 CT 和 MRI. 第 2 版. 上海: 上海医科大学出版社, 1999:546-549

3 段承祥, 吕桃珍, 陶文照, 王建军. 肝血管瘤 CT 表现的病理基础. *中华放射学杂志* 1990;24:263-266

4 裴云. MRI 对肝血管瘤的诊断价值(附 30 例分析). *广西医学* 2000; 22:632-634

5 李伟雄. 肝脏海绵状血管瘤 48 例影像学对比分析. *广西医科大学学报* 2000;17:294-295

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

## 内镜下微创黏膜切除术治疗消化道癌前病变

赵保民, 姜慧玲, 赵曙光, 张少玲, 黄裕新, 闻勤生

赵保民, 姜慧玲, 赵曙光, 张少玲, 黄裕新, 闻勤生. 中国人民解放军第四军医大学唐都医院消化科 陕西省西安市 710038  
项目负责人: 赵保民, 710038, 陕西省西安市灞桥区新寺路, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院消化科. zhaobm@163.com  
电话: 029-83377721 传真: 029-83377597  
收稿日期: 2003-09-06 接受日期: 2003-10-12

### 摘要

目的: 探讨内镜下治疗癌前病变的方法、适应证、手术操作和并发症, 评价其科学意义。

方法: 根据内镜检查发现的癌前病变形态及大小, 选择内镜下治疗方法如内镜下息肉套扎术, 内镜下电凝电切术, 内镜下射频消融术。

结果: 完成内镜下息肉套扎术 56 例, 内镜下电凝电切术 55 例, 内镜下射频消融术 19 例, 无并发症发生。

结论: 内镜下微创黏膜切除术创伤小、效果好、安全、可靠, 是治疗癌前病变的重要方法, 积极早诊早治癌前病变具有重要的科学意义。

赵保民, 姜慧玲, 赵曙光, 张少玲, 黄裕新, 闻勤生. 内镜下微创黏膜切除术治疗消化道癌前病变. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):239-241  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/239.asp>

### 0 引言

2000 年以来, 我院开展内镜下微创黏膜切除治疗术治疗 130 例癌前病变, 取得了一些体会和经验. 在此, 对其治疗方法、适应证、并发症等问题予以讨论。

### 1 材料和方法

1.1 材料 130 例癌前病变患者均来自我院日常门诊工作中经内镜检查发现的住院患者. 其中男 80 例, 女 50 例. 年龄分布: 小于 39 岁者 10 例, 40-49 岁者 41 例, 50-59

岁者 35 例, 60-69 岁者 29 例, 大于 70 岁者 15 例. 全部病例均采用 Olympus EVIS 240 电子内镜诊疗系统. 依据内镜下观察到的病变大小及形态, 选择不同的切除方法. 对于直径小于 1.0 cm 隆起性无蒂病变, 采用四川锦阳立德电子有限公司生产的 LDRF50 型射频治疗仪治疗. 直径大于 1.5 cm 采用 Olympus PSD-20 型高频电凝电切仪治疗. 直径在 1.0-1.5 cm 之间的病变, 采用内镜下橡皮圈套扎术, 仪器为天津医用硅胶二厂研制和生产的内镜牵拉式套扎器和日本产空气驱动式套扎器。

### 1.2 方法

1.2.1 术前准备 全部病例均行术前准备, 包括查血常规、出凝血时间、血型、交叉取血、备血、心电图等. 血小板及出凝血时间异常者, 给予纠正后方可实施手术. 如有心肌缺血性改变, 须经改善心肌供血等治疗. 术前禁食 12 h, 监测并记录血压、脉搏等生命体征, 征得家属同意并签字。

1.2.2 操作方法 本组共用 3 种内镜下黏膜切除术. (1) 内镜下射频消融术(ERF). 在上述术前准备的情况下, 选定输入功率为 50 W, 时间 3 s (脚踏开关控制), 从内镜活检孔插入射频天线治疗电极探头, 直接对准病变顶部进行点射, 使病变组织凝固变白、消失. (2) 内镜下橡皮圈套扎术(EPL). 使用牵拉式套扎器, 先由胃镜确定息肉部位和大小, 同时置入食管套管, 再退镜安装套扎器, 将装有套扎器的胃镜沿套管送入胃内, 直视下使套扎器口与息肉或正面充分接触, 并踩动吸引器, 使息肉全部吸入套扎器内, 此时视野呈红色, 立即拉动预先经活检孔道插入的牵引丝, 使“O”形橡皮圈从内套管前端边缘脱落并自然结扎在病灶底部. 结扎成功后可见病灶呈环形隆起并发绀, 检查无出血后退镜. 使用空气驱动式套扎器: 胃镜观察确定病变部位及大小, 套入外套管, 再退镜安装套扎器, 注气管固定于内镜表面, 将装有套扎器的胃镜沿套管送入胃内, 直视下使套扎器口与

病变成正面充分接触,并踩动吸引器,使息肉吸入套扎器内,视野变红,助手立即通过注气管注入空气2 mL,橡皮圈即脱落并自然套扎在病灶底部,套扎成功退出胃镜。(3)内镜下高频电凝电切术(EHCC),术前常规肠道准备(禁用甘露醇),内镜经肛门插入,循腔进镜达回盲部,退镜中发现病变后,再进镜5 cm,在此处充分换气,5次后退至病变处,再换气5次,将圈套器经内镜活检孔道送达病变处,套住病变,勿过紧,先充分电凝后电切,使病变脱落,检查无出血,退镜。

## 2 结果

2.1 病灶分布 130例中病灶位于食管14例(10.8%),胃57例(43.8%),十二指肠3例(2.3%),直肠17例(13.1%),结肠39例(30%)。

2.2 病变形态及大小 胃息肉51例,食管息肉9例,胃黏膜白斑2例,Barrett食管2例,大肠息肉57例,食管黏膜白斑2例,食管乳头状瘤2例,胃疣状变3例。病灶小于1.0 cm 19例,1.0-1.5 cm 56例,大于1.5 cm 55例。

2.3 病理诊断 130例中78例病检结果:腺瘤40例,不典型增生10例,乳头状瘤2例,Barrett食管2例,增生性改变10例,炎性改变14例。

2.4 病灶切除情况 本组病灶全部切除或消融。

2.5 并发症 无1例发生任何并发症。

2.6 随访情况 术后1 wk复查胃镜者50例,均见溃疡形成;术后2 wk复查者25例,全部愈合;术后1 a复查者48例均未见复发。

## 3 讨论

3.1 及早发现及早治疗癌前病变的科学意义 恶性肿瘤是严重危害人类健康和生命的常见病、多发病。尽管科学界不断追求防治肿瘤,然而科学与社会选择仍存在较大差距,大量的财力用于治疗中晚期患者。改变这种状态一是要预防,二是要早诊早治。业已发现,C-Ha-ras和K-ras基因突变<sup>[1-3]</sup>和c-myc、C-met<sup>[4-5]</sup>、MUC 2<sup>[6]</sup>、P53<sup>[7-8]</sup>基因表达异常多出现于癌前病变<sup>[9]</sup>中。胃癌组织微卫星不稳定性(MS1)的检出率为16-39%,不典型增生和肠上皮化生的检出率分别为42%和33%<sup>[10-12]</sup>。胃癌组织端粒酶活性阳性率为85%,不典型增生和肠上皮化生的阳性率分别为33.3%和16.7%,正常胃黏膜为阴性<sup>[13-14]</sup>。由于肠上皮化生和不典型增生两种病理变化,在抗原性方面表现为多种肿瘤相关抗原,生物学标志物的检出率增高,在细胞遗传特性上表现为遗传物质DNA含量的异常增加,具有与胃癌相类似的生物学性状,因此,称为癌前病变<sup>[15-20]</sup>。食管癌前病变从轻度不典型增生,到重度不典型增生发现率分别为12-24%、9-16%、3-5%,而癌变率分别为5%、25%和65%<sup>[21]</sup>。通过内镜活检技术可以检测上述指标,有可能成为胃癌预防和早期诊断的有用手段。

3.2 内镜下微创黏膜切除的适应证 通常认为创伤小,

并发症少,可根治,即可称为内镜下微创切除治疗。并不限制病灶的平面范围。但须指出浸润深度应在黏膜肌层以上,因此黏膜内癌、原位癌和癌前病变均可行内镜下微创治疗<sup>[22]</sup>。对于个体病灶能否做微创治疗取决于经验技术和设备。判断病灶的范围依赖于内镜观察、活检和钡透。某些情况下需要超声内镜检查。内镜观察可以大致判断范围,包括长度、宽度及深度。活检可以帮助确定深度。钡透有助于区分外压或内压及其与肌层的关系。超声内镜是术前准确判断早期消化道肿瘤最有效的方法。借助高分辨率的腔内超声探头可以精确地显示肿瘤浸润的深度和累及的层次。对于病变仅累及黏膜层以及局限于黏膜下层上1/3层内,可以采用微创切除治疗<sup>[23]</sup>。Giovannini et al<sup>[24]</sup>对21例经超声内镜诊断为早期胃肠道肿瘤的患者施行黏膜切除术,完全切除率达到90.4%,显示了超声内镜判断的准确性及其指导下的安全性和有效性。但是黏膜下病变转移机会在15-40%<sup>[25]</sup>,黏膜下层是微创切除的切像,所以黏膜下浸润癌是微创切除术的禁忌证。

3.3 微创黏膜切除的方法及手术操作 内镜下微创切除的方法很多,本组采用的微创切除方法,主要依据病变的形态和大小而定,部分参考了活检结果。(1)射频消融,通过极性变换率很高的射频电流使病变组织升温,细胞内外水分蒸发、干燥、固缩,以致蛋白变性而无菌性坏死<sup>[26]</sup>。术中靶对病灶中心,并同时去除周边部分正常黏膜,因此可达到完全彻底。术前无需麻醉,患者无不适感觉,不引起出血。(2)橡皮圈套扎术<sup>[27]</sup>,是在吸入病灶的同时,也吸入周边部分正常黏膜,部分黏膜下组织也被吸入,扎紧病变组织,1 wk后病变组织坏死脱落形成溃疡,术中可能造成局部黏膜渗血。(3)电凝电切术,是常用的息肉切除方法,技术已趋完全成熟,切除病灶完全彻底,且切除的病变可回收送病检。而前二者不易回收病变组织。三种方法的共同特点是术后形成溃疡,需要一段时间抑制胃酸分泌、消炎、保护创面等治疗。

3.4 内镜下微创切除的并发症 除了有内镜检查相关的并发症之外,微创黏膜切除的主要并发症有出血、穿孔、黏膜损伤、咽喉痛、肠壁气肿、腹胀、肠腔内气体爆炸等。由于镜下治疗采用的方法及仪器不同,并发症的发生有所区别。单纯橡皮圈套扎,一般无并发症,但病变坏死脱落后创面如不及时治疗,溃疡面易感染及出血。圈套电凝电切术中电凝不充分或机械摘除,易导致出血;套扎组织过多,电凝过强易出现穿孔。术前肠道准备用甘露醇易发生肠腔气体爆炸。微波、射频电凝等接触性电凝技术治疗时易引起组织粘连和术中出血。而激光、氩等离子治疗不粘连,无碳化,无冒烟等现象。手术安全可靠。

3.5 微创黏膜切除方法进展 除了本组采用的三种微创黏膜切除术之外,尚有其他方法如:(1)TADA通常内镜黏膜切除法 经内镜双活检道,一侧插入异物钳,钳起黏膜;另一侧插入圈套器,收紧圈套器接通高频电切

除。(2)INOUE黏膜吸入切除术<sup>[28]</sup> 将病灶吸入圈套器后, 缚住靶病灶使形成人工息肉, 然后通高频电切除。(3)黏膜咬除术 用电热活检钳按顺序分块咬除全部病灶黏膜, 此法优点是安全, 缺点是不能提供完整标本。对于较小病灶, 术前需作碘染或电灼, 标记病灶, 并从病灶上向病灶黏膜注射 1:20 000 的肾上腺素盐水 5-10 mL, 使黏膜与肌层分离, 减少切除黏膜损伤肌层的机会, 增加安全性, 减少出血。近年来, 德国发明了一种非接触式的电凝技术<sup>[29]</sup>, 较之接触式的电凝固技术安全性更高。其原理是当高频电压达到一定程度, 高频电极与肌体组织之间距离适当时, 氩气流中将产生导电的氩离子束, 从而使高频电流能够在电极与组织之间移动, 到达组织上的高频电流可产生凝固效应。适用于小息肉、扁平隆起性病变、溃疡出血、肿瘤狭窄再通等<sup>[30]</sup>。由于微创黏膜切除术创伤小, 并发症少, 易操作, 术后生活质量不受影响, 给患者带来很大利益, 因此, 内镜微创黏膜切除术将是今后治疗早期癌和癌前病变的发展方向。

#### 4 参考文献

- 1 胡家露, 林一帆, 刘杰, 孙永兴, 钱宗才, 范金城, 吴可法. 胃黏膜异型增生多项生物标本定量观察及癌变概率模糊判别研究. *中华消化杂志* 1996;16:14-17
- 2 宋伯根, 李义清, 石红军, 赵桂芬. 胃黏膜上皮异型增生表现类型及其癌前意义的实验研究. *中华消化杂志* 1994;14:216-219
- 3 吕有勇. 多基因变异与胃黏膜癌变的关系. *中华消化杂志* 1996;16:9-13
- 4 庄小强, 林三仁, 郑杰, 孙桂华, 李燕. 胃黏膜病变与 C-met 原癌基因表达的关系及预后研究. *世界华人消化杂志* 2000;8:711-712
- 5 Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, Watanabe A, Tatsuda W, Yamashita J, Matsuda M, Sakaguchi T, Hirao T, Nakano H. The prognostic significance amplification and overexpression of C-met and C-erb-B2 in human gastric carcinomas. *Cancer* 1999;85:1894-1902
- 6 Wang RQ, Fang DC, Liu WW. MUC2 gene expression in gastric cancer and preneoplastic lesion tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:285-288
- 7 徐虹, 周琦, 严明珠, 王立东. 胃黏膜上皮癌变过程中 P53、P16 基因的表达及其相关性研究. *世界华人消化杂志* 1998;6:919
- 8 Ochiai A, Yamaguchi Y, Hirohashi S. P53 mutations in the non-neoplastic mucosa of the human stomach showing intestinal metaplasia. *Int J Cancer* 1996;69:28-33
- 9 房殿春, 刘为纹. 胃黏膜肠上皮化生的分型及其与胃癌发生的关系. *第三军医大学学报* 1990;12:169-173
- 10 周晓东, 房殿春, 罗元辉, 鲁荣, 王东旭. 胃癌微卫星不稳定性及其临床意义. *中华医学杂志* 1997;77:850-851
- 11 房殿春, 周晓东, 罗元辉, 王东旭, 鲁荣, 杨仕明, 刘为纹. 胃癌微卫星不稳定性抑制癌基因杂合缺失. *世界华人消化杂志* 1999;7:479-481
- 12 Semba S, Yokozaki H, Yamamoto S, Yasui W, Tahara E. Microsatellite instability in precancerous lesions and adenocarcinomas of the stomach. *Cancer* 1996;77:1620-1627
- 13 杨仕明, 房殿春, 罗元辉, 王振华, 鲁荣, 刘为纹. 胃黏膜活检标本端粒酶活性的检测. *中华消化内镜杂志* 1997;14:298-300
- 14 姚希贤, 伊露, 张杰英, 白文元, 李英民, 孙中成. 胃癌及癌前病变 hTERT 的表达与细胞免疫功能. *世界华人消化杂志* 2001;9:508-512
- 15 刘金生, 黄晓兰, 陈瑾. 胃癌前状态 360 例随访资料分析. *中华消化内镜杂志* 1997;4:245
- 16 曹杰, 杜洪, 谭卫民, 刘锦怀, 何其华. 残胃黏膜异型增生生物学特性的探讨及意义. *中华消化杂志* 1997;17:339-341
- 17 Lauwers GY, Riddell RH. Gastric epithelial dysplasia. *Gut* 1999;45:784-790
- 18 Goldstein NS, Lewin KJ. Gastric epithelial dysplasia and adenoma: historical review and histological criteria for grading. *Hum Pathol* 1997;28:127-133
- 19 Zhou XM, Zhang XY, Fan DM. Techniques for cutaneous ECG recording and ECG study of patients with gastric motor disorders. *Proc Eng Med Biol* 1998;20:3238-3241
- 20 Fang DC, Liu WW. Subtypes of intestinal metaplasia and Gastric carcinoma: a clinicoendoscopic follow-up of 112 cases. *Chin Med J* 1999;104:467-471
- 21 董志伟. 新世纪肿瘤防治的目标. *中华肿瘤杂志* 2002;24:311-312
- 22 王国清. 食管癌癌前病变的发展趋势及对策. *中华肿瘤杂志* 2002;24:206-207
- 23 Wang GQ, Hao CQ, Wang GQ, Lu N, Lin DM, Xie YQ, Lai SQ. Endoscopic mucosectomy on precancerous lesions and early esophageal cancer. *Chinese J Dig End* 2002;19:218-220
- 24 Giovannini M, Bernardini D, Moutardier V, Monges G, Houvenaeghel G, Seits JF, Derlper JR. Endoscopic mucosal resection(EMR): results and prognostic factors in 21 patients. *Endoscopy* 1999;31:698-701
- 25 Yoshida M, Hanashi T. Endoscopic mucosal resection for radical treatment of esophageal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 1995;22:847-854
- 26 廖宁逊, 李增烈. 应用射频技术治疗消化道疾病. 引进国外医药技术与设备 1999;22:42
- 27 黄裕新, 张少玲, 穆琳, 陈岳祥, 闻勤声, 孙大勇. 内镜下弹性圈套结扎治疗上消化道息肉100例临床疗效评价. *中国内镜杂志* 2000;6:24-25
- 28 Inoue H, Takeshita K, Hori H, Muraoka Y, Yoneshima H, Endo M. Endoscopic mucosal resection with a cap-fitted panendoscope esophagus, stomach and colon mucosal lesions. *Gastrointest Endosc* 1993;39:58-62
- 29 Grund KE, Storek D, Farim G. Endoscopic argon plasma coagulation(APC). First clinical experiences in flexible endoscopy. *Endosc Surg Allied Technol* 1994;2:42-46
- 30 Wu YL, Feng L, Sun B, Ji SF, Fi YH, Fang WL, Zhu Q, Zhong J. Argon plasma coagulation in polypectomy of gastrointestinal sessile flat polypst. *Chin J Dig Endosc* 2001;18:325-327

## 两种肝门整形术对肝内胆汁成分及结石复发的作用

陈 涛, 田伏洲, 张小进, 蔡忠红

陈涛, 田伏洲, 张小进, 蔡忠红, 中国人民解放军成都军区总医院全军普通外科中心 四川省成都市 610083  
项目负责人: 田伏洲, 610083, 四川省成都市, 中国人民解放军成都军区总医院全军普通外科中心.  
电话: 028-86570351  
收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-07-30

### 摘要

目的: 研究皮下通道型胆囊肝总管成型术(STHG)与皮下盲襻型胆管空肠吻合术(CJ)术后肝内胆汁成分变化及结石复发情况, 了解其对肝胆管结石的治疗效果.

方法: 选择 1994-12/2000-12 在我科行 STHG 及 CJ 手术治愈的肝胆管结石患者 231 例, 术后 4 wk 抽取肝内胆管胆汁进行胆汁培养及成分测定, 随访术后胆管炎发生率及胆管结石复发率.

结果: STHG 术后肝内胆管胆汁培养阳性率、 $K^+$ 、 $Na^+$ 、糖蛋白含量及  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶( $\beta$ -G)活性显著低于 CJ 组, 总胆汁酸、总胆红素及胆固醇含量显著高于 CJ 组, 非结合胆红素及  $Ca^{2+}$  含量与 CJ 组无显著差异. 平均随访 4.5 a, STHG 组术后胆管炎发生率及胆管结石复发率显著低于 CJ 组.

结论: STHG 术后肝内胆汁成分变化有利于抑制结石生成, 对胆囊及 Oddi 括约肌功能正常的肝胆管结石患者, STHG 手术疗效优于 CJ 手术.

陈涛, 田伏洲, 张小进, 蔡忠红. 两种肝门整形术对肝内胆汁成分及结石复发的作用. 世界华人消化杂志 2004;12(1):242-243  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/242.asp>

### 0 引言

肝内胆管结石是腹部外科常见疾病, 以往多采用手术取石、胆管-空肠 Roux-Y 吻合进行治疗, 但术后结石复发率高, 是影响手术远期疗效的重要因素<sup>[1]</sup>. 由于胆管-空肠 Roux-Y 吻合破坏了胆道及消化道正常解剖结构, 使得反流性胆管炎等并发症常难以避免, 而胆道

的反流感染又进一步促进了结石的复发. 因此, 我们从 1994 年以来, 设计并应用了皮下通道型胆囊肝总管成型术(subcutaneous tunnel and hepatochoangioplasty with the use of gallbladder, STHG), 对预防肝胆管结石术后复发取得了良好的效果, 并对其与同期的皮下盲襻型肝胆管空肠吻合术(cholangio-jejunostomy, CJ)术后肝胆管胆汁成分及结石复发情况进行了研究.

### 1 材料和方法

1.1 材料 1994-12/2000-12 在本中心因肝胆管结石行手术治疗者, 共 231 例, 根据手术方式不同分为 STHG 组及 CJ 组. STHG 组 69 例, 男 31 例, 女 38 例, 平均年龄 42.3 岁(15-74 岁); CJ 组 162 例, 男 70 例, 女 92 例, 平均年龄 41.4 岁(19-72 岁).

### 1.2 方法

1.2.1 STHG 选择标准及具体手术方法见文献[2]报道.

1.2.2 胆汁成分测定 术后 4 wk 在无菌操作下由 T 管抽取肝内胆管胆汁进行细菌培养及胆汁成分测定, 包括: 总胆汁酸(TBA)和胆固醇(酶终点法)、总胆红素(TB)和非结合胆红素(UCB)(重氮试剂法)、 $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$  离子(离子选择电极直接测定法)、糖蛋白(改良 PAS 法)、 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶( $\beta$ -Glucuronidase,  $\beta$ -G)活性(ELISA).

1.2.3 随访 研究对象定期复查 B 超, 通过面询或问卷调查, 收集结石复发资料.

统计学处理 结果以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 采用 SPSS10.0 软件进行  $\chi^2$  检验、t 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有显著意义.

### 2 结果

2.1 胆汁培养 STHG 组有 4 例胆汁培养出大肠杆菌, 其余无菌生长, 阳性率 5.8%; CJ 组 76 例胆汁培养有细菌生长, 其中大肠杆菌 59 例, 肠球菌 7 例, 金黄色葡萄球菌 5 例, 其他菌种 5 例, 阳性率 46.9%.

2.2 胆汁成分变化 (1)STHG 组胆汁中总胆汁酸、总胆红素及胆固醇浓度显著高于 CJ 组; (2)STHG 组胆汁中  $K^+$ 、 $Na^+$ 、糖蛋白及  $\beta$ -G 活性显著低于 CJ 组; (3)STHG 组胆汁中非结合胆红素及  $Ca^{2+}$  离子浓度较 CJ 组无显著差异(表1).

表 1 STHG 与 CJ 术后肝内胆汁成分变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	TBA(mmol/L)	胆固醇(mmol/L)	TB(mmol/L)	UCB(mmol/L)	$K^+$ (mmol/L)	$Na^+$ (mmol/L)	$Ca^{2+}$ (mmol/L)	糖蛋白(mg/dl)	$\beta$ -G ( $\mu$ g/L)
STHG 组	70.3 $\pm$ 22.6	3.7 $\pm$ 1.1	0.74 $\pm$ 0.09	0.37 $\pm$ 0.07	5.73 $\pm$ 0.41	144.5 $\pm$ 12.6	7.9 $\pm$ 1.2	3.02 $\pm$ 0.67	97.1 $\pm$ 12.6
CJ 组	19.1 $\pm$ 5.7	2.7 $\pm$ 0.8	0.39 $\pm$ 0.08	0.32 $\pm$ 0.10	9.17 $\pm$ 0.98	203.1 $\pm$ 46.6	6.3 $\pm$ 0.9	6.14 $\pm$ 1.58	242.9 $\pm$ 29.3
P	<0.01	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05	<0.05	>0.05	<0.01	<0.01



2.3 随访结果 231例患者中共有178例获得随访(含5例死亡患者,其中3例死因为急性化脓性胆管炎,另2例其他原因死亡),随访率77.1%;平均随访时间4.5 a (2.2-8.2 a)。其中STHG组61例,CJ组117例。STHG组和CJ组术后胆管结石复发率分别为6.6%(4/61)和20.5%(24/117),胆管炎的发生率分别为8.2%(5/61)和23.1%(27/117),STHG术后胆管结石复发率及胆管炎的发生率显著低于CJ组( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

胆管-空肠 Roux-Y 吻合广泛应用于肝内胆管结石的治疗,但由于该术式破坏了胆道及消化道正常解剖结构,特别是Oddi括约肌功能的丧失,因此为了防止远期吻合口狭窄施行大口吻合使得术后反流性胆管炎常难以避免。胆道感染后 $\beta$ -G含量显著升高,以及在胆道繁殖的细菌产生的大量以糖蛋白为主要成分的粘泥在胆管结石的形成中发挥了重要作用<sup>[3-5]</sup>。STHG手术的优点则在于保留了正常Oddi括约肌的结构及功能,从而减少了胆管反流感染的发生。由本研究可见STHG术后胆汁细菌培养阳性率、糖蛋白含量及 $\beta$ -G活性显著低于CJ组;在术后随访过程中,CJ组胆道结石复发率为20.5%,与周泽民 et al<sup>[6]</sup>研究结果相似,但STHG组胆道结石复发率及胆管炎发生率均显著低于CJ组。说明STHG术式保留了正常的Oddi括约肌结构及功能,明显优于CJ组依靠延长空肠肠襻的抗反流作用,对预防肝内胆管结石复发具有重要作用。

STHG手术将胆囊作为术后远期结石复发再处理的预留通道,术后肝内胆管胆汁总胆汁酸浓度显著高于CJ组, $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 等无机盐离子浓度显著降低,说明胆囊黏膜仍具有正常的浓缩功能,胆囊收缩时胆囊内部分高浓度的胆汁酸进入肝内胆管,与非结合胆红素竞争结合 $\text{Ca}^{2+}$ 离子形成可溶性钙盐,肝内胆管胆汁成分总体向抑制成石的方向变化,使得结石复发率降低。

STHG手术由于保留了胆囊、肝外胆管及Oddi括约肌的功能,不改变胆汁的正常生理流向并有效防止了胆道反流感染的发生,从而降低了反流性胆管炎发生率及胆道结石复发率,对于胆囊和Oddi括约肌功能正常的患者是一种较为理想的治疗肝胆管结石的新术式。

### 4 参考文献

- 1 黄志强. 黄志强胆道外科手术学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1995:84-88
- 2 田伏洲, 赵铁军, 胡建中, 苗建国, 李旭, 蔡忠红, 张炳印, 阚和平, 刘伟, 胡兵, 汪涛. 皮下通道型胆囊肝胆管成形术治疗肝胆管结石和狭窄. 中华外科杂志 1997;35:28-30
- 3 Swidsinski A, Lee SP. The role of bacteria in gallstone pathogenesis. *Front Biosci* 2001;10:E93-E103
- 4 Chen CY, Shiesh SC, Tsao HC, Lin XZ. Human biliary beta-glucuronidase activity before and after relief of bile duct obstruction: is it the major role in the formation of pigment gallstones? *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:1071-1075
- 5 Stewart L, Ponce R, Oesterle AL, Griffiss JM, Way LW. Pigment gallstone pathogenesis: slime production by biliary bacteria is more important than beta-glucuronidase production. *J Gastrointest Surg* 2000;4:547-553
- 6 周泽民, 喻纳勇, 李朝龙, 周杰, 廖彩仙. 肝内胆管复发结石的调查及分析. 中国普外基础与临床杂志 2000;7:318-320

## 门静脉癌栓形成与肝脏供血特性的关系

吴志全, 樊嘉, 邱双健, 周俭, 沈忠培, 马爱英, 汤钊猷

吴志全, 樊嘉, 邱双健, 周俭, 汤钊猷, 复旦大学肝癌研究所, 中山医院, 上海市肝肿瘤临床医学中心 上海市 200032  
沈忠培, 中山医院浦南肝肿瘤诊疗中心 上海市 200125  
马爱英, 中山医院 455 医院肝肿瘤诊疗中心 上海市 200052  
项目负责人: 吴志全, 200032, 上海市医学院路 136 号, 中山医院, 上海市肝肿瘤临床医学中心.  
电话: 021-64041990-2903 传真: 021-64037181  
收稿日期: 2003-06-30 接受日期: 2003-09-24

### 摘要

目的: 探讨肝细胞癌易伴门静脉癌栓形成与肝脏供血方式的关系。

方法: 1998-01/2001-12 疑有门静脉癌栓形成的肝癌患者 231 例行肝动脉 DSA 血管造影, 造影全程录像, 分析门

静脉癌栓与瘤内外动静脉漏、门静脉反流, 有无肝硬化等关系, 结果用 $\chi^2$ 检验进行统计处理。

结果: 全部231例都发现瘤内存在肝动脉-门静脉漏(HAPVF)。伴门静脉癌栓形成 201 例, 其中伴有肝硬化 184 例, 无明显肝硬化 17 例。伴有明显瘤外 HAPVF 者 31 例门静脉主干均在动脉造影早期显影, 无门静脉主干癌栓。肝内肿瘤单发占 94%, 肝外转移占 9.7%。无明显瘤外 HAPVF 者 170 例门静脉主干癌栓占 22.5%, 肿瘤多发占 21%, 肝外转移占 3.5%。

结论: 肝脏的特殊血供是 HAPVF 形成的基础, 瘤内 HAPVF 是门静脉从肿瘤供应血管之一变为出瘤血管从而形成门静

脉癌栓的重要原因,肝硬化重者常伴明显瘤外动静脉漏、与无硬化者相比肝内转移率高而肝外转移率低。

吴志全,樊嘉,邱双健,周俭,沈忠培,马爱英,汤钊猷.门静脉癌栓形成与肝脏供血特性的关系.世界华人消化杂志 2004;12(1):243-244

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/243.asp>

## 0 引言

肝细胞癌伴门静脉癌栓(PVTT)的发生率高达62.9-90.0%<sup>[1]</sup>.门静脉癌栓形成是肝癌血行播散、转移复发的主要病理基础.肝细胞癌易形成门静脉癌栓的因素很多,作者等认为伴门静脉癌栓肝癌患者行数字减影(DSA)肝血管造影时发现肝脏的特殊供血方式可能是肝癌易伴门静脉癌栓形成的重要原因之一。

## 1 临床资料

1998-01/2001-12连续对CT或超声疑有门静脉癌栓的患者常规行肝动脉数字减影血管造影,后经病理证实为肝细胞癌者231例;男214例,年龄31-67(中位44.8岁);女17例,年龄34-69(中位48.4岁).AFP(+)210例,HBV(+)225例,伴肝硬化211例,其中肝脏严重硬化萎缩者148例,无肝硬化20例.用unipeque为造影剂,1-2 mL/kg,注射3.5 mL/s,在注射造影剂开始至肝脏实质显影结束整个肝血管显影过程用录像法记录,术后仔细分析录像并将典型图像摄片保存,供汇总分析。

统计学处理  $\chi^2$  检验

## 2 结果

DSA肝血管造影证实231例中201例伴门静脉一、二级分支或主干癌栓,其中伴肝硬化184例,无肝硬化17例.231例都发现瘤内明显存在肝动脉-门静脉漏(HAPVF),瘤体越大HAPVF越多,而且在动脉造影早期即已显示.有明显瘤外HAPVF31例伴,其中伴肝硬化30例,无肝硬化1例,门静脉主干均在动脉造影早期显影,严重者肠系膜上静脉、胃冠状静脉及肝门部曲张的门静脉侧支均显影,门静脉主干内无造影剂填充缺损.肝内肿瘤单发29例,占94%,3例有肝外转移,占9.7%.无瘤外HAPVF者170例中有门静脉

主干癌栓45例,占22.5%( $P < 0.05$ ),其中有肝硬化29例,无肝硬化16例.肝内肿瘤多发42例,占21%,伴肝外转移7例,占3.5%,与有明显瘤外HAPVF者相比差异显著( $P < 0.05$ ).有明显瘤外HAPVF者中门静脉主干癌栓形成比例明显低于无瘤外HAPVF者( $P < 0.05$ ).

## 3 讨论

形成门静脉癌栓的基本条件为肿瘤侵入血管腔和其内血流动力学适合肿瘤寄居与增生.本组资料显示所有患者瘤内都有明显的HAPVF,瘤体越大HAPVF越多,部分伴有明显的瘤外HAPVF,且瘤外HAPVF越明显门静脉反流越严重,肝内转移也越多,但门静脉主干癌栓形成反而较少,明显不同于其他类型的肝脏肿瘤,这是与肝细胞肝癌的供血方式有关。

肝血窦由肝动脉和门静脉双重供血并由肝静脉回心后经小循环入肺.肝动脉和门静脉在伴行途中有广泛的动静脉吻合,抵达血窦前更甚,终以动静脉混合血形式进入血窦从而使其内压力保持平衡,这种吻合就是微小的HAPVF<sup>[2]</sup>.肝脏发生广泛弥漫性病变使肝血窦或其前后阻力增高时促使肝动脉自动调节增加流速、流量,迫使这些吻合扩大,形成了肝血窦外HAPVF.肝细胞与肝血窦间既无严密屏障、肝细胞癌灶结构又疏松、故癌组织极易脱落进入肝血窦.较大癌块进入血窦即可将毛细肝静脉入口堵塞造成肝静脉血液回流障碍从而使肝血窦内压力增高,当血窦内压超过终末门静脉压时其内的血液和癌组织必将倒流入终末门静脉并逐渐向分支和主干推移,于是门静脉由供应血管变成了出瘤血管.癌组织在富营养、高黏度、低压力、低流速的门静脉内得以快速增生形成癌栓并可不断扩大延伸.明显瘤外HAPVF使门静脉近端压力异常升高,既阻止癌栓向主干延伸又使出瘤门静脉血流向邻近属支而造成肝内转移。

## 4 参考文献

- 1 汤钊猷.肝癌转移复发的基础与临床.第1版.上海:上海科技教育出版社,2003:346
- 2 吴志全,夏景林,邱双健.正常肝脏微循环及研究进展.中国微循环 1999;3:10-12

# 环氧合酶-2表达与幽门螺杆菌相关性胃十二指肠疾病

宋家锋, 严荣华

宋家锋, 严荣华, 杭州市萧山区第一人民医院消化内科 浙江省杭州市 311201  
项目负责人: 宋家锋, 311201, 浙江省杭州市萧山区市心南路 199 号, 杭州市萧山区第一人民医院消化内科. songjiafeng66@msn.com  
电话: 0571-82371653  
收稿日期: 2003-08-08 接受日期: 2003-09-24

## 摘要

目的: 探讨环氧合酶-2(COX-2)表达与幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)相关性胃十二指肠疾病的关系, 并通过抗菌治疗评价根除Hp感染对胃窦黏膜中COX-2表达的影响。

方法: 用免疫组化方法半定量检测264例经胃镜和组织病理学检查患有十二指肠球部溃疡、胃溃疡、复合性溃疡、胃癌、单纯性慢性胃炎及胃黏膜正常者的胃窦黏膜COX-2蛋白的表达, 比较Hp感染与非感染者之间的差异。对检出的35例Hp<sup>+</sup>的单纯慢性胃炎进行Hp<sup>+</sup>抗菌根除治疗, 比较根除前后胃窦黏膜COX-2蛋白的表达变化。根据2000-05全国慢性胃炎研讨会共识意见(江西·井冈山)对胃黏膜炎症、活动性、异型增生、肠化生和Hp<sup>+</sup>密度进行半定量测定。

结果: 胃黏膜表面上皮、腺上皮细胞和固有层间质细胞的胞质中可见COX-2蛋白表达, 但阳性染色细胞多集中在表层上皮。253例患者中, 143例Hp<sup>+</sup>者(56.5%) COX-2平均阳性细胞率显著高于110例Hp<sup>-</sup>者(43.5%,  $P=0$ ), 各疾病组Hp<sup>+</sup>患者的COX-2平均阳性细胞率均显著高于Hp<sup>-</sup>者( $P=0$ ), 各疾病组Hp<sup>+</sup>患者COX-2平均阳性细胞率也均显著高于正常对照组( $P<0.05$ )。27例Hp<sup>+</sup>根除后的胃黏膜COX-2平均阳性细胞率明显下降( $P=0$ ), 但仍明显高于正常对照组( $P=0$ )。不同程度胃炎间、以及活动性胃炎与非活动性胃炎之间胃窦黏膜COX-2平均阳性细胞率均有显著差异( $P=0$ ), 与正常对照组比较, 慢性胃炎仅伴有活动性75例, 异型增生5例, 肠化生13例的胃窦黏膜COX-2阳性细胞率明显增加, 并以异型增生组最高。COX-2表达与Hp<sup>+</sup>感染密度和慢性炎症程度密切相关, 分别为( $r_s=0.780$ ,  $P<0.01$ ;  $r_s=0.686$ ,  $P<0.05$ )。

结论: Hp<sup>+</sup>感染导致胃黏膜COX-2表达升高, 且与Hp<sup>+</sup>感染密度、炎症程度密切相关。根除Hp<sup>+</sup>后COX-2明显下降, 但仍明显高于正常对照组, Hp<sup>+</sup>的各种胃十二指肠疾病的胃窦黏膜COX-2表达也较正常对照组高; 肠化生和异型增生的COX-2表达均明显升高, 推测COX-2表达升高与良恶性胃十二指肠病的发生发展有密切关系。

宋家锋, 严荣华. 环氧合酶-2表达与幽门螺杆菌相关性胃十二指肠疾病. 世界华人消化杂志 2004;12(1):245-246  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/245.asp>

## 0 引言

探讨环氧合酶-2(COX-2)表达与幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)相关性胃十二指肠疾病的关系, 并通过抗菌治疗评价根除Hp<sup>+</sup>感染对胃窦黏膜中COX-2表达的影响。

## 1 材料和方法

1.1 材料 2001-08/12因上腹不适来医院内镜中心作胃镜检查并同时行病理活检者264例。其中有病变者253例, 男171例, 女82例, 年龄14-82( $46 \pm 15$ )岁, 包括十二指肠溃疡(DU)61例, 胃溃疡(GU)63例, 复合性溃疡(CU)28例, 胃癌(Gca)46例, 单纯性慢性胃炎(CG)55例。快速尿素酶和组织学美蓝染色检测均阳性者为Hp<sup>+</sup>感染(Hp<sup>+</sup>), 两项均阴性者非Hp<sup>+</sup>感染(Hp<sup>-</sup>)。另11例为正常对照组, 男8例, 女3例, 年龄22-61( $36 \pm 11$ )岁, 胃镜未见异常, Hp<sup>-</sup>和胃窦黏膜组织学正常。253例患者中Hp<sup>+</sup>143例, 其中单纯CG35例, DU38例, GU31例及CU21例, Gca18例; Hp<sup>-</sup>110例, 其中单纯CG20例, DU23例, GU32例及CU7例, Gca28例。在所有207例胃黏膜慢性炎症(含溃疡)患者中, 轻度CG54例, 中度CG123例, 重度CG30例; 活动性93例, 非活动性114例。35例Hp<sup>+</sup>的单纯CG患者按照说明书给以期为2wk的丽珠胃三联根除Hp<sup>+</sup>治疗, 治疗结束后4wk进行内镜复查, 快速尿素酶试验和组织学检测均阴性者为Hp<sup>+</sup>根除。

1.2 方法 内镜检查时均于胃镜直视下在距离幽门2-3cm范围内大小弯或前后壁共取4块活检标本。1块用于快速尿素酶试验, 另3块行组织切片(GU及Gca患者先在病灶外胃窦部取4块活检标本, 再取溃疡或癌组织, 分瓶装入送病理学检查)。内镜活检标本经甲醛固定、石蜡包埋、切片备用, 病理学检查用HE染色, Hp<sup>+</sup>检查用美蓝染色, COX-2蛋白表达按照说明书采用免疫组化二步法染色。根据2000-05全国慢性胃炎研讨会共识意见(中华消化杂志 2000;20:199), 将慢性炎症、活动性、萎缩、肠化、异型增生、Hp<sup>+</sup>密度分别分成0, 1, 2, 3级。

统计学处理 应用SPSS软件统计包对数据进行处理, 采用正态性检验、方差齐性检验Student t检验、t'检验, 方差分析、Wann-Whitney U检验, Sperarman秩相关检验,  $P<0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

胃黏膜表面上皮、腺上皮细胞和固有层间质细胞的胞质中可见COX-2蛋白表达, 但阳性染色细胞多集中在

表层上皮. 在253例患者中,  $\text{Hp}^+$ 者COX-2平均阳性细胞率( $50.0 \pm 13.7\%$ )显著高于 $\text{Hp}^-$ 者( $17.0 \pm 7.0\%$ ,  $P=0$ ), 各疾病组 $\text{Hp}^+$ 者的COX-2平均阳性细胞率均显著高于 $\text{Hp}^-$ 者( $P=0$ ), 各疾病组 $\text{Hp}^-$ 者COX-2平均阳性细胞率也均显著高于正常对照组( $8.1 \pm 5.7\%$ ,  $P<0.05$ ). 27例H pylori根除后的胃黏膜COX-2平均阳性细胞率明显下降( $54.9 \pm 11.6\% \rightarrow 27.7 \pm 12.7\%$ ,  $P=0$ ), 但仍明显高于正常对照组( $P=0$ ). 不同程度胃炎间、以及活动性胃炎( $48.0 \pm 16.1\%$ )与非活动性胃炎( $31.8 \pm 19.9\%$ )之间胃窦黏膜COX-2平均阳性细胞率均有显著差异( $P=0$ ), 与正常对照组比较, 慢性胃炎仅伴有活动性75例( $48.4 \pm 16.4\%$ ), 异型增生5例( $52.8 \pm 18.3\%$ ), 肠化生13例( $29.8 \pm 16.6\%$ )的胃窦黏膜COX-2阳性细胞率明显增加, 并以异型增生组最高. COX-2表达与H pylori感染密度和慢性炎症程度密切相关, 分别为( $r_s=0.780$ ,  $P<0.01$ ;  $r_s=0.686$ ,  $P<0.05$ ).

### 3 讨论

COX是一膜结合蛋白, 目前发现有两个同工酶-COX-1和COX-2. COX-1为原生型, 而COX-2为诱生型. 本结果表明, 所有 $\text{Hp}^+$ 者COX-2蛋白表达明显高于 $\text{Hp}^-$ , 对各疾病分析也证明,  $\text{Hp}^+$ 高于 $\text{Hp}^-$ ; 根除H pylori后COX-2表达明显下降, 并且COX-2表达增加与慢性炎症的程度相关, 提示H pylori感染增加COX-2表达. Sung et al<sup>[1]</sup>研究显示根除H pylori 1 a后随着胃黏膜炎症的消退, 固有层的单核细胞、成肌纤维细胞、内皮细胞的COX-2表达明显下降, 而胃黏膜上皮细胞的COX-2表达只是中度减少, 提示上皮细胞的COX-2持续增加不

是由炎症因素单独引起, 根除H pylori后胃内环境的其他因素也起作用. 一般认为, 抑制COX-1活性可致正常胃黏膜损害; 而抑制COX-2活性很少引起胃黏膜损害. 我们发现COX-2表达增加与慢性炎症程度密切相关; 随着H pylori的根除, 活动性胃炎消除, 慢性炎症程度减轻, 胃黏膜COX-2的表达也明显减少; 近年来研究表明, COX-2在肿瘤中表达升高. 动物实验发现, COX-2的表达增加了 $\text{PGE}_2$ 的合成, 后者诱导细胞增生并刺激Bcl-2蛋白表达, 从而抑制细胞凋亡; 另外COX-2增加并与核内凋亡/自身免疫相关蛋白nucleobindin (Nuc, 核结合素)相作用, 使COX-2保留于内质网促进细胞有丝分裂, 使细胞增生加速, 增加肿瘤形成的机率. 癌细胞中由COX-2合成的 $\text{PGE}_2$ 能抑制肿瘤细胞的局部免疫反应; 对细胞外基质的黏附增强; 调节肿瘤细胞相关的新生血管的形成; 增加癌细胞的侵袭性; 激活基质金属蛋白酶-2降解细胞外基质, 通过产生的促血小板凝集的血栓烷有利于肿瘤的转移, COX-2可催化花生四烯酸代谢产生丙二醛, 从而直接激活原癌基因或引起P53等抑癌基因的突变.

致谢: 本文承蒙广西医科大学第一附属医院消化内科陈振依、洪瑞香和唐国都等教授的热忱支持和大力协助, 在此, 谨致以衷心的感谢!

### 4 参考文献

- 1 Sung JJ, Leung WK, Go MYY, To KF, Cheng ASL, Ng EKW, Chan FKL. Cyclooxygenase-2 expression in *Helicobacter pylori*-associated premalignant and malignant gastric lesions. *Am J Pathol* 2000;157:729-735

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

## 幽门螺杆菌粪便抗原快检卡在对Hp根除治疗后检测的评价

郭红, 李宜辉, 赵晓晏, 张朋彬, 达四平, 柏健鹰, 王雷, 李春花

郭红, 李宜辉, 赵晓晏, 张朋彬, 达四平, 柏健鹰, 王雷, 李春花, 中国人民解放军第三军医大学附属新桥医院消化内科 重庆市 400037  
项目负责人: 李宜辉, 400037, 重庆市沙坪坝区, 中国人民解放军第三军医大学附属新桥医院消化内科. haoguo11@yahoo.com  
电话: 023-68774604 传真: 023-68755604  
收稿日期: 2003-08-23 接受日期: 2003-09-18

### 摘要

目的: 对幽门螺杆菌(Hp)粪便抗原(HpSA)快检卡在Hp根除治疗后感染检测中的临床应用价值进行评价.

方法: 以快速尿素酶试验及组织学检查两项阳性作为诊断

Hp标准, 采用HpSA法和 $\text{C}^{14}$ -尿素呼气试验( $\text{C}^{14}$ -UBT)同时对102例Hp阳性并行根除治疗后患者进行检测, 从Hp感染检测的特异性、敏感性、准确性方面, 将HpSA与 $\text{C}^{14}$ -UBT进行比较与评价.

结果: 根除治疗后4 wk随访,  $\text{C}^{14}$ -UBT和HpSA的敏感性分别为95.2%、81.0%, 特异性分别为100%、98.7%, 准确性分别为99.0%、95.1%.

结论: 虽然HpSA快检卡检测根除后Hp感染的准确性稍低于 $\text{C}^{14}$ -UBT, 但HpSA快检卡仍是一种操作简便、准确、

## 非侵入性的诊断Hp感染的方法.

郭红, 李宜辉, 赵晓曼, 张朋彬, 达四平, 柏健鹰, 王雷, 李春花. 幽门螺杆菌粪便抗原快检卡在对Hp根除治疗后检测的评价. 世界华人消化杂志 2004;12(1):246-248

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/246.asp>

## 0 引言

随着幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染在胃十二指肠疾病中作用认识的提高, 根治Hp感染已经成为治疗慢性胃炎和消化性溃疡的重要环节, 但经过根除治疗后Hp感染的复发率或再感染率呈上升趋势, 因此, Hp根除治疗后随访检测十分必要. 目前, 临床检查Hp感染的方法较多, 快速尿素酶试验, 组织学检查等侵入性检测方法容易给患者带来痛苦,  $^{13}\text{C}$ 或 $^{14}\text{C}$ 尿素呼气试验( $^{13}\text{C}/^{14}\text{C}$ -urea breath test,  $^{13}\text{C}/^{14}\text{C}$ -UBT)等非侵入性的检测方法因各自的局限作为临床常规检测受到一定限制, 而国内外所报道的检测粪便Hp抗原(Hp stool antigen, HpSA)的一种非侵入性新方法, 具有快速、简便、标本易收集等优点. 目前, 关于HpSA的检测国内有报道. 近期, Meridian公司推出了一种更为简易的检测方法, HpSA免疫快检卡(ImmunoCard STAT HpSA), 现国内暂无相关报道. 本研究采用HpSA免疫快检卡检测法对Hp根除治疗后患者进行随访检测, 以快速尿素酶试验及组织学检查作为诊断标准, 将HpSA快检卡与 $\text{C}^{14}$ -UBT进行比较, 以评价HpSA快检卡在Hp检测根除治疗后感染检测中的临床应用价值.

## 1 材料和方法

1.1 材料 因上消化道症状在我院门诊及住院就诊的患者102例, 其中男63例, 女39例, 年龄19-68岁, 4 wk内未服用抗生素、铋剂、 $\text{H}_2$ 受体抑制剂、质子泵抑制剂者以及常规服用激素或非甾体类抗炎药者等, 同时无严重肝病或肾病者. 其中慢性胃炎50例, 消化性溃疡52例, 均为Hp阳性.

1.2 方法 所有病例在胃镜下取出胃窦部黏膜行快速尿素酶试验和组织学检查. Hp阳性临床诊断标准: 在快速尿素酶试验、Hp组织学检查中均阳性者则判定为Hp阳性. 其后, Hp阳性者接受三联根除治疗(奥美拉唑、阿莫西林或甲硝唑、克拉霉素, 疗程1 wk), 完成上述方案后4-6 wk行胃镜检查(快速尿素酶试验、组织学检查)、 $^{14}\text{C}$ -UBT检查和HpSA检测. Hp阳性临床诊断标准同上.

1.2.1 HpSA快检卡检测 患者于胃镜检查当日早晨留取粪便标本, 采用一步法快检卡检测粪便中Hp抗原. 检测试剂盒由Meridian公司提供, 参照试剂盒说明书进行操作, 简要步骤如下: 取少量粪便标本至专门的样本稀释液瓶中并混匀, 在已用抗体包被的微孔板中加入稀释的粪便4滴, 室温5 min后读取结果. 此实验与胃黏膜活检标本的快速尿素酶试验、组织学检查由不同

检查者承担, 结果互盲.

1.2.2  $^{14}\text{C}$ -UBT 患者于胃镜检查后2 h口服 $^{14}\text{C}$ -尿素胶囊一粒, 25 min后收集呼气样本, 于HTY1001 Hp测试仪(深圳市海得威生物科技有限公司)上行样本 $^{14}\text{C}$ 放射性活度测定,  $^{14}\text{C}$ -UBT  $\geq 100\text{dpm}/\text{mmol CO}_2$ 时为Hp阳性.

统计学处理 以快速尿素酶试验、组织学为标准, 分析HpSA和 $^{14}\text{C}$ -UBT在根除治疗后诊断Hp感染的敏感性和特异性.

## 2 结果

102例患者完成疗程后4-6 wk接受胃镜检查、 $^{14}\text{C}$ -UBT和HpSA, 平均根除率达到79.4%(81/102例). 根除治疗后 $^{14}\text{C}$ -UBT和HpSA结果一致者为96例, 其中均为阴性者80例; 均为阳性者16例; 二者结果不一致者为6例, 其中UBT阳性, HpSA阴性者4例; UBT阴性, HpSA阳性者2例. 以Hp阳性临床诊断标准为金标准, 此6例中真阳性者为5例, 真阴性者为1例. 根除治疗后( $n=102$ ) $^{14}\text{C}$ -UBT和HpSA的敏感性分别为95.2%(20/21)、81.0%(17/21), 特异性分别为100%(81/81)、98.7%(80/81), 准确性分别为99.0%(101/102)、95.1%(97/102).

## 3 讨论

随着Hp的发现, 与其相关的胃十二指肠疾病的研究已取得了很大进展, 现已确认Hp是慢性胃炎和消化性溃疡的主要致病因子, 并且是胃癌与淋巴瘤的诱发因素之一, 国际癌症研究中心(IARC)已将其列为I类致癌因子. 因此, 临床上对于有Hp感染的患上消化道疾病的患者常规行Hp根除治疗是非常必要的. 目前临床上用于诊断Hp感染的方法分为侵入性和非侵入性两大类, 如尿素酶试验, 组织学检查、培养, 血清学试验, 尿素呼气试验, PCR等方法. 但由于侵入性检查必须行胃镜下取活检标本, 但该项检查对于不能耐受胃镜检查的患者及Hp根除后的随访患者难以接受; 而血清学检查在Hp根除后血中抗体可长时间维持在阳性水平, 故其阳性不能完全肯定患者有活动性感染, 阴性也不能排除初期的感染, 故只能用于流行病学筛查; 总之在Hp根除后的随访中难以进行.  $^{13}\text{C}/^{14}\text{C}$ -UBT具有很高的准确性, 且能反映Hp的活动性感染, 但 $^{13}\text{C}$ -UBT检测仪器昂贵,  $^{14}\text{C}$ -UBT有放射性, 故而应用都受到一定限制.

1997年, 国外开发出非侵入性Hp粪便抗原检测方法, 采用抗Hp多克隆抗体检测粪便中的Hp抗原, 国内外均报道其检测结果具有很高的准确性和可靠性<sup>[1]</sup>; 与 $^{14}\text{C}$ -UBT相比, 二者的敏感性和特异性均接近95%, 且可重复性好; 虽然二者在根除后随访中的评价尚存在不同的观点, 但仍被认为是评价Hp根除后惟一可靠的非侵入性评价标准<sup>[2]</sup>. Meridian公司提供的HpSA快检卡是一种基于横向流动的色谱技术, 使用高效的单克隆抗体在5 min内分析检测人粪便中的Hp抗原. 本研究

比较了Hp根除治疗后<sup>14</sup>C-UBT和HpSA快检卡检测的敏感性和特异性,结果表明<sup>14</sup>C-UBT和HpSA快检卡的敏感性分别为95.2%、81.0%,特异性分别为100%、98.7%,准确性分别为99.0%、95.1%;与欧洲的多中心、大样本(458例)的结果相似<sup>[3]</sup>。提示,HpSA快检卡在Hp根除后随访方面的准确性稍低于<sup>14</sup>C-UBT,可能是由于UBT较HpSA的敏感性更高导致。但在临床上,在选择何种实验作为监测根除治疗后Hp感染的最好方法之前,除了考虑实验方法的准确性以外,其他因素如患者的依从性、费用、可行性、地区性等也应考虑在内。HpSA留取标本容易,且有专门的样本稀释液易于滴加,操作简便、省时、无创,具有很强的适时性,适合常规检查,尤其适合幼儿、孕妇、年老体弱者的Hp感染的诊断及Hp根除后的随访,值得临床推广应用<sup>[4-5]</sup>。

#### 4 参考文献

- 1 Hu F, Cheng H, Li J. Evaluation and comparison of the *Helicobacter pylori* stool antigen test and the gastric mucosal antigen test. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2000;80:820-822
- 2 Vaira D, Malfertheiner P, Megraud F, Axon AT, Deltenre M, Hirschl AM, Gasbarrini G, O'Morain C, Garcia JM, Quina M, Tytgat GN. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. HpSA European study group. *Lancet* 1999;354:30-33
- 3 Perri F, Manes G, Neri M, Vaira D, Nardone G. *Helicobacter pylori* antigen stool test and <sup>13</sup>C-urea breath test in patients after eradication treatments. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2756-2762
- 4 van Doorn OJ, Bosman DK, van't Hoff BW, Taminiau JA, ten Kate FJ, van der Ende A. *Helicobacter pylori* Stool Antigen test: a reliable non-invasive test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:1061-1065
- 5 Koletzko S, Feydt-Schmidt A. Infants differ from teenagers: use of non-invasive tests for detection of *Helicobacter pylori* infection in children. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:1047-1052

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

## 贵阳兰州地区儿童幽门螺杆菌流行病学调查

朱 键, 周 力, 陈晓琴, 谭玉洁, 陈玉梅, 李淑惠, 张 华, 保 铭

朱键, 周力, 陈晓琴, 谭玉洁, 陈玉梅, 贵阳医学院附属医院消化内科 贵州省贵阳市 550004  
李淑惠, 张华, 贵州省妇幼保健院 贵州省贵阳市 550000  
保铭, 甘肃省兰州市城关区第三医院 甘肃省兰州市 730030  
项目负责人: 周力, 贵州省贵阳市云岩区北京路9号, 贵阳医学院附属医院消化内科。  
电话: 0851-6855119-3026  
收稿日期: 2003-06-17 接受日期: 2003-08-18

### 摘要

目的: 了解贵阳兰州两城市儿童幽门螺杆菌(Hp)感染状况。探讨儿童幽门螺杆菌感染与儿童疾病间关系。

方法: 采用金标免疫斑点法对1 388例儿童进行血清抗Hp-IgG、抗Hp-IgM检测。

结果: (1) IgG及IgM总阳性率分别为: 44.0%和26.2%。其中贵阳地区IgG及IgM阳性率分别为: 40.7%和25.0%。而兰州地区分别为: 52.3%和29.0%。(2)两地区儿童IgG阳性率随年龄增加而增加( $P < 0.01$ )。贵阳地区与兰州地区儿童在6、10岁儿童IgG阳性率有差异( $P < 0.05$ ); 有消化道症状儿童与体检健康组儿童IgM阳性率比较有显著差异( $P < 0.05$ )。(4)两地区男女儿童及各民族间儿童IgG及IgM阳性率无显著差异( $P > 0.05$ )。

结论: (1)贵阳, 兰州两地区儿童Hp感染率较高, 且随年龄增长而增加; 兰州地区Hp感染高于贵阳地区; 兰州地区儿童3-6岁年龄段Hp感染明显高于贵阳地区同年龄组段

Hp感染。(2)有消化道症状, 荨麻疹, 贫血儿童与Hp感染有关。(3)男女儿童Hp感染无显著差异。在儿童中民族间Hp感染无显著差异。

朱键, 周力, 陈晓琴, 谭玉洁, 陈玉梅, 李淑惠, 张华, 保铭. 贵阳兰州地区儿童幽门螺杆菌流行病学调查. 世界华人消化杂志 2004;12(1):248-251  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/248.asp>

### 0 引言

1983年澳大利亚学者Warren和Mashall报告了从人胃黏膜中分离了幽门螺杆菌(Hp), 各国学者对该菌在基础与临床研究方面取得了重大进展。从成人中获得流行病学资料显示: 人的一生中感染Hp最主要年龄阶段在儿童期<sup>[1]</sup>。可见, 儿童是受Hp侵袭的最危险因素。Hp感染与胃癌和胃淋巴瘤的发生有密切关系, 1994年世界卫生组织已将其确定为I类致癌因子。因此为了解Hp在胃癌低发区(贵阳)及胃癌高发区(兰州)<sup>[2]</sup>儿童Hp感染情况及与儿童疾病间关系, 2001-09/2002-11我们采用快速金标斑点免疫试验对1 388例疾病和健康儿童进行Hp流行病学调查, 报道如下:

### 1 材料和方法

1.1 材料 被调查儿童1 388例来源于医院门诊患儿, 住院患儿及体检儿童, 其中体检儿童归为无症状体检儿



童(即为对照组), 年龄为 0-14 岁. 贵阳儿童为 988 例, 男性儿童 571 例, 女性儿童 417 例; 兰州儿童为 400 例, 男性儿童 212 例, 女性儿童 188 例. 有消化道症状组主要表现为慢性腹痛, 腹泻, 恶心, 呕吐, 厌食, 上消化道出血等.

1.2 方法 采集肘静脉血 2 mL, 经离心机 1 000 转/min 离心 5 min 后获得血清, 立即放入 -20 ℃ 保存, 分 5 批应用快速金标免疫斑点法检测抗 Hp-IgG 及抗 Hp-IgM. 试剂盒由福建蓝波公司提供, 检测敏感性>95%, 特异性>85%. 抗 Hp-IgG 阳性表示 Hp 感染, 抗 Hp-IgM 阳性表示 Hp 现感染.

统计学处理 Hp 阳性率由百分数表示, 将所测的结果输入 586 计算机. 应用 SPSS10.5 版统计软件包进行统计学处理, 方法  $\chi^2$  检验、 $\chi^2$  趋势检验.

## 2 结果

2.1 在 1 388 例受检儿童中, 血清抗 Hp-IgG 阳性 610 例, 总阳性率为 44.0%; 血清抗 Hp-IgM 阳性 363 例, 总阳性率为 26.2%. 贵阳地区儿童血清抗 Hp-IgG 与抗 Hp-IgM 阳性率分别为 40.7%, 25.0%; 兰州地区儿童血清抗 Hp-IgG 与抗 Hp-IgM 阳性率分别为 52.3%, 29.0%. 兰州地区儿童 Hp 感染明显高于贵阳地区儿童 Hp 感染, 差异有显著性( $P < 0.01$ ); 而现感染两地区无显著性差异

( $P > 0.05$ ).

2.2 将两地区 0-14 岁儿童分别分为 5 个年龄段, 即小于 1 岁, 3 岁, 6 岁, 10 岁, 14 岁, 应用  $\chi^2$  趋势检验; 贵阳、兰州两地区儿童不同年龄段血清抗 Hp-IgG、抗 Hp-IgM 结果(表 1)显示: 在大于 1 岁后抗 Hp-IgG 阳性率随年龄增长而增长( $P < 0.01$ ). 其中贵阳地区小于 1 岁组 IgG 抗体阳性 68 例均为小于 6 月龄乳儿, 兰州地区<1 岁组抗体阳性 12 例均为小于 6 月龄乳儿, 提示婴儿期抗体可经胎盘由母体获得. 两地区间同年龄段儿童 Hp-IgG 抗体阳性率对比, 在 6 岁和 10 岁年龄段有显著差异( $P < 0.05$ ). 贵阳地区儿童抗 Hp-IgM 抗体阳性率随年龄增加而增长( $P < 0.01$ ), 而兰州地区儿童除小于 1 岁年龄段抗 Hp-IgM 抗体阳性率低以外, 其他年龄段组抗 Hp-IgM 抗体阳性率无显著性差异( $P > 0.05$ ); 在年龄段组儿童两地区间比较中兰州地区儿童 3 岁, 6 岁年龄段组抗 Hp-IgM 抗体阳性率高于贵阳同年龄段组( $P < 0.05$ ); 而贵阳地区儿童 14 岁年龄段组抗 Hp-IgM 抗体阳性率高于兰州地区同年龄段组( $P < 0.05$ ).

2.3 两地区儿童无症状体检组与疾病组抗 Hp-IgG 及抗 Hp-IgM 结果(表 2、3):

结果表明:有消化道症状, 缺铁性贫血, 荨麻疹儿童 Hp 感染率与无症状体检组儿童 Hp 感染率有差异( $P < 0.05$ ); 兰州地区儿童有消化道症状者 Hp 感染率(62.1%)高于贵

表 1 贵阳、兰州两地不同年龄段儿童抗 Hp-IgG、Hp-IgM 阳性率

年龄段(岁)	贵阳地区			兰州地区		
	检测(n)	IgG 阳性 n (%)	IgM 阳性 n (%)	检测(n)	IgG 阳性 n (%)	IgM 阳性 n (%)
<1	175	68 (38.9%)	9 (5.1%)	22	12 (54.5%)	1 (4.5%)
3	188	33 (17.6%)	28 (14.9%)	55	16 (29.1%)	15 (27.3%) <sup>a</sup>
6	197	48 (24.4%)	44 (22.3%)	149	63 (42.3%) <sup>a</sup>	49 (32.9%)
10	235	120 (51.1%)	81 (34.5%)	80	53 (66.2%) <sup>a</sup>	22 (27.5%)
14	193	133 (68.9%)	85 (44.0%)	94	65 (69.1%)	29 (30.9%)
合计	988	402 (40.7%)	247 (25.0%)	400	209 (52.3%)	116 (29.0%)

<sup>a</sup> $P < 0.05$  示两地区同年龄段组比较.

表 2 贵阳地区儿童无症状体检组与疾病组抗 Hp-IgG 及抗 Hp-IgM 阳性率

分组	抗 Hp-IgG 结果			抗 Hp-IgM 结果		
	检测(n)	IgG 阳性率(n)	IgG 阳性率(%)	检测(n)	IgM 阳性率(n)	IgM 阳性率(%)
无症状体检组	334	124	37.1	334	77	23.1
消化症状组	148	77	52.0 <sup>a</sup>	148	56	37.8 <sup>b</sup>
荨麻疹组	33	19	57.6 <sup>b</sup>	33	10	30.3
缺铁性贫血组	24	15	62.5 <sup>b</sup>	24	7	29.2
发热组	56	20	35.7	56	17	30.4
过敏紫癜组	20	7	35.0	20	6	30.0
其他疾病组	373	130	34.8	373	74	19.8

<sup>a</sup> $P < 0.01$  vs 无症状体检组对比; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 无症状体检组对比.

表3 贵阳地区儿童无症状体检组与疾病组抗Hp-IgG及抗Hp-IgM结果

分组	抗Hp-IgG结果			抗Hp-IgM结果		
	检测(n)	IgG 阳性(n)	IgG 阳性率(%)	检测(n)	IgM 阳性(n)	IgM 阳性率(%)
无症状体检组	148	64	43.2	148	39	26.4
消化症状组	87	54	62.1 <sup>a</sup>	87	34	39.1 <sup>b</sup>
荨麻疹组	29	20	69.0 <sup>b</sup>	29	8	27.6
缺铁性贫血组	27	18	66.7 <sup>b</sup>	27	7	25.9
发热组	17	7	41.2	17	5	29.4
过敏紫癜组	8	3	37.5	8	2	25.0
其他疾病组	84	43	51.2	84	21	25.0

<sup>a</sup>P < 0.01 vs 无症状体检组对比; <sup>b</sup>P < 0.05 vs 无症状体检组对比.

阳地区儿童有消化道症状者Hp感染率(52.0%), 比较无显著性差异(P > 0.05). 调查还表明仅有消化道症状儿童现感染与无症状体检组儿童现感染有显著差异(P < 0.05).

2.4 贵阳地区及兰州地区男儿童抗Hp-IgG阳性率分别为: 40.6%, 40.8%; 51.9%, 52.0%; 抗Hp-IgM阳性率分别为: 23.5%, 27.1%; 28.3%, 29.8%. 两地区均显示Hp感染及现感染在儿童期性别间无显著性差异(P > 0.05).

2.5 贵阳地区汉族, 苗族, 布依族儿童抗Hp-IgG阳性率分别为: 40.4%, 48.5%, 37.5%; 抗Hp-IgM阳性率分别为: 24.7%, 33.3%, 25.0%. 兰州地区汉族, 回族儿童抗Hp-IgG阳性率分别为: 52.1%, 54.5%; 抗Hp-IgM阳性率分别为: 29.4%, 22.7%. 两地区均显示Hp感染及现感染在儿童期民族间无显著性差异(P > 0.05).

### 3 讨论

Hp是世界范围内最常见感染性细菌之一, 各国及各地区感染情况不一. 近年来, 成人流行病学分析, 人一生中感染Hp主要年龄阶段是儿童期<sup>[1]</sup>, 尤其在发展中国家及地区有着非常高的感染率<sup>[3-4]</sup>, 因此儿童是研究Hp感染流行病学的理想人群. 而Hp确诊需经胃镜活检组织学培养, 会给儿童带来较大痛苦, 并且家长也不易接受, C<sup>13</sup>呼气试验费用较高, 不利于大范围的流行病学调查. 因此进行血清学检测在儿童流行病学调查中尤为适合.

Hp是慢性活动性胃炎的病原菌, 是消化性溃疡及胃MALT淋巴瘤的致病因子, 是胃癌的I类致癌原, 其与胃癌的发生有着密切关系. 而贵阳地区为胃癌低发区, 兰州地区为胃癌高发区, 因此对于两地区儿童Hp感染状况调查及比较有着切实可行的意义.

3.1 IgG及IgM在Hp感染中的意义 IgM是个体发育过程中最早出现的抗体, 胚胎晚期已能合成, 他也是感染后体液免疫应答早期阶段产生的主要抗体, 因此可作为Hp感染早期及宫内感染的敏感性指标. 但IgM维持时间不长, 因此我们可考虑将其用来检测Hp现感染, 用以调查Hp的现感染率. IgG是Hp感染后体液免疫应答出现较迟的抗体, 且维持时间长, 可作为调查Hp感染率的指标; 且该抗体可通过胎盘, 对胎儿及6-

8 mo乳儿有一定保护作用. 本次调查, 贵阳地区小于1岁年龄组中抗Hp-IgG阳性率为38.9%; 兰州地区小于1岁年龄组中抗Hp-IgG阳性率为54.5%, 而且两地区阳性者均为小于6月龄乳儿, 可考虑此IgG由胎盘从母体获得, 因在小于1岁年龄组中有少数儿童显示抗Hp-IgM阳性, 故也不能除外该组儿童早期获得感染的可能, 或两种因素混杂.

3.2 Hp感染与年龄间关系 Rotbenbacher et al<sup>[5]</sup>对生活在德国的180位土耳其儿童进行粪便Hp抗体检测, 发现儿童在出生后2 a内即有Hp感染, 而且2岁年龄组感染率高达36.4%; Yilmaz et al<sup>[6]</sup>对346名土耳其东部儿童Hp流行病学调查发现Hp感染在儿童早期获得且感染率随年龄的增大而增加. 本次调查也显示同样现象: 两地区儿童在早期即有Hp感染, 3岁年龄段组: 贵阳地区感染率为17.6%; 兰州地区感染率为29.1%, 而且随年龄的增大而感染率增加; 在现感染的调查中, 小于1岁年龄组两地区均显示有Hp感染现象, 其中贵阳地区该组儿童抗Hp-IgM阳性率为5.1%; 兰州地区该组儿童抗Hp-IgM阳性率为4.5%. 在抗Hp-IgM调查中发现, 贵阳地区儿童现感染率随年龄增加而增加(P < 0.01), 而兰州地区儿童现感染率除<1岁年龄组低外, 其余各年龄段现感染率无显著性差异. 考虑兰州地区儿童现感染趋势不同于贵阳地区儿童, 其原因可能因为兰州地区儿童受家庭因素影响大于贵阳地区儿童; 而贵阳地区儿童现感染率出现随年龄增高趋势, 可能是因为随年龄增加与社会接触日渐增多而引起现感染率增加. 许多资料已表明<sup>[1, 7-8]</sup>, 家庭内家长与孩子亲密接触、母亲喂养方式、低社会经济地位等都是儿童Hp感染的高危因素.

3.3 儿童Hp感染与胃癌发生间关系 国内学者张万岱 et al<sup>[9]</sup>对胃癌高发区福建省长乐县, 中发区安徽省蚌埠市怀远县, 低发区广东省广州市从化县自然人群Hp感染的血清学流行病学调查中发现高发区感染率及抗体水平明显高于低发区, 且感染的年龄早. Blecker<sup>[11]</sup>认为儿童期的Hp感染是成人期患胃癌的重要因素. 我们此次调查也显示: 胃癌高发区兰州地区儿童感染率为52.3%, 胃癌低发区贵阳地区儿童感染率为40.7%, 两地区比

较有显著性差异( $P < 0.01$ )。在年龄段比较中发现, 3-6岁年龄段两地区感染率有显著性差异, 兰州地区该年龄段组感染率(42.3%)明显高于贵阳地区(24.0%)。在抗Hp-IgM调查中, 我们对两地区同年龄段组儿童现感染率进行比较, 发现在1-3、3-6岁年龄段组, 兰州地区儿童现感染率高于贵阳地区同年龄段组( $P < 0.05$ ); 而在10-14岁年龄段组贵阳地区儿童感染率高于兰州地区同年龄段组( $P < 0.05$ ), 提示胃癌高发区兰州幽门螺杆菌感染高峰出现早于胃癌低发区贵阳, 可推测Hp早年感染是胃癌高发区Hp感染的一个重要特点, 早年Hp感染容许慢性胃炎有足够长的时间发展成胃癌; 更重要的是, 据认为早年Hp感染, 因为儿童期酸分泌功能尚未发育健全, 此时感染Hp易引起慢性全胃炎, 而胃体胃炎特别是发展到萎缩阶段又会进一步导致胃酸分泌的减少, 进而加重胃体Hp感染及慢性胃炎的发展形成恶性循环, 使发展为胃癌的危险因素明显增高<sup>[10]</sup>

**3.4 Hp感染与胃肠外疾病间关系** Hp感染不但与胃肠道疾病相关, 而且与胃肠外疾病相关。此次调查发现: 荨麻疹与缺铁性贫血Hp感染率高于无症状体检组Hp感染率( $P < 0.05$ )。机制可能为: 荨麻疹:Hp抗原与宿主组织抗原结构相似, 从而引起自身免疫反应, 同时Hp感染引起的炎症反应也参与病变。缺铁性贫血:Hp在生长过程中需要消耗铁, 增加铁的需要量, 成人的储存铁多于儿童, 因此很少出现缺铁性贫血, 而在发展中国家的儿童, 本身可能存在营养不良, 每天铁的摄入量低于感染所致铁的丢失时, 就引起缺铁性贫血。另外, Hp含有一个类似血清铁蛋白的铁结合蛋白, 他对红细胞中的血红蛋白有亲和力; 还发现Hp细胞膜外侧存在铁抑制蛋白, 他们干扰了人体内铁的正常代谢<sup>[11]</sup>。从而使儿童出现缺铁性贫血。

**3.5 Hp-IgM与消化道症状间关系** 两地区儿童抗Hp-IgM调查结果显示一个共同特点: 有消化道症状儿童的IgM阳性率高于无症状体检组儿童的IgM阳性率( $P < 0.05$ ), 而疾病组中荨麻疹及缺铁性贫血儿童的IgM阳性率与无症状体检组儿童的IgM阳性率无差异( $P > 0.05$ )。这可能与Hp早期感染引起急性胃黏膜病变, 导致患儿出现消化道症状; 然而疾病组中荨麻疹及缺铁性贫血儿童, 可能是由于Hp感染后, 在胃黏膜上皮定植长期慢性作用的结果。此时IgM已从体内消失, 而IgG仍存在, 因此在该类患儿的IgG阳性率高于无症状体检组儿童的IgG阳性率, 在我们的调查结果也显示这一点。

**3.6 无消化道症状儿童的Hp感染** 在调查中发现两地区无消化道症状儿童也有较高的Hp感染率, 其原因可能有3点: (1) 受感染儿童对Hp感染后耐受性较强, 出现症状阈值较高, 因此Hp感染后不出现症状; (2) 感染者感染Hp的数量较少, 虽然可引起受感者机体免疫反应, 但还不能引起症状; (3) 由于不同的Hp菌株其毒力及动力强弱有差异, 而且有的菌株可产生细胞毒素, 应用毒素基因分型, Hp又可分为CagA<sup>+</sup>VacA<sup>+</sup>、

CagA<sup>+</sup>VacA<sup>-</sup>、CagA<sup>-</sup>VacA<sup>+</sup>、CagA<sup>-</sup>VacA<sup>-</sup>4种亚型<sup>[12]</sup>, 无消化道症状儿童可能因感染了毒力较弱或无毒力的Hp, 因此表现为仅出现机体免疫反应, 而无症状出现。**3.7 Hp感染与性别、民族间关系** 本次调查结果显示: 贵阳、兰州两地区儿童Hp感染在性别上无显著性差异( $P > 0.05$ ), 结果与欧洲胃肠病研究组<sup>[13]</sup>对17组人群共3194例无症状受检者进行流行病学调查和David et al对美国无症状人群Hp流行病学调查一致。两地区儿童Hp感染民族间无显著性差异( $P > 0.05$ ), 此调查结果与国内云南云县彝族、汉族, 及新疆维吾尔族, 汉族感染比较报道一致。考虑这可能由于两地区汉族与该地少数民族长期混居, 从而形成基本相同的生活习惯, 在经济条件, 卫生状况, 饮用水源, 教育文化等也基本相同, 导致两地区儿童在Hp感染上无明显差异; 贵阳地区苗族儿童抗Hp-IgG和抗Hp-IgM均高于该地区汉族及布依族儿童, 但其无显著性差异( $P > 0.05$ ), 这可能与样本量太小有关。

总之, 儿童Hp感染不但可引发胃肠道疾病, 而且可引起胃肠外疾病, 例如儿童常见的荨麻疹, 缺铁性贫血等, 对于经久不愈的上述疾病应做有关Hp检查; 对Hp阳性者可抗Hp治疗, 也许可成为难治性荨麻疹, 缺铁性贫血的一条有效治疗措施。在胃癌高发区, 对于学龄前儿童应进行血清Hp抗体或粪便Hp抗体普查, 对有消化道症状儿童应积极抗Hp治疗。

#### 4 参考文献

- 1 Blecker U. *Helicobacter pylori* disease in childhood. *Clinical Pediatrics* 1996;35:175-183
- 2 杜国光, 李瑜元, 胡品津. 胃癌流行病学. 广州医药 1991;22:56-57
- 3 Sokucu S, Suoglu OD, Turkkan E, Elkabes B, Ozden T, Saner G. *Helicobacter pylori* infection in Turkish children with gastrointestinal symptoms and evaluation of serology. *Turk J Pediatr* 2002;44:102-108
- 4 Nabwera HM, Nguyen-Van-Tam JS, Logan RF, Logan RP. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Kenyan school-children aged 3-15 years and risk factors for infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:483-487
- 5 Rotbenbacher D, Inceoglu J, Bode G, Brenner H. Acquisition of *Helicobacter pylori* infection in a high-risk population occurs within the first 2 years of life. *J Pediatr* 2000;136:744-748
- 6 Yilmaz E, Dogan Y, Gurgoze MK, Unal S. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection among children and their parents in eastern Turkey. *J Paediatr Child Health* 2002;38:183-186
- 7 Rothenbacher D, Bode G, Berg G, Knayer V, Gonser T, Adler G, Brenner H, Hermann. *Helicobacter pylori* among preschool children and their parents: Evidence of parent-child transmission. *J Infectious Dis* 1999;179:398-402
- 8 Malatry HM, Graham DY. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1994;35:742-745
- 9 张万岱, 吴炎, 杨海涛, 周殿元, 吴鸿梯, 宋家信, 高河元, 吴昌信, 梁冠峰, 冯伟勋, 王斌会, 颜光宇. 胃癌自然人群幽门螺杆菌感染的血清流行病学调查. 中华消化杂志 1995;15:276-278
- 10 萧树东. 消化病学新理论与新技术. 第1版. 上海科技教育出版社, 1999:158-159
- 11 顾掌生, 郑萍. 幽门螺杆菌与胃肠外疾病. 临床消化病杂志 2000; 11:188-190
- 12 陈晶晶. 中国幽门螺杆菌感染研究进展. 中华流行病学杂志 2000; 21:150-152
- 13 Eurogast Study Group. Epidemiology of, and risk factors for *Helicobacter pylori* infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations. *Gut* 1993;34:1672-1676

# 少年胃黏膜相关组织淋巴瘤 1 例

舒筱灿, 谭常兰, 沈 滨, 杨月香, 孙 亮, 曾春玲

舒筱灿, 湖南省怀化医学高等专科学校 湖南省怀化市 418000  
谭常兰, 沈滨, 杨月香, 孙亮, 曾春玲, 湖南省怀化高等医学专科学校附属  
医院胃镜室 湖南省怀化市 418000  
项目负责人: 舒筱灿, 418000, 湖南省怀化市, 怀化医学高等专科学校.  
电话: 0745-2242886  
收稿日期: 2003-05-10 接受日期: 2003-06-07

## 摘要

目的: 通过对该患者的误诊提示人们对少年胃黏膜相关组织淋巴瘤的重视.

方法: 免疫组织化学检查确诊.

结果: 为少年胃黏膜相关组织淋巴瘤B细胞源性淋巴瘤.

结论: 胃黏膜相关组织淋巴瘤多见于中老年人, 罕见于青少年.

舒筱灿, 谭常兰, 沈滨, 杨月香, 孙亮, 曾春玲. 少年胃黏膜相关组织淋巴瘤 1  
例. 世界华人消化杂志 2004;12(1):252

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/252.asp>

## 1 病例报告

女, 16岁, 中学生, 腹痛、腹胀、呕吐9 d于2002-01-09入院. 患者4 mo前无诱因出现上腹持续胀痛、隐痛、无放射痛、进食后腹胀明显, 口服雷尼替丁、丽珠得乐、硫糖铝等药物, 腹胀、腹痛稍有好转. 入院前9 d无诱因出现呕吐而行胃纤维镜检查, 以胃癌收住院. 查体: 发育正常、营养较差、中度贫血貌、神志清醒、全身浅表淋巴结无肿大、咽部扁桃体无肿大、甲状腺无肿大、心肺未见异常、上腹部隆起, 可触及肿物约8×6 cm, 压痛、活动度差. 胸部X线: 心肺正常. B超: 胃占位性病变, 肝、脾无肿大. 血常规: WBC  $9.5 \times 10^9/L$ 、LYM 26.6%、MON 69.9%, 临床诊断“胃癌”. 病理检查: 次全胃、已剖开, 约19×14.5×5 cm, 胃壁广泛增厚、变硬, 无

胃的正常形态, 胃内多个不规则溃疡, 互相融合, 共约10×8×0.2 cm, 胃皱襞消失、胃壁切面厚约5 cm. 镜下观察: 瘤细胞弥漫成片、明显异形性、核膜厚、染色质颗粒粗、可见较大的核仁及花冠状大细胞, 可见核分裂, 血管内见瘤栓. 肿瘤侵犯胃壁全层. 胃右淋巴结、大网膜及肝总动脉旁淋巴结受累, 远处淋巴结未见受累. 免疫组织化学检查: LcA(+), L26(+), ueHL-I(-), CEA(-), EMA(-). 病理诊断: 胃黏膜相关组织淋巴瘤. B细胞源性. 中心母细胞型.

## 2 讨论

原发性胃淋巴瘤是指肿瘤仅发生于胃, 可伴有或不伴有局部淋巴结病变. 近年来, 由于免疫病理学的进展, 形成了黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的新概念. 胃MALT淋巴瘤多见于中老年人, 发病平均年龄为55岁, 罕见于青少年, 男性多于女性, 临床症状与胃癌相似, 胃纤维镜下见胃窦部溃疡单个或多个, 巨大、边缘不规则. 其误诊率为89.3%. MALT淋巴瘤多见于胃窦及胃体, 有溃疡型(最常见)、浸润型、结节型、息肉状或蕈状型. 组织学类型大多数为B细胞性, T细胞少见. 诊断要点: 胃淋巴瘤要排除转移性的可能: (1)全身无浅表淋巴结肿大; (2)外周血白细胞计数正常; (3)无纵隔淋巴结肿大; (4)手术时除局部淋巴结肿大外无其他部位病灶; (5)肝脾无病灶. 此例患者3 mo前曾到门诊就诊, 胃纤维镜为霉菌性溃疡, 3 mo后为胃癌.

## 3 参考文献

- 1 同济医科大学病理学教研室及中山医科大学病理学教研室. 外科病理学. 第2版. 湖北科学技术出版社, 1999:114-117
- 2 钟英强, 张世能, 陈为宪. 胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的内镜和病理特点. 中华消化内镜杂志 2001;18:339-341