

# 肝癌外科治疗的进展

汤钊猷 中国工程院院士

汤钊猷,复旦大学肝癌研究所、中山医院 上海市 200032  
汤钊猷,男,1930-12-26生,广东省新会市人,汉族。1954年上海医科大学医本科毕业,教授,主要从事肿瘤外科,专于肝癌临床研究。  
项目负责人:汤钊猷,200032,上海市医学院路136号,复旦大学肝癌研究所、  
中山医院 zytang@srcap.stc.sh.cn  
电话:021-64037181 传真:021-64037181  
收稿日期:2002-12-07 接受日期:2003-02-12

## 摘要

本文简述 2000 年以来国外文献和复旦大学肝癌研究所的部分工作。小肝癌切除的疗效继续得到公认,局部治疗的疗效虽未超过切除,但未来将部分取代切除。微创外科和微创外科观念值得重视。肝癌筛查可使更多患者获得治疗机会。肝癌切除的禁区已基本攻克,未来将更多研究对合并肝内静脉癌栓的外科综合治疗。临床肝癌中不能切除者仍将占多数,由于局部治疗的进步,不能切除肝癌的降期后(缩小后)切除是部分不能切除肝癌的一条出路。对于小肝癌,肝移植的无瘤生存率高于切除者,故其作用将缓慢上升。21 世纪肝癌转移复发的研究将成为重点,目前在转移复发预测和预防方面已有不少进展,但成为临床常规还有待时日。随机分组试验和荟萃分析是推动肝癌外科进步的必由之路。

汤钊猷. 肝癌外科治疗的进展. 世界华人消化杂志 2003;11(3):249-254  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/249.htm>

## 0 引言

笔者不久前才发表过“肝癌病因、治疗和转移”的综述(World J Gastroenterol 2001;7:445-454),故本文仅列举 2000 年以来的主要国外文献和复旦大学肝癌研究所(以下简称我所)的部分工作。

## 1 肝癌筛查

即使在 21 世纪,小肝癌的外科治疗仍将起重要作用,为此肝癌筛查问题仍无法回避。McMahon et al [1] 通过 16 a 对阿拉斯加土著乙肝携带者的筛查,认为每半年一次的 AFP 检测可查出仍可切除的肝癌,并明显提高生存率。香港认为,早期发现可使更多的肝癌患者获得治疗的机会[2]。意大利的结果提示,对肝硬化患者每年或每半年监测,可使更多肝癌患者获得局部治疗、化疗栓塞或肝移植的机会,从而延长生存期[3]。我国台湾对乙型肝炎高发区的肝癌高危人群进行超声显像筛查,并与未筛查组对比,死亡率降低 41%[4]。我所对肝癌高危人群进行前瞻性随机分组筛查试验(筛查组 9 373 人,未筛查组 9 443 人),使用检测血中 AFP 和超声显像的方法每 6 mo 进行一次筛

查提示,与未筛查组相比,小肝癌比例为 45.3 % vs 0, 切除率为 46.5 % vs 7.5 %, 5 a 生存率为 46.4 % vs 0, 肝癌死亡率为 83.2/10 万 vs 131.5/10 万[5]。

## 2 小肝癌的治疗

小肝癌切除的效果已得到公认。我所对比小肝癌(1 000 例)和大肝癌(1 366 例)切除,5 a 生存率为 62.7 % vs 37.1 %[6]。Hanazaki et al [7] 253 例小肝癌切除的 5 a 生存率为 47 %, 133 例 5 cm 肝癌切除则为 28 %。我所对小肝癌进行的分子生物学研究表明,与癌细胞侵袭性相关的分子指标,在小肝癌的表达仅略低于大肝癌,提示即使是小肝癌,进一步提高疗效的关键仍然是癌细胞的生物学特性(Tang et al 1998)。

近年局部治疗兴起,局部治疗实际上是外科治疗的延伸。小肝癌的局部治疗能否取代切除,不妨列述一下各种局部治疗对小肝癌的疗效,让读者自行判断。(1)射频消融(RFA)-Livrangi et al [8] 报告对肝癌进行射频治疗,病灶完全坏死的比例与肿瘤大小有关, <3 cm 者达 90 %, 3-5 cm 者 71 %, 5.1-9 cm 者 45 %; Child A 单个肝癌 <5 cm 的 3 a 生存率为 85 %. Buscarini et al [9] 88 例小肝癌射频治疗 5 a 生存率为 33 %, 但 5 a 无瘤生存率仅 3 %. (2)经皮乙醇注射(PEI)-Yamamoto et al [10] 观察到小肝癌切除与经皮乙醇注射(PEI)的 5 a 累计生存率相仿(61.5 % vs 59.0 %), 但 5 a 无瘤生存率则切除者较高(25.7 % vs 9.7 %)。对 111 例 Child A 肝硬化小肝癌的 PEI 治疗, 5 a 生存率为 41 %[11]。(3)经皮微波治疗(PMCT) - Lu et al [12] 50 例平均直径 2.7 cm 小肝癌 PMCT 治疗后 3 a 生存率为 73 %. Itamoto et al [13] 33 例小肝癌 PMCT 治疗后 5 a 生存率为 48.6 %. (4)激光热消融(LTA) - Pacella et al [14] 15 例小肝癌激光热消融合并 TACE 治疗后 5 a 生存率为 40 %. 总体而言,局部治疗的远期疗效似仍未超过切除,但患者情况不完全相同,需进行随机分组试验和荟萃分析才能获得结论。

## 3 大肝癌的外科治疗

大肝癌规范的外科治疗已有半个世纪的历史,肝内几乎任何部位肿瘤的切除,在技术上都已解决,故突破性进展不多。Poon et al [15] 认为切缘宽度并不影响复发率,因多数肝内复发来自静脉播散。肝尾叶切除报道日多,我所 12 例尾叶切除的 5 a 生存率为 37.8 %[16]。近年对合并门静脉癌栓者采取积极外科治疗逐渐增多,我所分析:肝癌切除 + 癌栓摘除 + 术后血管内化疗,肝癌切除 + 癌栓摘除,肝动脉结扎和 / 或插管和保守治疗 4 组的 5 a 生存率依

次为 26.8 %, 16.6 %, 0 % 和 0 %<sup>[17]</sup>. Fukuda et al<sup>[18]</sup> 19 例合并门静脉主干、下腔静脉或肝外胆管癌栓者作切除和癌栓摘除, 3 a 生存率为 48.5 %. 关于围手术期输血, 亦有人认为并不影响切除后的无瘤生存率<sup>[19]</sup>. Wakabayashi et al<sup>[20]</sup> 认为较大肝癌术前应用门静脉支栓塞(PVE)可能有助提高切除率, 但并不改善预后.

#### 4 不能切除肝癌的降期后切除(缩小后切除)

这是近 20 a 发展起来的值得重视的途径, 我所在 1980 年代起曾有不少报道. 2001 年 Lau et al<sup>[21]</sup> 报告 150 例不能切除肝癌全身化疗(顺铂 + 阿霉素 + 5-Fu) 合并干扰素, 结果 15 例获序贯切除, 其 3 a 生存率为 53 %. 近年局部治疗和适形放疗有所开展, 加上与 TACE 的合并应用, 增加了使肿瘤缩小的途径. 我所曾报告 65 例不能切除肝癌经 TACE 治疗肿瘤缩小后切除, 其 5 a 生存率为 56 % (Fan et al 1998). 根据最新材料, 我所 90 例手术证实 8 cm (中位直径 12 cm, 合并肝硬化 81.8 %) 不能切除肝癌缩小后切除的 5 a 生存率为 53.2 %, 这 90 例患者中 85.6 % 采用了肝动脉结扎、肝动脉插管化疗、导向治疗 / 外放射治疗中的三联或二联治疗作为缩小疗法.

#### 5 微创外科在肝癌治疗中的地位

有报道在腹腔镜下行 30 例肝切除, 但主要是左肝或右肝边缘可作局部切除的病灶<sup>[22]</sup>. Shimada et al<sup>[23]</sup> 比较 17 例肝癌腹腔镜手术和 38 例肝癌开腹手术, 无论手术时间、失血量、术后并发症和生存率均无明显差别, 而前者住院时间明显缩短, 但患者需严格挑选. Biertho et al<sup>[24]</sup> 汇总文献 168 例腹腔镜肝切除术(其中 102 例为恶性肿瘤), 并发症率 16.1 % (包括气栓), 死亡率 0.54 %. 在腹腔镜下行局部治疗的报道则较多, 如微波固化<sup>[25]</sup>, 乙醇注射<sup>[26]</sup>, 射频治疗<sup>[27]</sup>, 放置肝动脉灌注泵<sup>[28]</sup> 等. 但 Ishida et al<sup>[29]</sup> 在鼠实验发现腹腔充气压力可促使癌转移.

#### 6 肝移植在肝癌治疗中的地位

Figueras et al<sup>[30]</sup> 比较 85 例肝移植和 35 例手术切除, 5 a 生存率为 60 % vs 51 %, 5 a 无瘤生存率为 60 % vs 31 %, 血管侵犯为主要预后因素. Hemming et al<sup>[31]</sup> 112 例非纤维板层型肝癌作肝移植, 5 a 生存率为 57%, 乙肝相关肝癌较非乙肝相关者差(43 % vs 64 %), 但用抗病毒治疗后提高到 77 %; 有血管侵犯者明显差于无血管侵犯者(4 % vs 65 %). 关于肝癌行肝移植的指征, Figueras et al<sup>[32]</sup> 认为适合于 AFP 较低、无明显血管侵犯或肝外转移的小肝癌. Margarit et al<sup>[33]</sup> 103 例伴肝硬化小肝癌(平均肿瘤大小 3.1 cm, 多个结节 59 %, 累及左右肝 31 %, 血管侵犯 9.2 %) 行肝移植, 5 a 生存率为 58 %, 与因肝硬化行肝移植者相仿(63 %), 亦认为肝移植适于伴肝硬化的小肝癌. Yao et al<sup>[34]</sup> 根据 70 例伴肝硬化肝癌行肝移植的结果, 认为单个肿瘤 6.5 cm, 或 3 个结节其最大肿瘤 4.5 cm 以及肿瘤总直径 8 cm 者, 其 5 a 生存率仍达 75.2 %,

从而认为肝移植指征中肿瘤大小可适当放宽. 对合并肝硬化的不能切除小肝癌行肝移植, 采用活体供肝, 因避免等待供肝而优于尸体肝, 明显延长预期寿命<sup>[35,36]</sup>. 对略大的肝癌(5-7 cm), 如能合并综合治疗(TACE、化疗), 其效果亦可, 而 >7 cm 者则效果差<sup>[37]</sup>. TNM 第 IV 期肝癌则不适合行肝移植<sup>[38]</sup>. 肝移植后同样有乙型肝炎感染复发, 亚裔患者的预后比白人差<sup>[39]</sup>.

#### 7 肝癌转移复发的预测指标

无论一期或二期切除, 无论肝癌切除或肝移植, 所遇到的最重要问题乃转移复发. 研究转移复发有两大目标, 一是有效的预测, 二是有效的预防. 较早报道的预测指标, 除临床和病理指标外, 主要是细胞水平的指标, 如: PCNA(增生细胞核抗原)、AFP mRNA、AFP-L3、DNA 倍体、雄激素/雌激素受体等. 近年多集中在分子指标方面. (1) 细胞增生、运动和凋亡相关指标, 如 p53 突变和 P53 抗体、MDM-2<sup>[40]</sup>、p73、p27<sup>[41,42]</sup>、c-myc、Ki-67、Kai-1、Rb 蛋白、HGF、端粒酶<sup>[43]</sup>、IL-10<sup>[44]</sup> 等. (2) 细胞黏附和细胞外基质降解相关指标, 如上皮细胞钙粘蛋白(E-cadherin)、整合素(Integrin β1)、beta-Catenin<sup>[45]</sup>、细胞间黏附分子 -1(ICAM-1)、CD44<sup>[46]</sup>、细胞黏附调节分子(CMAR)、基质金属蛋白酶(MMP-9)、人巨噬细胞金属弹性蛋白酶(HME)<sup>[47]</sup>、TIMP-1(组织金属蛋白酶抑制剂 -1)、uPA(尿激酶型纤溶酶原激活物)、骨连接素(Osteonectin, ON/SPARC)、Syndecan-1 等. (3) 血管生成相关指标, 如 VEGF(血管内皮细胞生长因子)<sup>[48]</sup>、PD-ECGF(血小板衍化内皮细胞生长因子)、微血管密度(MVD) 等. (4) 免疫相关指标, 如淋巴细胞浸润、术前自然杀伤细胞(NK)活性等. 在上述指标中, 能够在血中测出者更有潜在应用价值. Ijichi et al<sup>[49]</sup> 前瞻性研究表明术后血中 AFP mRNA 的阳性率有助预测复发. 但亦有人持否定意见<sup>[50]</sup>. Charuruks et al<sup>[51]</sup> 认为检测血清中 P53 蛋白和 P53 抗体是有用的预后指标. Poon et al<sup>[52]</sup> 报道术前血清碱性成纤维细胞生长因子(bFGF) 水平高, 术后常早期复发. Kobayashi et al<sup>[43]</sup> 认为端粒酶活性是独立的复发预测指标. Mou et al<sup>[53]</sup> 认为随访血中 MAGE-1 和 MAGE-3 可早期预测复发. 然而 Parasole et al<sup>[54]</sup> 认为血清中 sICAM-1、sIL-2R、IL-6 和抗 P53 均无预测价值.

我所就血中的相关指标也作了探索, 观察到: (1) 血中血栓调节蛋白(Thrombomodulin, ELISA 法) 与门脉癌栓形成和肝内播散呈负相关<sup>[55]</sup>. (2) 血中 ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1, 细胞间黏附分子 -1) 与肝癌侵袭性呈正相关, 转移组高于非转移组<sup>[56]</sup>. (3) 血中 PAI-1 (尿激酶型纤溶酶原激活物受体的抑制剂) 水平与肝癌侵袭性呈正相关. 侵袭性肝癌和非侵袭性肝癌比, 血浆中 PAI-1 水平明显较高<sup>[57]</sup>. (4) 血清基质金属蛋白酶 -2 (MMP-2) 与肝细胞癌根治性切除术后转移复发有关<sup>[58]</sup>. (5) 血中 VEGF 水平与肝癌侵袭转移呈正相关<sup>[59,60]</sup>. (6) 碱性成纤维

细胞生长因子(bFGF)是预测肝细胞癌患者术后转移复发的潜在指标<sup>[61]</sup>. (7)高转移倾向组患者血浆DNA中D14S62和D14S51(14q染色体)杂合性丢失(LOH)的阳性率低<sup>[62]</sup>.

在手术切除标本的免疫组化检测方面,观察到:(1)有p53或p16突变者复发率高、生存率低<sup>[63,64]</sup>.最近发现p53免疫组化的积分与肝癌预后的相关性好<sup>[65]</sup>.(2)转化生长因子(TGF)可诱导细胞增生和表皮生长因子受体(EGF-R)的表达,而EGF-R的表达与预后差有关<sup>[66,67]</sup>.(3)转移抑制基因nm23-H1或Kai-1的表达则与肝癌的侵袭性呈负相关<sup>[68-70]</sup>.(4)凡MMP-2在癌的表达高于癌周肝者预后差<sup>[71]</sup>.(5)uPA的表达也与癌侵袭性呈正相关<sup>[72]</sup>.(6)ICAM-1在癌组织的表达也和肝癌侵袭性呈正相关,转移组高于非转移组<sup>[73]</sup>.(7)VEGF和/或PD-ECGF的表达与肝癌侵袭性呈正相关<sup>[74,75]</sup>.(8)小肝癌微血管密度(MVD)高者预后差,少血管型小肝癌的5 a无瘤生存率高于多血管型者,分别为74.6%和34.7%<sup>[76]</sup>.

## 8 肝癌转移复发的治疗

我所在1980年代即已报道对亚临床期复发的再切除可明显延长生存期,其后也一再证明这个论点(Tang et al 1984,Zhou et al 1993,Zhou et al 1994).目前,认为复发行再切除的疗效最好已得到公认.Sugimachi et al<sup>[77]</sup>78例复发再切除的5 a生存率为47.5%. Arii et al<sup>[78]</sup>28例再切除,5 a生存率自初次手术算起为62%,自再切除算起为47%. Matsuda et al<sup>[79]</sup>认为复发来自多中心发生者的再手术(切除或微波)预后优于复发来自肝内转移者,5 a生存率分别为58.1%和14.3%.关于术后肾上腺转移,多主张手术切除<sup>[80]</sup>.

## 9 肝癌转移复发的预防

过去文献对可切除肝癌的术前TACE多持否定态度,认为推迟了患者的手术时间,因TACE影响肝功能而增加手术风险,因TACE后粘连多而增加手术难度,且远期生存率还有所下降.但对仍局限的不能切除肝癌,TACE是使肿瘤缩小的有效方法.近年Gerunda et al<sup>[81]</sup>对比术前TACE组和对照组,总生存率相仿,而无瘤生存率则TACE组较好.Yoshida et al<sup>[82]</sup>报告术前经导管免疫栓塞(OK-432+纤维蛋白原+凝血酶)比TACE好.

关于术后预防转移复发:(1)术后TACE - Shimoda et al回顾性分析认为术后TACE(阿霉素+碘油)与对照组相比,5 a无瘤生存率为31.1% vs 7.9%<sup>[83]</sup>.(2)术后肝血管内化疗 - 过去虽有报告认为有用,但前瞻性随机分组试验认为无效(Ono et al, 1997).(3)术后全身化疗 - 过去前瞻性随机分组试验认为术后给予表阿霉素与HCFU并不优于对照组(Ono et al, 1997).另一随机分组试验,术后静脉表阿霉素合并肝动脉内化疗碘油,不仅预后更差,且肝外复发也多(Lai et al, 1998).但Huang et al<sup>[84]</sup>前瞻性研究提示术后静脉应用表阿霉素和丝裂霉素有减少复发和改善预后的倾向.Ono et al<sup>[85]</sup>对三个随机分组试验作荟萃分析(meta-analysis)提示,在伴有肝硬化的患者肝癌切除后给予化疗反而增加余肝的复发,且远期疗效更差.(4)干扰素术后预防复发 - Ikeda et al<sup>[86]</sup>认为β干扰素对丙型肝炎相关肝癌切除或乙醇注射后的复发有预防作用,中位随访25 mo时,与对照组比,复发为1/10 vs 7/10.Kubo et al<sup>[87]</sup>随机分组试验证实,干扰素可减少丙型肝炎相关肝癌切除后的复发,与对照组相比复发为5/15 vs 12/15.Suou et al<sup>[88]</sup>也有类似报道.(5)放射性碘标碘油(131I-Lipiodol) - 随机分组试验表明,肝动脉内一次注射131I-Lipiodol 1 850 MBq可减少术后复发(Lau et al, 1999).Partensky et al<sup>[89]</sup>报道131I-Lipiodol作为肝癌根治性切除后辅助治疗的II期临床试验亦获得类似结果.(6)维甲酸类药物 - 1996年Muto et al曾报道术后口服Polyprenoic acid(维甲酸类)可减少术后复发,1999年再次报道远期结果,6 a生存率治疗组为74%,而对照组为46%.(7)过继免疫治疗 - Takayama et al随机分组试验表明,76例接受370次淋巴细胞输注,平均随访4.4 a,与对照组比,复发率为59% vs 77%<sup>[89]</sup>.

总之,在过去100 a的肝癌治疗历史上,外科治疗始终占有最重要的地位.预期在21世纪,肝癌外科仍将占重要地位,但肝癌治疗的模式和重点将有所改变.(1)小肝癌切除仍将有其位置,但有一部分将被局部治疗所取代;腹腔镜下的小肝癌切除或局部治疗将明显增加;癌细胞生物学特性的研究将成为重点.(2)肝癌切除的禁区在20世纪已基本攻克,21世纪将更多研究对合并肝内静脉癌栓的外科综合治疗.(3)由于不能切除肝癌仍将占临床肝癌的大多数,加上局部治疗的兴起,以及多数局部治疗的不彻底性,不能切除肝癌的降期后切除(或缩小后切除)仍将是部分不能切除肝癌的一条重要出路.(4)微创外科以及微创外科观念将受到更多的关注.(5)肝移植在肝癌治疗中的地位将缓慢上升,一些瓶颈问题仍待解决.(6)术后转移复发的研究将成为肝癌外科研究的重点,生物治疗的进步,可能给转移复发的预防提供新的途径.随机分组试验和荟萃分析将成为推动肝癌临床进步的必由之路.

## 10 参考文献

- McMahon BJ, Bulkow L, Harpster A, Snowball M, Lanier A, Sacco F, Dunaway E, Williams J. Screening for hepatocellular carcinoma in Alaska natives infected with chronic hepatitis B: a 16-year population-based study. *Hepatology* 2000;32:842-846
- Yuen MF, Cheng CC, Lauder IJ, Lam SK, Ooi CG, Lai CL. Early detection of hepatocellular carcinoma increases the chance of treatment: Hong Kong experience. *Hepatology* 2000;31:330-335
- Trevisani F, De NS, Rapaccini G, Farinati F, Benvegnù L, Zoli M, Grazi GL, Del PP, Di N, Bernardi M. Italian Liver Cancer Group. Semiannual and annual surveillance of cirrhotic patients for hepatocellular carcinoma: effects on cancer stage and patient survival (Italian experience). *Am J Gastroenterol* 2002;97:734-744
- Chen TH, Chen CJ, Yen MF, Lu SN, Sun CA, Huang GT, Yang PM, Lee HS, Duffy SW. Ultrasound screening and risk factors for death from hepatocellular carcinoma in a high risk group in

- Taiwan. *Int J Cancer* 2002;98:257-261
- 5 张博恒,杨秉辉. 上海市肝癌高危人群监测方案实施评估. 中国肿瘤 2001;10:199-200
- 6 Zhou XD, Tang ZY, Yang BH, Lin ZY, Ma ZC, Ye SL, Wu ZQ, Fan J, Qin LX, Zheng BH. Experience of 1000 patients who underwent hepatectomy for small hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2001; 91:1479-1486
- 7 Hanazaki K, Kajikawa S, Shimozawa N, Shimada K, Hiraguri M, Koide N, Adachi W, Amano J. Hepatic resection for large hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* 2001;181:347-353
- 8 Livraghi T, Lazzaroni S, Meloni F. Radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma. *Eur J Ultrasound* 2001;13:159-166
- 9 Buscarini L, Buscarini E, Di Stasi M, Vallisa D, Quaretti P, Rocca A. Percutaneous radiofrequency ablation of small hepatocellular carcinoma:long-term results. *Eur Radiol* 2001;11:914-921
- 10 Yamamoto J, Okada S, Shimada K, Okusaka T, Yamasaki S, Ueno H, Kosuge T. Treatment strategy for small hepatocellular carcinoma: comparison of long-term results after percutaneous ethanol injection therapy and surgical resection. *Hepatology* 2001; 34:707-713
- 11 Pompili M, Rapaccini GL, Covino M, Pignataro G, Caturelli E, Siena DA, Villani MR, Cedrone A, Gasbarrini G. Prognostic factors for survival in patients with compensated cirrhosis and small hepatocellular carcinoma after percutaneous ethanol injection therapy. *Cancer* 2001;92:126-135
- 12 Lu MD, Chen JW, Xie XY, Liu L, Huang XQ, Liang LJ, Huang JF. Hepatocellular carcinoma: US-guided percutaneous microwave coagulation therapy. *Radiology* 2001;221:167-172
- 13 Itamoto T, Katayama K, Fukuda S, Fukuda T, Yano M, Nakahara H, Okamoto Y, Sugino K, Marubayashi S, Asahara T. Percutaneous microwave coagulation therapy for primary or recurrent hepatocellular carcinoma: long-term results. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1401-1405
- 14 Pacella CM, Bizzarri G, Cecconi P, Caspani B, Magnolfi F, Bianchini A, Anelli V, Pacella S, Rossi Z. Hepatocellular carcinoma: long-term results of combined treatment with laser thermal ablation and transcatheter arterial chemoembolization. *Radiology* 2001;219:669-678
- 15 Poon RT, Fan ST, Ng IO, Wong J. Significance of resection margin in hepatectomy for hepatocellular carcinoma: A critical reappraisal. *Ann Surg* 2000;231:544-551
- 16 Fan J, Wu ZQ, Tang ZY, Zhou J, Qiu SJ, Ma ZC, Zhou XD, Yu YQ. Complete resection of the caudate lobe of the liver with tumor: technique and experience. *Hepatogastroenterology* 2001;48: 808-811
- 17 Fan J, Wu ZQ, Tang ZY, Zhou J, Qiu SJ, Ma ZC, Zhou XD, Ye SL. Multimodality treatment in hepatocellular carcinoma patients with tumor thrombi in portal vein. *World J Gastroenterol* 2001;7: 28-32
- 18 Fukuda S, Okuda K, Imamura M, Imamura I, Eriguchi N, Aoyagi S. Surgical resection combined with chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombus: report of 19 cases. *Surgery* 2002;131:300-310
- 19 Kwon AH, Matsui Y, Kamiyama Y. Perioperative blood transfusion in hepatocellular carcinomas: influence of immunologic profile and recurrence free survival. *Cancer* 2001;91:771-778
- 20 Wakabayashi H, Ishimura K, Okano K, Izuishi K, Karasawa Y, Goda F, Maeba T, Maeta H. Is preoperative portal vein embolization effective in improving prognosis after major hepatic resection in patients with advanced-stage hepatocellular carcinoma? *Cancer* 2001;92:2384-2390
- 21 Lau WY, Leung TW, Lai BS, Liew CT, Ho SK, Yu SC, Tang AM. Preoperative systemic chemoimmunotherapy and sequential resection for unresectable hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2001; 233:236-241
- 22 Cherqui D, Husson E, Hammoud R, Malassagne B, Stephan F, Bensaid S, Rotman N, Fagniez PL. Laparoscopic liver resections: a feasibility study in 30 patients. *Ann Surg* 2000;232:753-762
- 23 Shimada M, Hashizume M, Maehara S, Tsujita E, Rikimaru T, Yamashita Y, Tanaka S, Adachi E, Sugimachi K. Laparoscopic hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Surg Endosc* 2001;15: 541-544
- 24 Biertho L, Waage A, Gagner M. Laparoscopic hepatectomy. *Ann Chir* 2002;127:164-170
- 25 Abe T, Shinzawa H, Wakabayashi H, Aoki M, Sugahara K, Iwaba A, Haga H, Miyano S, Terui Y, Mitsuhashi H, Watanabe H, Matsuo T, Saito K, Saito T, Togashi H, Takahashi T. Value of laparoscopic microwave coagulation therapy for hepatocellular carcinoma in relation to tumor size and location. *Endoscopy* 2000; 32:598-603
- 26 Okano H, Shiraki K, Inoue H, Yamanaka T, Deguchi M, Sugimoto K, Sakai T, Ohmori S, Murata K, Nakano T. Laparoscopic ethanol injection therapy for hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2002;20:267-271
- 27 Chung MH, Wood TF, Tsioflias GJ, Rose DM, Bilchik AJ. Laparoscopic radiofrequency ablation of unresectable hepatic malignancies. A phase 2 trial. *Surg Endosc* 2001;15:1020-1026
- 28 Urbach DR, Herron DM, Khajanchee YS, Swanstrom LL, Hansen PD. Laparoscopic hepatic artery infusion pump placement. *Arch Surg* 2001;136:700-704
- 29 Ishida H, Murata N, Idezuki Y. Increased insufflation pressure enhances the development of liver metastasis in a mouse laparoscopy model. *World J Surg* 2001;25:1537-1541
- 30 Figueras J, Jaurrieta E, Valls C, Ramos E, Serrano T, Rafecas A, Fabregat J, Torras J. Resection or transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: outcomes based on indicated treatment strategy. *J Am Coll Surg* 2000;190:580-587
- 31 Hemming AW, Cattral MS, Reed AI, Van Der Werf WJ, Greig PD, Howard RJ. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2001;233:652-659
- 32 Figueras J, Ibanez L, Ramos E, Jaurrieta E, Ortiz-de-Urbina J, Pardo F, Mir J, Loinaz C, Herrera L, Lopez-Cillero P, Santoyo J. Selection criteria for liver transplantation in early-stage hepatocellular carcinoma with cirrhosis: results of a multicenter study. *Liver Transpl* 2001;7:877-883
- 33 Margarit C, Charco R, Hidalgo E, Allende H, Castells L, Bilbao I. Liver transplantation for malignant diseases: selection and pattern of recurrence. *World J Surg* 2002;26:257-263
- 34 Yao FY, Ferrell L, Bass NM, Watson JJ, Bacchetti P, Venook A, Ascher NL, Roberts JP. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology* 2001;33:1394-1403
- 35 Cheng SJ, Pratt DS, Freeman RB Jr, Kaplan MM, Wong JB. Living-donor versus cadaveric liver transplantation for non-resectable small hepatocellular carcinoma and compensated cirrhosis: a decision analysis. *Transplantation* 2001;72:861-868
- 36 Sarasin FP, Majno PE, Llovet JM, Bruix J, Mentha G, Hadengue A. Living donor liver transplantation for early hepatocellular carcinoma: A life-expectancy and cost-effectiveness perspective. *Hepatology* 2001;33:1073-1079
- 37 Roayaie S, Frischer JS, Emre SH, Fishbein TM, Sheiner PA, Sung M, Miller CM, Schwartz ME. Long-term results with multimodal adjuvant therapy and liver transplantation for the treatment of hepatocellular carcinomas larger than 5 centimeters. *Ann Surg* 2002;235:533-539
- 38 Herrero JL, Sangro B, Quiroga J, Pardo F, Herranz M, Cienfuegos JA, Prieto J. Influence of tumor characteristics on the outcome of liver transplantation among patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2001;7:631-636
- 39 Teo EK, Han SH, Terrault N, Luketic V, Jensen D, Keeffe EB, Lok AS. Liver transplantation in patients with hepatitis B virus infection: outcome in Asian versus white patients. *Hepatology* 2001;34:126-132
- 40 Endo K, Ueda T, Ohta T, Terada T. Protein expression of MDM2 and its clinicopathological relationships in human hepatocellular carcinoma. *Liver* 2000;20:209-215
- 41 Fiorentino M, Altomari A, D'Errico A, Cukor B, Barozzi C, Loda M, Grigioni WF. Acquired expression of p27 is a favorable prognostic indicator in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:3966-3972
- 42 Tannapfel A, Grund D, Katalinic A, Uhlmann D, Kockerling F, Haugwitz U, Wasner M, Hauss J, Engelhard K, Wittekind C. Decreased expression of p27 protein is associated with advanced tumor stage in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2000;89: 350-355
- 43 Kobayashi T, Kubota K, Takayama T, Makuuchi M. Telomerase activity as a predictive marker for recurrence of hepatocellular

- carcinoma after hepatectomy. *Am J Surg* 2001;181:284-288
- 44 Chau GY, Wu CW, Lui WY, Chang TJ, Kao HL, Wu LH, King KL, Loong CC, Hsia CY, Chi CW. Serum interleukin-10 but not interleukin-6 is related to clinical outcome in patients with resectable hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2000;231:552-558
- 45 Wong CM, Fan ST, Ng IO. beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer* 2001;92:136-145
- 46 Lara-Pezzi E, Serrador JM, Montoya MC, Zamora D, Yanez-Mo M, Carretero M, Furthmayr H, Sanchez-Madrid F, Lopez-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein (HBx) induces a migratory phenotype in a CD44-dependent manner: possible role of HBx in invasion and metastasis. *Hepatology* 2001;33:1270-1281
- 47 Gorrin-Rivas MJ, Arii S, Mori A, Takeda Y, Mizumoto M, Furutani M, Imamura M. Implications of human macrophage metalloelastase and vascular endothelial growth factor gene expression in angiogenesis of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2000;231:67-73
- 48 Poon RT, Ng IO, Lau C, Zhu LX, Yu WC, Lo CM, Fan ST, Wong J. Serum vascular endothelial growth factor predicts venous invasion in hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Ann Surg* 2001;233:227-235
- 49 Ijichi M, Takayama T, Matsumura M, Shiratori Y, Omata M, Makuchi M. alpha-Fetoprotein mRNA in the circulation as a predictor of postsurgical recurrence of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Hepatology* 2002;35:853-860
- 50 Witzigmann H, Geissler F, Benedix F, Thiery J, Uhlmann D, Tannapfel A, Wittekind C, Hauss J. Prospective evaluation of circulating hepatocytes by alpha-fetoprotein messenger RNA in patients with hepatocellular carcinoma. *Surgery* 2002;131:34-43
- 51 Charuruk N, Tangkijvanich P, Voravud N, Chatsantikul R, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Clinical significance of p53 antigen and anti-p53 antibodies in the sera of hepatocellular carcinoma patients. *J Gastroenterol* 2001;36:830-836
- 52 Poon RT, Ng IO, Lau C, Yu WC, Fan ST, Wong J. Correlation of serum basic fibroblast growth factor levels with clinicopathologic features and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* 2001;182:298-304
- 53 Mou DC, Cai SL, Peng JR, Wang Y, Chen HS, Pang XW, Leng XS, Chen WF. Evaluation of MAGE-1 and MAGE-3 as tumour-specific markers to detect blood dissemination of hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer* 2002;86:110-116
- 54 Parasole R, Izzo F, Perrone F, Pignata S, Galati MG, Leonardi E, Castiglione F, Orlando R, Castello G, Esposito G, Gallo C, Daniele B. Prognostic value of serum biological markers in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:3504-3509
- 55 Zhou J, Tang ZY, Fan J, Wu ZQ, Ji Y, Ye SL. The potential of plasma thrombomodulin as a biomarker of portal vein tumor thrombus in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:559-564
- 56 Sun JJ, Zhou XD, Liu YK, Tang ZY, Feng JX, Zhou G, Xue Q, Chen J. Invasion and metastasis of liver cancer: expression of intercellular adhesion molecule 1. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:28-34
- 57 郑起, 汤钊猷, 吴志全. 肝癌患者血浆和肿瘤组织中PAI - 1变化. 中华消化杂志 1999;19:16-18
- 58 牛旗, 汤钊猷, 马曾辰, 钱伦秀, 鲍卫华, 张连海. 血清基质金属蛋白酶-2与肝细胞癌根治性切除术后转移复发的关系. 中华肝脏病杂志 2001;9:56-58
- 59 Li XM, Tang ZY, Qin LX, Zhou J, Sun HC. Serum vascular endothelial growth factor is a predictor of invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 1999;18:511-517
- 60 Niu Q, Tang ZY, Ma ZC, Qin LX, Zhang LH. Serum vascular endothelial growth factor is a potential biomarker of metastatic recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2000;6:565-568
- 61 牛旗, 汤钊猷, 陈俐, 马曾辰, 钱伦秀, 张连海. 碱性成纤维细胞生长因子是预测肝细胞癌患者术后转移复发的潜在指标. 中华外科杂志 2000;38:637
- 62 汤钊猷, 钱伦秀, 孙惠川, 周俭, 王鲁, 林芷英, 马曾辰, 叶胜龙, 吴志全. 肝癌复发转移的研究. 中华普通外科杂志 2000;15:517-520
- 63 Qin LX, Tang ZY, Liu KD, Ye SL, Zhou G. P53 mutations may be related to tumor invasiveness of human hepatocellular carcinoma in China. *Oncol Rep* 1995;2:1175-1179
- 64 Qin LX, Tang ZY, Liu KD, Ye SL, He B, Zhang Y, Zhou G. Alterations of CDKN2(P16/MTS1) exon 2 in human hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 1996;3:405-408
- 65 Qin LX, Tang ZY, Ma ZC. P53 immunohistochemistry scoring is an independent prognostic marker of patient with hepatocellular carcinoma resection: A prospective study of 256 formalin-fixed paraffin embedded tumor samples. *World J Gastroenterol* 2002;8:459-463
- 66 Wang XM, Tang ZY, Xue Q, Hong XY, Bao WH, Zou HQ. Transforming growth factor α induces proliferation and expression of epidermal growth factor receptor in hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 1995;14:179-184
- 67 王效民, 汤钊猷, 邹合强, 鲍卫华. 表皮生长因子受体在肝癌中的表达及其临床意义. 当代肿瘤杂志 1995;2:22-24
- 68 叶颖江, 万大方, 汤钊猷, 陆继珍, 贺丽萍. 肝细胞癌nm23-H1 mRNA表达水平及其临床意义. 肿瘤 1997;17:445-448
- 69 叶颖江, 余业勤, 汤钊猷, 万大方, 陆继珍, 贺丽萍. nm23-H1 cDNA 克隆的构建及其mRNA表达与肝癌转移的关系. 中华实验外科杂志 1998;15:17-18
- 70 Sun HC, Tang ZY, Zhou G, Li XM. Kai-1 gene expression in hepatocellular carcinoma and its relationship with intrahepatic metastases. *J Exp Clin Cancer Res* 1998;17:307-311
- 71 卜文, 黄晓武, 汤钊猷. 基质金属蛋白酶-2与肝细胞癌侵袭转移性的关系. 中华医学杂志 1997;77:661-664
- 72 Zheng Q, Tang ZY, Wu ZQ, Shi DR, Tang HB, Zhu YS, Song HY. Urokinase-type plasminogen activator, its receptor and inhibitor expression in hepatocellular carcinoma relation to cancer invasiveness and prognosis. *Chin J Cancer Res* 1998;10:268-271
- 73 孙婧景, 周信达, 刘银坤, 汤钊猷. 肝癌组织中细胞间粘着分子-1的表达与肝癌侵袭转移的研究. 中国癌症杂志 1997;7:161-164
- 74 Li XM, Tang ZY, Zhou G, Liu YK, Ye SL. Significance of vascular endothelial growth factor mRNA expression in invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 1998;17:13-17
- 75 Zhou J, Tang ZY, Fan J, Wu ZQ, Li XM, Liu YK, Liu F, Sun HC, Ye SL. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma and portal vein tumor thrombus. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126:57-61
- 76 Sun HC, Tang ZY, Li XM, Zhou YN, Sun BR, Ma ZC. Microvessel density of hepatocellular carcinoma: its relationship with prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:419-426
- 77 Sugimachi K, Maehara S, Tanaka S, Shimada M, Sugimachi K. Repeat hepatectomy is the most useful treatment for recurrent hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:410-416
- 78 Arii S, Teramoto K, Kawamura T, Okamoto H, Kaido T, Mori A, Imamura M. Characteristics of recurrent hepatocellular carcinoma in Japan and our surgical experience. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:397-403
- 79 Matsuda M, Fujii H, Kono H, Matsumoto Y. Surgical treatment of recurrent hepatocellular carcinoma based on the mode of recurrence: repeat hepatic resection or ablation are good choices for patients with recurrent multicentric cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:353-359
- 80 Shuto T, Hirohashi K, Kubo S, Tanaka H, Yamamoto T, Higaki I, Takemura S, Kinoshita H. Treatment of adrenal metastases after hepatic resection of a hepatocellular carcinoma. *Dig Surg* 2001;18:294-297
- 81 Gerunda GE, Neri D, Merenda R, Barbazza F, Zangrandi F, Meduri F, Bisello M, Valmasoni M, Gangemi A, Faccioli AM. Role of transarterial chemoembolization before liver resection for hepatocarcinoma. *Liver Transpl* 2000;6:619-626
- 82 Yoshida T, Sakon M, Umeshita K, Kanai T, Miyamoto A, Takeda T, Gotoh M, Nakamura H, Wakasa K, Monden M. Appraisal of transarterial immunoembolization for hepatocellular carcinoma: a clinicopathologic study. *J Clin Gastroenterol* 2001;32:59-65
- 83 Shimoda M, Bando T, Nagata T, Shiroasaki I, Sakamoto T, Tsukada K. Prophylactic chemolipiodolization for postoperative hepatoma patients. *Hepatogastroenterology* 2001;48:493-497
- 84 Huang YH, Wu JC, Lui WY, Chan GY, Tsay SH, Chiang JH, King KL, Huo TI, Chang FY, Lee SD. Prospective case-controlled trial of adjuvant chemotherapy after resection of hepatocellular carcinoma. *World J Surg* 2000;24:551-555

- 85 Ono T, Yamanoi A, Nazmy EL, Assal O, Kohno H, Nagasue N. Adjuvant chemotherapy after resection of hepatocellular carcinoma causes deterioration of long-term prognosis in cirrhotic patients: metaanalysis of three randomized controlled trials. *Cancer* 2001;91:2378-2385
- 86 Ikeda K, Arase Y, Saitoh S, Kobayashi M, Suzuki Y, Suzuki F, Tsubota A, Chayama K, Murashima N, Kumada H. Interferon beta prevents recurrence of hepatocellular carcinoma after complete resection or ablation of the primary tumor - a prospective randomized study of hepatitis C virus-related liver cancer. *Hepatology* 2000;32:228-232
- 87 Kubo S, Nishiguchi S, Hirohashi K, Tanaka H, Shuto T, Yamazaki O, Shiomi S, Tamori A, Oka H, Igawa S, Kuroki T, Kinoshita H.
- 88 Suou T, Mitsuda A, Koda M, Matsuda H, Maruyama S, Tanaka H, Kishimoto Y, Kohno M, Hirooka Y, Kawasaki H. Interferon alpha inhibits intrahepatic recurrence in hepatocellular carcinoma with chronic hepatitis C: a pilot study. *Hepatol Res* 2001;20:301-311
- 89 Partensky C, Sassolas G, Henry L, Paliard P, Maddern GJ. Intraarterial iodine 131-labeled lipiodol as adjuvant therapy after curative liver resection for hepatocellular carcinoma: a phase 2 clinical study. *Arch Surg* 2000;135:1298-1300

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003年版权归世界胃肠病学杂志社

### •封面故事•

## 复旦大学肝癌研究所

复旦大学肝癌研究所的前身为1968年的上海第一医学院中山医院肿瘤小组。1978年更名为中山医院肝癌研究室，1988年更名为上海医科大学肝癌研究所，2000年复旦大学与上海医科大学两校合并后更名为复旦大学肝癌研究所。著名肝癌外科学家、中国工程院院士汤钊猷教授任所长，叶胜龙、吴志全、刘银坤三位教授任副所长。

### 1 学术地位

该所是我国最重要的肝癌防治研究中心之一，为国家重点学科、上海市肝脏肿瘤临床医学中心、复旦大学“重中之重”建设学科及“211”建设项目肿瘤学重点学科。中国抗癌协会肝癌专业委员会及国家级医学继续教育项目(全国肝癌诊疗进展学习班)依托单位。已成功地承办四次大型“上海国际肝癌肝炎会议”和八届“全国肝癌学术会议”。

### 2 硬件条件

研究所由肝肿瘤外科、内科及实验室组成，拥有60张专科病床及面积900 m<sup>2</sup>的设备精良的实验室，以及正在建设中的“上海市肝肿瘤临床医学中心”大楼，面积20 000 m<sup>2</sup>，床位360张，实验室面积达3 000 m<sup>2</sup>。

### 3 技术力量

该所现有院士1人，教授10人，副教授(副主任医师、副研究员)10人，主治医师4人，助理研究员5人，主管技师3人。该所是博士学位及硕士学位授予点，设有博士后流动站(临床医学)。现有博士生导师8人，硕士生导师5人。

### 4 临床特色

以外科治疗为主，内外科、中西医、基础与临床结合的综合治疗研究是该所的特色。其特色包括：(1)肝癌的早诊早治(获国家科技进步一等奖)；(2)不能切除肝癌的缩小后手术切除(获国家科技进步三等奖)；(3)肝癌术后复发的手术再切除；(4)复杂、难切性肝脏肿瘤的切除；(5)包括活体供肝移植在内的各种肝移植手术；(6)肿瘤局部治疗新技术(射频消融、冷冻、微波、氩氦刀、超声介入等)；(7)生物治疗；(8)自1993年开始开展以“肝癌术后复发转移的防治研究”为重点的临床综合治疗研究，探索肝癌术后复发的综合防治方案，进一步延长肝癌患者的生存期，改善预后。现已积累逾6 000例肝癌诊疗经验，5年生存率达40%左右。根据2 000年底统计，所治肝癌患者已有558例存活超过5年，169例存活10年以上，1例存活已达42年，居国际领先水平。

### 5 实验室

研究所实验室为“教育部癌变与侵袭原理重点实验室”。下设无菌动物模型实验室、细胞生物学实验室、免疫学实验室、病理学实验室、同位素实验室、分子生物学与基因治疗实验室。实验室课题组以教授课题组为主体，分为模型与分子病理、分子遗传与预测指标、血管生成、蛋白质组、生物与基因治疗等研究组。

### 6 科研方向

可分三个阶段：1960-1970年代的肝癌早诊早治研究；1980年代的不能切除肝癌缩小后切除研究；1993年起以“肝癌复发转移的防治”为重点进行研究。连续承担“六五”至“十五”的国家科技攻关、美国中华医学基金会基金及教育部、卫生部重点学科基金等重大课题的研究。现承担国家“973”、“863”、“十五”攻关、教育部、卫生部及上海市多项重大项目的研究工作。已在Cancer Res, Hepatology, Int J Cancer, Cancer, World J Surg, World J Gastroenterol等国际著名刊物上发表多篇论文，1篇论文即将在国际顶尖杂志Nature Med发表。先后获国家科技进步一、三等奖，中华医学科技进步一、二等奖，多项上海市科技进步一、二等奖，多个卫生部科技进步奖及美国癌症研究所金牌等多项奖励。

### 7 国际协作

与美国国立癌症研究所、匹兹堡大学医学院及挪威、日本多家著名科研机构、大学有良好的合作关系，与之进行课题合作及研究生培养。

### 8 封面图片

A 团结合作、奋发向上的优秀群体：研究所部分成员合影；B 主办大型国际学术会议；C 汤钊猷院士与其同事及学生讨论科研结果；D 在该所治疗的上海地区部分长期生存肝癌患者与研究所及中山医院领导联谊活动；E 应用cDNA芯片技术研究肝癌转移机制(即将在Nature Med发表)；F 国际领先的肝癌转移模型。

### 9 通讯地址

200032,上海市徐汇区医学院路136号，复旦大学肝癌研究所、复旦大学附属中山医院。zytang@srcap.stc.sh.cn

# HAb18G/CD147 拮抗肽抗肝癌转移作用的体外实验

骞爱荣,商 澎,李 郁,黄宝成,朱 平,梅其炳,陈志南

骞爱荣,商澎,李郁,黄宝成,陈志南,中国人民解放军第四军医大学细胞工程研究中心 陕西省西安市 710032  
朱平,中国人民解放军第四军医大学西京医院临床免疫科  
陕西省西安市 710033  
梅其炳,药理教研室 陕西省西安市 710032  
骞爱荣,女,1973-08-25 生,甘肃省张掖市人,汉族,医学博士。  
国家自然科学基金重点资助项目, No.39989002,国家高技术研究发展(863)计划重点项目, No.2001AA215061  
项目负责人:陈志南,710032,陕西省西安市长乐西路 17 号, 中国人民解放军第四军医大学细胞工程研究中心。 chcerc2@fmmu.edu.cn  
电话:029-3374547  
收稿日期:2002-10-09 接受日期:2002-10-22

## Effects of HAb18G/CD147 antagonistic peptides on invasion and metastasis of HCC

Ai-Rong Qian,Peng Shang,Yu Li, Bao-Cheng Huang,Ping Zhu,  
Qi-Bing Mei,Zhi-Nan Chen

Ai-Rong Qian,Peng Shang,Yu Li,Bao-Cheng Huang,Zhi-Nan Chen, Cell Engineering Research Centre,Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032,Shaanxi Province,China  
Ping Zhu,Department of Clinical Immunology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University,Xi'an, 710033,Shaanxi Province,China  
Qi-Bing Mei, Department of Pharmacology,Fourth Military Medical University,Xi'an,710032,Shaanxi Province,China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No39989002. Hi-Tech Research and Development Program of China (863) No.2001AA215061  
Correspondence to:Professor Zhi-Nan Chen, Cell Engineering Research Centre,Fourth Military Medical University,17 Changle Xilu,Xi'an 710032,Shaanxi Province,China. chcerc2@fmmu.edu.cn  
Received:2002-10-09 Accepted:2002-10-22

## Abstract

AIM:To obtain the antagonistic peptides that have effect to prevent metastasis of Hepatocellular Carcinoma(HCC).

METHODS:Nine pieces of high affinity peptides (AP-1-AP-9) were obtained by pure HAb18G/CD147 antigen to panning phage displayed random peptide library.MTT assay was used to test toxicity of AP-1-AP-9 on human hepatocellular carcinoma cell (HHCC); Gelatin zymogram was used to analyze the effects of AP-1-AP-9 on activation and production of matrix metalloproteinase (MMPs); Matrigel-boyden chamber method was used to evaluate inhibitory abilities of AP-1-AP-9 on tumor cell invasion and metastasis; Inhibitory effect of AP-1-AP-9 on HHCC adhesion to extracellular matrix protein and fb cells were investigated. The influences of AP-1-AP-9 on HHCC chemotaxis migration were also tested.

RESULTS:AP-1-AP-9 has no toxicity on HHCC; AP-1, AP-6 and AP-9 could inhibit production and activation of MMP-2; the amounts of infiltrative cells in AP-1, 3, 6, 7, 8, 9 experimental groups are significantly less than that in control group ( $P < 0.05$ ), and inhibition rate was 78.22 %, 90.1 %, 62.83 %, 56.44 %, 68.32 %, 81.19 %, respectively; AP-1-AP-9 had no effects

on HHCC adhesion to matrigel and fibronectin (FN), whereas AP-3 and AP-9 could inhibit HHCC adhesion to collagen and laminin(LN), AP-1, AP-6 and AP-9 could inhibit HHCC adhesion to fb. AP-6 could inhibit chemotaxis migration of HHCC with the inhibitory rate of 54 % without statistical significance ( $P > 0.05$ ).

CONCLUSION:HAb18G/CD147 antagonistic peptides (AP-1-AP-9) have inhibitory effects on many aspects or steps associated with metastasis of HCC, which provides avenue to explore medication for preventing metastasis of HCC.

Qian AR,Shang P, Li Y, Huang BC, Zhu P,Mei QB,Chen ZN. Effects of HAb18G/CD147 antagonistic peptides on invasion and metastasis of HCC. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(3):255-259

## 摘要

目的:筛选获得 HAb18G/CD147 高亲和性拮抗肽中具有体外抗肝癌细胞转移作用的拮抗肽。

方法:对于采用 HAb18G/CD147 纯抗原筛选噬菌体随机 12 肽库所获得的 9 条高亲和性的 12 肽(AP-1-AP-9).分别采用:MTT 法测定 AP-1-AP-9 的对肝癌细胞(HHCC)的直接毒性;明胶酶谱法分析 AP1 - AP - 9 对基质金属蛋白酶 (MMPs) 产生及其激活过程的影响;重组细胞基底膜 (Matrigel) 侵袭抑制实验测定 AP-1-9 对肝癌细胞(HHCC) 侵袭力的影响;观察 AP-1-AP-9 对 HHCC 与细胞外基质蛋白 (Matrigel, FN, LN, Collagen )、HHCC 与间质细胞 (成纤维细胞 fb) 黏附能力;以及 AP1 - 9 对 HHCC 运动能力的影响。

结果:拮抗肽 AP-1-AP-9 对 HHCC 无明显细胞毒性作用; AP-1, 6, 9 对 HHCC 刺激 fb 细胞产生 MMP-2 其激活过程具有明显的抑制作用;AP-1, 3, 6, 7, 8, 9 对 HHCC 侵袭力有明显的抑制作用( $P < 0.05$ ),抑制率分别为 78.22 %, 90.1 %, 62.83 %, 56.44 %, 68.32 % 和 81.19 %;9 条拮抗肽对 HHCC 与细胞外基质蛋白 Matrigel, FN 无明显的抑制作用,但 AP-3, 9 对 HHCC 与 Collagen , LN 的黏附有抑制作用;AP-1, 6, 9 对 HHCC 与 fb 细胞之间的黏附有抑制作用;AP-6 可抑制 HHCC 的运动能力,抑制率 54 %, 但统计学上差异无显著性( $P > 0.05$ ).

结论:HAb18G/CD147 拮抗肽(AP-1-AP-9)对肝癌的侵袭转移相关的多个环节有明显的抑制作用,为研究开发新的抗肿瘤转移多肽药物开辟了新途径。

骞爱荣,商澎,李郁,黄宝成,朱平,梅其炳,陈志南. HAb18G/CD147拮抗肽抗肝癌转移作用的体外实验.世界华人消化杂志 2003;11(3):255-259  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/255.htm>

## 0 引言

侵袭、转移行为是恶性肿瘤的本质特征。肿瘤的转移规律极其复杂，涉及诸多因素，如蛋白水解酶；血管生成因子；黏附因子，如整合素(integrin),选择素(selectin),钙黏合素(E-cadherin)等；运动因子；信号转导。在肿瘤的侵袭、转移过程中，癌细胞诱导效应细胞分泌蛋白水解酶，降解细胞外基质，其中基质金属蛋白酶(MMPs)最为重要。HAb18是我室用肝癌抗原免疫小鼠得到的特异性单克隆抗体(mAb)<sup>[1]</sup>，我们用 HAb18mAb 从人肝癌组织 cDNA 文库中筛选得到其相应抗原 HAb18G，查询 GENE BANK 发现其基因序列与 CD147 分子序列一致，并经鉴定 HAb18G 与 CD147 为同一分子，并在此基础上进行了大量研究<sup>[2-6]</sup>。CD147 分子，又名EMMPRIN(细胞外基质金属蛋白酶诱导因子)，最初源于人肺癌细胞系 LX-1<sup>[7,8]</sup>，在肝癌组织中发现尚属首次，大量研究表明 HAb18G/CD147 与其效应细胞(癌周成纤维细胞)结合，诱导产生基质金属蛋白酶(MMPs)，使肿瘤组织中 MMPs 含量及活性显著提高，间质成分和血管基底膜的胶原蛋白过度降解，癌细胞穿过基底膜及结缔组织屏障不断侵袭扩散，低转移细胞经转染 HAb18G/CD147 后侵袭及转移能力增强<sup>[9,10]</sup>。所以，筛选有效的 HAb18G/CD147 拮抗肽，在高位阻断其引起效应细胞分泌 MMPs，是抗肿瘤转移的新途径。为此，我们采用 HAb18G 纯抗原筛选噬菌体随机 12 肽文库获得了 9 条与 HAb18G/CD147 分子具有高度亲和力的多肽分子，为获得具有抗肿瘤转移作用的拮抗肽采用细胞基底膜侵袭抑制实验、明胶酶谱、抗运动、抗黏附等实验进行亲和肽的功能筛选，为进一步研究与开发肽类抗肿瘤转移药物提供新的备选化合物。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 细胞系和试剂人肝癌细胞系 HHCC 购自中科院上海细胞所细胞库；人胚胎皮肤成纤维细胞(fb)西京医院烧伤科，韩军涛博士馈赠；Millipore 公司；Matrigel 胶、层粘连蛋白(LN)购自 BD 公司；纤维粘连蛋白(FN)、Ⅰ型胶原(Col I)、DMEM 培养基购自 GIBCO 公司；四氮唑(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购自华美公司。HAb18G/CD147 拮抗肽(APs)采用固相合成法合成 9 条 HAb18G/CD147 拮抗肽(AP1-9)，成品经高效液色谱分析 > 90%，MALDI-TOF 质谱分析分子质量符合理论值。Heraeus CO<sub>2</sub> 二氧化碳培养箱(德国 Heraeus 公司)，酶标仪(Bio-Rad)，图像分析仪(上海复日科技有限公司)，96，24 孔板(Nunc,瑞典)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞毒性实验** 人肝癌细胞(HHCC)培养至对数期，用 2.5 g/L 胰酶消化，以  $8 \times 10^4$ /孔 200 μL 的密度接种于 96 孔板中同时加入 20 μL (1 g/L)APs，37℃ 孵育 2 h；弃取培养液，加入 PBS 200 μL/孔，吹打 3 遍，加入 MTT 40 μg/孔，37℃ 孵育 4 h。弃取 MTT，加入 200 μL DMSO，酶标仪 570 nm 测定吸光度 A 值。

**1.2.2 改良的明胶酶谱法<sup>[7]</sup>** 人成纤维细胞(Fb)和人肝癌细胞(HHCC)培养至对数期，用 2.5 g/L 胰酶消化，以  $10^5$ /孔的密度接种于 96 孔板中(Fb 细胞和 HHCC 细胞的体积比为 1:1，共 200 μL)，完全 DMEM 培养 24 h。弃去培养上清，用 PBS 洗 2 次后，换无血清 DMEM 培养液培养 1 h，再用 PBS 洗 2 次，加 300 μL 无血清 DMEM 培养液共培养 20 h。在培养后的 5, 10, 15 和 20 h 收集无血清 DMEM 培养细胞上清，低速离心(200 g)去除细胞碎片后，4℃ 备用。上清进行 SDS-PAGE 电泳，其中分离胶含 1 g·L<sup>-1</sup> 的明胶。电泳结束后将凝胶置于洗脱液(25 mg·L<sup>-1</sup> Triton X-100, 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl)室温洗 2 次，45 min/次，接着将凝胶置于孵育液(50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 0.2 g·L<sup>-1</sup> Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)37℃ 孵育 24 h 以上，考马斯亮蓝染色，脱色液脱色，蓝色背景上出现透亮带。经图像分析系统读取条带面积和酶解条带灰度，酶含量 = 条带面积 × (条带灰度 - 背景灰度)。

**1.2.3 重组基底膜侵袭抑制实验** 采用 Matrigel-Boyden 方法观察 Millicell 小室的滤膜保证其正常，将小室放入灭菌的 24 孔板中；在 Millicell 小室内膜上加入 Matrigel 胶(40 μL/膜)，37℃ 1 h，超净台内吹干；在小室的外部 24 孔板内加入趋化剂 200 μL；用 2.5 g/L 胰酶消化 HHCC 和 fb 细胞，离心洗涤 3 次，DMEM(含 1 g/L BCS) 悬起，1:1(各 150 μL)加入上室，同时在上室加入拮抗肽 20 μL(1 mg/ml)，在下室加入 200 μL 不完全 DMEM(含 0.1% BCS)，37℃，50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养 20 h；取出小室，弃去培养液，用棉签擦去上室中的细胞，950 mL/L 酒精固定 15 min 后，取下滤膜；固定后的滤膜 HE 染色，中性树胶封片，在 40×光镜下计数膜背面侵袭的细胞数，随机计数中间和四周共 5 个视野，每细胞计数 3 份，求出其平均值，测验重复 3 次。

### 1.2.4 拮抗肽抗 HHCC 与细胞外基质黏附实验

96 孔板中分别铺上 LN 或 FN 或 Matrigel 各 2 μg，室温干燥；加入 20 g/L BSA 20 μL/孔，37℃ 孵育 1 h，PBS 冲洗；以含 1 g/L BCS 的 DMEM 悬浮 HHCC 细胞，每孔加入 HHCC 细胞 200 μL 及 10 μL (1 g/L) 拮抗肽，37℃ 孵育 2 h；弃取培养液，加入 PBS 200 μL/孔，吹打 3 遍，加入 MTT 40 μg/孔，37℃ 孵育 4 h；弃取 MTT，加入 DMSO 200 μL，酶标仪 570 nm 测定吸光度 A 值。

### 1.2.5 拮抗肽抗 HHCC 与人 fb 黏附实验

用 2.5 g/L 胰酶消化生长至对数期的人成纤维细胞(fb)，离心，不完全 DMEM 悬浮 fb 细胞( $1 \times 10^5$ )，96 孔板中，每孔加入 200 μL，37℃，50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养 24 h。弃去 96 孔板中的培养液，PBS 洗二次，加入用 2.5 g/L 胰酶消化后，不完全 DMEM 悬浮的 HHCC 细胞( $1 \times 10^5$ )，同时加入拮抗肽(10-80 μg)。分别在 1, 2, 3 h 各自复孔中，分别取出上清，并用 PBS 冲洗 3 次，合并提取液，离心，用 PBS 100 μL 悬浮沉淀，血球计数板计数，每样重复计数 3 次，取平均值。

**1.2.6 抗趋化运动实验** 在小室下室面涂趋化剂 FN 10 μg，室温干燥；上室加入  $2 \times 10^5$  HHCC 细胞 300 μL，同时加入(1 g/L)拮抗肽 20 μL，下室加入 1 g/L BCS 的 DMEM 300 μL。

37 ,50ML/L CO<sub>2</sub> 培养 20 h; 取出小室, 弃去培养液, 用棉签擦去上室中的细胞, 950 mL/L 酒精固定 15 min 后, 取下滤膜; 固定后的滤膜 HE 染色, 中性树胶封片, 在 40×光镜下计数膜背面穿过的细胞数, 随机计数中间和四周共 5 个视野, 每细胞计数 3 份, 求出其平均值, 测验重复 2 次。

#### 统计学处理 单因素方差分析.

## 2 结果

**2.1 细胞毒性** 各实验组与对照组之间差别无显著性( $P > 0.05$ , 图 1), 表明 APs 对 HHCC 无明显的直接细胞毒性.

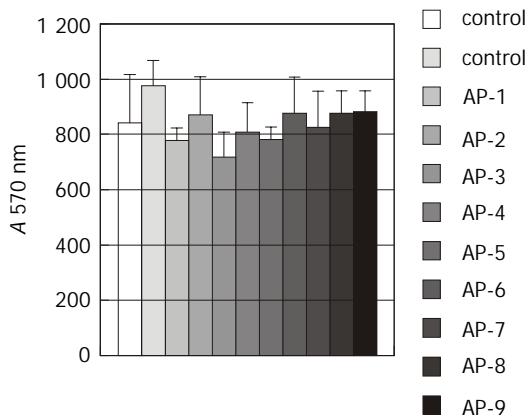


图 1 拮抗肽 AP-1~9 对 HHCC 细胞的毒性.

**2.2 明胶酶谱** 5~15 h 动态明胶酶谱法中, AP-9 对 MMP-2 和 MMP-9 的产生和激活有明显的抑制作用(图 2). 图 2 是在不同时间点采样, 进行的酶谱分析. 测定了给予 AP-9 后 5, 10, 15 h 时间段内明胶酶的变化. 其中 1, 3, 5 条带分别为给药组, 2, 4, 6 条带为对照组. 从该图可发现给药组各时间点明胶酶的含量均低于对照组各时间点, 随着时间的延长, 明胶酶的量也在逐渐增加; 另外随着时间的延长酶原形式的 ProMMP-2, 9 以及活性形式的 MMP-2, 9 产生均增加, 15 h 达到最高.

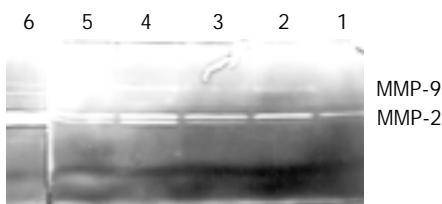


图 2 AP-9 在 5 h, 10 h 和 15 h 对明胶酶 MMP-2 和 MMP-9 产生的影响.

**2.3 重组基底膜侵袭抑制** HHCC 单独培养组与 HHCC+fb 共培养组相比较, 穿膜细胞数明显少于后者( $P < 0.05$ ), HHCC 和 fb 共培养并加入 APs 的 9 个实验组的 AP-1, 3, 6, 7, 8, 9 六条肽穿膜细胞数明显少于对照组( $P < 0.05$  表 1).

**2.4 APs 对 HHCC 细胞与细胞外基质组分黏附的影响** APs 中的 AP-1, 3, 4, 6, 7, 9 对 HHCC 与 Matrigel, FN 黏附无明显的抑制作用, 但 AP-3, 9 能抑制 HHCC 与 Collagen, LN 的黏附作用(图 3).

表 1 AP1~9 对 Millicell 小室中 HHCC 与 fb 共培养后 HHCC 侵袭力的影响

分组	穿膜细胞数( $\bar{x} \pm s$ )	抑制率(%)
对照	20.2 ± 18.5	0
AP-1	4.4 ± 1.5	78.22 <sup>a</sup>
AP-2	28 ± 6.9	-38.61
AP-3	2	90.1 <sup>a</sup>
AP-4	12.2 ± 5.6	39.6
AP-5	23.2 ± 4.7	-14.85
AP-6	7.6 ± 4.9	62.38 <sup>a</sup>
AP-7	8.8 ± 4.7	56.44 <sup>a</sup>
AP-8	6.4 ± 2.2	68.32 <sup>a</sup>
AP-9	3.8 ± 2.1	81.19 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Control

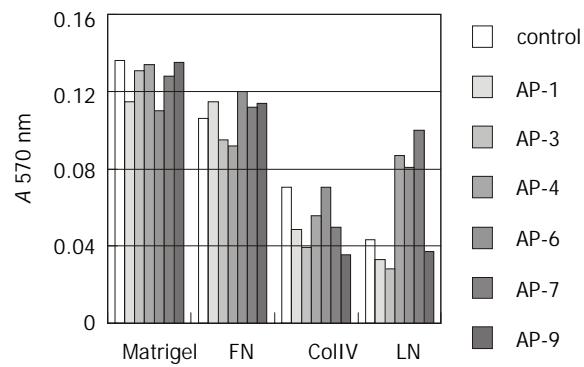


图 3 APs 对 HHCC 细胞与细胞外基质组分黏附的影响.

**2.5 APs 对 HHCC 与 fb 细胞之间黏附的影响** AP-1, AP-9 在 1, 2, 3 h, AP-6 在 2, 3 h 能明显抑制 HHCC 细胞与 fb 细胞之间的黏附(图 4).

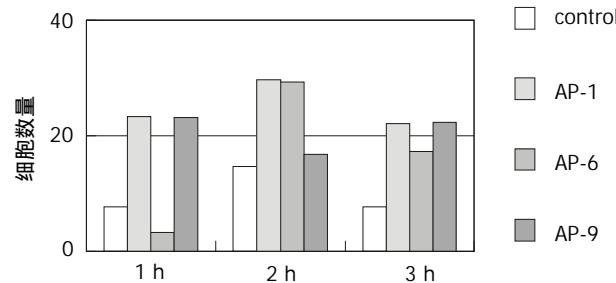


图 4 APs 对 HHCC 与 fb 细胞之间黏附的影响.

**2.6 APs 对 HHCC 运动的影响** AP-6 可抑制 HHCC 的运动(图 5), 抑制率 54 %, 但在统计学上差别无显著性.

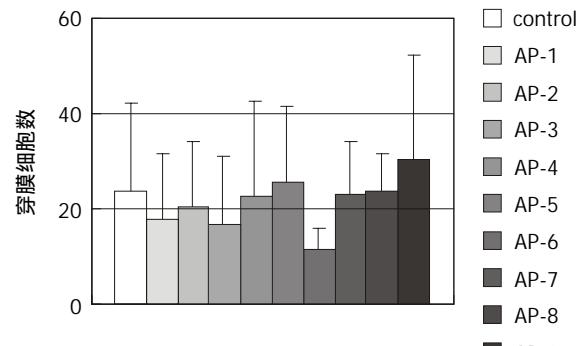


图 5 APs 对 HHCC 运动能力的影响.

### 3 讨论

CD147分子是广泛表达于造血及非造血细胞系,分子质量为50-60 ku的跨膜糖蛋白,属免疫球蛋白超家族(IgSF)成员。编码CD147的基因定位于人19号染色体19p13.3<sup>[7]</sup>,人CD147分子曾有多种不同的命名,包括TCSF/EMMPRIN<sup>[13,14]</sup>,M6<sup>[11]</sup>,Basigin<sup>[12]</sup>,Neurothelin<sup>[15,16]</sup>。如此多的命名也反映其在不同的组织中有不同的功能。我们曾经用表达HAb18G/CD147的CHO细胞刺激人成纤维细胞,证实成纤维细胞分泌MMPs的量大大增加,即其具有EMMPRIN的功能。EMMPRIN,能够结合于内皮细胞及纤维母细胞<sup>[17]</sup>,因纯化的该蛋白可刺激人成纤维细胞分泌基质金属蛋白酶(MMPs)而得名。恶性肿瘤的转移虽然极其复杂,但在其侵袭、转移演进过程中,癌细胞必须首先具备降解细胞外结缔组织间质和血管基底膜这些天然屏障的能力,这依赖于蛋白水解酶的作用。蛋白水解酶主要包括四类,即:丝氨酸蛋白酶(如纤溶酶原激活物PAAs)、半胱氨酸蛋白酶(如组织蛋白酶B)以及天门冬氨酸蛋白酶(如胃蛋白酶)和基质金属蛋白酶MMPs。其中基质金属蛋白酶最为重要,大量研究已表明,恶性肿瘤组织中MMPs的含量及活性显著高于其周围正常组织,且与肿瘤恶性表型密切正相关<sup>[18]</sup>,因而是肿瘤具备高转移潜能的一个客观、良好的分子指标,已逐渐成为近年来肿瘤侵袭、转移研究的热点。MMPs在肿瘤转移中的作用可概括为:破坏局部组织结构,促进肿瘤生长;破坏基底膜屏障,利于肿瘤转移;通过对细胞外基质的改建,促进肿瘤新生血管的形成。近来的文献报道,CD147分子不仅能刺激MMPs的产生,而且还能与MMPs在肿瘤细胞表面形成复合物,这种复合物的形成相当于将MMPs浓缩在肿瘤细胞周围,有利于肿瘤细胞周围基质的降解,使肿瘤细胞易于扩散和转移<sup>[19]</sup>。目前,抗间质降解多采用酶抑制剂,如天然酶抑制剂-组织型金属蛋白酶抑制剂(TIMPs),能够与MMPs结合并抑制酶活性,但TIMPs在组织中含量极微且难于提取,人工重组TIMPs是大分子蛋白质,存在降解和口服吸收不良等问题。人工合成的拟肽类金属蛋白酶抑制剂,如Batimastat(BB-94)由于其给药方式的局限和生物利用度低等原因,导致一期临床实验的停止<sup>[20]</sup>。目前MMPs的抑制剂(MMPIs)Marimastat及其类似物现已进入临床一期,均能不同程度的改善患者的生活质量<sup>[21]</sup>。

目前关于肽类抗肿瘤转移抑制剂的研究主要有以下几种:RGD(Arg-Gly-Asp)三肽,他通过结合和饱和细胞表面的整合素、纤维粘连蛋白(FN)和层粘连蛋白(LN)结合位点来抑制肿瘤的黏附、浸润和转移<sup>[22-25]</sup>;RGDS(Arg-Gly-Asp-Ser)四肽的类似物抑制肿瘤细胞黏附到FN、玻璃粘连蛋白(vitronectin,VN)和RGDS底物,从而抑制肿瘤转移<sup>[26-28]</sup>;YIGSR,是一合成的LN的5肽,可以抑制肿瘤细胞与内皮细胞的黏附及肿瘤细胞的侵袭能力<sup>[29-31]</sup>;来自Col IV胶原的合成肽有二种,一种是来自Col IV胶原1链胶原结构域的15肽(IV-H1),可以促进肿瘤细胞

的浸润、黏附和转移,但是抗IV-H1肽抗体可抑制肿瘤细胞的黏附、运动和转移<sup>[32]</sup>。另一种是来自Col IV胶原3链非胶原结构域(185-203),可以抑制黑素瘤细胞和成纤维肉瘤细胞的运动、膜结合的MMP-2的活化、激活设计到黏附斑激酶(FAK)和PI3激酶的信号转导通路<sup>[33,34]</sup>;来自FN的合成肽通过抑制肿瘤细胞的运动能力、整合素介导的黏附、VN刺激的酪氨酸磷酸酶包括p125(FAK)和纽带蛋白以及整合素介导的信号转导等多个环节,从而抑制肿瘤的转移<sup>[35,36]</sup>;其他的一些肽类抑制剂包括一些丝氨酸蛋白酶、基质金属蛋白酶抑制剂等均可通过抑制肿瘤转移相关的几个环节来抑制肿瘤的转移<sup>[37-40]</sup>。

在此基础上,我们采用HAb18G/CD147纯化抗原筛选噬菌体随机12肽文库,得到了9条与抗原高度亲和的12肽,再通过体内外抗转移活性功能性筛选,欲获得可以在高位阻断HAb18G/CD147诱导效应细胞分泌MMPs,以期获得对肿瘤复发转移的治疗拮抗肽。我们筛选获得的拮抗肽AP-1-9荷瘤裸鼠体内实验结果表明:APs具有抑制皮下移植瘤生长,防止肝内移植瘤播散、转移和延长荷瘤裸鼠生存期的作用。APs还对鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)和Matrigel plug小鼠体内血管生成具有抑制作用。经生物信息学分析与黏附、凋亡、血管生成及信号转导相关蛋白高度同源。经激光共聚焦和流式细胞仪证实HAb18G/CD147拮抗肽与肝癌细胞表面抗原HAb18G/CD147有较高的亲和性。我们经体外实验证明,对肝癌细胞转移的抑制率可高达90%。通过细胞毒性实验结果证明各组与对照组之间差别无显著性,这提示该拮抗肽无直接的细胞毒性,其作用机制不是直接杀伤或杀死癌细胞,进一步证实本实验的原理是阻断MMPs的产生。此外,本实验中拮抗肽对肿瘤细胞与细胞外基质之间的黏附无拮抗作用,而对肿瘤细胞与间质细胞之间的黏附有拮抗作用,抗运动实验在统计学上差别无显著性,该结果也进一步证实我们设计的靶点是正确的,是通过特异的阻断MMPs产生,进而抑制新生血管的形成,从而抑制肿瘤的侵袭、转移,提高生命延长率。

总之,HAb18G/CD147拮抗肽是从高位阻断效应细胞分泌MMPs,从而抑止肿瘤的浸润和转移,为肿瘤转移的治疗提供了新的途径。

### 4 参考文献

- Chen ZN, Liu YF, Jiang MD, Deng JL, Sui YF. Radiolocalization of human hepatoma with anti-human hepatoma monoclonal antibodies and its F(ab')2 in tumor-bearing nude mice. *Zhonghua Yixue Za Zhi* 1989;69:566-568
- Chen ZN, Liu YF, Sui YF. Significance and application of anti-malignant hepatoma MAb HAb18 in radioimmunological diagnosis of human hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Za Zhi* 1992;14:9-12
- Lou C, Chen ZN, Bian HJ, Li J, Zhou SB. Pharmacokinetics of radioimmuno-therapeutic agent of direct labeling mAb 188Re-HAb18. *World J Gastroenterol* 2002;8:69-73
- Yang LJ, Sui YF, Chen ZN. Preparation and activity of conjugate of monoclonal antibody HAb18 against hepatoma F(ab')(2) frag-

- ment and staphylococcal enterotoxin A. *World J Gastroenterol* 2001;7:216-221
- 5 Bian HJ, Chen ZN, Deng JL. Direct technetium-99m labeling of anti-hepatoma monoclonal antibody fragment:a radioimmunoconjugate for hepatocellular carcinoma imaging. *World J Gastroenterol* 2000;6:348-352
- 6 Qiu K, Wang BC, Chen ZN, Fang P, Liu CG, Wan WX, Liu YF. 99mTc-labeled HAb18 McAb Fab fragment for radioimmunoimaging in nude mice bearing human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 1998;4:117-120
- 7 Ellis SM, Nabeshima K, Biswas C. Monclonal preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor. [J]. *Cancer Res* 1989; 49: 3385-3391
- 8 Nabeshima K, Lane WS, Biswas C. Partial sequencing and characterization of the tumor cell-derived collagenase stimulatory factor. [J]. *Arch Biochem Biophys* 1991; 285: 90-96
- 9 Jiang JL, Zhou Q, Yu MK, Ho LS, Chen ZN, Chan HC. The involvement of HAb18G/CD147 in regulation of store-operated calcium entry and metastasis of human hepatoma cells. *J Biol Chem* 2001;276:46870-46877
- 10 Leber TM, Balkwill FR. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal Biochem* 1997;249:24-28
- 11 Kasinrerk W, Fiebiger E, Stefanova I, Baumruker T, Knapp W, Stockinger H. Human Leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species Homologue of Rat OX-47, Mouse Basigin, and Chicken HT 7 molecule. *J Immunol* 1992; 149:847-854
- 12 Kaname T, Miyauchi T, Kuwano A, Matsuda Y, Muramatsu T, Kajii T. Mapping basigin(BSG). a member of Immunoglobulin superfamily, to 19P 13.3. [J]. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 64: 195-197
- 13 Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, Nabeshima K. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (Renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. [J]. *Cancer Res* 1995;55: 434-439
- 14 Guo H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP, Biswas C. Stimulation of matrix metalloproteinase Production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese Hamster Ovary Cell. [J]. *J Biol Chem* 1997; 272: 24-27
- 15 Seulberger H, Unger CM, Risau W. HT7, Neurothelin, Basigin, Gp42 and OX-47—many names for one developmentally regulated immunoglobulin-like surface glycoprotein on blood-brain barrier endothelium, epithelial tissue barrier and neurons. [J]. *Neurosci Lett* 1992;140: 93-97
- 16 Schlosshauer B, Herzog KH. Neurothelin: an inducible cell surface glycoprotein of blood-brain barrier-specific endothelial cells and distinct neurons. [J]. *J Cell Biol* 1990;110:1261-1274
- 17 Kasinrerk W, Tokrasinwit N, Phunpae P. CD147 monoclonal antibodies induce homotypic cell aggregation of monocytic cell line U937 via LFA-1/ICAM-1 pathway. [J]. *Immunology* 1999;96:184-192
- 18 Davies B, Miles DW, Happerfield LC, Naylor MS, Bobrow LG, Rubens RD, Balkwill FR. Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. [J]. *Br J Cancer* 1993;67:1126-1131
- 19 Guo H, Li R, Zucker S, Toole BP. EMMPRIN( CD147), an inducer of matrix metalloproteinase synthesis ,also binds interstitial collagenase to the tumor cell surface. *Cancer Res* 2000;388-391
- 20 Zucker S, Cao J, Chen WT. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene* 2000; 19:6642-6650
- 21 Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 2002;295: 2387-2392
- 22 Tuschiya Y, Sawada S, Tsukada K, Saiki I. A new pseudo-peptide of Arg-Gly-Asp (RGD) inhibits intrahepatic metastasis of orthotopically implanted murine hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2002;20:319-324
- 23 Pasqualini R, Koivunen E, Ruoslahti E. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J. Cell Biol* 1995;130:1189-1196
- 24 Sogabe T, Nishimura S, Chung YS, Sowa M. Role of tripeptide Arg-Gly-Asp (RGD) on adhesiveness of human pancreatic cancer cell, PANC-1 to extracellular matrix. *Nippon Rinsho* 1995;53: 1648-1652
- 25 Gehlsen KR, Argraves WS, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Inhibition of in vitro tumor cell invasion by Arg-Gly-Asp-containing synthetic peptides. *J Cell Biol* 1988;106:925-930
- 26 Komazawa H, Saiki I, Aoki M,Kitaguchi H, Satoh H, Kojima M, Ono M, Itoch I, Azuma I. Synthetic Arg-Gly-Asp-Ser analogues of the cell recognition site of fibronectin that retain antimetastatic and anti-cell adhesive properties. *Biol Pharm Bull* 1993;16:997-1003
- 27 Saiki I, Koike C, Obata A, Fujii H, Murata J, Kiso M, Hasegawa A, Komazawa H, Tsukada H, Azuma I, Okada S, Oku N. Functional role of sialyl Lewis X and fibronectin-derived RGDS peptide analogue on tumor-cell arrest in lungs followed by extravasation. *Int J Cancer* 1996;65:833-839
- 28 Fujii H, Komazawa H, Mori H, Kojima M, Itoh I, Murata J, Azuma I, Saiki I. Antimetastatic activities of synthetic Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) and Arg-Leu-Asp-Ser (RLDS) peptide analogues and their inhibitory mechanisms. *Biol Pharm Bull* 1995;18:1681-1688
- 29 Iwamoto Y, Robey FA, Graf J, Sasaki M, Kleinman HK, Yamada Y, Martin GR. YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. *Science* 1987;238:1132-1134
- 30 Iwamoto Y, Fujita Y, Sugioka Y. YIGSR, a synthetic laminin peptide, inhibits the enhancement by cyclophosphamide of experimental lung metastasis of human fibrosarcoma cells. *Clin Exp Metastasis* 1992;10:183-189
- 31 Koliakos G, Trontzos C, Kouzi-Koliakos K, Kanellaki M, Grammaticos P. Lung carcinoma imaging using a synthetic laminin derivative radioiodinated peptide YIGSR. *J Nucl Med* 1997;38:1940 -1944
- 32 Chelberg MK, McCarthy JB, Skubitz AP, Furcht LT, Tsilibary EC. Characterization of a synthetic peptide from type IV collagen that promotes melanomacell adhesion, spreading, and motility. *J Cell Biol* 1990;111:261-270
- 33 Pasco S, Han J, Gillery P, Bellon G, Maquart FX, Borel JP, Kefalides NA, Monboisse JC. A specific sequence of the noncollagenous domain of the  $\alpha$  3(IV) chain of type IV collagen inhibits expression and activation of matrix metalloproteinases by tumor cells. *Cancer Res* 2000;60:467-473
- 34 Pasco S, Monboisse JC, Kieffer N. (2000). The alpha 3(IV)185-206 peptide from noncollagenous domain 1 of type IV collagen interacts with a novel binding site on the beta 3 subunit of integrin alpha vbeta 3 and stimulates focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation. *J Biol Chem* 2000; 275: 32999-33007
- 35 Humphries MJ, Olden K, Yamada KM. A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science* 1986;233: 467-470
- 36 Kato R, Ishikawa T, Kamiya S, Oguma F, Ueki M, Goto S, Nakamura H, Katayama T, Fukai F. A new type of antimetastatic peptide derived from fibronectin Clin. *Cancer Res* 2002;8:2455- 2462
- 37 Kanemoto T, Martin GR, Hamilton TC, Fridman R. Effects of synthetic peptides and protease inhibitors on the interaction of a human ovarian cancer cell line (NIH:OVCAR-3) with a reconstituted basement membrane (Matrigel). *Invasion Metastasis* 1991;11:84-92
- 38 Melchiorri A, Albini A, Ray JM, Stetler-Stevenson WG. Inhibition of tumor cell invasion by a highly conserved peptide sequence from the matrix metalloproteinase enzyme prosegment. *Cancer Res* 1992; 52:2353-2356
- 39 Yamada KM, Kennedy SW, Yamada SS, Grlnick H, Chen WT, Akiyama SK. Monoclonal antibody and synthetic peptide inhibitors of human tumor cell migration. *Cancer Res* 1990;50:4485-4496
- 40 DeRoock IB, Pennington ME, Sroka TC, Lam KS, Bowden GT, Bair EL, Cress AE. Synthetic peptides inhibit adhesion of human tumor cells to extracellular matrix proteins. *Cancer Res* 2001;61: 3308-3313

# 莪术油微球释放莪术油对人肝癌SMMC-7721细胞的作用

吴万垠,郭伟剑,常 钢

吴万垠,广州中医药大学第二附属医院肿瘤科介入室 广东省广州市 510120  
郭伟剑,上海第二医科大学新华医院肿瘤内科 上海市 200092  
常钢,广州中医药大学第二附属医院介入室 广东省广州市 510120  
吴万垠,男,1964-08-10生,安徽省和县人,汉族。1997年上海医科大学博士研究生毕业,副研究员、副主任医师,主要从事肝癌的中西医结合临床与实验研究,发表论文43篇。  
“九五”国家科技攻关课题基金资助, No.96-906-07-04;广东省自然科学基金资助, No.980663  
项目负责人:吴万垠,510120,广东省广州市大德路111号,广州中医药大学第二附属医院肿瘤科。wwanyin@hotmail.com  
电话:020-81887233-368  
收稿日期:2002-07-31 接受日期:2002-08-16

## Effect of CAO released from MS-CAO on human hepatoma cell line SMMC-7721

Wan-Yin Wu,Wei-Jian Guo,Gang Chang

Wan-Yin Wu,Department of Cancer, Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China  
Wei-Jian Guo, Department of Cancer, Xinhua Hospital of Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092, China  
Gang Chang, Department of Interventional Therapy, Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China  
Supported by National key project of the 9<sup>th</sup> 5-year plan for Medicine and Health, No.96-906-07-04; Guangdong Provincial Natural Science Grant, No. 980663  
Correspondence to: Wan-Yin Wu, Department of Cancer, Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, 111 Dadelu, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China. wwanyin@hotmail.com  
Received:2002-07-31 Accepted:2002-08-16

## Abstract

AIM:To explore the inhibitory effects and mechanisms of CAO released from CAO-MS on the growth of human hepatoma cell line SMMC-7721.

METHODS:Inhibitory effects of CAO and CAO-MS on the growth of human hepatoma cell line SMMC-7721 *in vitro* were determined with MTT assay. The cell cycles of SMMC-7721 treated with CAO and CAO-MS were analyzed with flow cytometry. The apoptosis of human hepatoma cell line was tested with cellular DNA quantitative analysis, Annexin labeling and morphological study. The expressions of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein and mRNA were detected, respectively, with immunocytochemistry staining (ICC) and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS:The inhibitory effects of CAO and CAO-MS on the growth of human hepatoma cell line were dose- and time-dependent ( $P < 0.01$ ). The IC<sub>50</sub>s of CAO and CAO-MS on SMMC-7721 were 50 mg/L and 100 mg/L, respectively. The proportion of SMMC-7721 in G<sub>0</sub>+G<sub>1</sub> phase increased and that in S and G<sub>2</sub>+M phase decreased after exposure with 50mg/L CAO and 100mg/L CAO-MS for 72 hours. ICC and RT-PCR analysis showed that both CAO and CAO-MS increased the level of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein and mRNA.

The effect of CAO was superior to that of CAO-MS with the same dosage of CAO and CAO-MS.

CONCLUSION:Dose-dependent inhibitory effects of CAO and CAO-MS on the growth of human hepatoma cell line are remarkable. Both CAO and CAO-MS could induce apoptosis of human hepatoma cell and keep the cell cycle at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase from up-regulating expression of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein and mRNA.

Wu WY,Guo WJ,Chang G. Effect of CAO released from MS-CAO on human hepatoma cell line SMMC-7721. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11 (3):260-263

## 摘要

目的:探讨莪术油微球(CAO-MS)释放出莪术油(CAO)对人肝癌SMMC-7721细胞的生长抑制作用及机制。

方法:用MTT法测定CAO及CAO-MS对体外培养的人肝癌细胞系SMMC-7721的生长抑制作用。用FCM测定CAO及CAO-MS对人肝癌细胞周期的影响。用DNA含量测定、Annexin标记、电镜观察细胞形态检测CAO及CAO-MS对人肝癌细胞的诱导凋亡作用。用免疫细胞化学(ICC)及RT-PCR方法分别检测p21<sup>WAF1/CIP1</sup>蛋白与mRNA表达水平。

结果:CAO与CAO-MS对肝癌细胞的生长抑制作用与药物浓度及作用时间呈一定的依赖关系( $P < 0.01$ )。药物作用72 h时,CAO与CAO-MS对SMMC-7721的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )分别约为50 mg/L和100 mg/L。50 mg/L CAO和100 mg/L CAO-MS作用于肝癌细胞72 h后,使G<sub>0</sub>+G<sub>1</sub>比例增加,S期及G<sub>2</sub>+M期比例相对下降,细胞周期阻滞于G<sub>0</sub>+G<sub>1</sub>期。DNA含量测定、Annexin标记、形态学研究结果提示,CAO与CAO-MS均能诱导肝癌细胞的凋亡,CAO的作用优于CAO-MS。ICC和RT-PCR检测结果表明,50 mg/L CAO和100 mg/L CAO-MS作用于肝癌细胞72 h后,均能提高CAO-MS p21<sup>WAF1/CIP1</sup>蛋白及mRNA表达水平,相同剂量的CAO的作用优于CAO-MS。

结论:CAO及CAO-MS对人肝癌细胞SMMC-7721均有显著的抑制增生作用,作用呈剂量依赖性;CAO及CAO-MS能诱导对人肝癌细胞SMMC-7721凋亡,并能使细胞周期阻滞于G<sub>0</sub>+G<sub>1</sub>期;CAO及CAO-MS抑制肝癌细胞增生及诱导其凋亡的机制可能与其上调p21<sup>WAF1/CIP1</sup>基因表达有关。

吴万垠, 郭伟剑, 常钢. 莪术油微球释放莪术油对人肝癌 SMMC-7721 细胞的作用. 世界华人消化杂志 2003;11(3):260-263

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/260.htm>

## 0 引言

含药微球用于经导管肝动脉灌注栓塞治疗肝细胞肝癌(HCC), 具有栓塞肿瘤血管和缓释药物达到局部抗癌的双重功效<sup>[1-4]</sup>。从活血破瘀中药药术中提取的挥发油药术油(CAO)含有多种抗癌成分。CAO对HepA肝癌有显著的抑制作用并能延长腹水癌小鼠的生存时间, 其作用机制可能与其抑制肿瘤细胞增生活性及诱导细胞凋亡有关<sup>[5-8]</sup>。将CAO制成的含药明胶微球(CAO-MS), 经肝动脉灌注治疗大鼠肝脏移植型肿瘤, 在控制瘤体增长及延长荷瘤大鼠生存时间方面均显示了较好的疗效。本研究中, 我们利用体外培养的人肝癌细胞, 对从药术油微球中缓释的药术油在避开栓塞作用后是否能达到对人肝癌细胞生长的抑制作用及其作用机制进行了探讨。

## 1 材料和方法

1.1 材料 p21<sup>WAF1</sup> 单抗(稀释度为 1:50)为 Dako 公司产品。荧光标记 Annexin V(FIFT-Annexin V)试剂盒为德国宝灵曼公司产品。PCR 引物为上海中科院植物生理研究所合成:p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 基因扩增片段为 384bp, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 5' GCGACTGTGATGCGCTAATG 3'、5' AGAACAT CAGCCGGCGTTTG 3' 作为内标的  $\beta$ -actin 扩增片段为 114 bp,  $\beta$ -actin 5' ACCCCC ACTGAAAAAGATGA 3', 5' ATCTCAAACCTCCATGATG 3' 可供静脉注射的 10 g/L CAO 注射液由我院制剂室制备, 批号 97112601, 97041601。空白微球(B-MS)及 CAO-MS 由沈阳药科大学陈济民教授负责制备, 直径 50-150  $\mu\text{m}$ 。含药微球中温药术油与明胶比例为 1:9。将 CAO-MS 及 B-MS 按 4 g/L 加入细胞培养液中, 经 24 h 释放 CAO 后, 所得的培养液即为 CAO-MS 及 B-MS 药液。再以培养液稀释至各种浓度。人肝癌细胞株 SMMC-7721 引自中国科学院上海细胞生物研究所。常规培养于 DMEM 完全培养液中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ , 50 mL/L CO<sub>2</sub> 充分湿度条件下恒温培养箱中培养, 隔 3-4 d 传代 1 次。取对数生长期的细胞用于实验。

### 1.2 方法

1.2.1 MTT 法测定 CAO 及 CAO-MS 药液对肝癌细胞的生长抑制作用。SMMC-721 细胞  $5 \times 10^3/\text{孔}$  接种于 96 孔板中; 预培养 24 h 后加入含不同浓度的 CAO 及 CAO-MS 药液 100  $\mu\text{L}$ , 并设立对照组(培养液、溶剂和 B-MS 药液), 终体积为 0.2 mL/孔。分别于 24, 48, 72 和 96 h 进行 MTT 实验, 每次实验结束前 4 h 于每实验孔中加入 MTT 液(2 g/L) 20  $\mu\text{L}$ , 再培养 4 h, 离心吸弃上清, 加入 DMSO 180  $\mu\text{L}/\text{孔}$  显色。用酶标仪在波长 570 nm 处测定并记录吸光 A, 计算抑制率: 细胞生长抑制率 = (1 - 加药组 A 平均值 / 对照组 A 平均值)  $\times 100\%$

1.2.2 FCM 检测细胞形态凋亡及细胞周期 细胞接种于 24 孔板, 预培养 24 h 后换新培养液, 加药继续培养 72 h 后收集细胞, 制成细胞悬液(每份约  $10^6$  细胞)。1 体积细胞悬液加 9 体积 700 mL/L 乙醇于 -20 $^{\circ}\text{C}$  固定 24 h; PI 染色, 上 FCM 分析细胞周期。Annexin V 标记法检测肝癌细胞

凋亡。细胞预培养 24 h 后换新培养液, 加药继续培养 72 h 后收集细胞, PBS 洗后加入 Hepes 缓冲液 96  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$  FIFT-Annexin V, 2  $\mu\text{L}$  PI (50 g/L), 室温避光孵育 10-15 min, 再加入 400  $\mu\text{L}$  Hepes 缓冲液, 上 FCM 分析。激发波长 488 nm, 双参数分析绿荧光(Annexin V 标记的细胞)及红荧光(PI 标记的胞膜破损细胞)MODFIT 软件分析细胞凋亡结果。电子显微镜观察肝癌细胞超微结构的变化。收集加药培养 72 h 后细胞, 用 25 g/L 戊二醛和 10 g/L 四氧化锇前后固定, 梯度乙醇脱水, 渗透包埋, 以常规方法制备超薄切片, 染色, 透射电镜观察。

1.2.3 检测 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白和 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> mRNA 表达 细胞预培养 24 h 后换新培养液, 加药继续培养 72 h 后收集细胞涂片, 丙酮固定, 加 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 单抗, 再依次加二抗、三抗, DAB 显色, 苏木素复染; 常规蓝化、脱水、透明、封固。参照文献标准, 评价 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白表达结果。细胞接种预培养 24 h 后换新培养液, 加 CAO(50 g/L)、CAO-MS(100 g/L) 继续培养 72 h 后收集细胞, 以 TRIZOL 试剂抽提总 RNA, 方法按说明书进行。以 RNA 为模板, 合成 cDNA, 20  $\mu\text{L}$  反应体系含 RNA 1  $\mu\text{g}$ , 5 × 缓冲液 4.0  $\mu\text{L}$ , Olig(dT) 0.2  $\mu\text{g}$ , dNTP 1 mmol/L; Rnasin 0.5  $\mu\text{g}$ ; 逆转录酶 AMV 15U/42 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 1 h, 99 $^{\circ}\text{C}$  灭活 AMV 5 min, 迅速置冰浴中, -20 $^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 反应体系含 cDNA 2.0  $\mu\text{L}$ , MgCl<sub>2</sub> 1.8 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L,  $\beta$ -actin 引物(25  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.4  $\mu\text{L}$ , p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 引物(25  $\mu\text{mmol/L}$ )各 1.0  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 1 U。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$  × 45 s, 58 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  1.5 min, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。取 20  $\mu\text{L}$  PCR 产物, 于 15 g/L 琼脂糖凝胶(含 EB 0.5 g/L)上电泳; 以 TAE 作电泳缓冲液, 6 V/cm 胶, 电泳完成后于紫外灯下观察结果并拍照, 电泳条带在图像分析仪上分析。

统计学处理 采用华西医科大学卫生统计教研室研制的《中国医学百科全书医学统计学》统计软件包。主要采用方差分析及  $\chi^2$  检验等。

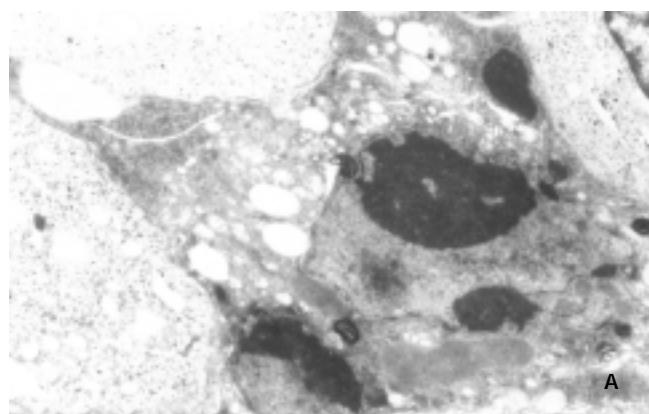
## 2 结果

2.1 CAO 及 CAO-MS 对人肝癌细胞 SMMC-7721 抑制作用 CAO 与 CAO-MS 对肝癌细胞的生长抑制作用与药物浓度及作用时间呈一定的依赖关系。作用 72 h 时, CAO 与 CAO-MS 对 SMMC-7721 的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )分别约为 50 g/L 和 100 g/L, 提示 CAO 的作用强于 CAO-MS(其中 CAO-MS 浓度指其所含 CAO 的浓度)。

2.2 肝癌细胞形态周期及细胞凋亡 肝癌细胞经 CAO 及 CAO-MS 药物作用 72 h 后, 可见部分细胞膜完整、体积缩小、皱缩、形态不规则, 细胞内出现空泡, 凋亡小体形成(图 1A); 部分细胞胞质细胞器完好, 核内染色质凝聚外突, 趋向凋亡小体形成(图 1B); 另一类细胞染色质凝集, 胞质基质溶解、出现空泡, 为凋亡小体形成早期(图 1C)。未经药物作用的肝癌细胞则多表现为胞质密度高, 细胞器正常, 核常规则或不规则, 核仁大, 凋亡小体

少见(图1D).未经药物作用的对照组肝癌细胞G<sub>0</sub>+G<sub>1</sub>S及G<sub>2</sub>+M期平均比例分别为0.61, 0.23和0.16.药物作用于肝癌细胞72 h后, 低浓度的CAO(25 g/L)对细胞各期比例无显著影响, 较高浓度(50 g/L)使G<sub>0</sub>+G<sub>1</sub>比例增加(0.89), S期(0.03)及G<sub>2</sub>+M期(0.09)比例相对下降, 细胞周期阻滞于G<sub>0</sub>+G<sub>1</sub>期. 较低浓度的CAO-MS(50 g/L)仅使G<sub>2</sub>+M期比例增加(0.55), 对G<sub>0</sub>+G<sub>1</sub>期及S期比例均无显著影响, 加倍剂量的CAO-MS(100 g/L)方显示出类似于CAO的作用, G<sub>0</sub>+G<sub>1</sub>、S及G<sub>2</sub>+M期平均比例分别为0.81, 0.09和0.10. 在Annexin标记法检测细胞凋亡实验中, 根据细胞凋亡的早期即开始出现磷脂酰丝氨酸(PS)残基的暴露(自胞膜内层转移至外层), Annexin能特异而高亲和力地与PS结合, 因而凋亡细胞表现为Annexin标记阳性, 而PI染色阴性. 坏死细胞则表现为Annexin、PI标记均阳性, 可与凋亡细胞区别. 结果高(50 g/L)、低剂量(25 g/L)的CAO均能增加凋亡肝癌细胞的比例, 高剂量( $39.0 \pm 1.1\%$ )优于低剂量( $17.5 \pm 2.0$ ,  $P < 0.01$ ); 相同剂量的CAO-MS作用低于CAO( $P < 0.01$ ), 100 g/L的CAO-MS( $34.4 \pm 2.2\%$ )诱导肝癌细胞凋亡作用与50 g/L的CAO( $39.0 \pm 1.1\%$ )的作用类似( $P > 0.05$ ). 结果提示, 二药均能诱导肝癌细胞的凋亡, 并有一定的剂量依赖关系, 相同剂量下, CAO的作用优于CAO-MS.

**2.3 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>蛋白和p21<sup>WAF1/CIP1</sup>mRNA表达** p21<sup>WAF1/CIP1</sup>蛋白ICC染色阳性定位于细胞核, 呈棕黄色. 未经药物作用的细胞, p21<sup>WAF1/CIP1</sup>蛋白表达呈弱阳性(图2A); 肝癌细胞经CAO(50 g/L)作用72 h后, p21<sup>WAF1/CIP1</sup>蛋白表达呈强阳性(图2B); CAO-MS(100 g/L)作用72 h后, p21<sup>WAF1/CIP1</sup>蛋白表达呈中度阳性(图2C). 该结果提示CAO及CAO-MS能提高p21<sup>WAF1/CIP1</sup>基因的蛋白表达水平. RT-PCR检测p21<sup>WAF1/CIP1</sup>mRNA表达的结果详见图3A, 3B. 未经药物作用的人肝癌SMMC-7721细胞未见明显的p21<sup>WAF1/CIP1</sup>扩增条带. 肝癌细胞经CAO(50 g/L)作用72 h后, 可见明显的p21<sup>WAF1/CIP1</sup>扩增条带(图3A); CAO-MS(100 g/L)作用72 h后, 亦可见明显的p21<sup>WAF1/CIP1</sup>扩增条带(图3B), 但与CAO作用后的条带相比较弱.



A

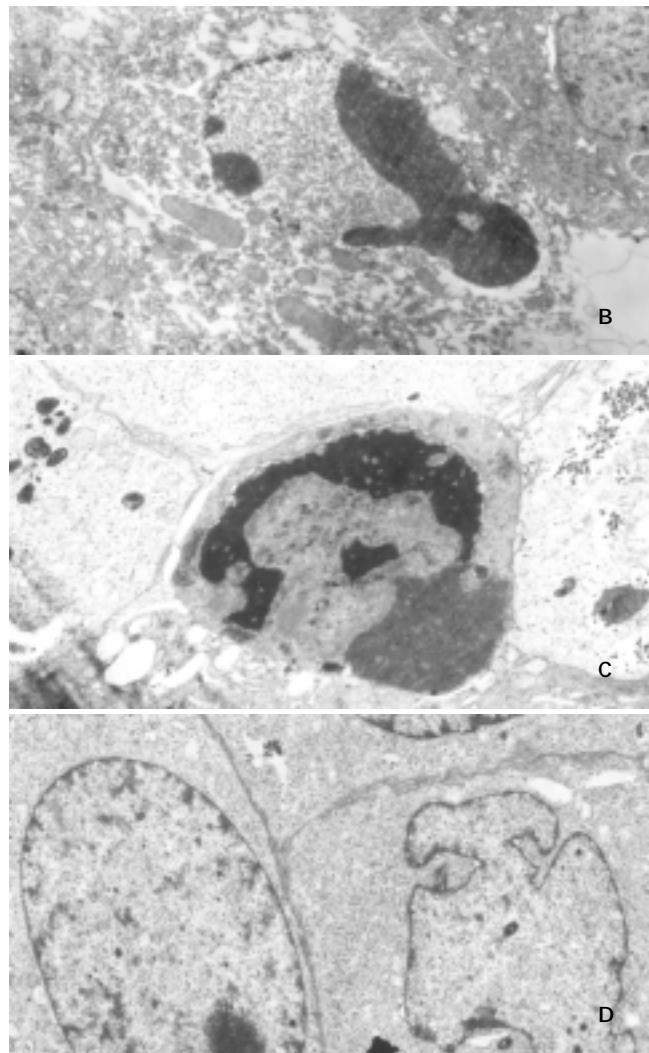


图1 人肝癌细胞电镜观察经CAO及CAO-MS作用72 h,部分细胞膜完整、体积缩小、皱缩、形态不规则, 细胞内出现空泡, 凋亡小体形成(图3A  $\times 7500$ ); 部分细胞质细胞器完好, 核内染色质凝聚外突, 趋向凋亡小体形成(图B  $\times 4000$ ); 另一类细胞染色质凝聚, 胞质基质溶解、出现空泡, 为凋亡小体形成早期(图C  $\times 6000$ )未经药物作用的肝癌细胞则多表现为胞质密度高, 细胞器正常, 核常规则或不规则, 核仁大, 凋亡小体少见(图D  $\times 4000$ ).

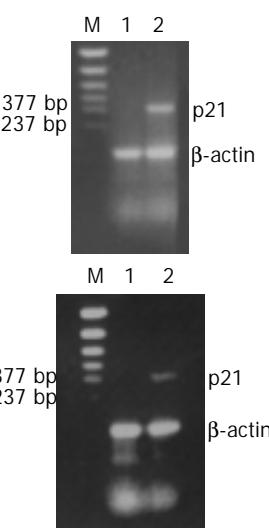


图3 RT-PCR检测p21<sup>WAF1/CIP1</sup>mRNA表达. M为DNA Marker; 1:未经药物作用的人肝癌SMMC-7721细胞未见明显的p21<sup>WAF1/CIP1</sup>扩增条带; A2肝癌细胞经CAO(50 g/L)作用72 h后见明显p21<sup>WAF1/CIP1</sup>扩增条带; B2肝癌细胞经CAO-MS(100 g/L)作用72 h见p21<sup>WAF1/CIP1</sup>扩增条带, 但与CAO作用后的条带相比较弱.

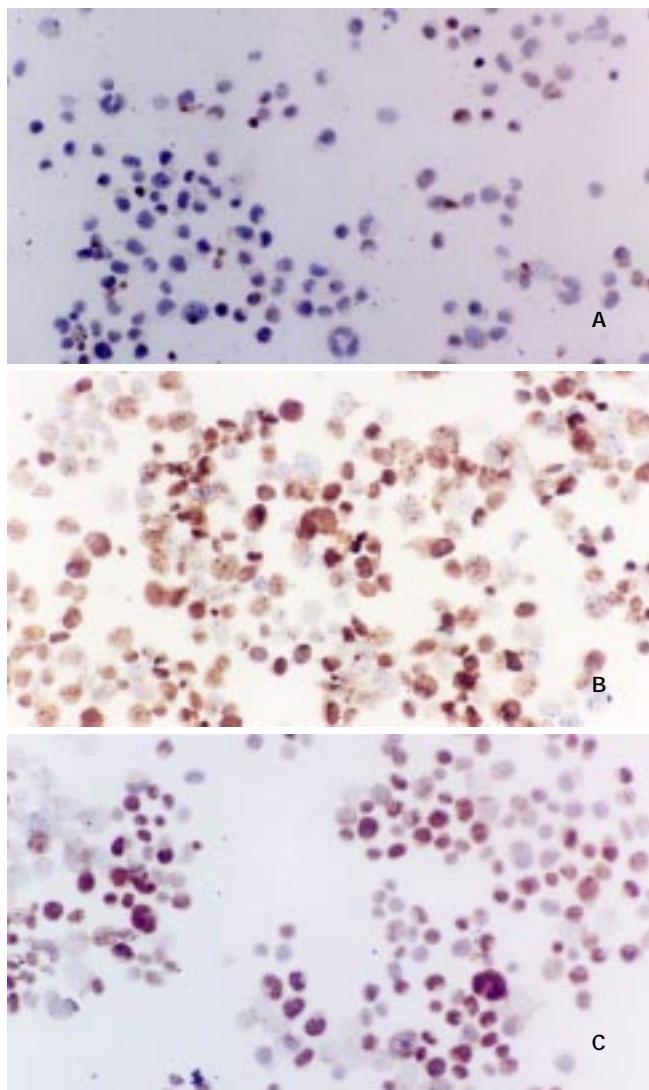


图2 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>蛋白ICC染色( $\times 250$ )，阳性染色定位于细胞核，呈棕黄色。未经药物作用的细胞，p21<sup>WAF1/CIP1</sup>蛋白表达呈弱阳性(A)；肝癌细胞经 CAO(50 g/L)作用72 h，p21<sup>WAF1/CIP1</sup>蛋白表达呈强阳性(B)；CAO-MS(100 g/L)作用72 h，p21<sup>WAF1/CIP1</sup>蛋白表达呈中度阳性(C)。

### 3 讨论

药术油(CAO)含有榄香烯、药术醇、药术二酮等多种抗癌成分,对HepA肝癌有显著的抑制作用,并能延长腹水癌小鼠的生存时间,其作用机制可能与其抑制肿瘤细胞增生活性及诱导细胞凋亡有关。将CAO制成的含药明胶微球(CAO-MS),经肝动脉灌注治疗大鼠肝脏移植型肿瘤,在控制瘤体增长及延长荷瘤大鼠生存时间方面均显示了较好的疗效。我们采用电子显微镜、DNA含量FCM分析及Annexin标记FCM分析多种方法相结合检测凋亡,能检测出早期凋亡细胞并能区分坏死细胞。p53,p21<sup>WAF1/CIP1</sup>基因为与凋亡、细胞周期相关基因,在细胞的增生、分化、凋亡过程中发挥重要作用。CAO及CAO-MS对人肝癌细胞SMMC-7721均有一定的抑制生长作用,抑制效应呈剂量依赖性,且与作用时间亦有一定的相关性。药物作用72 h时,CAO与CAO-MS对SMMC-7721的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )分别约为50 g/L和100 g/L。FCM细胞周期检测结果表明,CAO主要使细胞周期阻滞于 $G_0+G_1$ 期,S期比例降低;低剂量CAO-MS则使细

胞周期阻滞于 $G_2+M$ 期,较高剂量的作用类似于CAO。药物诱导肝癌细胞凋亡检测结果提示,电镜下可见特征性的凋亡小体形成等凋亡证据;Annexin标记法及DNA含量测定法均提示一定浓度的CAO或CAO-MS能增加肝癌凋亡细胞的百分比,在FCM图上可见明显的 $A_1$ 峰形成。以上多种方法检测出的结果提示,CAO及CAO-MS确能诱导人肝癌细胞凋亡。

免疫组化检测结果显示,CAO或CAO-MS作用于肝癌细胞后能上调p21<sup>WAF1/CIP1</sup>蛋白表达水平;RT-PCR测定结果则进一步提示他们尚能提高p21<sup>WAF1/CIP1</sup>mRNA的表达水平。综合以前的文献研究及以上的实验结果,CAO及CAO-MS抑制人肝癌细胞增生的机制可能如下:(1)CAO中含有多种抗癌成份,具细胞毒作用,可能通过直接损伤细胞DNA,激活p21<sup>WAF1/CIP1</sup>基因表达,引起细胞周期阻滞以修复DNA,无法修复时则激发凋亡发生;(2)CAO中含有的榄香烯等成份能激活自然杀伤细胞(NK)活性及诱导生物体产生白介素-2(IL-2),而已有人证实NK和IL-2对诱导肿瘤细胞凋亡有重要作用。总之,CAO以及从CAO-MS中缓释出的CAO对人肝癌细胞SMMC-7721的增生均有显著的抑制作用。其作用机制是通过调节与细胞增生及凋亡相关的某些基因表达,一方面引起肝癌细胞增生周期阻滞,另一方面诱导肝癌细胞发生程序化死亡(凋亡)。本结果为临幊上使用CAO或CAO-MS治疗原发性肝癌提供了一定的实验依据,我们预计经肝动脉灌注CAO-MS至肝癌局部后,从微球中缓释出的CAO亦能达到以上的效应,同时配合微球的微动脉栓塞作用有望进一步增强疗效,其最终疗效目前正在临幊试验过程中。

### 4 参考文献

- 1 Liu L, Jiang Z, Teng GJ, Song JZ, Zhang DS, Guo QM, Fang W, He SC, Guo JH. Clinical and experimental study on regional administration of phosphorus 32 glass microspheres in treating hepatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 1999;5:492-505
- 2 Fan J, Ten GJ, He SC, Guo JH, Yang DP, Wang GY. Arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 1998;4:33-37
- 3 Ho S, Lau WY, Leung TW, Johnson PJ. Internal radiation therapy for patients with primary or metastatic hepatic cancer: a review. *Cancer* 1998;83:1894-1907
- 4 Lau WY, Leung WT, Ho S, Leung NW, Chan M, Lin J, Metreweli C, Johnson P, Li AK. Treatment of inoperable hepatocellular carcinoma with intrahepatic arterial yttrium-90 microspheres: a phase I and II study. *Br J Cancer* 1994;70:994-999
- 5 Sharma RA, McLelland HR, Hill KA, Ireson CR, Euden SA, Manson MM, Pirmohamed M, Marnett LJ, Gescher AJ, Steward WP. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:1894-1900
- 6 Wu WY, Luo YJ, Chen JH, Chang G, Xu Q, Liu WS, Li RX. Image cytometric DNA analysis of hepatic carcinomas carried by mice treated by Curcuma aromatica oil (CAO). *Zhongxiyi Jiehe Ganbing Zazhi* 1999; 9: 18-20
- 7 Shi LC, Wu WY, Zhang WB, Qu YQ, Tan M, Xiao QM. Effect of Curcuma aromatica oil on proliferating cell nuclear antigen of hepatoma in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:156-157
- 8 Wu WY, Xu Q, Shi LC, Zhang WB. Inhibitory effects of Curcuma aromatica oil on proliferation of hepatoma in mice. *World J Gastroenterol* 2000;6:216-219

# 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

苏 颖,陈 增,林可熳,邹长松,林华妹

苏颖,陈增,林可熳,邹长松,林华妹,福建省肿瘤医院放射生物研究室 福建省福州市 350014  
苏颖,女,1958-02-23生,福建省福州市人,汉族,1982年福建医科大学毕业,主任医师。  
福建省卫生厅科学研究课题基金资助, No. 96038  
项目负责人:苏颖,350014,福建省福州市福马路凤坂马路顶91号,福建省肿瘤医院放射生物研究室 . zjsuying@pub5.fz.fj.cn  
电话:0591-3660063-8491  
收稿日期:2002-07-31 接受日期:2002-08-16

## Effect of arsenic trioxide on expression of telomerase and induction of apoptosis of human hepatoma cell

Ying Su ,Zeng Chen ,Ke-Yu Lin ,Chang-Yan Zou,Hua-Mei Lin

Ying Su , Zeng Chen , Ke-Yu Lin , Chang-Yan Zou , Hua-Mei Lin ,  
Department of Radiobiology, Fujian Tumor Hospital, Fuzhou 350014,  
Fujian Province, China  
Supported by the Health Bureau of Fujian Province, No. 96038  
Correspondence to: Ying Su, Department of Radiobiology, Fujian Tumor Hospital, Fuzhou 350014, Fujian Province, China. zjsuying@pub5.fz.fj.cn  
Received:2002-07-31 Accepted:2002-08-16

## Abstract

AIM:To investigate the effect of arsenic trioxide on expression of telomerase and induction of apoptosis of hepatoma cells *in vitro*.

METHODS:The human hepatoma cells were incubated with variety concentration of arsenic trioxide. The cell growth and proliferation were detected by MTT assay. DNA distribution in cell was analyzed with flow cytometry. The expression of telomerase was studied by *in situ* hybridization, and induction of apoptosis was observed with terminal deoxynucleotidyl transferase nick and labeling (TUNEL).

RESULTS:Inhibitory rate of proliferation of hepatoma cell with arsenic trioxide at 24, 48, 72 hours was 22.0 %, 25.7 %, 32.0 %, respectively ( $P < 0.05$ ). Flow cytometry study indicated that ratio of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase cell was decreased and the portion of S phase cell increased following treatment with arsenic trioxide. The expression of telomerase was decreased and the number of apoptotic cells increased with the increment of arsenic trioxide dosage.

CONCLUSION:Arsenic trioxide may inhibit the proliferation of hepatoma cells in a time-and concentration-dependent manner, and suppress the expression of telomerase and induce apoptosis of human hepatoma cells.

Su Y, Chen Z, Lin KY, Zou CY, Lin HM. Effect of arsenic trioxide on expression of telomerase and induction of apoptosis of human hepatoma cell. Shijie Huaren Xazhi 2003;11(3):264-267

## 摘要

目的:观察三氧化二砷对体外培养的人肝癌细胞株细胞端粒酶表达和细胞生长抑制的影响及诱导细胞凋亡的作用,探讨三氧化二砷的抗肿瘤作用及机制。

方法:采用噻唑蓝比色分析法(MTT法),流式细胞分析,原位杂交方法以及TUNEL原位末端标记法观察和检测了不同浓度的三氧化二砷对人肝癌细胞株(SMMC-7721)细胞的增生,细胞DNA含量的分布,细胞端粒酶表达的影响及细胞凋亡的诱导作用。

结果:20, 5, 5 μmol/L 三氧化二砷在24, 48, 72 h时抑制率分别为22.0 %, 25.7 %, 32.0 %, 均能明显抑制人肝癌细胞株细胞的增生(单侧置信区间为10.1, 23.7, 18.0,  $P < 0.05$ )。流式细胞分析显示加药组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例减少,S期细胞所占比例增高。随着药物浓度的增加细胞端粒酶的表达下降,而凋亡细胞数增加。

结论:三氧化二砷能抑制人肝癌细胞增生,其抑制作用具有时间-计量效应关系,并能抑制肝癌细胞端粒酶的表达及诱导肝癌细胞凋亡。

苏颖,陈增,林可熳,邹长松,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(3):264-267  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/264.htm>

## 0 引言

端粒参与DNA复制,染色体定位和染色体稳定,在控制细胞生长寿命等方面起重要作用<sup>[1,2]</sup>。端粒酶是一种能够维持端粒长度的酶,可不断合成端粒重复序列添加至染色体末端,而使细胞具有永生化的生物学特性。近来研究表明,端粒酶的激活及表达与恶性肿瘤的发生,发展存在密切关系<sup>[3-6]</sup>。我们研究了三氧化二砷(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)对人肝癌细胞株(SMMC-7721)细胞端粒酶表达和细胞生长的影响及诱导细胞凋亡的作用,并探讨二者的关系。

## 1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株SMMC-7721由成都华西医科大学彭文珍老师惠赠。细胞呈贴壁生长,常规培养于含150 mL/L 新生牛血清的RPMI1640完全培养液中,置37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养、传代,每2-3 d 传代1次。1 g/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(哈尔滨医科大学附属第一医院). 噻唑蓝(MTT, Fluka公司)。端粒酶原位杂交检测试剂盒(北京

大学医学部病理系) 原位细胞凋亡检测 (TUNEL) 试剂盒(宝灵曼公司) 流式细胞DNA试剂盒(DNA-Prep Reagents kit )(Coulter 公司).

**1.2 方法** 采用MTT法检测As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>作用后对SMMC-7721细胞增生的抑制作用. 收集对数生长期细胞, 以 $1 \times 10^4$ 细胞/孔浓度种植于96孔板, 加入不同浓度的As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 对照组加入等量的培养液, 每组设3个复孔, 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养24, 48, 72 h, 每孔加入2 g/L MTT 50 μL, 继续孵育4 h, 加入150 μL二甲基亚砜(DMSO), 振荡溶解10 min, 酶标仪以波长570 nm测A值. 对数生长期细胞以 $1 \times 10^9$ 细胞/L浓度种植于培养瓶, 每瓶细胞数约200万, 细胞贴壁后加入不同浓度的As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 对照组加入等量培养液, 继续培养24 h. 收集细胞, PBS洗2次, 滴片, 室温下干燥, 按试剂盒说明书, 采用原位杂交方法检测细胞端粒酶mRNA的表达. 以未加药者作阴性对照, 以杂交稀释液代替生物素探针杂交液作空白对照. 计数300个细胞, 计算阳性细胞比率. 细胞凋亡的检测采用TUNEL原位末端标记法. 收集经药物处理的细胞及对照组细胞, 滴片, 按试剂盒说明书进行TUNEL原位末端标记, 以未加药者作阴性对照, 以标记溶液代替TUNEL反应混合液作空白对照, 以人外周血淋巴细胞滴片作阳性对照, 计数300个细胞, 计算凋亡指数(AI), AI=(凋亡细胞数/总细胞数)×100%. 收集经不同浓度As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>作用的细胞和对照组细胞, 取 $1 \times 10^6$ 个细胞, 冷PBS(pH7.2)漂洗2次, 过滤, 加入DNA-prep Reagent, 置4℃冰箱过夜, 流式细胞仪(BIO-Rad公司)检测, 数据由ModFit软件分析.

统计学处理 采用t检验进行显著性检验.

## 2 结果

**2.1 肝癌细胞的生长抑制** As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对人肝癌细胞株细胞有显著的抑制增生作用, 且抑制作用随药物浓度提高、作用时间延长而增强(图1). 同阴性对照比较有统计学意义( $P < 0.05$ ,表1).

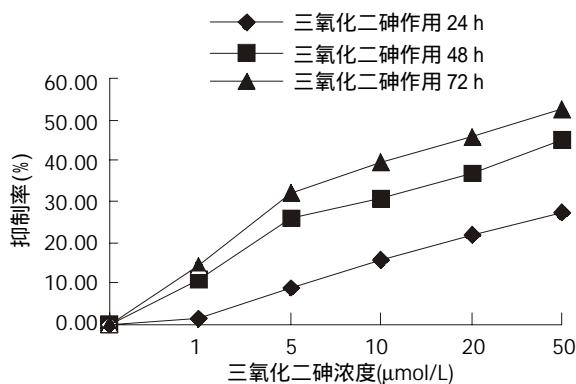


图1 三氧化二砷对肝癌细胞增生的抑制作用

**2.2 肝癌细胞端粒酶的表达** As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>抑制肝癌细胞端粒酶的表达, 当浓度为5 μmol/L时端粒酶的表达即有明显抑

制作用, 并随着浓度的提高抑制作用增强(表1).

**2.3 TUNEL末端标记** As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>诱导肝癌细胞的凋亡, 调亡细胞数随药物浓度的升高而增多(表1).

表1 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对肝癌细胞的作用 (%  $\bar{x} \pm s$ , n=3)

药物作用	对照	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (μmol/L)				
		1.00	5.00	10.00	20.00	50.00
增生抑制						
24 h	0.0	1.2±10.8	8.9±10.5	15.9±8.5	22.0±5.0 <sup>a</sup>	27.3±7.8 <sup>a</sup>
48 h	0.0	10.6±5.8	25.7±0.9 <sup>a</sup>	30.9±1.7 <sup>b</sup>	36.9±2.0 <sup>b</sup>	45.3±2.2 <sup>b</sup>
72 h	0.0	14.4±12.6	32.0±5.9 <sup>a</sup>	39.6±0.9 <sup>b</sup>	45.4±2.6 <sup>b</sup>	52.2±4.9 <sup>b</sup>
凋亡指数	26.7±2.1	36.0±5.2	35.3±2.3	43.0±7.0 <sup>a</sup>	47.7±8.5 <sup>a</sup>	50.3±7.5 <sup>b</sup>
端粒酶表达	96.3±0.6	73.0±14.9	72.7±8.7 <sup>a</sup>	72.0±5.3 <sup>b</sup>	64.3±7.5 <sup>b</sup>	41.0±0.1 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05; <sup>b</sup>P < 0.01; <sup>c</sup>P < 0.001 vs 对照

**2.4 细胞-DNA含量的分布** As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>使G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例减少,S期细胞所占比例增高,并出现G<sub>2</sub>-M期细胞(图2).

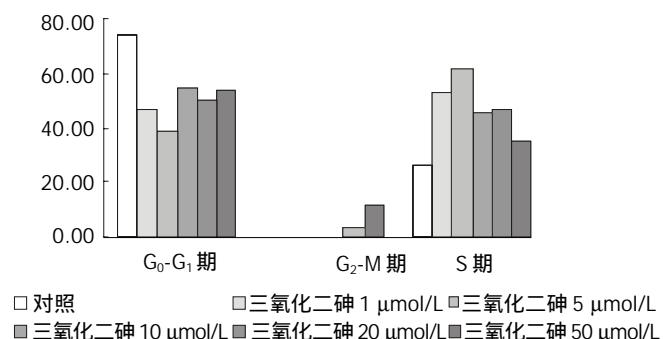


图2 三氧化二砷对肝癌细胞周期的影响

## 3 讨论

研究表明85-95%的恶性肿瘤细胞端粒酶阳性<sup>[7,8]</sup>, 而正常的体细胞几乎阴性<sup>[9-11]</sup>, 端粒酶的活化可能是各种基因改变导致肿瘤细胞绕过无限增生的限制获得永生化的共同通路, 是肿瘤细胞克隆繁衍, 使癌症得以发展的重要因素<sup>[12,13]</sup>. 因此, 如何调节端粒酶的活性成为治疗肿瘤的一个新的探索途径, 以限制端粒酶活性为目标的肿瘤治疗可能具有更广阔的临床应用前景<sup>[14-18]</sup>. 而细胞凋亡不仅在维护机体内环境稳定的方面起重要作用, 并与肿瘤的发生、发展、消退及转归有密切关系<sup>[19]</sup>. 诱导肿瘤细胞凋亡已成为肿瘤治疗的新思路, 可能是寻找抗肿瘤药物的新靶点<sup>[20-22]</sup>.

砷剂及其化合物是一种剧毒物, 有致癌及致畸作用, 但砷剂也有其有益的生物学作用, 与其他微量元素一样, 低浓度时对人体有益, 并且有抗癌作用<sup>[23]</sup>. 我国学者应用砷化合物(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)治疗急性早幼粒白血病(APL)获得满意疗效, 进一步研究证明砷剂通过诱导APL细胞凋亡而发挥作用. 近年来As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>在实体瘤的研究也逐渐增多, 砷剂的抗肿瘤作用与抑制细胞生长和诱导细胞凋亡有关<sup>[24-27]</sup>. 由于端粒酶与肿瘤生长及发展关系密

切，我们研究了As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对肝癌端粒酶表达的作用，并探讨与As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>其他抗肿瘤机制间的关系。结果提示，As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>具有下调肝癌细胞端粒酶表达的作用。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对体外培养的肝癌细胞有显著的抑制增生作用，且有时间和浓度依赖性，这与多位作者的研究报道是一致的<sup>[28,29]</sup>。进一步的研究表明，As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>在抑制肝癌细胞生长的同时，肝癌细胞端粒酶的表达下降并与剂量有效应关系，因此端粒酶可能是As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>的作用靶点。另方面据近来的研究，As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>有诱导肝癌细胞凋亡的作用，并认为诱导凋亡是As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>抑制肝癌细胞增生，杀灭肝癌细胞的主要机制，As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>可能通过改变bcl-2，Bax的表达以及两者之间的比率而诱导凋亡<sup>[30,31]</sup>。细胞凋亡受到多种基因的调控如P<sup>53</sup>，c-myc，bcl-2，Bax等<sup>[19]</sup>，而bcl-2是最早发现与凋亡有关的基因，是一种抗凋亡基因，Bax是bcl-2家族成员但作用相反，Bax既可形成同聚体，又可与bcl-2形成异二聚体，Bax蛋白与bcl-2蛋白的比值影响着细胞受到刺激后发生凋亡的比率，上调Bax和bcl-2表达下降可诱发细胞凋亡<sup>[32-34]</sup>。Mandal et al将bcl-2基因转染HeLa细胞和人结肠Difi细胞系，发现转染阳性的细胞端粒酶活性分别升高5-10倍和8-12倍，说明bcl-2蛋白的过度表达是端粒酶激活的重要途径之一。而下调bcl-2，c-myc基因的表达一方面增加凋亡比率，另方面降低端粒酶活性<sup>[28,30]</sup>。我们的研究也观察到As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>在抑制细胞增生及端粒酶表达的同时，也诱导细胞凋亡，但其引起端粒酶表达明显下调所需的浓度低于引起凋亡指数(AI)明显增高所需的浓度，提示As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>抑制端粒酶表达可能出现在凋亡之前，而不是凋亡的结果，是否为As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对端粒酶活性的抑制而启动凋亡过程有待进一步探讨。

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>作用的细胞周期动力学机制可能为周期特异性药物<sup>[23,26,28]</sup>，本组实验结果亦显示As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>改变肝癌细胞的周期分布，使S期细胞所占比例增高，并有G<sub>2</sub>-M期细胞。端粒酶活性的调节亦具有细胞周期依赖性<sup>[4]</sup>，As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对肝癌细胞周期的影响与下调端粒酶表达的关系有待进一步研究。以抑制端粒酶活性为靶点的研究，除了反义核苷酸、肽核酸、核酶、昔核类似物外，细胞分化诱导剂，细胞周期调节剂，其他细胞内外因子及药物，如巯基酶及蛋白激酶抑制剂，DNA损伤因子等抑制剂都呈现了抑制端粒酶活性的作用<sup>[35-37]</sup>。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>具有干扰DNA及RNA合成，抑制巯基酶，影响细胞周期分布，诱导细胞分化等作用<sup>[23,38,39]</sup>，这些作用可能为诱导细胞凋亡的机制，也可能通过这些机制抑制端粒酶的活性。总之As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>具有抑制肝癌细胞端粒酶活性及诱导细胞凋亡的作用，其作用机制及其端粒酶活性抑制与凋亡诱导间关系有待进一步研究。

目前，干预端粒酶活性及诱导细胞凋亡均为肿瘤治疗研究的热点。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>等药物可能通过这些作用靶点而发挥抗肿瘤作用，因此具有临床应用前景，值得进一步研究。

## 4 参考文献

- 1 Gasser SM. A Sense of the end. *Science* 2000; 288: 1377-1379
- 2 Shay JW, Wright WE. When do telomeres matter. *Science* 2001; 291:839-840
- 3 Chen B, Liu WW, Fang DC. Overview of telomerase studies. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:441-446
- 4 Wang W, Liu JP. Telomerase and tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:683-688
- 5 Fu JM, Yu XF, Shao YF. Telomerase and primary liver Cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000; 8: 461-463
- 6 Rudolph KL, Chang S, Lee HW, BLasco M, Gottlieb GJ, Greider C, Depinho RA. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient Mice. *Cell* 1996;96:701-712
- 7 Zhu R, Xiao WD, Xiong YY, Zhou DD, Wang L, Chen XY. The expression of telomerase and nm 23 in gastric adenocarcinoma and its prognosis *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8: 1305-1306
- 8 Fan GR, Wang Y, Wu GH, Huang SL. Expression of telomerase activity in primary liver carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:573
- 9 Meyerson M. Role of telomerase in normal and cancer cells. *J Clin Oncol* 2000;18: 2626-2634
- 10 Wang W, Luo HS, Yu BP. Telomerase and colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000; 8:800-802
- 11 Lin H, Chen HX, Li SG, Zeng H, Liu JH, Tong ZY. The expression of telomerase activity in various gastric mucosa lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000; 8:585-586
- 12 Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE. Telomerase and cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10: 677-685
- 13 Rahat MA, Lahat N, Gazawi H, Resnick MB, Sova Y, Ben-Ari G, Cohen M, Stein A. Telomerase activity in patients with transitional cell carcinoma: a preliminary study. *Cancer* 1999;85: 919-924
- 14 Guo Z, Yang SM. New anti-cancer target point:progress in the studies of telomere and its inhibitors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:607-609
- 15 de Lange T, Jacks T. For better or worse? telomerase inhibition and cancer. *Cell* 1999; 98: 273-275
- 16 Yang JL, Fang DC, Yang SM, Luo YH, Lu R, Luo KL, Liu WW. Construction of sense and antisense hTR eukaryotic expression vector. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000; 8: 491-493
- 17 Zhang FX, Zhang XY, Fan DM, Deng ZY, Yan Y, Wu HP, Fan JJ. Antisense telomerase RNA induced human gastric cancer cell apoptosis. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 430-432
- 18 Izbicka E, Wheelhouse RT, Raymond E, Davidson KK, Lawrence RA, Sun D, Windle BE, Hurley LH, Von Hoff DD. Effects of cationic porphyrins as g-quadruplex interactive agents in human tumor cells. *Cancer Res* 1999; 59: 639-644
- 19 Shen YF, Zhuang H, Shen JW, Chen SB. Apoptosis and neoplasms. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999; 7:267-268
- 20 Gao H, Chen JY, Yu XL. Drug-induced apoptosis in treatment of liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:686-688
- 21 Xue XC, Fang GE, Hua JD. Gastric cancer and apoptosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:359-361
- 22 Gao H, Zhang FX, Liang JR. Drug-induced apoptosis in treatment of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:795-796
- 23 Gao H, Zhao ZH, Yang F. Treatment of GI tract cancer with arsenic trioxide to induce tumor cell apoptosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:710-711
- 24 Zhu XH, Shen YL, Jing YK, Cai X, Jia PM, Huang Y, Tang W, Shi GY, Sun YP, Dai J, Wang ZY, Chen SI, Zhang TD, Waxman S, Chen Z, Chen GQ. Apoptosis and growth inhibition in malignant lymphocytes after treatment with arsenic trioxide at clinically achievable concentrations. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 772-778
- 25 Rousselot P, Labaume S, Marolleau JP, Larghero J, Noguera MH, Brouet JC, Fermand JP. Arsenic trioxide and melarsoprol induce apoptosis in plasma cell lines and in plasma cells from myeloma patients. *Cancer Res* 1999; 59: 1041-1048
- 26 Liu L, Qin SL, Chen HY, Wang JH, Chen H, Ma J, Liu WH. An experimental study on arsenic trioxide-selectively induced human hepatocarcinoma cell lines apoptosis and its related genes. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2000;8:367-369
- 27 Zhang J, Xie DR, Yao HR, Lin XG, Liang XW, Xiang YQ. Arsenic

- trioxide induce apoptosis in colorectal cancer cell line SW620 *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001; 9: 228-229
- 28 Xu HY, Gao YY, Wu QL, Gao GQ, Yang YL, Chen SX, Liu TF. Proliferation inhibition and apoptosis induction by arsenic trioxide on human hepatoma cell line in vitro. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1233-1237
- 29 Chen H, Qin SK, Pang QS, Chen HY, Ma J. Antitumor effect of arsenic trioxide on mice experimental liver cancer. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2000; 8: 27-29
- 30 Chen HY, Liu WH, Qin SK. Induction of arsenic trioxide on apoptosis hepatocarcinoma cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8: 532-535
- 31 Yang YL, Xu HY, Gao YY, Wu QL, Gao GQ. Effects of arsenic trioxide on human hepatocarcinoma cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000; 8: 1422-1423
- 32 Wang JM, Zou Q, Zou SQ. The role of bcl-2 gene in apoptosis of liver in rat with obstructive jaundice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:1035-1037
- 33 Qiao Q, Wu JS, Zhang J, Ma QJ, Lai DN. Expression and significance of apoptosis related gene bcl-2 bax in human large intestine adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:936-938
- 34 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Men RP. Expression and significance of proapoptotic gene Bax in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 1999; 5:15-17
- 35 Zhu ZH, Xia ZS, He SG. The effects of ATRA and 5-Fu on telomerase activity and cell growth of gastric cancer cells in vitro. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:669-673
- 36 Meng ZQ, Yu EX, Song MZ. Inhibition of telomerase activity of human liver cancer cell SMMC-7721 by chemotherapeutic drugs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999; 7: 252-254
- 37 Matthes E, Lehmann C. Telomerase protein rather than its RNA is the target of phosphorothioate-modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 1999;27:1152-1158
- 38 Huang C, Ma W, Li J, Dong Z. Arsenic induces apoptosis through a c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-dependent, p53-independent pathway. *Cancer Res* 1999; 59: 3053-3058
- 39 Li YM, Broome JD. Arsenic targets tubulins to induce apoptosis in myeloid leukemia cells. *Cancer Res* 1999; 59: 776-780

## • 病例报告 •

## 腹股沟斜疝术后横结肠扭转1例

童卫东,刘宝华,张连阳,雷英,陆珂

童卫东,刘宝华,张连阳,中国人民解放军第三军医大学大坪医院普外科  
重庆市 400042  
项目负责人:童卫东,400042,重庆市大坪长江支路10号,中国人民解放军第三军医大学大坪医院普外科 vdtong@hotmail.com  
电话:023-68757248  
收稿日期:2002-11-19 接受日期:2002-11-29

### 摘要

报告1例罕见的腹股沟斜疝手术后并发横结肠扭转,以期引起同道们的注意,分析其可能的发生原因。全面汇报该例患者病历资料及其诊疗过程,并附上典型的钡灌肠影像学图片1张。Medline检索有无类似病例,分析发生的可能原因。腹股沟疝手术后并发结肠扭转至国内外未见报道,原因不明,治疗上应尽量采用肠镜复位等保守的方法。

童卫东,刘宝华,张连阳,雷英,陆珂. 腹股沟斜疝术后横结肠扭转1例. 世界华人消化杂志 2003;11(3):267  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/267.htm>

### 1 病例报告

患者男,45岁,因发现右侧腹股沟区可复性包块7 a以“右侧腹股沟斜疝”收入院。平素无腹痛、便秘等不适,大便1-2次/d。查体:一般状况好,心肺(-)。腹平,未见肠型,右腹股沟区可见6×7 cm大小隆起,表面皮肤正常,界限清楚,质地软,无压痛,可还纳入腹腔,还纳后压迫内环口咳嗽不再突出。全腹无压痛,未触及包块,肝脾未触及,移动性浊音(-),肠鸣音正常。血WBC $5.0 \times 10^9/L$ , RBC $4.62 \times 10^{12}/L$ , HGB139 g/L, 尿便常规正常,肝功能正常。胸片及腹部B超正常。经术前准备择期行“右腹股沟斜疝修补术(Bassini法)”。术后第3天肛门不排气,诉腹痛、腹胀。听诊肠鸣音4-5次/min,无明显高调音。予持续胃肠减压,口服大承气汤,新斯的明肌注足三里等效果不明显,并出现

阵发性腹痛,查体见腹部膨隆,轻压痛,肠鸣音亢进,有高调音。术后第5天检查腹部平片提示低位小肠梗阻,钡灌肠见横结肠右段扭曲呈“鸟嘴样”形成狭窄,钡剂不能通过,提示良性狭窄(图1)。急诊行肠镜检查,入50 cm,见横结肠近肝曲处肠腔明显扭曲,肠腔闭塞不能通过镜身,边充气边缓慢尝试前进,镜身穿过扭曲部位后见升结肠腔明显扩张,吸出大量气体和液体,患者即刻感到腹胀明显缓解。继续进镜达回肠末段,观察全大肠未见器质性疾病,诊断:横结肠扭转。术后第7天痊愈出院。

### 2 讨论

查阅国内外文献,腹股沟疝术后发生结肠扭转未见报道,本例实属罕见。结肠扭转一般为沿系膜轴的顺时针或逆时针扭转,但本例从钡灌肠图像(图1)看,扭转是沿肠管纵轴的扭曲,而非通常所见的沿系膜轴扭转。患者术后卧床休息期间、无身体突然转动等诱发因素,且术前常规灌肠,大肠处于空虚状态。分析其发生的原因可能有以下几点:(1)术前精神紧张、麻醉等因素造成结肠神经功能紊乱,局部肠管的不协调运动导致肠管扭曲;(2)术中缝合结扎内环口时腹膜牵拉过度,引起结肠反射性反常收缩。

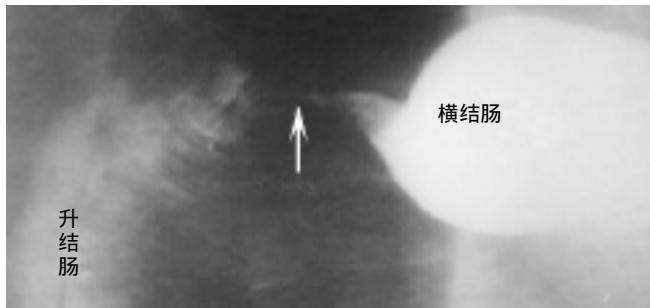


图1 横结肠近肝曲处扭转( )

- trioxide induce apoptosis in colorectal cancer cell line SW620 *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001; 9: 228-229
- 28 Xu HY, Gao YY, Wu QL, Gao GQ, Yang YL, Chen SX, Liu TF. Proliferation inhibition and apoptosis induction by arsenic trioxide on human hepatoma cell line in vitro. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1233-1237
- 29 Chen H, Qin SK, Pang QS, Chen HY, Ma J. Antitumor effect of arsenic trioxide on mice experimental liver cancer. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2000; 8: 27-29
- 30 Chen HY, Liu WH, Qin SK. Induction of arsenic trioxide on apoptosis hepatocarcinoma cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8: 532-535
- 31 Yang YL, Xu HY, Gao YY, Wu QL, Gao GQ. Effects of arsenic trioxide on human hepatocarcinoma cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000; 8: 1422-1423
- 32 Wang JM, Zou Q, Zou SQ. The role of bcl-2 gene in apoptosis of liver in rat with obstructive jaundice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:1035-1037
- 33 Qiao Q, Wu JS, Zhang J, Ma QJ, Lai DN. Expression and significance of apoptosis related gene bcl-2 bax in human large intestine adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:936-938
- 34 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Men RP. Expression and significance of proapoptotic gene Bax in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 1999; 5:15-17
- 35 Zhu ZH, Xia ZS, He SG. The effects of ATRA and 5-Fu on telomerase activity and cell growth of gastric cancer cells in vitro. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:669-673
- 36 Meng ZQ, Yu EX, Song MZ. Inhibition of telomerase activity of human liver cancer cell SMMC-7721 by chemotherapeutic drugs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999; 7: 252-254
- 37 Matthes E, Lehmann C. Telomerase protein rather than its RNA is the target of phosphorothioate-modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 1999;27:1152-1158
- 38 Huang C, Ma W, Li J, Dong Z. Arsenic induces apoptosis through a c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-dependent, p53-independent pathway. *Cancer Res* 1999; 59: 3053-3058
- 39 Li YM, Broome JD. Arsenic targets tubulins to induce apoptosis in myeloid leukemia cells. *Cancer Res* 1999; 59: 776-780

• 病例报告 •

## 腹股沟斜疝术后横结肠扭转1例

童卫东,刘宝华,张连阳,雷英,陆珂

童卫东,刘宝华,张连阳,中国人民解放军第三军医大学大坪医院普外科  
重庆市 400042  
项目负责人:童卫东,400042,重庆市大坪长江支路10号,中国人民解放军第三军医大学大坪医院普外科 vdtong@hotmail.com  
电话:023-68757248  
收稿日期:2002-11-19 接受日期:2002-11-29

### 摘要

报告1例罕见的腹股沟斜疝手术后并发横结肠扭转,以期引起同道们的注意,分析其可能的发生原因。全面汇报该例患者病历资料及其诊疗过程,并附上典型的钡灌肠影像学图片1张。Medline检索有无类似病例,分析发生的可能原因。腹股沟疝手术后并发结肠扭转至国内外未见报道,原因不明,治疗上应尽量采用肠镜复位等保守的方法。

童卫东,刘宝华,张连阳,雷英,陆珂. 腹股沟斜疝术后横结肠扭转1例. 世界华人消化杂志 2003;11(3):267  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/267.htm>

### 1 病例报告

患者男,45岁,因发现右侧腹股沟区可复性包块7 a以“右侧腹股沟斜疝”收入院。平素无腹痛、便秘等不适,大便1-2次/d。查体:一般状况好,心肺(-)。腹平,未见肠型,右腹股沟区可见6×7 cm大小隆起,表面皮肤正常,界限清楚,质地软,无压痛,可还纳入腹腔,还纳后压迫内环口咳嗽不再突出。全腹无压痛,未触及包块,肝脾未触及,移动性浊音(-),肠鸣音正常。血WBC5.0×10<sup>9</sup>/L, RBC4.62×10<sup>12</sup>/L, HGB139 g/L, 尿便常规正常,肝功能正常。胸片及腹部B超正常。经术前准备择期行“右腹股沟斜疝修补术(Bassini法)”。术后第3天肛门不排气,诉腹痛、腹胀。听诊肠鸣音4-5次/min,无明显高调音。予持续胃肠减压,口服大承气汤,新斯的明肌注足三里等效果不明显,并出现

阵发性腹痛,查体见腹部膨隆,轻压痛,肠鸣音亢进,有高调音。术后第5天检查腹部平片提示低位小肠梗阻,钡灌肠见横结肠右段扭曲呈“鸟嘴样”形成狭窄,钡剂不能通过,提示良性狭窄(图1)。急诊行肠镜检查,入50 cm,见横结肠近肝曲处肠腔明显扭曲,肠腔闭塞不能通过镜身,边充气边缓慢尝试前进,镜身穿过扭曲部位后见升结肠腔明显扩张,吸出大量气体和液体,患者即刻感到腹胀明显缓解。继续进镜达回肠末段,观察全大肠未见器质性疾病,诊断:横结肠扭转。术后第7天痊愈出院。

### 2 讨论

查阅国内外文献,腹股沟疝术后发生结肠扭转未见报道,本例实属罕见。结肠扭转一般为沿系膜轴的顺时针或逆时针扭转,但本例从钡灌肠图像(图1)看,扭转是沿肠管纵轴的扭曲,而非通常所见的沿系膜轴扭转。患者术后卧床休息期间、无身体突然转动等诱发因素,且术前常规灌肠,大肠处于空虚状态。分析其发生的原因可能有以下几点:(1)术前精神紧张、麻醉等因素造成结肠神经功能紊乱,局部肠管的不协调运动导致肠管扭曲;(2)术中缝合结扎内环口时腹膜牵拉过度,引起结肠反射性反常收缩。

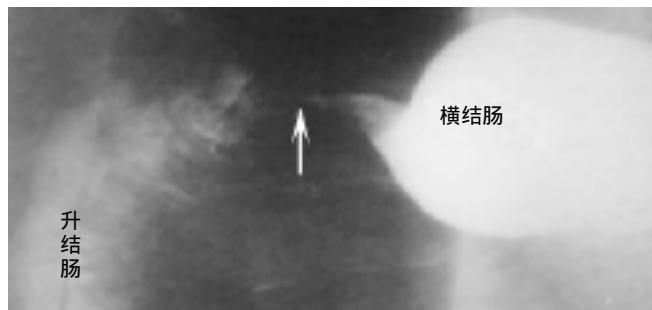


图1 横结肠近肝曲处扭转( )

# 经动脉化疗栓塞结合经皮微波凝固治疗肝癌的实验和临床研究

申宝忠,刘岩,李任飞,杨光,于友涛,董宝玮,梁萍

申宝忠,刘岩,李任飞,杨光,于友涛,哈尔滨医科大学第三临床医学院放射科 黑龙江省哈尔滨市 150040  
董宝玮,梁萍,中国人民解放军总医院 北京市 100853  
申宝忠,男,1961-01-02生,黑龙江省齐齐哈尔市人,汉族,1984年哈尔滨医科大学本科毕业,1999年哈尔滨医科大学硕士研究生毕业,教授,主任医师,主要从事消化系统的影像诊断及介入治疗研究。  
哈尔滨市科委基金资助课题, NO.2002AA9CS151-2  
项目负责人:申宝忠,150040,黑龙江省哈尔滨市哈平路150号,哈尔滨医科大学第三临床医学院。shenbzh@hotmail.com  
电话:0451-6623347 传真:0451-6623347  
收稿日期:2002-10-07 接受日期:2002-10-29

## Effects of intraarterial chemoembolization combined with percutaneous microwave coagulation on hepatocellular carcinoma: a clinical and experimental study

Bao-Zhong Shen,Yan Liu,Ren-Fei Li,Guang Yang,You-Tao Yu,  
Bao-Wei Dong,Ping Liang

Bao-Zhong Shen,Yan Liu, Ren-Fei Li, Guang Yang, You-Tao Yu,  
Department of Radiology, Third Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China  
Bao-Wei Dong, Ping Liang, Department of Ultrasound, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853  
Supported by the Natural Scientific Foundation of Harbin City, NO. 2002AA9CS151-2  
Correspondence to: Dr.Bao-Zhong Shen, Department of Radiology, Third Affiliated Hospital, Harbin Medical University, 150 Haping Road, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China. shenbzh@hotmail.com  
Received:2002-10-07 Accepted:2002-10-29

## Abstract

AIM: To evaluate the role of microwave coagulation for liver cancer after occlusion of hepatic artery in animal experiment and clinical study.

METHODS: Total 24 suitable hepatic lobes of ten dogs were separated into two groups. Microwave coagulation alone (control group) or after hepatic artery occlusion (experiment group) was performed respectively. The power of irradiation was 50 W and the duration was 300 and 400 seconds. Clinically, 25 patients with hepatocellular carcinoma (30 nodules) were treated with PMCT after TACE. The TACE was performed 1-3 times and PMCT 1-2 times totally in every patients.

RESULTS: In animal experiment, the coagulated area was elliptic in control group and was elliptic or round in experimental group. The volume of coagulated tissue in experimental group was 3.8 times bigger than that in control. Clinically, all the lesions in contrast-enhanced CT showed slight enhancement or no enhancement after treatment. Intratumoral blood flow decreased significantly in 6 patients and disappeared

in 20 patients. In 19 patients with elevated  $\alpha$ -fetoprotein, the level decreased in all patients and was normalized in 14. There were no significant side-effects.

CONCLUSION: PMCT after TACE can significantly enlarge the necrosis volume of microwave coagulation, and promote the efficacy of treatment for hepatocellular carcinoma.

Shen BZ,Liu Y,Li RF,Yang G,Yu YT,Dong BW,Liang P. Effects of intraarterial chemoembolization combined with percutaneous microwave coagulation on hepatocellular carcinoma: a clinical and experimental study. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(3):268-271

## 摘要

目的:通过动物实验和临床研究评价经动脉化疗栓塞(TACE)+经皮微波凝固(PMCT)在肝癌治疗中的作用。

方法:活体实验狗10只,取其中24个肝叶分别行TACE+PMCT和单纯PMCT,微波输出功率50W,时间为300和400s,比较两组动物肝脏凝固范围的大小和形态.另原发性肝癌25例(30个结节)行TACE+PMCT治疗,TACE治疗1-3次,PMCT治疗1-2次.

结果:动物实验中,非栓塞组组织凝固区多为椭球形.栓塞+微波组组织凝固区为椭球形或近球形,凝固灶体积较前者平均增大3.8倍.临床CT复查,所有术前强化的病灶动脉期强化明显减弱或消失.6例患者再次血管造影表现为肿瘤血供明显减弱,20例表现为肿瘤血供消失.19例AFP升高的患者均出现 AFP下降,14例达正常范围.未出现明显并发症.

结论:TACE后行PMCT可明显增大组织凝固范围,提高肝癌治疗的疗效.

申宝忠,刘岩,李任飞,杨光,于友涛,董宝玮,梁萍. 经动脉化疗栓塞结合经皮微波凝固治疗肝癌的实验和临床研究. 世界华人消化杂志 2003;11(3):268-271  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/268.htm>

## 0 引言

微波凝固治疗肝癌(HCC),可产生完全,局部组织坏死.我们通过阻断肿瘤供血血管,减低血流所引起的冷却效应,观察经动脉化疗栓塞(TACE)后经皮微波凝固治疗(PMCT)的范围和形态,并在实验的基础上应用于临床,总结TACE+PMCT在治疗HCC中的作用.

## 1 材料和方法

1.1 材料 选择成年狗 10 条, 全麻后进行实验。共选择其中 24 个肝叶行微波凝固。(1)栓塞组开腹后经胃十二指肠动脉逆行插管至肝固有动脉, 注入碘化油和明胶海绵碎屑, 栓塞肝动脉一级分支后, 于栓塞叶段行微波固化; (2)非栓塞组于与栓塞相应的叶段直接行微波固化, 进针深度与栓塞组相同。微波(2 450 Hz)天线长度为 27 mm, 输出功率 50 和 60 W, 加热时间 300 或 400 s。实验结束后取肝组织剖开, 观察凝固灶的大小及形态, 并观察其镜下病理改变。

1.2 方法 HCC 患者 25 例, 男 22 例, 女 3 例, 年龄 35~63(平均 49)岁。肿瘤最大径 2.9~8.2(平均 5.2 cm), 单发结节 21 例, 4 例为 2~3 个结节, 肝功能为 Child A,B 级。TACE 方案均采用动脉灌注 Epi-ADM 50 mg, 5-FuDR 1 000 mg, 丝裂霉素 20 mg+ 碘化油 10~20 mL 栓塞肿瘤血管, 明胶海绵碎屑或明胶海绵条栓塞至肿瘤供血动脉完全消失。TACE 后 2~3 d, 局部麻醉后行超声引导下 PMCT 治疗, 依据肿瘤大小穿刺 1~5 针, 2~10 点微波凝固治疗, 对于直径 < 6 cm 的肿瘤, 我们使微波凝固后的强回声将肿瘤完全覆盖。直径 > 6 cm 的肿瘤, 由于患者承受能力的限制, 则着重对肿瘤的周边及碘化油充盈缺损区行微波固化。术后检查肝功能变化, 并行 CT 增强扫描, 数字减影、超声及 AFP 检查。根据复查结果, 行补充 TACE 或 PMCT 治疗, 治疗间隔时间 1~3 mo。本组患者 TACE 治疗 1~3 次, PMCT 治疗 1~2 次。

统计学处理 样本均数 t 检验。

## 2 结果

2.1 动物实验 肝组织微波凝固后肉眼观呈现以天线为长轴的轮廓清晰的椭球体, 由中心向外依次分为中心区, 凝固区, 充血反应区三层。单纯微波凝固组 中心区宽约 5 mm, 呈黑褐色焦带状; 凝固区位于碳化区的外周, 呈灰褐色, 质硬, 紧邻中心区含微孔; 充血反应区位于凝固坏死区的外周, 宽约 3 mm, 呈红色。充血反应区的外围可见一条宽约 1 mm 的暗红色出血带(图 1)。栓塞 + 微波凝固组 中心区宽约 5 mm, 成黑褐色焦带状; 凝固区呈灰白色, 质硬, 气化明显; 充血反应区宽约 8 mm, 呈淡红色, 有时其外可见不明显的暗红色出血带。(图 2)凝固时间 400 s 时, 中心碳化区及周围气化较凝固时间 300 s 时明显。光镜下中心区表现为黑褐色无结构碳化区; 凝固区肝组织正常结构消失, 肝细胞分界不清, 细胞膜结构不清, 呈重度凝固变性, HE 染色呈深红色(图 3); 反应区表现为肝细胞变性, 但程度较轻, 可见血管充血(图 4)。单纯微波凝固治疗单电极在肝组织内形成长径 25~33 mm, 短径 10~22 mm 的凝固灶, 栓塞后可形成长径 33~44 mm, 短径 24~33 mm 的凝固灶, 有显著性差别( $P < 0.05$ )。栓塞后平均长径增大约 1.3 倍, 短径增大约 1.7 倍, 体积(按公式  $V=4/3 \pi r^3$ ,  $r$  短轴  $\times 2 r$  长轴, 粗略计算)增大约 3.8 倍。微波输出时间 400 s 时形成的凝

固灶略大于输出时间 300 s 时所形成的凝固灶, 但在统计学上无显著差别( $P > 0.05$ )。

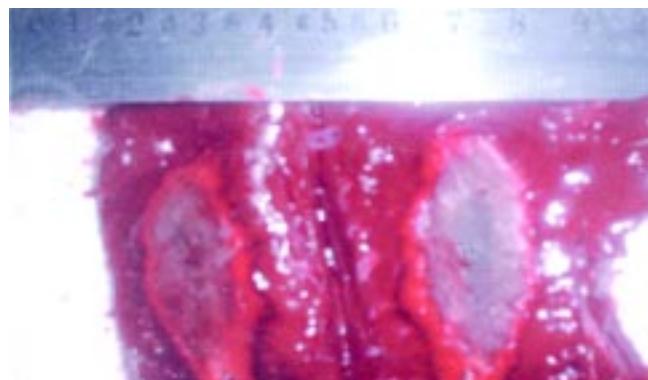


图 1 单电极单纯微波凝固 微波输出功率 50 W, 输出时间 300 s。中央为黑褐色碳化区, 其外部为灰褐色凝固区(29 × 15 × 15 mm), 外周为 3 mm 宽红色反应区。



图 2 栓塞后单电极微波凝固微波输出功率 50 W, 输出时间 300 s。中央为黑褐色碳化区, 其外部为灰褐色凝固区(40 × 27 × 27 mm), 气孔明显, 外周为 7 mm 宽淡红色反应区。

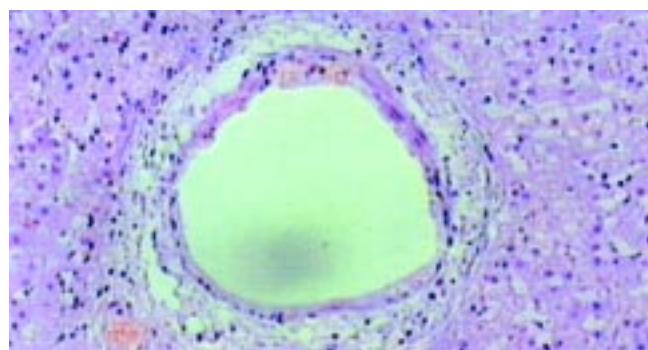


图 3 凝固区: 针孔旁以纤维化为主(中心碳化已脱落), 周围细胞变性, 呈疏松改变。肝细胞无明显界限, 变性重。个别小血管扩张充血。

2.2 临床研究 首次治疗至今为 6~11(平均 9 mo), 所有患者均存活。CT 扫描见 20% 的病灶缩小 50% 以上, 27 缩小 25~50%, 33% 缩小 25% 以内, 3 例病灶大小无明显变化, 3 例病灶增大, 2 例患者在其他叶段内出现新病灶。CT 增强扫描, 坏死区表现为无强化的低密度影, 增强区表示肿瘤残留或复发。24 个病灶(80%) 坏死完全。治疗前 16 个结节为低回声, 8 个为高回声, 6 个为混杂回声, TACE 后 2~3 d 超声检查, 碘化油沉积良好的肿瘤区显示为高回声, 肿瘤周边可见

约3 mm环形低回声区，PMCT治疗过程中显示为围绕微波天线不断扩大的强回声区。24 h后强回声消失，凝固灶内血流信号消失。治疗前16例原发性肝癌的患者表现为AFP增高，为30-4580 ug，治疗后所有患者均表现为AFP值减低，其中10例降为正常值(<20 ug/L)。21例术前血管造影肿瘤染色较明显的患者，9例于首次TACE+PMCT后30-45 d血管造影检查表现为肿瘤染色完全消失，7例经过2-3次TACE及1-2次PMCT后肿瘤染色完全消失，5例可见肿瘤染色较治疗前明显减少(图5,6)。术后出现发热反应19例，达37.2-38.7，其中16例于5 d内消失，其余3例20 d内消失，22例患者在PMCT后出现在上腹疼痛，均于术后1 wk内缓解。所有患者均于术后1 wk内出现转氨酶一过性升高，1例穿刺点处皮肤轻度烧伤。2例自觉右上腹部皮区痛觉敏感(考虑为肋间神经损伤)，未见针道肿瘤细胞种植，无胆道损伤、出血、周边脏器损伤、门脉血栓、气胸等严重并发症，2例出现腹水，经治疗后消失。

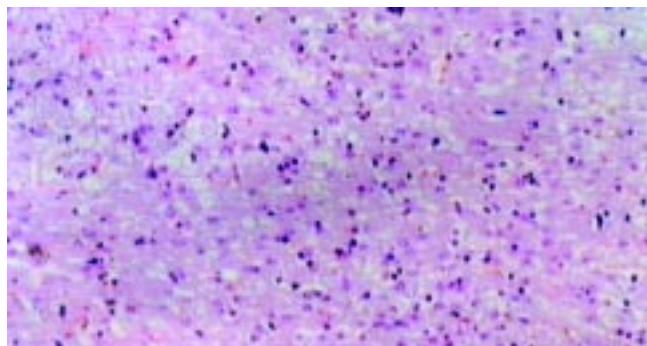


图4 反应区：肝正常结构消失，肝细胞呈轻度变性，胞间可见点状出血。

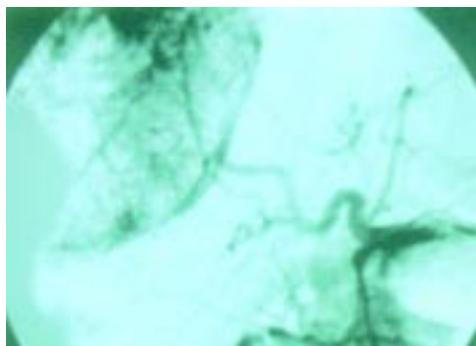


图5 治疗前肿瘤血管造影显示肿瘤内血供丰富。

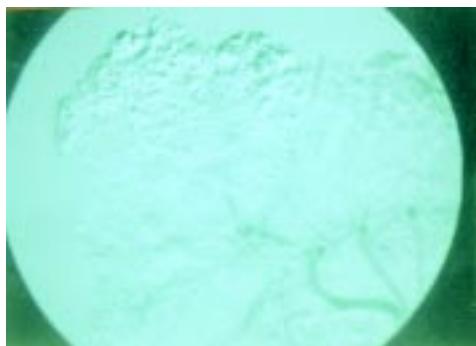


图6 2次TACE+1次PMCT治疗后显示肿瘤血供完全消失。

### 3 讨论

经皮微波凝固治疗(PMCT)是目前HCC介入治疗的重要方法之一<sup>[1-12]</sup>，但单纯PMCT只适合治疗直径<2 cm的肝脏肿瘤<sup>[7,8,11-21]</sup>。

为了减少引起肿瘤结节及其周边组织坏死和治疗较大肿瘤所需的电极数目，需要增大单电极的凝固范围。实验研究表明，相同条件下，活体动物肝脏的微波凝固范围小于离体肝脏的微波凝固范围，说明血流引起的散热效应可使微波凝固范围缩小<sup>[22]</sup>。

Rossi et al<sup>[23]</sup>临床研究报道用球囊导管或明胶海绵颗粒阻塞肿瘤供血动脉后可使单电极射频消融的凝固体积由8 cm<sup>3</sup>增大到22-87 cm<sup>3</sup>。TACE可使肿瘤供血动脉阻塞，清除了肝动脉血流的冷却效应，同时碘化油还可以通过大量的动脉-门静脉交通支到达肿瘤周边的门静脉，暂时性地减少了肿瘤周边门静脉的血流，这样也减少了门静脉所致的血流吸热效应<sup>[24]</sup>。同时，TACE术后2-3 d内肿瘤组织及其周边组织的水肿也可使对微波的阻抗降低，使凝固范围增大<sup>[25-27]</sup>。

通过动物实验可见，TACE后单级微波凝固的范围可明显增大。但相同输出功率及时间时，同一组内凝固灶的大小及形态变化较大，说明影响凝固灶大小的因素除了肝动脉的血流外，还有其他因素，如门脉、肝静脉血流，肿瘤的位置等。肝内肿瘤多为球形生长，因此，使微波凝固范围在空间形态上接近于球形是提高治疗疗效的关键。从本实验看，栓塞后的凝固灶形态更接近于球形，是治疗的理想形态。

通过TACE+PMCT治疗直径<3 cm的肝脏肿瘤，取得了满意效果<sup>[14,27]</sup>，但有关这方面的文献，尤其是治疗更大的肿瘤尚少有报道。本临床研究中，肿瘤治疗的近期有效率及缓解率都高于文献报道的单纯TACE和单纯PMCT治疗<sup>[7-12,28]</sup>。肿瘤体积过大、分化程度低、形状不规则、周边小结节的存在以及治疗过程中为避免周围大的肝内管状系统和重要脏器的损伤而减轻治疗力度是肿瘤治疗不彻底和局部复发的主要原因。本研究未出现与治疗相关的严重并发症<sup>[19,29-32]</sup>，主要预防措施是在进针过程中保证穿刺路线上无大的肝内管状系统及重要脏器，退针过程中使用天线的余热加热穿刺防止针道转移等。

TACE结合PMCT治疗肝脏肿瘤可以充分发挥二种治疗的优势，使肿瘤的坏死率增高，通过TACE可以使影像学不能发现的隐匿病变也得到有效的治疗，减少单纯PMCT治疗的失误率。而且和单纯PMCT相比，联合治疗可使所需植入的微波天线数目和治疗次数减少，从而减少了并发症的发生。

### 4 参考文献

- 1 Hamazaki K, Fujiwara T, Asakawa T, Ikeda Y, Matsumoto M, Murashima N, Akura Y. A long-term survivor undergoing microwave coagulation therapy for hepatocellular carcinoma located just above the main trunk of right hepatic vein. *Gan To Kagaku Ryoho* 2002;29:143-147

- 2 Shibata T, Iimuro Y, Yamamoto Y, Maetani Y, Ametani F, Itoh K, Konishi J. Small hepatocellular carcinoma: comparison of radiofrequency ablation and percutaneous microwave coagulation therapy. *Radiology* 2002;223:304-307
- 3 Georgiades CS, Ramsey DE, Solomon S, Geschwind JF. New non-surgical therapies in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Tech Vasc Interv Radiol* 2001;4:193-199
- 4 Beppu T, Ishiko T, Doi K, Matsuda T, Maeda T, Ishihara K, Ogata K, Ogawa M. A promising new treatment strategy for advanced hepatocellular carcinoma--"multi-ablation therapy" consisting of radio-frequency ablation (RFA), microwave coagulation therapy (MCT) and ethanol injection therapy (EIT). *Gan To Kagaku Ryoho* 2001;28:1583-1586
- 5 Midorikawa T, Kumada K, Kikuchi H, Ishibashi K, Yagi H. Microwave coagulation therapy for hepatocellular carcinoma. *J Hepatobil Pancreat Surg* 2000;7:252-259
- 6 Horigome H, Nomura T, Nakao H, Saso K, Takahashi Y. Treatment of solitary small hepatocellular carcinoma: consideration of hepatic functional reserve and mode of recurrence. *Hepatogastroenterology* 2000;47:507-511
- 7 Ohmoto K, Tsuduki M, Shibata N, Takesue M, Kunieda T, Yamamoto S. Percutaneous microwave coagulation therapy for hepatocellular carcinoma located on the surface of the liver. *Am J Roentgenol* 1999;173:1231-1233
- 8 Tabuse K, Tsuji T. Indication of percutaneous microwave coagulation therapy for hepatocellular carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho* 1999;26:1684-1688
- 9 Seki T, Wakabayashi M, Nakagawa T, Imamura M, Tamai T, Nishimura A, Yamashiki N, Okamura A, Inoue K. Percutaneous microwave coagulation therapy for patients with small hepatocellular carcinoma: comparison with percutaneous ethanol injection therapy. *Cancer* 1999;85:1694-1702
- 10 Beppu T, Ogawa M, Matsuda T, Ohara C, Hirota M. Efficacy of microwave coagulation therapy (MCT) in patients with liver tumors. *Gan To Kagaku Ryoho* 1998;25:1358-1361
- 11 Dong B, Liang P, Yu X. US-guided microwave in the treatment of liver cancer: experimental study and preliminary clinical application. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1996;76:87-91
- 12 Murakami R, Yoshimatsu S, Yamashita Y, Matsukawa T, Takahashi M, Sagara K. Treatment of hepatocellular carcinoma: value of percutaneous microwave coagulation. *Am J Roentgenol* 1995;164:1159-1164
- 13 Asahara T, Nakahara H, Fukuda T, Nakatani T, Yano M, Hino H, Okamoto Y, Katayama K, Itamoto T, Ono E, Dohi K, Kitamoto M, Nakanishi T. Percutaneous microwave coagulation therapy for hepatocellular carcinoma. *Hiroshima J Med Sci* 1998;47:151-155
- 14 Itamoto T, Asahara T, Kohashi T, Katayama S, Fukuda S, Nakatani T. Percutaneous microwave coagulation therapy for hepatocellular carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho* 1999;26:1841-1844
- 15 Chen Y, Chen H, Wu M, Zhou W, Wei G, Wang P, Li X. Curative effect of percutaneous microwave coagulation therapy for hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2002;24:65-67
- 16 Itamoto T, Katayama K, Fukuda S, Fukuda T, Yano M, Nakahara H, Okamoto Y, Sugino K, Marubayashi S, Asahara T. Percutaneous microwave coagulation therapy for primary or recurrent hepatocellular carcinoma: long-term results. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1401-1405
- 17 Lu MD, Chen JW, Xie XY, Liu L, Huang XQ, Liang LJ, Huang JF. Hepatocellular carcinoma: US-guided percutaneous microwave coagulation therapy. *Radiology* 2001;221:167-172
- 18 Okuda K, Nakashima O, Imamura I, Imamura M, Aoyagi S. Indication and limitation of microwave coagulation therapy for stage IV-A hepatocellular carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho* 2000;27:1501-1508
- 19 Ohmoto K, Miyake I, Tsuduki M, Shibata N, Takesue M. Percutaneous microwave coagulation therapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1999;46:2894-2900
- 20 Horigome H, Nomura T, Saso K, Itoh M. Standards for selecting percutaneous ethanol injection therapy or percutaneous microwave coagulation therapy for solitary small hepatocellular carcinoma: consideration of local recurrence. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1914-1917
- 21 Matsukawa T, Yamashita Y, Arakawa A, Nishiharu T, Urata J. Percutaneous microwave coagulation therapy in liver tumors. A 3-year experience. *Acta Radiol* 1997;38:410-415
- 22 Seki T, Wakabayashi M, Nakagawa T. Ultrasonically guided percutaneous microwave coagulation therapy for small hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1994;74:817-825
- 23 Rossi S, Garbagnati F, Lencioni R. Percutaneous radio-frequency thermal ablation of nonresectable hepatocellular carcinoma after occlusion of tumor blood supply. *Radiology* 2000;217:119-126
- 24 Kan Z, Sato M, Ivancev K. Distribution and effect of iodized poppyseed oil in the liver after hepatic artery embolization: experimental study in several animal species. *Radiology* 1993;186:861-866
- 25 Stigsson L, Ekelund L, Jonsson N, Sjogren HO. Transcatheter arterial embolization of experimental hepatic tumours in the rat. *Acta Radiol Diagn (Stockh)* 1979;20:422-432
- 26 Ishida T, Murakami T, Shibata T, Inoue Y, Takamura M, Niinobu T, Sato T, Nakamura H. Percutaneous microwave tumor coagulation for hepatocellular carcinomas with interruption of segmental hepatic blood flow. *J Vasc Interv Radiol* 2002;13:185-191
- 27 Seki T, Tamai T, Nakagawa T, Imamura M, Nishimura A, Yamashiki N, Ikeda K, Inoue K. Combination therapy with transcatheter arterial chemoembolization and percutaneous microwave coagulation therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000;89:1245-1251
- 28 董宝玮, 梁萍, 于小玲. 超声引导下微波治疗肝癌的实验研究及临床初步应用. 中华医学杂志 1996;76:87-91
- 29 Takahashi Y, Shibata T, Shimano T, Kitada M, Niinobu T, Ikeda K, Takami M, Inoue Y, Ishida T. A case report of intra-thoracic biliary fistula after percutaneous microwave coagulation therapy. *Gan To Kagaku Ryoho* 2000;27:1850-1853
- 30 Kojima Y, Suzuki S, Sakaguchi T, Tsuchiya Y, Okamoto K, Kurachi K, Okumura T, Igarashi T, Takehara Y, Nakamura S. Portal vein thrombosis caused by microwave coagulation therapy for hepatocellular carcinoma: report of a case. *Surg Today* 2000;30:844-848
- 31 Sato M, Tokui K, Watanabe Y, Lee T, Kohtani T. Generalized intraperitoneal seeding of hepatocellular carcinoma after microwave coagulation therapy: a case report. *Hepatogastroenterology* 1999;46:2561-2564
- 32 Shimada S, Hirota M, Beppu T, Matsuda T, Hayashi N. Complications and management of microwave coagulation therapy for primary and metastatic liver tumors. *Surg Today* 1998;28:1130-1137

# 原发性肝癌DNA修复酶hOGG1, hMTH1基因表达与DNA氧化损伤的修复

程斌,王思元

程斌,王思元,华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

程斌,男,1966-09-04生,湖北省天门市人,汉族,消化内科主治医师,1989年同济医科大学毕业,1994年获同济医科大学硕士学位,2002年获德国波恩大学医学院医学博士学位。目前主要从事原发性肝癌发病机制及其防治方面的研究工作和消化系疾病的临床工作。

项目负责人:程斌,430030,湖北省武汉市解放大道1095号,华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。whchengbin0768@sina.com

电话:027-83663341

收稿日期:2002-11-16 接受日期:2002-12-20

## Expression of DNA repair genes hMTH1 and hOGG1 and repair of oxidative damage of DNA in hepatocellular carcinoma

Bin Cheng, Si-Yuan Wang

Bin Cheng, Si-Yuan Wang, Digestive department, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Bin Cheng, Digestive department, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Jiefang-Dadao 1095, Wuhan 430030, Hubei Province, China. whchengbin0768@sina.com

Received: 2002-11-16 Accepted: 2002-12-20

## Abstract

AIM: To study the regulatory effect of expression of hMTH1 and hOGG1 genes on the oxidative DNA-adduct 8-OHdG levels in hepatocellular carcinoma (HCC) and non-tumourous liver tissue in order to elucidate the role of the DNA repair enzymes in hepatocarcinogenesis.

METHODS: A reverse transcription (RT)/real-time-polymerase chain reaction (PCR) assay was used to semi-quantify mRNA of hMTH1 and hOGG1 in HCC and non-tumourous liver tissue from 23 patients with HCC. 8-OHdG levels were determined by HPLC/ECD.

RESULTS: The median of 8-OHdG levels in non-tumourous liver tissue was significantly (133 vs 56 nmol/g DNA,  $P < 0.01$ ) higher than that in HCC tissue. This was correlated with the severity of inflammation in non-tumourous liver tissues. The expression of hMTH1 was significantly (0.476 vs 0.256,  $P < 0.05$ ) higher in HCC tissue than that in non-tumourous liver tissue. No difference of expression of hOGG1 between non-tumourous liver and HCC tissue was seen. A significant correlation was detected between the expression of hMTH1 and hOGG1 ( $r = 0.81$ ,  $P < 0.01$ ).

CONCLUSION: Elevated 8-OHdG levels in non-tumourous liver are likely due to the increased generation of reactive oxygen intermediates by infiltrating inflammatory cells. The expression of DNA repair enzymes hOGG1 and hMTH1 may involve cooperatively in the repair oxidative DNA adduct 8-

OHdG and have a potential role in hepatocarcinogenesis.

Cheng B, Wang SY. Expression of DNA repair genes hMTH1 and hOGG1 and repair of oxidative damage of DNA in hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(3): 272-275

## 摘要

目的:探讨DNA修复酶hOGG1和hMTH1基因表达对DNA氧化损伤产物8-OHdG的修复调控及其在肝癌发生和防御机制中的作用。

方法:RT/实时PCR定量检测23例HCC患者癌和癌旁组织中hOGG1和hMTH1基因的表达, HPLC/ECD法测定其8-OHdG含量。

结果:HCC患者癌旁组织8-OHdG含量明显高于癌组织(133 vs 56 nmol/g DNA,  $P < 0.01$ ),且与炎症程度密切相关。而癌组织中hMTH1表达较癌旁组织显著升高(0.476 vs 0.256,  $P < 0.05$ )。hOGG1表达在HCC和癌旁组织间无显著差异。但hOGG1和hMTH1表达之间存在显著的相关性( $r = 0.81$ ,  $P < 0.01$ )。

结论:慢性肝脏炎症反应可能是肝细胞内DNA氧化损伤及肝细胞癌变的重要原因。DNA修复酶hOGG1和hMTH1可能协同参与肝细胞内DNA氧化损伤的修复,在肝癌发生和防御机制中起到作用。

程斌,王思元. 原发性肝癌DNA修复酶hOGG1,hMTH1基因表达与DNA氧化损伤的修复. 世界华人消化杂志 2003;11(3):272-275

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/272.htm>

## 0 引言

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发病率高,预后差。其癌变是一个多步骤的渐进过程,慢性肝炎和肝硬化过程中基因突变的积累在HCC发生中的作用已得到广泛认同<sup>[1-3]</sup>。DNA氧化损伤是引起基因组不稳定以及基因突变的常见原因<sup>[4]</sup>。反应性氧化产物(reactive oxygen species, ROS)的生成超过抗氧化酶如过氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, Mn-SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)以及DNA修复酶修复能力时可产生氧应急(oxidative stress),导致细胞内DNA氧化损伤产物的积累<sup>[5-7]</sup>。8-羟基脱氧鸟苷酸(8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG)是

一种主要的DNA氧化损伤产物,可在细胞DNA复制中通过G-T或A-C碱基颠换导致DNA误读,参与癌变发生过程<sup>[8-9]</sup>. 参与8-OHdG所致基因突变修复的hMTH1(human MutT homologue)基因编码产物可通过水解核苷酸池中的游离8-OHdG而阻止8-OHdG误配入DNA<sup>[10-11]</sup>. hOGG1(human OGG1/MutM homologue)可通过其糖苷酶活性切除DNA双链中与碱基C配对的8-OHdG<sup>[12]</sup>. 因此,hMTH1和hOGG1可能在人类基因组DNA氧化损伤的修复中起重要作用,但迄今尚未见其在HCC发生中的研究报道. 我们观察HCC癌组织与癌旁组织中DNA修复酶hMTH1和hOGG1基因表达水平与8-OHdG含量并比较其相互关系,旨在探讨DNA修复酶hMTH1及hOGG1基因表达在HCC发生与防御机制中的作用与地位.

## 1 材料和方法

1.1 材料 HCC患者23例,男16例,女7例. 中位数年龄59(40-71)岁. 取手术切除的癌组织与癌旁组织,液氮冷却后储存于-80℃冰箱中待检. 所有病例均由二位有经验的病理医师独立诊断,并按Edmondson和Steiner分级标准分为G1,G2和G3期. 癌旁组织的炎症程度按HAI评分标准评定,并将病例分为炎症组( $n=8$ )和无炎症组( $n=15$ ).

1.2 方法 根据Shigenaga(Methods Enzymol 1994;234:16)的方法略加改良,应用高效液相色谱仪并电化学检测器(high pressure liquid chromatography/electrochemical detection,HPLC/ECD,Waters)检测组织中8-OHdG含量. 一种铁离子螯合物-甲磺酸去铁胺(deferoxamine mesylate,DFAM,Sigma)用于防止标本处理过程中人为产生8-OHdG. DNA抽提采用Gupta法. 用核酸酶P1和碱性磷酸酶消化处理DNA,所得核苷酸溶液用Ultrafree-MW 5000离心滤过管(Sigma)以5 000 g离心过滤50 min. 滤过液即可注入HPLC/ECD进行检测. 用含已知浓度的标准脱氧鸟核苷酸(dG)和8-OHdG溶液作为标准参照. 测量结果应用相应软件处理,所得8-OHdG含量以nmol 8-OHdG/g DNA表示. 用Trizol试剂(life technologies, Inc.)根据产品说明书抽提总RNA. 取总RNA 2 μg用随机引物(random primer, promega)在反转录酶MMLV(Promega)作用下反转录生成第一链cDNA. PCR引物由Gibco公司合成. 外标准物为相应引物的PCR扩增产物经GenElute™PCR DNA纯化试剂盒(Sigma)洗涤纯化获得,并根据需要分别稀释为 $10^{-3}$ , $10^{-4}$ , $10^{-5}$ , $10^{-6}$ , $10^{-7}$ 和 $10^{-8}$ mg/L.

采用实时PCR技术半定量检测hMTH1,hOGG1,Mn-SOD和GSH-Px在HCC组织和癌旁组织中的表达. β-actin作为内对照. PCR反应体积为10 μL,其中含引物各0.5 μmol/L,2.5 μmol/L MgCl<sub>2</sub>和1 μL LightCycler™ DNA Master SYBR Green I,1 μL来自2 μg总RNA的cDNA以及1 μL序列稀释的外标准物分别作为模板.

采用LightCycler系统(Roche Diagnostics, Inc)扩增测量循环条件,95℃预变性30 s后,95℃变性1 s,β-actin,hMTH1,hOGG1,Mn-SOD和GSH-Px分别在60,60,64,62和58℃下退火3 s,72℃下分别延伸30,15,15,16和14 s,均扩增40个循环周期. 定量分析采用LightCycler软件,β-actin,hMTH1,hOGG1,Mn-SOD和GSH-Px经融点曲线分析确定其特异性后选定相应定量测量温度分别为86,87,86,84和85℃. 所有测量重复2次,取其平均值,结果以目标基因与β-actin基因表达的比值表示. 所有PCR扩增片段大小均经溴化乙啶染色的琼胶显影所证实.

统计学处理 癌和癌旁组织间配对比较采用Wilcoxon检验,两组间非配对检验采用Mann-Whitney检验,相关分析采用Pearson法.

hOGG1	5'-ACA CTG GAG TGG TGT ACT AGCG-3'	Genbank: AB000410
	5'-GCG ATG TTG TTG TTG GAG G-3'	
hMTH1	5'-AGC CTC AGC GAG TTC TCC TG-3'	Genbank: AK026631
	5'-GAT CTG GCC CAC CTT GTG C-3'	
Mn-SOD	5'-GAG ATG TTA CAG CCC AGA TAG C-3'	Genbank: Y00472
	5'-AAT CCC CAG CAG TGG AAT AAG G-3'	
GSH-Px	5'-TGC TCG GCT TCC CGT GCA A-3'	Genbank: M21304
	5'-ACC GTT CAC CTC GCA CTT CT-3'	
β-Actin	5'-CGG GAA ATC GTG CGT GAC AT-3'	Genbank: NM001101
	5'-GAA CTT TGG GGG ATG CTC GC-3'	

## 2 结果

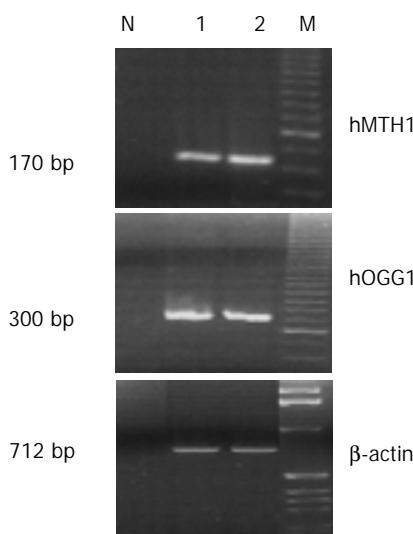
HPLC/ECD检测的结果标明,癌旁组织8-OHdG含量明显高于HCC组织( $P < 0.01$ ,表1). 癌旁组织中炎症组( $n = 8$ )8-OHdG含量的中位数为228(142-256)nmol/g DNA,无炎症组( $n = 15$ )为76(34-224)nmol/g DNA,差异有显著性( $P < 0.05$ ). 应用LightCycler实时PCR半定量测定HCC及癌旁组织中hMTH1和hOGG1的表达. HCC组织和癌旁组织hMTH1表达的中位数分别为0.476和0.256(hMTH1/β-actin×100),差异有显著性( $P < 0.05$ ,图1). 而hOGG1的表达在癌组织和癌旁组织间没有显著差异. 在癌旁组织中,炎症组和非炎症组间hMTH1和hOGG1的表达也无显著差异.

为了观察8-OHdG含量以及hMTH1,hOGG1表达和肿瘤临床分期间的关系,21例HCC患者根据Edmondson和Steiner分类标准分为2组:早期组(G<sub>1</sub>;  $n = 7$ )和晚期组(G<sub>2</sub>/G<sub>3</sub>;  $n = 16$ ). 结果两组间均无显著差异. HCC和癌旁组织中8-OHdG含量分别与hMTH1,hOGG1表达之间的相关分析均无显著相关性( $r = -0.18$ , $P = 0.243$ ; $r = -0.20$ , $P = 0.19$ ). hMTH1和hOGG1表达间存在极显著的相关性( $r = 0.81$ , $P < 0.01$ ;图2). 本组HCC病例癌组织和癌旁组织间Mn-SOD和GSH-Px表达无显著差异(表1). 癌旁组织中无炎症组和炎症组间Mn-SOD和GSH-Px表达也无显著差异.

表1 HCC 及癌旁组织 8-OHdG 含量,hMTH1, hOGG1, Mn-SOD 和 GSH-Px 的表达

组织	8-OHdG 含量 (nmol/g DNA)	hMTH1 mRNA (hMTH1/β-actin ×100)	hOGG1 mRNA (hOGG1/β-actin ×100)	Mn-SOD mRNA (Mn-SOD/β-actin)	GSH-Px mRNA (GSH-Px/β-actin)	M (n = 23)
癌旁	133 (27-387)	0.256 (0.062-1.917)	1.256 (0.392-5.782)	0.190 (0.114-1.114)	1.652 (0.615-9.082)	
HCC	56 (16-361) <sup>b</sup>	0.476 (0.083-4.861) <sup>a</sup>	1.196 (0.370-6.687)	0.186 (0.010-1.257)	0.980 (0.211-13.931)	

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



M:marker, N:阴性对照,1:癌旁组织,2:HCC 组织  
图1 RT/实时PCR扩增产物的凝胶电泳条带.

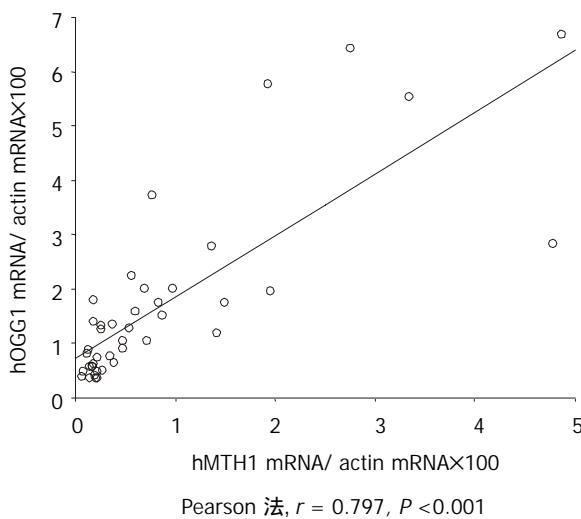


图2 HCC 和癌旁组织 hMTH1 表达与 hOGG1 表达的相关性.

### 3 讨论

8-OHdG 是一种由细胞内氧应激所引起的有致突变作用的DNA 氧化损伤产物<sup>[13]</sup>. 氧应激主要由细胞内代谢, γ-射线和金属离子转换等所引起<sup>[14-17]</sup>. 许多报道表明肿瘤组织内DNA 中 8-OHdG 含量明显高于癌旁组织<sup>[18,19]</sup>. Shimoda et al<sup>[20]</sup>的观察发现 8-OHdG 含量在慢性肝炎组织中明显升高, 而在肝硬化和肝癌组织中并无显著升高. 近来研究表明 DNA 修复系统缺陷可导致基因组不稳定性及 DNA 突变率升高, 从而导致肿瘤发生<sup>[21-23]</sup>. 新近在HBV和HCV相关性慢性肝病的研究中发现DNA

氧化损伤产物 8-OHdG 含量与癌基因 c-myc 的表达呈正相关<sup>[24]</sup>. 因此, 本研究在比较肝癌组织和癌旁组织中氧应激标志物 8-OHdG 含量的基础上进一步观察了具备清除 8-OHdG 能力的DNA 修复酶 hMTH1、hOGG1 以及抗氧化酶 Mn-SOD 和 GSH-Px mRNA 表达的变化, 并分析其与 8-OHdG 含量之间的相互关系. 结果表明, 8-OHdG 含量在癌旁组织明显高于肝癌组织, 在癌旁组织中炎症组明显高于无炎症组. 而抗氧化酶 Mn-SOD 和 GSH-Px 表达在肝癌和癌旁组织间无明显差异, 且在癌旁组织中与有无炎症无关, 这表明肝癌癌旁组织中 8-OHdG 含量升高可能为 ROS 产生过多所致, 这与癌旁组织中炎症细胞浸润过度释放氧自由基有关.

核苷酸池中游离鸟苷的氧化比其在DNA中更迅速, 因此,DNA 修复酶 hMTH1 通过水解核苷酸池中游离 8-OHdG 在 DNA 氧化损伤的修复中起着首要作用<sup>[25]</sup>. Kennedy et al<sup>[26]</sup>对 SV-40 转化的非肿瘤性 支气管上皮细胞 (SV-40 transformed non-tumorigenic human bronchial epithelial cell, BEAS-2B) 和肺 癌细胞系的研究以及 Okamoto et al<sup>[27]</sup>在肾癌组织中的研究均显示 8-OHdG 含量在转化细胞和肿瘤细胞内明显升高. 本研究也发现 hMTH1 在肝癌组织中的表达明显增加. 因此, 肝癌组织中 8-OHdG 含量相对较低可能为上调表达的 hMTH1 的清除效应. 肿瘤细胞中 hMTH1 基因过度表达有助于减少细胞内核苷酸池中游离 8-OHdG 的浓度, 进而防止 8-OHdG 在 DNA 复制中错配入细胞 DNA, 以保持细胞 DNA 的完整性. 肿瘤细胞代谢相对活跃, 因而可持续产生较高的氧应激, 这可能是肿瘤细胞持续表达 hMTH1 的原因. 所以, hMTH1 表达既能作为反映肝细胞内 DNA 修复能力的指标, 也可作为氧应激反应程度的指标.

hOGG1 基因编码产物的主要功能是切除 DNA 双链中与碱基 C 配对的 8-OHdG, 从而恢复基因组中正常的 G:C 配对, 在防止 8-OHdG 的致突变作用中也起着十分重要的作用<sup>[11]</sup>. Konto et al<sup>[28]</sup>的研究发现 hOGG1 表达在人类结肠癌组织中明显升高, 且与 8-OHdG 含量呈明显比例关系. 但我们的研究发现 hOGG1 表达在肝癌和癌旁组织间无显著差异, 这可能与组织特异性有关. 另外, 在人类肺癌和肾癌组织的研究也未发现癌组织和癌旁组织间 hOGG1 表达的差异, 但发现了三种纯和性突变<sup>[29]</sup>. 在前列腺癌患者中也发现了二种 hOGG1 基因序列变异(11657A/G 和 Ser326Cys), 其修复酶活性降低可能与癌发生有关<sup>[30]</sup>. 随后在大规模的肺癌临床病例对照研究中发现了一种与肺癌发生密切相关的基因

多态位点hOGG1Ser326Cys, 其修复酶活性降低, 使得患肺癌的易感性增加<sup>[31,32]</sup>. 是否 hOGG1 基因突变和 / 或多态位点也在肝癌的发生发展中起作用有待于进一步大规模的临床病例对照研究.

此外, 本研究还发现了肝癌和癌旁组织中hOGG1 和 hMTH1 表达之间存在着明显的关系, 提示二者在修复氧化性 DNA 损伤产物 8-OHdG 中可能存在一定的协同关系. 前者主要功能是切除 DNA 中与碱基 C 错配的 8-OHdG , 后者则水解核苷酸池中游离的 8-OHdG . 因此, 推测 DNA 修复酶 hOGG1 和 hMTH1 可能通过协同作用调节细胞内 8-OHdG 浓度, 修复其所致的碱基错配和可能引起的关键基因突变, 在肝癌发生的防御机制中起到作用.

总之, 通过本组病例观察可初步得出如下结论:(1) 肝癌癌旁组织中升高的8-OHdG浓度主要是由于炎症反应时炎性细胞过多释放氧自由基所致, 由此推测, 肝脏慢性炎症反应可能通过引起肝细胞内DNA氧化损伤, 进而导致肝细胞的癌变; (2)肝癌组织中 8-OHdG 含量相对较低可能与上调表达的 hMTH1 的调节有关; (3)hMTH1 表达水平可作为反映肝细胞内氧应激水平以及 DNA 氧化损伤修复能力的指标; (4)DNA 修复酶 hOGG1 和 hMTH1 可能协同参与肝细胞内与 8-OHdG 相关的DNA 氧化损伤的修复, 在肝癌的发生和防御机制中起着重要的作用. 其表达不足或基因多态位点与突变可能参与肝癌的发生和防御机制.

#### 4 参考文献

- 1 刘为纹. 肝细胞性肝癌病因学研究. 世界华人消化杂志 1999;7:93-95
- 2 Tang ZY. Hepatocellular Carcinoma Cause, Treatment and Metastasis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 445-454
- 3 Qin LX,Tang ZY. The prognostic significance of clinical and pathological features in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002; 8:193-199
- 4 Musarrat J, Arezina-Wilson J, Wani AA. Prognostic and aetiological relevance of 8-hydroxyguanosine in human breast carcinogenesis. *Eur J Cancer* 1996; 32: 1209-1214
- 5 Liu SL, Shi DY, Pan XH, Shen ZH. Inhibition of Proliferation and Expression of N-ras in Hepatoma Cells by Antioxidation Treatment. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuji Xuebao* 2001; 33: 463-466
- 6 Oltra AM, Carbonell F, Tormos C, Iradi A, Saez GT. Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1286-1292
- 7 Lee M, Hyun DH, Marshall KA, Ellerby LM, Bredesen DE, Jenner P, Halliwell B. Effect of overexpression of BCL-2 on cellular oxidative damage, nitric oxide production, antioxidant defenses, and the proteasome. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1550-1559
- 8 Sato H, Sone H, Sagai M, Suzuki KT, Aoki Y. Increase in mutation frequency in lung of Big Blue rat by exposure to diesel exhaust. *Carcinogenesis* 2000; 21: 653-661
- 9 Den nog C, Gedik C, Wood S, Speit G. Analysis of oxidative DNA damage and HPRT mutations in humans after hyperbaric oxygen treatment. *Mutat Res* 1999; 431: 351-359
- 10 Iida T, Furuta A, Kawashima M, Nishida J, Nakabeppu Y, Iwaki T. Accumulation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and increased expression of hMTH1 protein in brain tumors. *Neuro Oncol* 2001;3: 73-81
- 11 Tsutsui H, Ide T, Shiomi T, Kang D, Hayashidani S, Suematsu N, Wen J, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A. 8-oxo-dGTPase, which prevents oxidative stress-induced DNA damage, increases in the mitochondria from failing hearts. *Circulation* 2001;104: 2883-2885
- 12 Nash HM, Bruner SD, Scharer OD, Kawate T, Addona TA, Spooner E, Lane WS, Verdine GL. Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr Biol* 1996;6:968-980
- 13 Toyokuni S, Tanaka T, Hattori Y, Nishiyama Y, Yoshida A, Uchida K, Hiai H, Ochi H, Osawa T. Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab Invest* 1997; 76: 365-374
- 14 Haegele AD, Wolfe P, Thompson HJ. X-radiation induces 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in vivo in rat mammary gland DNA. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1319-1321
- 15 De Martinis BS, Bianchi MD. Effect of vitamin C supplementation against cisplatin-induced toxicity and oxidative DNA damage in rats. *Pharmacol Res* 2001; 44: 317-320
- 16 Wei H, Zhang X, Wang Y, Lebwohl M. Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein. *Cancer Lett* 2002; 185: 21-29
- 17 Knaapen AM, Shi T, Borm PJ, Schins RP. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol Cell Biochem* 2002; 234: 317-326
- 18 Oliva MR, Ripoll F, Muniz P, Iradi A, Trullenque R, Valls V, Drehmer E, Saez GT. Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community. *Mol Carcinog* 1997; 18: 232-243
- 19 Kondo S, Toyokuni S, Iwasa Y, Tanaka T, Onodera H, Hiai H, Imamura M. Persistent oxidative stress in human colorectal carcinoma, but not in adenoma. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 401-410
- 20 Shimoda R, Nagashima M, Sakamoto M, Yamaguchi N, Hirohashi S, Yokota J, Kasai H. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. *Cancer Res* 1994; 54: 3171-3172
- 21 Sekiguchi M, Sakumi K. Roles of DNA repair methyltransferase in mutagenesis and carcinogenesis. *Jpn J Hum Genet* 1997;42:389-399
- 22 Halas A, Baranowska H, Policinska Z. The influence of the mismatch-repair system on stationary-phase mutagenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 2002; 42: 140-146
- 23 Garfinkel DJ, Bailis AM. Nucleotide Excision Repair, Genome Stability, and Human Disease: New Insight from Model Systems. *J Biomed Biotechnol* 2002; 2: 55-60
- 24 Farinati F, Cardin R, Bortolami M, Grottola A, Manno M, Colantoni A, Villa E. Estrogens receptors and oxidative damage in the liver. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 193: 85-88
- 25 Fujikawa K, Kamiya H, Yakushiji H, Nakabeppu Y, Kasai H. Human MTH1 protein hydrolyzes the oxidized ribonucleotide, 2-hydroxy-ATP. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 449-454
- 26 Kennedy CH, Cueto R, Belinsky SA, Lechner JF, Pryor WA. Overexpression of hMTH1 mRNA: a molecular marker of oxidative stress in lung cancer cells. *FEBS Lett* 1998; 429:17-20
- 27 Okamoto K, Toyokuni S, Kim WJ, Ogawa O, Kakehi Y, Arao S, Hiai H, Yoshida O. Overexpression of human mutT homologue gene messenger RNA in renal-cell carcinoma: evidence of persistent oxidative stress in cancer. *Int J Cancer* 1996;65:437-441
- 28 Kondo S, Toyokuni S, Tanaka T, Hiai H, Onodera H, Kasai H, Imamura M. Overexpression of the hOGG1 gene and high 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) lyase activity in human colorectal carcinoma: regulation mechanism of the 8-OHdG level in DNA. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1394-1400
- 29 Chevillard S, Radicella JP, Levalois C, Lebeau J, Poupon MF, Oudard S, Dutrillaux B, Boiteux S. Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene* 1998; 16: 3083-3086
- 30 Xu J, Zheng SL, Turner A, Isaacs SD, Wiley KE, Hawkins GA, Chang BL, Bleeker ER, Walsh PC, Meyers DA, Isaacs WB. Associations between hOGG1 sequence variants and prostate cancer susceptibility. *Cancer Res* 2002; 62: 2253-2257
- 31 Sugimura H, Kohno T, Wakai K, Nagura K, Genka K, Igarashi H, Morris BJ, Baba S, Ohno Y, Gao C, Li Z, Wang J, Takezaki T, Tajima K, Varga T, Sawaguchi T, Lum JK, Martinson JJ, Tsugane S, Iwamasa T, Shinmura K, Yokota J. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 669-674
- 32 Wikman H, Risch A, Klimek F, Schmezer P, Spiegelhalder B, Dienemann H, Kayser K, Schulz V, Drings P, Bartsch H. hOGG1 polymorphism and loss of heterozygosity (LOH): significance for lung cancer susceptibility in a caucasian population. *Int J Cancer* 2000; 88: 932-937

# 清热活血健脾中药对大鼠肝癌基因转录差异的调整

方肇勤,管冬元,梁尚华

方肇勤,管冬元,梁尚华,上海中医药大学基础医学院 上海市 200032  
国家中医药管理局科研基金, NO.97Z014  
项目负责人:方肇勤,200032,上海市零陵路 530 号,上海中医药大学基础医学院。zqfang@sh163d.sta.net.cn.  
电话:021-54231178  
收稿日期:2002-07-20 接受日期:2002-08-07

Regulation of gene transcription in rat with liver cancer by traditional Chinese medicine

Zhao-Qin Fang, Dong-Yuan Guan, Shang-Hua Liang

Zhao-Qin Fang, Dong-Yuan Guan, Shang-Hua Liang, Institute of Basic Medicine, Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China  
Supported by National Traditional Chinese Medicine Administration Bureau. NO:97Z014

Correspondence to: Professor Zhao-Qin Fang, Institute of Basic Medicine, Shanghai University of TCM, 530 Lingling Road, Shanghai 200032, China. zqfang@sh163d.sta.net.cn.

Received:2002-07-20 Accepted:2002-08-07

## Abstract

AIM: To observe the regulatory effects of YAF Compositus and its modified Compositus: Gingrefang, Huoxuefang and Jianpifang on liver cancer and their transcription the genes in rats.

METHODS: DEN was used to induce the liver cancer in rats. All rats were divided into seven groups: normal group, model group, four therapy groups and FT-207 group. The survival rate, liver weight, body weight, liver weight/body weight, and pathological change of liver tissues were observed. Immunocytochemical change of AFP and DD-PCR was used to display the different transcriptional expression of cDNA fragments between normal liver tissues and DEN-induced liver cancer tissues. Northern blotting was used to verify the different transcription of these cDNA fragments.

RESULTS: Both YAF Composita and its modified Composita could improve the general condition of rats with liver cancer, especially Qingrefang and Huoxuefang. Different Composita inhibited the growth of cancer and synthesis of AFP, especially YAF Composita and Qingrefang. 9 genes important for the transformation of cancer were selected with DD-PCR and Northern blotting. YAF Composita and its modified Composita had capabilities to regulate differently the genetic transcription: DD-29 decreased 51-78 %, DD11 and DD-25 decreased 60 % and 78 % respectively, near to that of normal liver tissue.

CONCLUSION: Both YAF Composita and its modified Composita can be directly used to treat the liver cancer, and to regulate the transcription of the different genes in the tissues.

Fang ZQ, Guan DY, Liang SH. Regulation of gene transcription in rat with liver cancer by traditional Chinese medicine. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(3): 276-280

## 摘要

目的:观察中药抑癌扶正行气活血方(全方)及其不同治法的拆方:清热方、活血方、健脾方对肝癌大鼠的作用和对肝组织基因转录的整体调节作用。

方法:采用二乙基亚硝胺(DEN)诱发大鼠肝癌,设正常组、模型组、不同中药组及FT-207组对照,分别观察各组大鼠生存率、肝、体、肝/体及肝组织的病理、甲胎蛋白(AFP)免疫组化变化;以及采用DDPCR技术显示正常肝组织与模型组肝癌组织中呈差异转录的cDNA片段,Northern blot验证这些cDNA片段在各组中转录的差异,并将呈差异转录的cDNA片段进行克隆与测序。

结果:全方其及拆方均能不同程度地改善肝癌大鼠的一般情况,提高大鼠的生存率。各拆方中以清热组与活血组为优;全方其及拆方均能不同程度地抑制肿瘤的生长及肝脏AFP的合成,其中以全方组与清热组为优;采用DDPCR结合Northern blot筛选出在各组中呈显著差异转录的9个阳性cDNA片段,经与Genbank比较4个为新的基因,且这9个基因在肝癌发生与转归中的作用至今未见报道;全方及其拆方对这些基因的转录水平有不同程度的调节作用,其中DD<sub>29</sub>下调57-78%,DD<sub>11</sub>、DD<sub>25</sub>也有下调至60%和78%,使基因转录水平接近正常肝组织。

结论:全方及其不同治法的拆方中药对大鼠肝癌具有直接治疗作用,能不同程度地广泛地调控肝组织(含肝癌组织)有关基因的转录水平。

方肇勤,管冬元,梁尚华. 清热活血健脾中药对大鼠肝癌 基因转录差异的调整. 世界华人消化杂志 2003;11(3):276-280

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/276.htm>

## 0 引言

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1-4]</sup>。近年来,我国在肝癌的病因、病理、诊断与治疗等方面的研究均取得了突出的成绩<sup>[5-9]</sup>。肝癌早期采用手术切除可以达到较高的治愈率,但由于原发性肝癌起病隐匿,待确诊时多数已属中晚期,往往丧失手术指征,而其他针对癌肿的治疗手段均有显著的副作用。我们通过对大量的中医临床文献整理,表明中医将肝癌的病因病机归纳为“瘀”、“毒”、“虚”等3个方面;治法集中在清热解毒、健脾理气、活血化瘀,以及这三种治法的合用;中药出现频率以半枝莲、白花蛇舌草,黄芪、白术,八月札、丹参、赤芍等为高。

据此我们归纳出清热方、活血方、健脾方, 以及由这3方组合的抑癌扶正行气活血方(全方), 代表了目前国内治疗原发性肝癌的中医治法的主流<sup>[10]</sup>.

我们以往的研究发现, 全方、清热方、活血方、健脾方等治法对肝癌大鼠具有一定的治疗作用, 并发现这些治法对N-ras、P53等已知癌基因或抑癌基因具有一定的调整作用, 其中清热方对N-ras癌基因下调作用最强<sup>[11]</sup>. 鉴于中医药作用多途径、多靶点的特点, 进一步重复以上的实验, 并扩大以上不同治法对大鼠肝和肝癌组织可能调整基因的筛选对于深入揭示肝癌的发生机制和不同中医治法的作用异同十分重要.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 采用wistar大鼠, , 体重100-120 g, 自由饮用60-80 ppm DEN水溶液, 直到24 wk末实验结束. 清热中药由半枝莲、白花蛇舌草、蒲公英等组成, 活血中药由桃仁、丹参、赤芍、八月札、茵陈、郁金、柴胡等组成, 健脾中药由黄芪、白芍、白术、薏苡仁、神曲、法夏、云苓等组成. 600 ml/L乙醇沉淀中药水煎剂, 4 静置48 h, 过滤, 浓缩至1 ml含2 g生药, 4 存放. FT-207用双蒸水溶解, 4 存放. 正常组常规饲养, 各用药组从第18周起给予相应治疗药物. 各组药物均于下午19时加入饮水中给药. 剂量约为成人单位公斤体重的10倍量.

喃氟啶(FT-207, 上海华联制药有限公司)[ -33P]dATP、[ -32P]dCTP(250 uCi, Amersham), DEN购自中国科学院南京土壤研究所, ABC(兔)试剂盒及兔抗人甲胎蛋白(AFP)抗体(华美生物工程公司), 异硫氰酸胍(Sangon), M-MuLV逆转录酶(Promega), Taq DNA聚合酶(Perkin Elmer), 硝酸纤维素膜(Sangon), 大肠杆菌聚合酶K片段(Sangon), T4 DNA连接酶(Sangon), 9600型PCR仪(Perkin Elmer), 测序电泳系统(pharmacia), 377自动测序仪(Perkin Elmer), 3个cDNA第一链合成引物(简称锚引物)及8个寡核苷酸随机引物(Sangon合成).

**1.2 方法** 病理形态学用常规HE染色观察. 每组取5个大鼠5 mm大小的肝组织, 用中性甲醛固定、石蜡包埋切片, 用ABC试剂盒进行免疫组化染色(兔抗人AFP抗体浓度为1:100); 光镜下观察, 用显微镜网格测微尺测定切片中央左右各5个视野(400倍)中含 AFP 的阳性细胞数, 计算每个视野中含 AFP 阳性细胞的平均数, 作为半定量分析的参数. 常规异硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步法抽提肝(含肝癌)组织中的总RNA<sup>[12]</sup>. 取正常肝组织与模型组肝组织总RNA进行逆转录, 在20 μL反应体系中, 含5 × M-MuLV reverse buffer 4 μL, 250 μmol/L dNTP 1.6 μL, 总RNA 1 μg, 5 μmol/L的锚引物2 μL. 65 5 min, 37 10 min, 冰上加入200 U/μL M-MuLV 1 μL, 37 50 min, 最后95 5 min灭活逆转录酶. 在20 μL反应体系中, 加入10 × Taq DNA polymerase buffer 2 μL, 25 μmol/L

dNTP 1.6 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.6 μL, 5 μmol/L 锚引物(与逆转录对应) 2 μL, 5 μmol/L 随机引物 2 μL, [ -33P]dATP 0.25 μL, 逆转录产物 2 μL, Taq DNA 聚合酶1 U. 反应条件: 94 变性3 min, 然后依次94 变性30 s, 40 退火2 min, 72 延伸30 s, 共40个循环, 最后72 延伸5 min, 4 保存<sup>[13]</sup>. 用6 g/L的聚丙烯酰胺尿素变性凝胶进行电泳, 电泳条件: 温度55 , 电压2 000 V, 电流70 mA, 时间4 h. 然后将凝胶黏附于滤纸上, 并在80 的真空干燥仪上脱水干燥2 h, 最后进行放射自显影72 h. 放射自显影显示: 正常肝组织与肝癌组织许多条带一致, 部分出现差异, 表现为条带有无或密度不同. 取32个表达差异条带对应的凝胶切下, 自凝胶中回收cDNA, 取回收产物进行PCR扩增: 在40 μL反应体系中, 加入10 × Taq DNA polymerase buffer 4 μL, 250 μmol/L dNTP 3.2 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4 μL, 5 μmol/L的对应锚引物与随机引物各4 μL, Taq DNA聚合酶2 U; 反应条件同前DD-PCR反应. 取30 μL PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳, 并从凝胶中回收与纯化扩增的DNA片段. 肝组织总RNA, 经752紫外光栅分光光度计测定RNA样品浓度和纯度后, 在7组样品中组内各取等量RNA混匀, 再以每组RNA混匀后取10 μg, 依次上样于含溴化乙锭的1.4 g/L琼脂糖甲醛变性凝胶, 电泳(电压80 V), 紫外光观察电泳结果, 并拍照. 将RNA转移到硝酸纤维素膜上, 80 真空干燥2 h. Northern blot杂交的操作按常规方法进行, 探针模板来自DD-PCR显示的差异片段再扩增产物, 随机引物法把[ -32P]dCTP标记到探针上, 放射自显影结果采用激光光密度计作灰度扫描. PCR产物克隆与测序: 先对PCR产物添加单个碱基A: 30 μL PCR产物回收后用18 μL TE(pH 8.0)溶解, 加入10 × Taq DNA polymerase buffer 2 μL, 10 mmol/L dATP 0.4 μL, Taq聚合酶1 U, 混匀, 72 保温7 min, 回收后用20 μL TE溶解; 接着进行连接反应: 取7 μL回收产物, 加入10 × T4 DNA ligase buffer 1 μL, pUCM-T(50 ng/μL)1 μL, T4 DNA ligase 5 U, 混匀, 16 过夜. 最后用常规方法把连接反应产物转化到感受态细胞DH5 内, 经用含X-gal和IPTG的LB-Amp平板筛选白色的重组克隆, 并经Pst I酶切鉴定. 最后抽提重组克隆后的质粒, 按有关操作要求处理样品后, 用377型自动荧光测序仪测序.

统计学处理 生存率采用两时点生存率U检验, 其他计数资料均采用F检验.

## 2 结果

除全方组、模型组、活血组分别于第4、8、8周时各由于意外原因死亡1只大鼠外, 其余均为有效动物例数. 各组生存率与模型组比较, 正常组、全方组、活血组均存在显著差异( $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ ); 而各组与正常组(100%)比较, 模型组(54.6%), 西药组(70%), 清热

组(80 %)、健脾组(70 %)呈显著差异( $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ )。提示不同组别中药具有延长肝癌大鼠生存率的作用。

各饮用 DEN 水溶液大鼠肝、肝 / 体明显大于正常组( $P < 0.01$ )，其中全方组的肝、肝 / 体较模型组、西药组显著降低( $P < 0.05$ )，活血组的肝 / 体较模型组、西药组显著降低( $P < 0.05$ )。提示不同组别中药具有抑制肝癌发展和改善肝癌大鼠生存质量的作用(表 1)。

表 1 各组大鼠体、肝及肝 / 体之比情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

· $\ddot{\circ}$ 组	$n$	体 / g	肝 / g	肝 / 体 *100
正常组	10	382 ± 29	11.2 ± 1.4 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.3 <sup>b</sup>
模型组	5	250 ± 27 <sup>c</sup>	38.0 ± 9.5 <sup>c</sup>	15.5 ± 5.1 <sup>c</sup>
西药组	7	239 ± 30 <sup>c</sup>	34.5 ± 8.0 <sup>c</sup>	14.3 ± 2.8 <sup>c</sup>
全方组	8	278 ± 28 <sup>c</sup>	28.6 ± 6.1 <sup>acd</sup>	10.3 ± 2.0 <sup>acd</sup>
清热组	8	273 ± 16 <sup>c</sup>	30.7 ± 6.0 <sup>c</sup>	11.4 ± 2.8 <sup>c</sup>
活血组	8	279 ± 14 <sup>c</sup>	29.1 ± 7.7 <sup>c</sup>	10.4 ± 2.8 <sup>acd</sup>
健脾组	7	257 ± 32 <sup>c</sup>	33.1 ± 12.4 <sup>c</sup>	13.0 ± 4.7 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05 vs 模型组; <sup>b</sup>P < 0.01 vs 模型组; <sup>c</sup>P < 0.01 vs 正常组; <sup>d</sup>P < 0.05 vs 西药组;

2.1 肝病理改变 正常组大鼠肝脏外观正常，表面无结节。模型组肝脏肿大，表面布满大小不一的灰白结节，伴出血斑点(图 1)；光镜下呈典型的柱状及腺管样

癌巢结构，且周围组织肝细胞异型性明显，伴癌细胞浸润(图 2)。在各组 5 个肝组织中，全方组有 1 例、清热组有 2 例明显优于模型组：肝脏体重明显小于模型组，表面灰白结节少而小，无出血斑点；光镜下，细胞排列有序，细胞核大小、规则一致，核浆比例基本正常，病理性有丝分裂少见，癌巢周围组织肝细胞异型性不明显，无癌细胞浸润。同时西药组 5 个切片中有一例表现大量肝细胞坏死、纤维组织增生为特征的肝萎缩病理形态。

正常组大鼠肝组织 AFP 免疫组化染色呈阴性反应，模型组大鼠肝细胞大多数呈强阳性反应( $112 \pm 22$ )。大鼠各治疗组阳性细胞数均有一定程度的减少，尤其是癌巢周围组织，其中与模型组比较，全方组( $80 \pm 12$ )与清热组( $76 \pm 13$ )呈显著降低( $P < 0.05$ )，以清热组为最低；各治疗组之间无明显差异，但相比之下，全方组、清热组有下降趋势。

2.2 Northern blot、克隆、测序 32 个 Northern blot 印迹杂交结果提示：部分探针经反复杂交各组中差异不显著，其中 9 个显著差异(表 2)。部分放射自显影结果见图 5。9 个差异显著基因片段经回收、克隆、测序，并与 GenBank 比较<sup>[14-17]</sup>(表 3)

表 2 不同差异 cDNA 片段的 Northern blot 印迹杂交结果灰度扫描

基因片段	正常组	模型组	西药组	全方组	清热组	活血组	健脾组
DD <sub>4</sub>	36.3	47.8	50.2	50.9	39.4	62.4	
DD <sub>9</sub>	10.4	18.8	5.5	4.4	7.4	12.4	3.8
DD <sub>11</sub>	17.8	25.4	8.9	5.7	10.8	16.1	6.3
DD <sub>22</sub>	23.7	13.3	11.7	13.2	8.7	14.3	
DD <sub>23</sub>	2.9	5.2	2.6	5.5	4.0	2.6	
DD <sub>25</sub>	18.4	23.1	16.9	16.4	9.7	12.4	
DD <sub>26</sub>	17.1	20.9	13.2	17.6	13.7	16.0	
DD <sub>29</sub>	4.5	11.6	3.6	2.7	3.0	4.7	3.0
DD <sub>31</sub>	28.5	34.4	25.7	27.2	20.4	31.8	

表 3 所测基因序列与 GenBank 比较结果

基因片段	基因名称
DD <sub>4</sub>	Rat mRNA for fibronectin.
DD <sub>9</sub>	Rat phosphorylated N-glycoprotein ( pp63 ) mRNA, completecds.
DD <sub>11</sub>	新基因 126 bp CGACTGTTGC CACAATGCCA GAAGACTGAA TTCAAAGCTT CTAATCCAAA ATATGATATG TCTAAGGACA AACTATGTCC AAGCAAAAG AAATAAATGT AAGTTCTTC TGTCAAAAA AAAAAA
DD <sub>22</sub>	新基因 269 bp CTCAACGGAA TGACGCATCT GTAACCTCTG TGGTAGAATG TATCCCAGCC TTCTGAGATA CAAAGGTTCC AAAACGAGAC ATTGACTTCA AATGGAGACC GCCTTGAGAT GGAGGGATGC CAAATCTAAC TGTCTACCTA CATAGTTAGG CAACATTCA GACTTTGAA AAGTTATCTT CCACAAACC ACTGTTAA TAAAGCTTCAGTAATGCCA TTGTTAGATC ATGAATAAAA TATGAGAGGA CAGACTCCAA AAAAAAAA
DD <sub>23</sub>	Mus musculus TPR-containing, SH2-binding phosphoprotein ( Tspn )mRNA.
DD <sub>25</sub>	Rattus norvegicus mitochondrial genome.
DD <sub>26</sub>	Human DNA sequence from clone RP3-47704 on chromosome 20, complete sequence.
DD <sub>29</sub>	新基因 195 bp AGTAGGCATA AAAGAAGTGG CTCAAAGATA TTGTAAATGC ATATTTATT ATAGTCTTAA TACAACCTTA AGGTTAATGT TGTAACCTTA GATTGAGGAA TCTTAATTCA TTATAGTTAC CTGAATTAAT GTGCACTGCT TGCAAAATTCA AAGCATAATT AACTAAATAA AACTTCGTCT TTTGAAAAAA AAAAAA
DD <sub>31</sub>	新基因 191bp TTACCGCCAT GTGGGCCAT TCAGTTGTAG AACCCAGCAA GGTCGGATTACAACACAGAC GCATACTTT GTGTCGACCA ACAATGTGCT ACAAATGTGA CACTTGACCC TGAACTGCAT GTATGGGAA CTTTTAGAA GAAAAAACAA ACTTGAAATC AATAAATTAA CAGTTTCC AAAAAAA



图1 肝脏外观图,伴出血斑点. 织肝细胞异型性明显,伴癌细胞浸润.

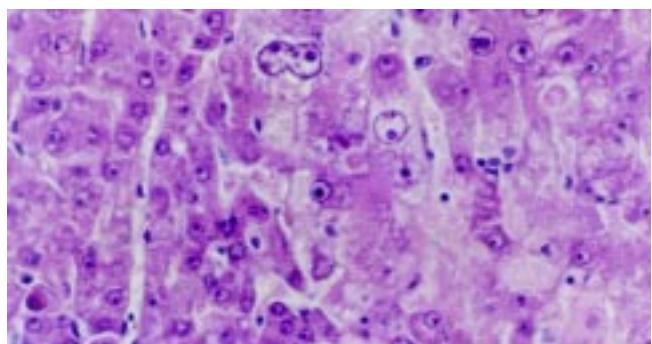
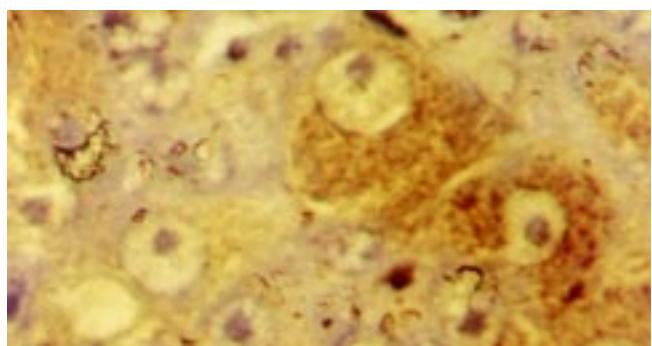
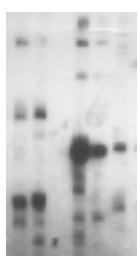
图2 大鼠肝癌病理(HE  $\times$  200)肝癌的肝脏肿大,表面布满大小不一的灰白结节,典型的柱状及腺管样癌巢结构,周围组.图3 模型组肝癌组织细胞AFP免疫组化呈强阳性反应,见棕黄色颗粒.( $\times$  400)

图4 DD-PCR 放射自显影结果.

图5 DD<sub>11</sub> Northern blot 放射自显影结果.自左向右依次为正常组、模型组、西药组、全方组、清热组、活血组. 健脾组.

### 3 讨论

本研究表明,无论是清热解毒法、活血化瘀法,还是健脾理气法、西药化疗,在肝癌的治疗上均取得了一定的疗效,各中药治法均优于西药化疗. 其中清热解毒法在肝癌局部治疗方面是最有效的,尤其体现在对肝脏病理中癌细胞的恶性程度的改变及降低肝组织中AFP的含量等方面. 但可能是该治法方药过度集中于“癌毒”的病机而忽视了苦寒致虚、致滞的病机,以致在大鼠肝脏局部情况的好转与大鼠生存质量及生存率不一致. 这提示辨证论治的重要性. 实验结果表明,活血化瘀法疗效较好,说明活血化瘀在治疗原发性肝癌方面具有一定的现实意义,也印证了中医对肿瘤以瘀血为主要病机的认识. 但在临幊上,医师普遍担心活血化瘀法会加重出血倾向. 但是,我们的结果表明,与模型组相比,活血组大鼠腹腔出血死亡数明显降低,大鼠肝脏表面出血斑点也明显好转. 同时活血化瘀可减少邪毒的进一步积聚,恢复机体对癌肿的抗病能力,这可能是采用活血化瘀法取得较好效果的原因.

健脾理气法可提高机体的免疫功能,有使肿瘤生长减慢,瘤体缩小,症状改善,生存期延长的作用. 我们的实验表明,如果不顾及肝癌形成过程中“瘀”、“毒”病机,单纯健脾理气法效果并不理想. 因而针对肝癌复杂的病因病机配伍清热解毒、活血化瘀等祛邪之法可望提高疗效. 抑癌扶正行气活血方,数法并用,以清热解毒、活血化瘀为主、佐以健脾理气,取得了较好的疗效,进一步验证中医药组方配伍的重要性. 与我们所推測的一致,DD-PCR 显示不同治疗组别肝脏(含肝癌)组织基因表达存在广泛的差异,其中,清热解毒治法下调 DD<sub>4</sub>、DD<sub>25</sub>、DD<sub>31</sub> 基因表达的作用最为突出;健脾理气治法下调 DD<sub>9</sub> 基因表达的作用最为突出;活血化瘀治法下调 DD<sub>22</sub>、DD<sub>23</sub> 基因表达的作用最为突出;全方下调 DD<sub>11</sub>, DD<sub>29</sub> 基因表达的作用最为突出;FT207 下调 DD<sub>23</sub>、DD<sub>26</sub> 基因表达的作用最为突出. 提示不同治法可能直接或间接对这些基因进行选择性地调控,从而实现对原发性肝癌的防治作用. 由于这些基因在肝癌发生与转归中的作用至今未见报道,其作用将有待于进一步深入研究.

由于DD-PCR随机扩增与其一对引物对应的基因片段,我们所挑选的9个差异表达基因中尚未见到一些与原发性肝癌密切有关的基因,如N-ras基因. 推测所选用引物对尚不能在较小的PCR产物(200-500 bp)中反映这些基因. 但不代表这些基因表达没有差异. 如果增加DD-PCR的引物对,或采用基因芯片,这些基因表达的差异将会明显、全面地展现出来.

原发性肝癌的发生发展是一个多因素、多阶段的复杂过程,基因表达异常是其最基本的分子生物学特征. 深入研究其基因表达的差异,及其差异基因的作用,将有助于深入研究不同中医治法的分子作用机制,寻找不同治法的作用靶点,及有关中医证的分子基础,因

而对中医基础理论证及其证治机制的深入研究，以及进一步指导临床用药，具有重要的理论与实践意义。

#### 4 参考文献

- 1 吴彬,罗仁夏. 消化道恶性肿瘤的关联性和地区聚集性的对应分析. 中国卫生统计 2001;18:326-327
- 2 汤钊猷. 中国肝癌研究现状. 中西医结合肝病杂志 1998;8:60-63
- 3 杨广顺,吴志全,吴孟超. 原发性肝癌的规范化综合治疗. 中华外科杂志 2001;039:742-744
- 4 孙华林. 肝癌的综合治疗. 中国医刊 2002;37:25-28
- 5 朱争艳,宋继昌. 肝癌基因治疗研究进展. 临床肝脏病学杂志 2002; 18:134-136
- 6 王锦波. 多中心肝癌与肝癌肝内转移. 国外医学:外科学分册 2002; 29:170-171
- 7 南克俊,隋晨光,魏永长,李春丽,李毅,杨谨,陈玲,刘亚民. 中晚期肝癌介入化疗术的预后影响因素. 第四军医大学学报 2002;23:1134-1136
- 8 叶胜龙. 原发性肝癌介入治疗的现状及评价. 中华肝脏病学杂志 2002;10:165-166
- 9 吴孟超. 重视中西医结合治疗肝癌的研究. 第二军医大学学报 2001; 22:601-602
- 10 Guan DY,Fang ZQ.Advances in TCM Treatment of Primary Hepatocarcinoma. *J Tradit Chin Med* 2000;20:223-226
- 11 方肇勤,管冬元,梁尚华,鲁恒心. 不同中医治疗法对 DEN 诱发大鼠肝癌作用的比较研究. 中医杂志 2002;43: 542-544
- 12 Chomczyuski P,Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159
- 13 Liang P, Pardee AB.Differential display of eukaryotic mRNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992;257:967-972
- 14 Schwarzbauer JE, Patel RS, Fonda D, Hynes RO. Multiple sites of alternative splicing of the rat fibronectin gene transcript. *EMBO J* 1987;6:2573-2580
- 15 Falquerho L, Patey G, Paquereau L, Rossi V, Lahuna O, Szpirer J, Szpirer C, Levan G, Le Cam A. Primary structure of the rat gene encoding an inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase. *Gene* 1991;98:209-216
- 16 Malek SN, Yang CH, Earnshaw WC, Kozak CA, Desiderio S. p150TSP, a conserved nuclear phosphoprotein that contains multiple tetratricopeptide repeats and binds specifically to SH2 domains. *J Biol Chem* 1996;271:6952-6962
- 17 Gadaleta G, Pepe G, De Candia G, Quagliariello C, Sbisa E, Saccone C. The complete nucleotide sequence of the Rattus norvegicus mitochondrial genome: cryptic signals revealed by comparative analysis between vertebrates. *J Mol Evol* 1989;28:497-516

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版

本刊讯 世界华人消化杂志(原新消化病学杂志)从1993-2002年的电子版全部出版。世界华人消化杂志过刊索引:新消化病学杂志,1993(1-4期);新消化病学杂志,1994(1-4期);新消化病学杂志,1995(1-4期);新消化病学杂志,1996(1-12期);新消化病学杂志,1997(1-12期);华人消化杂志,1998(1-12期);世界华人消化杂志,1999(1-12期);世界华人消化杂志,2000(1-12期);世界华人消化杂志,2001(1-12期)。世界华人消化杂志现刊索引:2002(1-12期)。

World Journal of Gastroenterology(原中国新消化病学杂志)从1993-2002年的电子版全部出版。过刊索引:China Natl J New Gastroenterol, 1995(1期);China Natl J New Gastroenterol, 1996(1-4期);China Natl J New Gastroenterol, 1997(1-4期);World J Gastroenterol, 1998(1-6期);World J Gastroenterol, 1999(1-6期);World J Gastroenterol, 2000(1-6期);World J Gastroenterol, 2001(1-6期)。现刊索引:World J Gastroenterol, 2002(1-6期)。

世界华人消化杂志和World J Gastroenterol的电子版网址如下:2002世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm> 2001世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm> 2000世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2000.htm> 1999世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1999.htm> 1998华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1998.htm> 1997新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1997.htm> 1996新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1996.htm> 1995新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1995.htm> 1994新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1994.htm> 1993新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1993.htm> 2002 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm> 2001 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm> 2000 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2000.htm> 1999 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1999.htm> 1998 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1998.htm> 1997 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1997.htm> 1996 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1996.htm> 1995 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1995.htm>

# 转导单链免疫毒素基因的 PBMCs 对人肝癌细胞 SMMC-7721 的体外杀伤活性

程 虹, 刘彦仿, 张惠中, 沈万安, 张 菊, 张 静

程虹, 刘彦仿, 张静, 中国人民解放军第四军医大学基础部病理学教研室  
陕西省西安市 710033  
张惠中, 沈万安, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军骨肿瘤研究所  
陕西省西安市 710038  
张菊, 中国人民解放军第四军医大学基础部生物化学教研室  
陕西省西安市 710033  
程虹, 女, 1967-06-24 生, 安徽省宣州市人, 汉族, 病理学博士, 讲师。  
军队“九·五”重点补充课题, No.98M098  
项目负责人: 刘彦仿, 710033, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学基础部病理学教研室。 yfliu@fmnu.edu.cn  
电话: 029-3375497  
收稿日期: 2002-11-19 接受日期: 2002-12-20

## In vitro cytotoxicity of PBMCs via genetic modification of single-chain immunotoxin

Hong Cheng, Yan-Fang Liu, Hui-Zhong Zhang, Wan-An Shen,  
Ju Zhang, Jing Zhang

Hong Cheng, Yan-Fang Liu, Jing Zhang, Department of Pathology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China  
Hui-Zhong Zhang, Wan-An Shen, Orthopaedics Oncology Institute of Chinese PLA, Fourth Military Medical University, Tangdu Hospital, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China  
Ju Zhang, Department of Biochemistry, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China  
Supported by Military 95 Major Supplementary Project, No.98M098  
Correspondence to: Yan-Fang Liu, Department of Pathology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China.  
yfliu@fmnu.edu.cn  
Received: 2002-11-19 Accepted: 2002-12-20

## Abstract

AIM: To investigate the selective cytotoxicity of single-chain immunotoxin (sFv-TNF- $\alpha$  fusion proteins) in cell line SMMC-7721.

METHODS: HCC-specific killer cells were generated by transducing the recombinant retroviral virus in supernatant of the virus producing cells into human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). PCR and RT-PCR were used to detect integration and transcription of the sFv-TNF- $\alpha$  gene in transduced PBMCs (PBMCs/PST). MTT method was used to detect antitumour activity of the sFv-TNF- $\alpha$  fusion proteins.

RESULTS: There was integrated sFv-TNF- $\alpha$  gene in the genome of PBMCs/PST, and PBMCs/PST were able to express the fusion sFv-TNF- $\alpha$  proteins. Cell killing was significant in HCC cells co-cultivated with PBMCs/PST, whereas the PBMCs/pLXSN control cells had no significant cytotoxic effects on HCC cells.

CONCLUSION: Expression of sFv-TNF- $\alpha$  fusion proteins in PBMCs/PST has cytotoxicity to HCC cells *in vitro*.

Cheng H, Liu YF, Zhang HZ, Shen WA, Zhang J, Zhang J. In vitro cytotoxicity of PBMCs via genetic modification of single-chain immunotoxin. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(3):281-284

## 摘要

目的:用携带分泌型抗肝癌单链免疫毒素基因(sFv-TNF- $\alpha$ )的重组逆转录病毒感染人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs),使其表达并分泌针对人肝癌细胞的 sFv-TNF- $\alpha$  融合蛋白,观察转导的 PBMCs 对体外培养人肝癌细胞 SMMC-7721 的杀伤作用。

方法:用感染性重组病毒产生细胞 C<sub>22</sub>(PA317/PST)产生的病毒上清转导人 PBMCs,采用 PCR 和 RT-PCR 方法对转导的 PBMCs(PBMCs/PST)进行 DNA 和 mRNA 水平的分析。PBMCs/PST 与 SMMC-7721 共培养,MTT 法检测 PBMCs/PST 表达产物对肝癌细胞的体外杀伤活性。

结果:PCR 及 RT-PCR 结果显示 PBMCs/PST 中扩增出外源目的基因对应的电泳条带。MTT 法检测结果,分泌型抗肝癌单链免疫毒素对体外培养肝癌细胞 SMMC-7721 的杀伤率为(38.2 ± 6.7)%。

结论:分泌型抗肝癌单链免疫毒素基因可以在 PBMCs 中整合并稳定表达,其分泌的表达产物对 SMMC-7721 具有一定的体外杀伤作用。

程虹, 刘彦仿, 张惠中, 沈万安, 张菊, 张静. 转导单链免疫毒素基因的 PBMCs 对人肝癌细胞 SMMC-7721 的体外杀伤活性. 世界华人消化杂志 2003;11(3): 281-284

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/281.htm>

## 0 引言

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见的恶性肿瘤之一,位居我国恶性肿瘤发病的第三位,约占全世界肝癌病例的 42.5%,每年死于肝癌的人数约为 11 万<sup>[1-7]</sup>。迄今为止,肝癌的病因和发病机制仍不十分清楚,更无理想的治疗手段<sup>[8-18]</sup>。随着现代分子生物学和免疫学的发展,自 1990 年代初迄今,已有百余项肿瘤基因治疗方案获准进入临床试验,但纵观近 10 a 的研究发现,其临床疗效与预期的目标之间还存在较大差距,原因之一就是肿瘤细胞的特异性识别尚未解决。肿瘤特异性单链抗体的问世为基因治疗靶向性问题的解决提供了新的手段,近年来成为肿瘤免疫基因治疗中的热点,目前已有很多种单链免疫毒素基因治疗计划进入临床试验<sup>[19-27]</sup>。在本实验室成功克隆的抗肝癌单链抗体基础上,我们构建了分泌型抗肝癌单链免疫毒素基

因逆转录病毒表达载体 pLXSN-sFv-TNF-<sub>-</sub>(PST) , 并用PA317细胞进行包装 , 筛选出一株具有较高滴度的感染性重组病毒产生细胞C<sub>22</sub>(PA317/PST)<sup>[28]</sup>。用C<sub>22</sub>细胞产生的病毒上清转导人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells , PBMCs) , 使其表达并分泌针对人肝癌细胞的靶向性sFv-TNF-<sub>-</sub>融合蛋白 , 观察转导的PBMCs对体外培养肝癌细胞的杀伤作用。

## 1 材料和方法

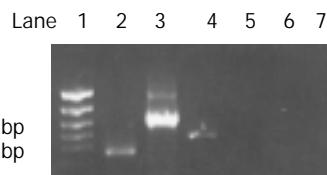
1.1 材料 人肝癌细胞系SMMC-7721为本室保存,RPMI1640常规传代培养。转染的逆转录病毒产生细胞系C<sub>22</sub>由本室构建<sup>[28]</sup> , 用DMEM常规传代培养。DMEM , G418 , Superscript<sup>TM</sup> 逆转录试剂盒和Trizol Reagent为Gibco公司产品 , Polybrene为Sigma公司产品 , MTT为Serva公司产品 , PHA购自Sigma公司 , 超级小牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所。重组人IL-2为上海生物技术研究所产品。淋巴细胞分离液购自上海试剂二厂。

1.2 方法 抽取正常人外周血50 mL , 肝素抗凝 , 加入淋巴细胞分离液50 mL , 室温1 400 g离心30 min , 吸取单个核细胞层悬液 , 40 mL无血清RPMI1640洗涤细胞3次(1 000 g离心10 min) , 计数,用含200 mL/L小牛血清的完全RPMI1640培养液稀释为活细胞 $1\times 10^9\cdot L^{-1}$ ,加入 $5\times 10^5\cdot L^{-1}$  IL-2及 $5\times 10^3\mu g\cdot L^{-1}$  PHA,于37℃,50 mL·L<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>培养3 d , 换含 $5\times 10^5\cdot L^{-1}$  IL-2, 200 mL/L小牛血清的完全RPMI1640培养液继续培养3 d后 , 进行逆转录病毒的转导<sup>[29]</sup>。用C<sub>22</sub>细胞制备重组逆转录病毒上清<sup>[28]</sup> , 取5 mL C<sub>22</sub>细胞上清(不含G418)及8 mg·L<sup>-1</sup> Polybrene感染 $1\times 10^6$ 个PBMCs , 置37℃, 50 mL·L<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>孵箱内培养6 h , 换普通完全RPMI1640培养液 , 连续感染3 d , 转导的PBMCs命名为PBMCs/PST。对照组PBMCs用PA317/pLXSN(空白载体)细胞上清感染 , 转导的PBMCs命名为PBMCs/pLXSN。病毒连续感染3 d后4 d转入含500 mg·L<sup>-1</sup> G418的完全RPMI1640培养液中培养1 wk。分别提取重组逆转录病毒转导的PBMCs/PST和PBMCs/pLXSN细胞中的基因组DNA<sup>[28]</sup> , 用3对引物(sFv-1和sFv-2, TNF-<sub>-1</sub>和TNF-<sub>-2</sub>及neo-1和neo-2), 分别扩增细胞基因组DNA中sFv, TNF-<sub>-</sub>及neo基因 , 以证实外源基因导入靶细胞。PCR反应于25 μL体积中完成 , 基因组DNA模板2.5 μL, 引物2.5 μL, 10×PCR缓冲液2.5 μL, 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> , dNTP 2.5 μL , TaqDNA聚合酶0.5 μL , 加水补足25 μL , 混匀后在PCR仪上扩增。循环参数为:94℃变性60 s , 58℃退火60 s, 72℃延伸90 s , 经30个循环后 , 72℃保温10 min。PCR产物于15 g·L<sup>-1</sup>琼脂糖凝胶电泳,紫外透射仪观察PBMCs/PST细胞基因组DNA中的外源基因。采用Trizol一步法 , 分别提取重组逆转录病毒转导的PBMCs/PST和PBMCs/pLXSN细胞中的总RNA。利用Superscript<sup>TM</sup>系统 , 以细胞内总RNA为模板进行cDNA第一链的合成:3.5 μL RNA , 2 μL 5×逆转录缓冲液 , 1 μL Oligo(dT<sub>12</sub>), 70

保温10 min , 冰浴2 min , 加入1 μL 100 mmol·L<sup>-1</sup> DTT , 1 μL 10 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP , 1 μL RNase inhibitor , 0.5 μL MMLV逆转录酶 , 37℃反应1 h。以cDNA第一链为模板进行sFv和TNF-<sub>-</sub>基因的扩增 , PCR反应于50 μL体积中完成 , cDNA模板2.5 μL , 5 umol·L<sup>-1</sup> 引物5 μL , 10×PCR缓冲液5 μL , 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP 5 μL , TaqDNA聚合酶0.5 μL , 加水补足50 μL , 混匀后在PCR仪上扩增。PCR产物于15 g·L<sup>-1</sup>琼脂糖凝胶电泳 , 紫外透射仪观察sFv和TNF-<sub>-</sub>基因的mRNA。选择对数生长期的人肝癌细胞SMMC-7721接种于24孔培养板中 , 每孔 $2\times 10^4$  , 将PBMCs/PST按每孔 $2\times 10^5$ 接种于孔径0.4 μm的Millicell滤膜培养皿中 , 并将Millicell置24孔培养板中 , 使PBMCs/PST与SMMC-7721共培养<sup>[29,30]</sup>。设PBMCs/pLXSN与SMMC-7721共培养为空载体对照组 , PBMCs与SMMC-7721共培养为空白对照,每种细胞设20复孔。培养板置37℃, 50 mL·L<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>孵箱内培养 , 72 h后取出Millicell , 加MTT每孔40 μL至24孔培养板中 , 继续培养4 h , 弃上清 , 加入0.2 mL DMSO终止反应 , 充分振荡后在酶标仪上检测A<sub>550nm</sub>值 , 计算细胞杀伤率<sup>[29]</sup>。

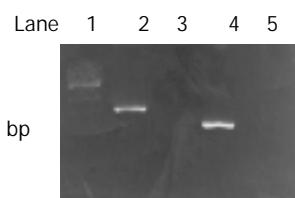
## 2 结果

2.1 PBMCs/PST基因组DNA中外源基因扩增 PCR产物电泳后观察,可见相应的327 bp, 470 bp, 790 bp大小的条带 , 分别与neo, TNF-<sub>-</sub>, sFv基因片段大小相符 , 而PBMCs/pLXSN中未扩增出这3种大小的条带(图1) , 证实PBMCs/PST中有外源性目的基因的导入。



1 PCR markers 2 PBMCs/PST (Neo, sFv, TNF-<sub>-</sub>)  
5-7 空载体对照PBMCs/pLXSN (Neo, sFv, TNF-<sub>-</sub>)  
图1 基因组DNA中sFv、TNF-<sub>-</sub>及neo基因PCR扩增结果。

2.2 外源基因在PBMCs/PST中转录水平的分析 RT-PCR产物电泳后 , 可见相应的470 bp , 790 bp大小的条带 , 分别与TNF-<sub>-</sub>, sFv基因片段大小相符 , 对照组未扩增出这两种大小的条带(图2) , 证实PBMCs/PST中外源性目的基因有mRNA表达。



1 PCR markers 2 PBMCs/PST (sFv) 3 空载体对照PBMCs/pLXSN (sFv)  
4 PBMCs/PST(TNF-<sub>-</sub>) 5 空载体对照PBMCs/pLXSN(TNF-<sub>-</sub>)  
图2 sFv和TNF-<sub>-</sub>基因mRNA的RT-PCR检测。

**2.3 细胞杀伤率检测** 用 MTT 法检测与 PBMCs/PST , PBMCs/pLXSN 共培养 SMMC-7721 的  $A_{550nm}(A)$  值及与 PBMCs 共培养 SMMC-7721 的  $A_{550nm}$  值( $A_0$ ) , 计算对 SMMC-7721 细胞的杀伤率(%). 计算公式为: 细胞杀伤率 (%) =  $(1 - A/A_0) \times 100\%$ . PBMCs/PST( $n = 20$ ) 细胞杀伤率为(38.2 ± 6.7) % , 而 PBMCs/pLXSN( $n = 20$ ) 细胞杀伤率为(15.7 ± 3.1) % , 经 t 检验 ,  $P < 0.01$ .

### 3 讨论

实现人类实体瘤基因治疗的途径主要有 2 种 ,(1) 在体靶细胞的转染(*in vivo*) , 即直接基因治疗途径 , 例如将细胞因子或肿瘤抗原的基因表达载体直接体内注射或将 MHC-I 基因直接注射入瘤体内等治疗肿瘤 ;(2) 离体靶细胞的转染(*ex vivo*) , 即间接基因治疗途径 , 必须分离并培养离体的靶细胞 , 并在接受基因转移后移植回人体以治疗疾病 , 例如应用体外基因修饰的 TIL 、瘤苗、成纤维细胞等体内回输或接种的方法治疗肿瘤<sup>[31-34]</sup>. 我们选择逆转录病毒介导的体外基因转移方法进行基因治疗的研究 , 要求基因转移的靶细胞既要容易获得 , 又要容易回输到人体 , 因此 , 我们采用 PBMCs 作为基因转移的靶细胞 . 由于目前所常用的基因转移方法<sup>[35-41]</sup> (包括逆转录病毒载体 - 包装细胞转移系统) 效率均不高 , 获得大量的靶细胞是重要的先决条件 , 因此 , 要求该细胞易于体外培养 , 而且具有一定的分裂和增生能力 . 此外 , 逆转录病毒载体对处于活跃分裂状态的细胞感染率和基因转移率较高 , 而对未分化的分裂不十分活跃的细胞感染率和基因转移率较低 , 因此 , 基因治疗中应尽量选择处于活跃分裂状态的细胞作为靶细胞 . PBMCs 具备上述的各项条件 , 目前是一种较理想的基因治疗靶细胞<sup>[42-44]</sup>. 虽然有研究表明 , TIL 抗肿瘤的活性是 PBMCs 的 50-100 倍 , 而且具有良好的肿瘤病灶趋向性和浸润性<sup>[45-49]</sup> , 但由于其不易分离和培养 , 在某些肿瘤如肝癌中 TIL 数量极少 , 无法满足基因治疗中反复操作的要求 , 因而其应用受到很大的限制.

我们将正常人 PBMCs 分离并用 PHA 和 IL-2 进行体外刺激培养 , 用携带分泌型抗肝癌单链单链免疫毒素基因的重组逆转录病毒感染 , 使其表达并分泌针对人肝癌细胞的 sFv-TNF- 融合蛋白 , 采用 PCR, RT-PCR 方法 , 对转导的 PBMCs 进行 DNA 和 mRNA 水平的分析 , 证实外源目的基因在 PBMCs 中整合并表达 . 将转导的 PBMCs 与 SMMC-7721 共培养 , 由于 Millicell 底部为孔径 0.4 μm 的滤膜 , 细胞不能通过该滤膜 , 而其分泌物可以相互透过<sup>[29]</sup> , 因此 , 用 MTT 法可检测 PBMCs/PST 表达产物对肝癌细胞的杀伤作用 , 结果表明 , 分泌型抗肝癌单链单链免疫毒素对体外培养的肝癌细胞系 SMMC-7721 具有杀伤作用 . 本实验结果表明 , 转导的人 PBMCs 可以表达并分泌特异性的抗肝癌 sFv-TNF- 融合蛋白 , 并且对体外培养的肝癌细胞系 SMMC-7721 具有杀伤活性 . 因此 , 采用人 PBMCs 作

为靶向细胞因子的表达细胞进行肝癌基因治疗是可行的.

### 4 参考文献

- 1 Llovet JM, Fuster J, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2002;49:7-11
- 2 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
- 3 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
- 4 Zhang G, Long M, Wu ZZ, Yu WQ. Mechanical properties of hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:243-246
- 5 Sun ZJ, Pan CE, Liu HS, Wang GJ. Anti-hepatoma activity of resveratrol *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2002;8:79-81
- 6 El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. *Hepatology* 2002;36(Suppl 5):S74-83
- 7 Liu WW. Etiological studies of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:93-95
- 8 Li MS, Yuan AL, Zhang WD, Liu SD, Lu AM, Zhou DY. Dendritic cells *in vitro* induce efficient and special anti tumor immune response. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:161-163
- 9 Chen HB, Zhang JK, Huang ZL, Sun JL, Zhou YQ. Effects of cytokines on dendritic cells against human hepatoma cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:191-193
- 10 Liu LH, Xiao WH, Yang JL. Effects of 5-Aza 2' deoxycytidine on growth of human hepatocellular carcinoma cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8: 420-423
- 11 Fu JM, Yu XF, Shao YF. Telomerase and primary liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:461-463
- 12 Du QY, Wang FS, Xu DP, Liu H, Lei ZY, Liu MX, Wang YD, Chen JM, Wu ZZ. Cytotoxic effects of CIK against hepatocellular carcinoma cells *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8: 863-866
- 13 Llovet JM, Mas X, Aponte JJ, Fuster J, Navasa M, Christensen E, Rodes J, Bruix J. Cost effectiveness of adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma during the waiting list for liver transplantation. *Gut* 2002;50:123-128
- 14 Llovet JM, Sala M, Bruix J. Nonsurgical treatment of hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2000;6(Suppl 2):S11-15
- 15 Bruix J, Llovet JM. Locoregional treatments for hepatocellular carcinoma. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 1999;13:611-622
- 16 Xia SS. Current status of liver transplantation in China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:645-646
- 17 Chen HY, Liu WH, Qin SK. Induction of arsenic trioxide on apoptosis of hepatocarcinoma cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:532-535
- 18 Ishikawa M, Yogita S, Miyake H, Fukuda Y, Harada M, Wada D, Tashiro S. Differential diagnosis of small hepatocellular carcinoma and borderline lesions and therapeutic strategy. *Hepatogastroenterology* 2002;49:1591-1596
- 19 Peipp M, Kupers H, Saul D, Schlierf B, Greil J, Zunino SJ, Gramatzki M, Fey GH. A recombinant CD7-specific single-chain immunotoxin is a potent inducer of apoptosis in acute leukemic T cells. *Cancer Res* 2002;62:2848-2855
- 20 Ueno A, Arakawa F, Abe H, Matsumoto H, Kudo T, Asano R, Tsumoto K, Kumagai I, Kuroki M, Kuroki M. T-cell immunotherapy for human MK-1-expressing tumors using a fusion protein of the superantigen SEA and anti-MK-1 scFv antibody. *Anticancer Res* 2002;22:769-776
- 21 Pennell CA, Erickson HA. Designing immunotoxins for cancer therapy. *Immunol Res* 2002;25:177-191
- 22 Tur MK, Sesse S, Stocker M, Djabelkhir K, Huhn M, Matthey B, Gottstein C, Pfitzner T, Engert A, Barth S. An anti-GD2 single chain Fv selected by phage display and fused to *Pseudomonas exotoxin A* develops specific cytotoxic activity against neuroblastoma derived cell lines. *Int J Mol Med* 2001;8:579-584
- 23 Matthey B, Engert A, Barth S. Recombinant immunotoxins for the treatment of Hodgkin's disease (Review). *Int J Mol Med* 2000; 6:509-514
- 24 Rosenblum MG, Horn SA, Cheung LH. A novel recombinant fusion

- toxin targeting HER-2/NEU-over-expressing cells and containing human tumor necrosis factor. *Int J Cancer* 2000;15:88267-88273
- Vallera DA, Kuroki DW, Panoskaltsis-Mortari A, Buchsbaum DJ, Rogers BE, Blazar BR. Molecular modification of a recombinant anti-CD3epsilon-directed immunotoxin by inducing terminal cysteine bridging enhances anti-GVHD efficacy and reduces organ toxicity in a lethal murine model. *Blood* 2000;96:1157-1165
- Tsutsumi Y, Onda M, Nagata S, Lee B, Kreitman RJ, Pastan I. Site-specific chemical modification with polyethylene glycol of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) improves antitumor activity and reduces animal toxicity and immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8548-8553
- Bera TK, Kennedy PE, Berger EA, Barbas CF 3rd, Pastan I. Specific killing of HIV-infected lymphocytes by a recombinant immunotoxin directed against the HIV-1 envelope glycoprotein. *Mol Med* 1998;4:384-391
- Cheng H, Liu YF, Zhang HZ, Shen WA. Construction of the recombinant retroviral vector encoding anti-HCC single-chain bifunctional antibody and establishment of a stable virus producing PA317 cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:708-709
- Chen SY, Yang AG, Chen JD, Kute T, King CR, Collier J, Cong Y, Yao C, Huang XF. Potent antitumour activity of a new class of tumour-specific killer cells. *Nature* 1997;385:78-80
- Yang AG, Chen SY. A new class of antigen-specific killer cells. *Nat Biotechnol* 1997;15:46-51
- Dai YM. Targeting chemotherapy: a new focus in gene therapy research. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:469-472
- Barzon L, Bonaguro R, Castagliuolo I, Chilos M, Gnatta E, Parolin C, Boscaro M, Palu G. Transcriptionally targeted retroviral vector for combined suicide and immunomodulating gene therapy of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5304-5311
- Indraccolo S, Habeler W, Tisato V, Stievano L, Piovan E, Tosello V, Esposito G, Wagner R, Uberla K, Chieco-Bianchi L, Amadori A. Gene transfer in ovarian cancer cells: A comparison between retroviral and lentiviral vectors. *Cancer Res* 2002;62:6099-6107
- Martin KR, Klein RL, Quigley HA. Gene delivery to the eye using adeno-associated viral vectors. *Methods* 2002;28:267-275
- Mochizuki H, Miura M, Shimada T, Mizuno Y. Adeno-associated virus-mediated antiapoptotic gene delivery: *in vivo* gene therapy for neurological disorders. *Methods* 2002;28:248-252
- Kim SH, Lechman ER, Kim S, Nash J, Oligino TJ, Robbins PD. Ex Vivo gene delivery of IL-1Ra and soluble TNF receptor confers a distal synergistic therapeutic effect in antigen-induced arthritis. *Mol Ther* 2002;6:591-600
- Wang F, Xia X, Hu H, Li L, Tian Y, Chen X, Huang Q. Liposome-mediated gene transfer into retina. *Chunghua Yenko Tsachih* 2002;38:520-522
- Pan X, Pan W, Ke CW, Zhang B, Cao GW, Qi ZT. Tetracycline controlled DT/VEGF system gene therapy mediated by adenovirus vector. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1121-1126
- Guo JC, Li JC, Fan DM, Qiao TD, Zhang XY. Regulation of HSP70 expression in human gastric cancer cell line SGC7901 by gene transfection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:773-776
- Ewert K, Ahmad A, Evans HM, Schmidt HW, Safinya CR. Efficient synthesis and cell-transfection properties of a new multivalent cationic lipid for nonviral gene delivery. *J Med Chem* 2002;45:5023-5029
- Hurez V, Hautton RD, Oliver J, Matthews RJ, Weaver CK. Gene delivery into primary T cells: overview and characterization of a transgenic model for efficient adenoviral transduction. *Immunol Res* 2002;26:131-141
- MacGregor RR, Ginsberg R, Ugen KE, Baine Y, Kang CU, Tu XM, Higgins T, Weiner DB, Boyer JD. T-cell responses induced in normal volunteers immunized with a DNA-based vaccine containing HIV-1 env and rev. *AIDS* 2002;16:2137-2143
- Keating SM, Bollinger RC, Quinn TC, Jackson JB, Carruth LM. Cross-clade T lymphocyte-mediated immunity to HIV Type 1: implications for vaccine design and immunodetection assays. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:1067-1079
- Papageorgiou K, Isenberg D, Latchman D. Optimisation of herpes simplex virus-based vectors for delivery to human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods* 2002;270:235
- Dreno B, Nguyen JM, Khammari A, Pandolfino MC, Tessier MH, Bercegeay S, Cassidanius A, Lemarre P, Billaudel S, Labarriere N, Jotereau F. Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:539-546
- Labarriere N, Pandolfino MC, Gervois N, Khammari A, Tessier MH, Dreno B, Jotereau F. Therapeutic efficacy of melanoma-reactive TIL injected in stage III melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:532-538
- Parker C, Milosevic M, Panzarella T, Banerjee D, Jewett M, Catton C, Tew-George B, Gospodarowicz M, Warde P. The prognostic significance of the tumour infiltrating lymphocyte count in stage I testicular seminoma managed by surveillance. *Eur J Cancer* 2002;38:2014
- Paul S, Calmels B, Acres RB. Improvement of adoptive cellular immunotherapy of human cancer using *ex-vivo* gene transfer. *Curr Gene Ther* 2002;2:91-100
- Donskov F, Bennedsgaard KM, Von Der Maase H, Marcussen N, Fisker R, Jensen JJ, Naredi P, Hokland M. Intratumoural and peripheral blood lymphocyte subsets in patients with metastatic renal cell carcinoma undergoing interleukin-2 based immunotherapy: association to objective response and survival. *Br J Cancer* 2002;87:194-201

# 人源化抗肝癌单链抗体融合突变型 TNF $\alpha$ 的导向作用

张 静,刘彦仿,杨守京,乔 庆,张素珍,程虹

张静,刘彦仿,杨守京,张素珍,程虹,中国人民解放军第四军医大学西京医院病理科 陕西省西安市 710033  
乔庆,中国人民解放军第四军医大学唐都医院普外科 陕西省西安市 710038  
张静,女,1970-02-22生,辽宁省沈阳市人,汉族,病理生理学博士,讲师。  
军队95重点补充课题,NO.98M098  
项目负责人:刘彦仿,710033,陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学西京医院病理科 iuyf@fmmu.edu.cn  
电话:029-3375497 传真:029-3375497  
收稿日期:2002-11-12 接受日期:2002-11-29

## Targeting therapeutic of humanized scFv<sub>25</sub> and the fusion to mutant TNF $\alpha$ against hepatocellular carcinoma: a preliminary study

Jing Zhang,Yan-Fang Liu,Shou-Jing Yang,Qing Qiao,Su-Zhen Zhang, Hong Cheng

Jing Zhang,Yan-Fang Liu,Shou-Jing Yang, Su-Zhen Zhang,Hong Cheng, Department of Pathology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China  
Qing Qiao,Department of General Surgery, TangDu Hospital,Fourth Military Medical University,Xi'an 710038, Shaanxi Province,China  
Supported by Military 95 major supplementary project,NO.98M098  
Correspondence to: Prof Yan-Fang Liu, Department of Pathology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China. liuyf@fmmu.edu.cn

### Abstract

AIM: To explore the cytotoxic effects of humanized scFv<sub>25</sub> and the fusion to mutant TNF $\alpha$  on HCC xenografts in nude mice.

METHODS: The mice with HCC xenografts were injected the purified recombinant immunotoxin through tail vain and executed after two weeks. The bulk and weight of tumor were observed. Expression of TNF $\alpha$  was detected by immunohistochemical staining in the tumor tissues.

RESULTS: The tumor regression trials of hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$  showed 5/5 effective, with 2/5 completely remission and 3/5 partly remission. The therapeutic result of hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$  was better than that of mutant TNF $\alpha$  ( $X^2=6.62$ ,  $P < 0.05$ ). The HCC tissue treated by hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$  expressed TNF $\alpha$ , and the positive granules were mainly existed in cytoplasm.

CONCLUSION: Recombinant immunotoxin the hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$  can regress the growth of HCC with a great potential.

Zhang J,Liu YF,Yang SJ, Qiao Q, Zhang SZ, Cheng H. Targeting therapeutic of humanized scFv<sub>25</sub> and the fusion to mutant TNF $\alpha$  against hepatocellular carcinoma: a preliminary study. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003; 11(3):285-288

### 摘要

目的:用人源化抗人肝癌单链抗体(hscFv<sub>25</sub>)融合人突变型 TNF $\alpha$  构建重组免疫毒素 , 对荷肝癌(SMMC-7721)裸鼠进行体内杀伤活性实验.

方法:用纯化的 hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$  重组免疫毒素经尾静脉注射治疗荷肝癌裸鼠 , 2 wk 后处死裸鼠 , 观察肿瘤的体积、质量 , 并对瘤组织进行 TNF $\alpha$  的免疫组化染色.

结果:hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$ 治疗组对荷肝癌裸鼠的有效率为5/5, 其中 2/5 为完全缓解 , 3/5 为部分缓解 , 与 mTNF $\alpha$  对照组相比 , 有显著差异( $X^2=6.62$ ,  $P < 0.05$ ) , 疗效明显高于对照组 , 治疗组裸鼠的肝、肺等组织中未见转移性病灶 , 经 hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$  治疗后的瘤组织 , TNF $\alpha$  呈弥漫性阳性反应 , 主要存在于瘤组织的胞质中.

结论:hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$ 对荷肝癌裸鼠具有一定的抑瘤作用 , 为 HCC 治疗打下基础.

张静,刘彦仿,杨守京,乔庆,张素珍,程虹. 人源化抗肝癌单链抗体融合突变型 TNF $\alpha$  的导向作用. 世界华人消化杂志 2003;11(3):285 - 288  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/285.htm>

### 0 引言

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma , HCC)是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一<sup>[1-5]</sup> , 其诊断和治疗一直是亟待解决的重点课题之一<sup>[6-10]</sup>. 1980 年代首次开始了基因工程抗体的新技术 , 单链抗体是由完整的抗体可变区轻链(VL)和可变区重链(VH)组成 , 中间有一条肽链相连<sup>[11,12]</sup> , 目前已在当今肿瘤性疾病中显示了广泛的应用前景<sup>[13-15]</sup>. 我室与军事医学科学院合作 , 成功构建了人源化抗肝癌单链抗体(hscFv<sub>25</sub>)<sup>[16]</sup> , 在此基础上,我们将之与人突变型肿瘤坏死因子(mTNF $\alpha$ )连接,在对其进行诱导表达、鉴定和纯化后,对荷肝癌(SMMC-7721)裸鼠进行了体内杀伤活性的研究.

### 1 材料和方法

1.1材料 人肝癌细胞株SMMC-7721为本室保存,RPMI1640 常规传代培养 ; RPMI1640 购自 Gibco 公司 ; EnVision™ System 及 DAB 显色剂购自 Dako 公司 ; 突变型 TNF $\alpha$  (mTNF $\alpha$ )蛋白冻干粉由本校生物技术中心提供 ; 鼠抗人 TNF $\alpha$  单克隆抗体购自 Stanta Cruz 公司 ; 超级小牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所.裸鼠Balb/c-nu15 只 , 分别购自本校动物实验中心及上海细胞所 ,

并一直在本校动物实验中心无特殊病原菌(SPF 三级动物饲养条件)实验室进行饲养及实验研究。消化对数生长期的 SMMC-7721 细胞, 无血清 RPMI 1 640 培养液洗涤 2 次, 倒置显微镜下计算活细胞数, 调整细胞数后, 将细胞重悬于 PBS 中, 在无菌条件下, 对 15 只体质量为 17~24 g 的裸鼠, 在右侧背部按  $2 \times 10^6$ /只, 进行接种, 定期观察肿瘤生长情况。

1.2 方法 scFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$  的导向作用。荷癌裸鼠 15 只, 肿瘤直径约 2.0 mm, 随机分 3 组, 每组 5 只, 第 1 组为阴性对照组, 给予 PBS; 第 2 组为阳性对照组, 给予 mTNF $\alpha$ ; 第 3 组为实验组, 给予 hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$ 。给药方式为尾静脉注射, 实验组给药剂量为 80  $\mu$ L(2 g/L)/只, 相当于 mTNF $\alpha$  6  $\mu$ g/只, 阳性对照组给予 mTNF $\alpha$  的剂量为 12  $\mu$ g/只, 1 次/d, 1 wk 为 1 疗程, 2 wk 后处死各组荷癌裸鼠, 取出瘤组织称重、测量体积后, 用 40 g/L 中性甲醛进行固定, 制备石蜡切片备用, 并进行常规 HE 染色。对各组肿瘤组织用鼠抗人 TNF $\alpha$  单克隆抗体进行免疫组化染色。石蜡切片常规脱蜡至水, 用 800 mL/L 甲醇 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(甲醇 4 mL + 三蒸水 1 mL + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mL)阻断内源性过氧化物酶, RT 40 min; PBS 振洗 5 min  $\times$  2 次; 加入鼠抗人 TNF $\alpha$  单克隆抗体, 4 ℃过夜, 次日 37℃孵育 30 min, PBS 振洗 5 min  $\times$  3 次; 滴加 EnVision<sup>TM</sup> 孵育 1 h, PBS 振洗 5 min  $\times$  3 次; DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色 5~10 min; 蒸馏水漂洗, 脱水透明, DPX 封固。实验中设立无关抗出血热病毒 IB<sub>3</sub> 抗体对照、不加抗体的阴性对照。

统计学处理 采用  $X^2$  检验,  $P < 0.05$  为显著差异,  $P < 0.01$  为非常显著,  $P > 0.05$  为无差异。

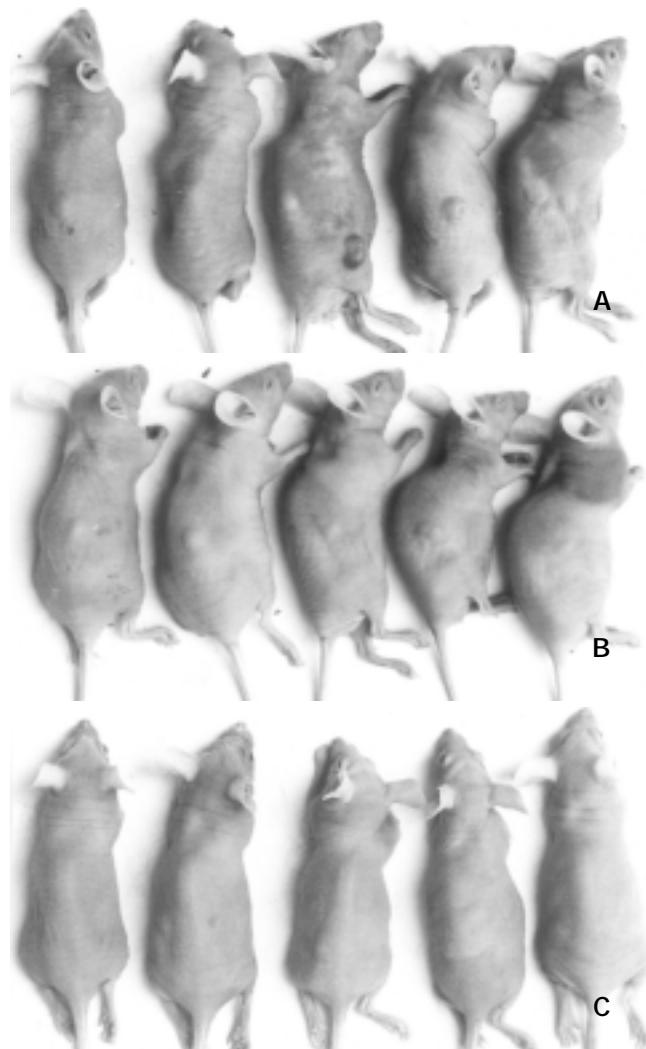
## 2 结果

体质量 16~24 g 的裸鼠 15 只, 分别在其右侧背部接种  $2 \times 10^6$  SMMC-7721 细胞(PBS 悬浮), 7 d 即可见到 15 只裸鼠都有肿瘤生长, 从 10 d 开始给药。

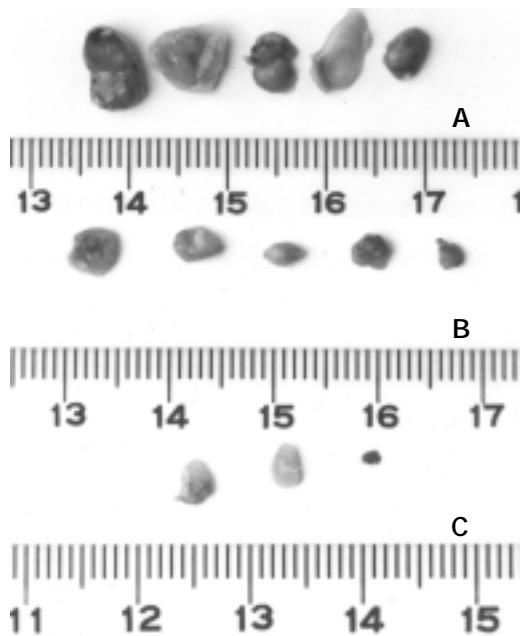
2.1 hscFv<sub>25</sub>-mTNF- $\alpha$  的导向治疗 各组荷肝癌裸鼠经抗肝癌重组免疫毒素治疗 14 d 后的裸鼠情况及肿瘤组织见图 1,2, 各实验组荷肝癌裸鼠肿瘤体积、肿瘤质量及治疗结果见表 1。hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$  治疗组的有效率为 5/5, 其中为 2/5 完全缓解, 3/5 为部分缓解。mTNF $\alpha$  对照组的有效率为 5/5, 均为部分缓解, 其肿瘤质量抑制率与 hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$  治疗组相比, 有显著差异( $X^2=6.62$ ,  $P < 0.05$ ), 疗效明显低于治疗组。对实验组肝、肺等组织进行连续切片、染色, 都没有见到转移性病灶, 完全缓解的荷肝癌裸鼠皮下组织经连续切片、染色证实未见残留的肿瘤细胞, 部分缓解的荷肝癌裸鼠的肿瘤组织, 经 HE 染色后, 可见瘤组织中存在大量坏死区(图 3)。

2.2 瘤组织的免疫组织化学染色 以鼠抗人 TNF $\alpha$  单克隆抗体为一抗, 对瘤组织进行免疫组化染色, 结果可见经 hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$  治疗后的瘤组织呈弥漫性阳性反应, 阳性颗粒为棕黄色, 主要存在于瘤细胞的胞质

中(图 4)。无关抗出血热 IB<sub>3</sub> 抗体为阴性反应, 未给予 TNF $\alpha$  治疗的 PBS 对照组的瘤组织为阴性或弱阳性反应。



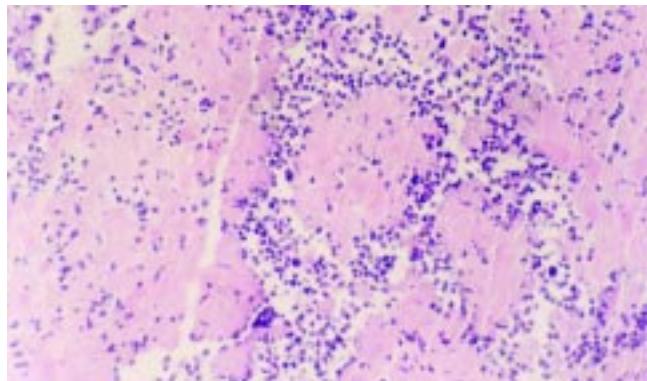
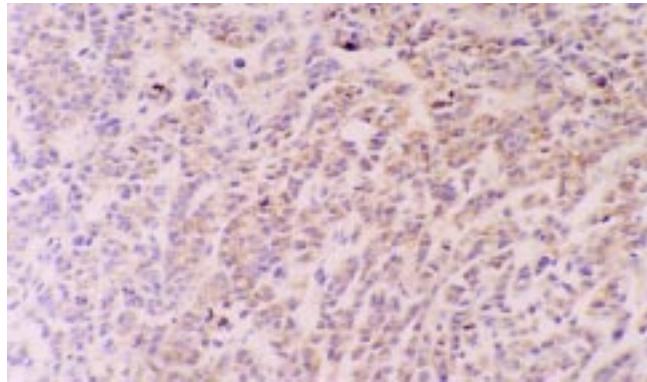
A:PBS 组;B:mTNF $\alpha$  组;C:hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$  组。  
图 1 hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$  治疗 2 wk 后的荷肝癌裸鼠。



A:PBS 组;B:mTNF $\alpha$  组;C:hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$  组。  
图 2 hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$  治疗 2 wk 后的荷肝癌裸鼠肿瘤组织。

表1 hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$  对荷肝癌(SMMC-7721)裸鼠的导向治疗

处理		瘤体积(mm $\times$ mm)	瘤质量(mg)	瘤体积抑制率(%)	瘤质量抑制率(%)	疗效
PBS	1	9 $\times$ 5	119	0	0	NR
	2	7 $\times$ 7	87	0	0	NR
	3	9 $\times$ 4	51	0	0	NR
	4	5 $\times$ 3	26	0	0	NR
	5	5 $\times$ 4	30	0	0	NR
hscFv <sub>25</sub> -mTNF $\alpha$	1	0.8 $\times$ 0.5	2	99.2	96.8	PR
	2	2 $\times$ 3	10	81.8	84.0	PR
	3	2 $\times$ 3	15	81.8	76.0	PR
	4	0	0	100	100	CR
	5	0	0	100	100	CR
mTNF $\alpha$	1	2 $\times$ 2	11	87.9	82.4	PR
	2	3 $\times$ 3	22	72.7	64.9	PR
	3	2 $\times$ 4	15	75.8	76.0	PR
	4	2 $\times$ 3	10	81.8	84.0	PR
	5	2 $\times$ 3	10	81.8	84.0	PR

图3 hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$ 治疗组PR裸鼠肿瘤组织中的大片坏死区(HE  $\times$  200倍)图4 hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$ 治疗组残存组织TNF $\alpha$ 呈弥漫性胞质阳性(EnVision  $\times$  200倍)

### 3 讨论

近20年来, 抗体已通过了多克隆抗体、单克隆抗体、基因工程抗体三个阶段的发展, 其中基因工程抗体因其显著的优点, 已成为众多学者关注的热点, 目前抗肿瘤的单链抗体已有进入I期临床的报道<sup>[17,18]</sup>, scFv具有分子量小、特异性强、亲合力高等优点<sup>[19-22]</sup>, 在

其基因3'端接上毒素、酶、细胞因子等, 构成重组免疫毒素, 就可以作为良好的导弹, 对肿瘤细胞发挥杀伤作用<sup>[22-25]</sup>。HAb25是我室自行建立的抗人肝癌单克隆抗体, 在此基础上构建的抗肝癌单链抗体hscFv<sub>25</sub>经实验证明, 也具有较好的导向作用<sup>[26]</sup>, 因此我们将其与高效、低毒性的mTNF $\alpha$ 融合, 构建了hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$ 原核表达载体PGEX4T-1/hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$ , 通过转化大肠杆菌JM109后, 通过IPTG诱导进行了目的蛋白的初步表达<sup>[27]</sup>, 表达的蛋白产物经体外分离、变性、复性及纯化后, 采用SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳、Western blot进行分析、鉴定证实后, 对荷肝癌裸鼠进行体内杀伤活性实验。

TNF $\alpha$ 是由单核/巨噬细胞分泌的一种蛋白质, 对大多数肿瘤细胞具有特异性的细胞毒作用, 但对正常细胞和某些肿瘤细胞却没有影响, 其抗肿瘤作用比较复杂, 普遍认为可能与以下几种机制有关<sup>[28-31]</sup>:直接杀伤肿瘤细胞; 刺激产生肿瘤特异性的细胞毒抗体; 阻断肿瘤血液供应; 促进肿瘤细胞凋亡。尽管TNF $\alpha$ 是迄今为止所发现的直接杀伤肿瘤作用最强的一种生物活性物质, 但毒副作用十分严重, 事实上, TNF $\alpha$ 的氨基酸序列和恶液质素完全一样, 恶液质素可以抑制脂蛋白脂肪酶的活性, 引起全身衰竭, 在临幊上出现发热、寒战、恶心、呕吐, 严重者甚至出现全身消瘦, 导致各脏器衰竭而死亡, TNF $\alpha$ 全身治疗的效果极不理想, 目前TNF $\alpha$ 在临幊治疗中仅为局部使用<sup>[32]</sup>。文献研究通过采用定点突变或聚合物改造TNF分子可以降低其活性<sup>[33,34]</sup>, 例如(J Biol Response Mod, 1988;7:587-589)分别在TNF $\alpha$ 的N端增加三个氨基酸、在TNF $\alpha$ 的第四个外显子编码序列的N端增加三个氨基酸, 研制出新型具有更强、更广泛的抗癌活性且毒性反应也大大降低的TNF-S.(Int J Cancer, 1991;48:744-748)将TNF $\alpha$ 去掉7个N端氨基酸同时将

Pro<sup>8</sup>Ser<sup>9</sup>Asp<sup>10</sup> 改为 ArgLysArg , 形成 TNF $\alpha$  突变体 , 体外抗肿瘤活性可提高 7 倍 , 且与 TNFR 的亲和力提高 , 毒性比天然 TNF $\alpha$  降低 18 倍 , 而 (Zhonghua Weishengwu Mianyixue Zazhi, 1996;16:254-258) 在此基础上 , 又同时将 C 端第 157 位 Leu 由 Phe 替代 , 与天然野生型 TNF $\alpha$  相比 , 细胞毒活性提高约两个数量级 , 从而显示了潜在的临床应用价值 . 在本实验中 , 我们选用的 TNF $\alpha$  突变体即为此种 .

通过实验 , 我们认为 hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$  具有较好的导向杀伤作用 , 疗效明显高于对照组 , 相比实验组的 m/hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$  的用量 (6  $\mu$ g/ 只 ) , 对照组 mTNF $\alpha$  的用量达到 12  $\mu$ g/ 只 , 这提示在 scFv<sub>25</sub> 的导向下 , mTNF $\alpha$  很可能会更有效地集中在肿瘤组织的局部 , 从而发挥杀瘤作用 . 同时对瘤组织进行用鼠抗 TNF $\alpha$  单克隆抗体免疫组化染色 , 结果显示 : 瘤细胞中有弥漫性、强弱不等的 TNF $\alpha$  分布 , 说明 scFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$  在瘤组织内具有较好的分布率 , 说明 hscFv<sub>25</sub>-mTNF $\alpha$  是有一定潜能的抗肝癌基因工程抗体 , 为今后的工作打下了基础 .

#### 4 参考文献

- 1 Luo YQ, Wu MC, Cong WM. Gene expression of hepatocyte growth factor and its receptor in HCC and nontumorous liver tissues. *World J Gastroenterol* 1999;5:119-121
- 2 Qian QJ, Xue HB, Qu ZQ, Fang SG, Cao HF, Wu MC. In situ detection of tumor infiltrating lymphocytes expressing perforin and fas-ligand genes in human HCC. *World J Gastroenterol* 1999;5:12-14
- 3 Guo XZ, Shao XD, Xu JH, Zhao JJ, Li HY, Wang D. Expression of bcl-xL mRNA in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:530-532
- 4 Yang YL, Dou KF, Li KZ. Correlation of UPAR and VEGF expression with invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:381-383
- 5 Zeng JX, Wang WL, Luo WJ, Wang ZL. Construction of differentially expressed cDNA library in human hepatocellular carcinoma apoptotic cells with suppression subtractive hybridization. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1233-1237
- 6 Cao W, Wang ZM, Liang ZH, Zhang HX, Wang YQ, Guan Y, Li WX, Pan BR. Effects of angiogenesis inhibitor TNP-470 with lipiodol in arterial embolization of liver cancer in rabbits. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:629-632
- 7 Qi YY, Zhou LG, Wang WX, Chen WJ, Xiang KL, Zhao XY, Yang TH, Yi XZ. Dual-phase enhanced spiral CT in the diagnosis of hepatocellular carcinoma with tumor thrombus in portal vein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:384-387
- 8 Tian XM, Zhang ZX. The anticancer activity of resveratrol on implanted tumor of HepG<sub>2</sub> in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:161-164
- 9 Qu B, Li BJ, Lu ZW, Pan HL. Clinical significance of telomerase activity detected in fine-needle aspiration specimens to liver cancer diagnosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:538-541
- 10 Zhen JY, Li KZ, Wang WZ. Impact of the expression of P<sup>27</sup>KIP1 on apoptosis and progression of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:883-886
- 11 Colcher D, Pavlinkova G, Beresford G, Booth BJ, Batra SK. Single-chain antibodies in pancreatic cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1999;880:263-280
- 12 zu Putlitz J, Skerra A, Wands JR. Intracellular expression of a cloned antibody fragment interferes with hepatitis B virus surface antigen secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255:785-791
- 13 Pavlinkova G, Beresford GW, Booth BJ, Batra SK, Colcher D. Pharmacokinetics and biodistribution of engineered single-chain antibody constructs of MAbs CC49 in colon carcinoma xenografts. *J Nucl Med* 1999;40:1536-1546
- 14 Pavlinkova G, Booth BJ, Batra SK, Colcher D. Radioimmunotherapy of human colon cancer xenografts using a dimeric single-chain Fv antibody construct. *Clin Cancer Res* 1999;5:2613-2619
- 15 Goel A, Colcher D, Baranowska-Kortylewicz J, Augustine S, Booth BJ, Pavlinkova G, Batra SK. Genetically engineered tetravalent single-chain Fv of the pancarcinoma monoclonal antibody CC49: improved biodistribution and potential for therapeutic application. *Cancer Res* 2000;60:6964-6971
- 16 Yuan QA, Yu WY, Huang CF. Construction and expression of a hepatocellular carcinoma specific rodent and its humanized single-chain Fv fragments in Escherichia coli. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2000;16:86-90
- 17 Turatti F, Mezzanzanica D, Nardini E, Luison E, Maffioli L, Bambardieri E, de Lalla C, Caneveri S, Figini M. Production and validation of the pharmacokinetics of a single-chain Fv fragment of the MGR6 antibody for targeting of tumors expressing HER-2. *Cancer Immunol Immunother* 2001;49:679-686
- 18 Mayer A, Tsionpanou E, O'Malley D, Boxer GM, Bhatia J, Flynn AA, Chester KA, Davidson BR, Lewis AA, Winslet MC, Dhillon AP, Hilson AJ, Begent RH. Radioimmunoguided surgery in colorectal cancer using a genetically engineered anti-CEA single-chain Fv antibody. *Clin Cancer Res* 2000;6:1711-1719
- 19 Niv R, Assaraf YG, Segal D, Pirak E, Reiter Y. Targeting multidrug resistant tumor cells with a recombinant single-chain Fv fragment directed to P-glycoprotein. *Int J Cancer* 2001;94:864-872
- 20 McCall AM, Shahied L, Amoroso AR, Horak EM, Simmons HH, Nielson U, Adams GP, Schier R, Marks JD, Weiner LM. Increasing the affinity for tumor antigen enhances bispecific antibody cytotoxicity. *J Immunol* 2001;166:6112-6117
- 21 Cooke SP, Boxer GM, Lawrence L, Pedley RB, Spencer DI, Begent RH, Chester KA. A strategy for antitumor vascular therapy by targeting the vascular endothelial growth factor: receptor complex. *Cancer Res* 2001;61:3653-3659
- 22 van der Poel HG, Molenaar B, van Beusechem VW, Haisma HJ, Rodriguez R, Curiel DT, Gerritsen WR. Epidermal growth factor receptor targeting of replication competent adenovirus enhances cytotoxicity in bladder cancer. *J Urol* 2002;168:266-272
- 23 Goel A, Baranowska-Kortylewicz J, Hinrichs SH, Wisecarver J, Pavlinkova G, Augustine S, Colcher D, Booth BJ, Batra SK. 99mTc-labeled divalent and tetravalent CC49 single-chain Fv's: novel imaging agents for rapid in vivo localization of human colon carcinoma. *J Nucl Med* 2001;42:1519-1529
- 24 Matsumoto H, Liao S, Arakawa F, Ueno A, Abe H, Awasthi A, Kuroki M, Kuroki M. Targeting of interleukin-2 to human MK-1-expressing carcinoma by fusion with a single-chain Fv of anti-MK-1 antibody. *Anticancer Res* 2002;22:2001-2007
- 25 Akamatsu Y, Murphy JC, Nolan KF, Thomas P, Kreitman RJ, Leung SO, Junghans RP. A single-chain immunotoxin against carcinoembryonic antigen that suppresses growth of colorectal carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1998;4:2825-2832
- 26 Cheng H, Liu YF, Zhang HZ, Shen WA. Construction of anti-HCC bifunctional antibody retroviral vector and virus packed cell. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:708-709
- 27 Zhang J, Liu YF, Yang SJ, Sun ZW, Qiao Q, Zhang SZ. Construction and expression of mouse/humanized scFv and their fusion to humanized mutant TNF- $\alpha$  against hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:616-620
- 28 Vaskivuo TE, Stenback F, Tapanainen JS. Apoptosis and apoptosis-related factors Bcl-2, Bax, tumor necrosis factor-alpha, and NF-kappaB in human endometrial hyperplasia and carcinoma. *Cancer* 2002;95:1463-1471
- 29 Inoue H, Shiraki K, Yamanaka T, Ohmori S, Sakai T, Deguchi M, Okano H, Murata K, Sugimoto K, Nakano T. Functional expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human colonic adenocarcinoma cells. *Lab Invest* 2002;82:1111-1119
- 30 Kandasamy K, Srivastava RK. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2002;62:4929-4937
- 31 Vaculova A, Hofmanova J, Soucek K, Kovarikova M, Kozubik A. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis associated with poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in HT-29 colon cancer cells. *Anticancer Res* 2002;22:1635-1639
- 32 Thomas PS, Heywood G. Effects of inhaled tumour necrosis factor alpha in subjects with mild asthma. *Thorax* 2002;57:774-778
- 33 Yamamoto M, Oshiro S, Tsugu H, Hirakawa K, Ikeda K, Soma G. Treatment of recurrent malignant supratentorial astrocytomas with carboplatin and etoposide combined with recombinant mutant human tumor necrosis factor-alpha. *Anticancer Res* 2002;22:2447-2453
- 34 Terlikowski SJ. Local immunotherapy with rhTNF-alpha mutein induces strong antitumor activity without overt toxicity—a review. *Toxicology* 2002;174:143-152

• 大肠癌 LARGE INTESTINAL CANCER •

# 抗人大肠癌单链抗体—胞嘧啶脱氨酶融合基因的构建及表达

方瑾,宋今丹

方瑾,宋今丹,中国医科大学卫生部细胞生物学重点实验室  
辽宁省沈阳市 110001  
方瑾,女,1961-01-02生,天津市人,汉族,理学博士,副教授.主要从事肿瘤细胞  
生物学研究.  
国家自然科学基金攻关项目, NO.85-722-18-02  
项目负责人:宋今丹,110001,辽宁省沈阳市和平区北二马路92号,中国医科大  
学卫生部细胞生物学重点实验室. jdsong@mail.cmu.edu.cn  
电话:024-23256666-5349  
收稿日期:2002-08-10 接受日期:2002-08-31

## Construction and expression of fusion gene of single chain Fv against human colorectal carcinoma

Jin Fang,Jin-Dan Song

Jin Fang,Jin-Dan Song, Key Lab of Cell Biology,Ministry of Public Health of China,China Medical University,Shenyang 110001,Liaoning Province, China  
Supported by the Natural Scientific Foundation of State, No.85-722-18-02  
Correspondence to: Prof Jin-Dan Song,Key Lab of Cell Biology,Ministry of Public Health of China,China Medical University,92 Beier Road,Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province,China. jdsong@mail.cmu.edu.cn  
Received:2002-08-10 Accepted:2002-08-31

### Abstract

AIM:To explore the construction of the fusion gene of recombinant ND-1scFv against human colorectal carcinoma and yeast cytosine deaminase and the expression of the fusion protein in *E.coli*.

METHODS:Yeast cytosine deaminase gene was fused with the 3'terminus of gene of ND-1scFv against human colorectal carcinoma by a 18 bp linker with sequences encoding GSGGSG. To construct ND-1scFv-CD gene,plasmid pET 28 a (+)-ND-1scFv-CD was transformed into *E. coli* BL-21, and induced by IPTG to express the ND-1scFv-CD fusion protein. The expressed product was purified by affinity chromatography using NI-NTA resin, and its immunity was analyzed by ELISA. The cytotoxic activity of the ADEPT system containing ND-1 scFv-CD/5FC against human colon carcinoma cell line was evaluated by MTT assay.

RESULTS:Sequencing results showed that the ND-1scFv-CD gene consisted of 1 269 bp,including ND-1scFv 732 bp and CD 477 bp. SDS-PAGE analysis showed that the expected molecular weight of fusion protein was 47 Kd. Optical density scanning showed that fusion protein expressed in *E. coli* accounted to 27 % of the total bacterial proteins. ELISA analysis revealed that ND-1scFv-CD reserved similar immunity of ND-1scFv. MTT assay showed scFv-CD/5FC was cytotoxic to human colorectal carcinoma cells.

CONCLUSION:ND-1scFv-CD gene against human colorectal carcinoma was constructed and expressed successfully in *E. coli*. The fusion protein exhibited good immunity and

enzymatic activity.

Fang J, Song JD. Construction and expression of fusion gene of single chain Fv against human colorectal carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(3):289-293

### 摘要

目的:构建抗人大肠癌重组单链抗体ND-1scFv与酵母胞嘧啶脱氨酶CD 的融合基因 ,并在大肠杆菌中表达.

方法:采用基因重组技术借助GSGGSG Linker序列将酵母胞嘧啶脱氨酶基因融合于ND-1scFv基因的3' 端 ,构建pET-28a (+) ND-1scFv-CD 载体 ,转化 *E.coli* BL21 ,经IPTG诱导 ,表达二者的融合蛋白. 表达产物用Ni-NTA resin 亲和层析方法纯化 ,并采用ELISA 检测其免疫活性 ,MTT 法测定由ND-1scFv-CD/5FC 构成的ADEPT 系统对大肠癌细胞的体外杀伤作用.

结果:序列测定表明 :ND -1scFv-CD 基因全长 1 269 bp ,包含了732 bp的scFv基因和477 bp的CD基因.SDS-PAGE 检测显示 ,融合蛋白相对分子质量 47 KDa ,与预测值一致. 光密度扫描结果表明 ,重组蛋白占菌体蛋白总量的 27 % ,ELISA 检测证实 ,ND-1scFv-CD 保留了与 ND-1scFv 相近的免疫活性.MTT 实验检测结果显示 ,由 scFv-CD/5FC 构成的ADEPT 体系对大肠癌细胞具靶向杀伤作用.

结论:成功地构建了抗人大肠癌单链抗体ND-1scFv与酵母胞嘧啶脱氨酶CD的融合蛋白 ,并在大肠杆菌中高效表达. 融合蛋白具有良好的免疫活性和一定的酶活性.

方瑾,宋今丹. 抗人大肠癌单链抗体—胞嘧啶脱氨酶融合基因的构建及表达. 世界华人消化杂志 2003;11(3):289-293  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/289.htm>

### 0 引言

对肿瘤细胞实施特异性的杀伤作用一直是肿瘤导向治疗的关键所在. 抗体介导的酶解前药疗法(antibody directed enzyme prodrug therapy , ADEPT)是近年发展起来的颇具应用前景的肿瘤导向治疗新途径<sup>[1-13]</sup> ,他以巧妙的设计克服了以往单抗作为药物载体的许多缺陷 ,日益受到广泛关注 ,并已有效应用于临床. 其基本思想是将单克隆抗体与一种活化酶交联 ,制备抗体 - 酶偶联物 ,借助抗体识别瘤细胞表面抗原的特性 ,把酶带到靶部位 ,某些无抗癌活性或低活性的前体药在酶的催化下可转化为细胞毒性药物 ,实现抗癌药物在靶部位

的特异性释放，提高疗效。

ND-1是本室以人大肠癌细胞系CCL-187为免疫源制备的鼠抗人大肠癌单克隆抗体，体内外一系列实验显示，该单抗特异性强，亲和力高，并优于目前广泛采用的美国商业产品抗CEA单抗。以该单抗构建的基因工程抗体ND-1scFv亦显示了良好的体内外特异结合活性。本研究在此基础上，将ND-1单链抗体基因与酵母胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase, CD)基因融合，在大肠杆菌中成功地表达了单链抗体与酶的融合蛋白，并考察了其与5-氟尿嘧啶(5-FU)的前体药5-氟胞嘧啶(5-FC)构成的ADEPT系统对大肠癌细胞的体外杀伤作用。

## 1 材料和方法

1.1 材料 CCL-187人大肠癌细胞株由美国哈佛大学医学院肿瘤所惠赠，HeLa人宫颈癌上皮细胞株为本室保存。pET-28a(+)-ND-1scFv表达载体及pMD18-T-CD由本室构建。T4 DNA连接酶为Pharmacia公司产品。Pyrobest DNA聚合酶、Hind、EcoR、Sal限制性内切酶、IPTG、卡那霉素、DNA片段回收试剂盒为宝生物工程有限公司产品。Ni-NTA亲和层析填料为Qiagen公司产品。FITC荧光标记羊抗鼠抗体、5-氟胞嘧啶(5FC)为Sigma公司产品，辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体为北京中山生物技术有限公司产品。抗His-Tag单抗为Invitrogen公司产品。MTT购自Fluka公司。引物C1、C2由大连宝生物工程有限公司合成。其余试剂均为分析纯或分子生物学纯级。

## 1.2 方法

1.2.1 ND-1scFv-CD载体的构建 引物设计：根据CD序列设计5'和3'引物，使其包含有能够与ND-1scFv基因连接的Linker序列GSGGSG，同时引入酶切位点。具体序列如下：

引物C1: 5' AGCAAGCTTACAGCGTGCTGCGTGCTACTCAC 3'  
Hind  
引物C2: 5' TATGTCGACGGTAGCGCGGTTCTGGTATGGTGACAGGGGGA 3'  
Sal Linker

引物C1为酵母CD带有Hind位点的3'引物，引物C2为酵母CD的5'引物，带有Sal位点和编码6个氨基酸GSGGSG的Linker序列。

载体构建：以质粒pMD18-T-CD为模板，以引物C1、C2进行PCR，扩增出5'端带有Sal和Linker序列，3'端带有Hind位点的CD片段，产物经1.5%琼脂糖电泳，DNA片段回收试剂盒回收纯化后，用Sal/Hind双酶切，与相同酶切的pET-28a(+)-ND-1 scfv载体于16连接过夜，转化宿主菌BL21，分别用EcoR/Hind、EcoR/Sal和Sal/Hind酶切鉴定插入片段并测序。

1.2.2 ND-1scFv-CD基因序列测定 采用Sanger双脱氧末端终止法用ABI PRISM 377 DNA测序仪进行DNA序列测定，确定CD 5'与ND-1scFv 3'连接处及

CD再次PCR后序列的正确性。每个基因测三个独立克隆。

1.2.3 ND-1scFv-CD融合基因的诱导表达 挑取鉴定正确的阳性克隆接种于2 ml LB(含50 μg/ml卡那霉素)液体培养基中，37℃振荡培养过夜，并以1%接种量转种到100 ml相同LB培养基中，37℃振荡培养至OD<sub>600</sub>为0.6左右，加入IPTG至终浓度1 mmol/L，继续培养3 h，获得诱导培养物，表达产物以SDS-PAGE鉴定，并用凝胶灰度扫描测定蛋白表达量。

1.2.4 包涵体蛋白的变性、复性及纯化 将诱导的菌体用裂解缓冲液冰上裂解30 min，并于冰浴上超声破碎，4℃，10 000 g离心20 min得到包涵体。将包涵体重悬于原培养物0.1倍体积的变性液中(0.1 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 mol/L Tris, 6 mol/L盐酸胍, pH8.0)，待包涵体全部溶解后，20 000 g离心20 min，取上清加至Ni-NTA resin亲和层析柱中，按顺序分别用10倍柱体积的6 mol/L盐酸胍(pH8.0) 8 mol/L尿素(pH8.0) 8 mol/L尿素(pH 6.5) 8 mol/L尿素(pH 4.2)洗脱镍柱，收集8 mol/L尿素(pH 4.2)流出液。用变性液调整蛋白浓度至100 μg/ml，加入4倍体积复性液(20 mmol/L Tris, 0.25 mol/L NaCl, 0.5% NP-40, 0.4 mmol/L PMSF, 2 mmol/L还原型谷胱甘肽, 0.2 mmol/L氧化型谷胱甘肽, 100 mmol/L EDTA)4℃复性24 h，然后将复性样品转移至截留分子量为8-10 kDa的透析袋中用透析液(20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 5% 蔗糖)透析48 h，超滤浓缩样品至适当体积，-20℃分装保存。

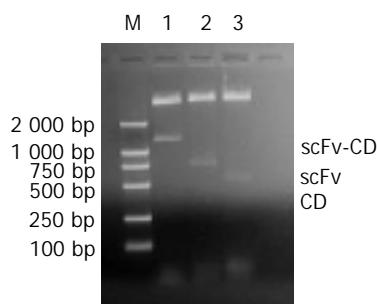
1.2.5 ELISA检测ND-1scFv-CD免疫活性 取处于对数生长期的人大肠癌细胞CCL-187和人宫颈癌上皮细胞HeLa，以5×10<sup>4</sup>接种于96孔培养板中，100 μL/孔，于37℃培养24 h，分别以ND-1scFv和ND-1scFv-CD作为一抗，抗His6 mAb作为二抗，HRP-羊抗鼠IgG作为三抗，于37℃分别孵育2 h，以底物TMB显色，终止反应后，用酶标仪于波长450 nm测定光吸收(A)值。

1.2.6 MTT法检测ND-1scFv-CD/5FC系统的细胞杀伤活性 取对数生长期人大肠癌细胞CCL-187，人宫颈癌上皮细胞HeLa，将密度为3×10<sup>5</sup>/ml的细胞悬液接种于96孔培养板100 μL/孔，37℃培养24 h后，加入ND-1scFv-CD融合蛋白(10 μg/ml)，37℃培养2 h，弃去培养液，用PBS洗涤3次，加入新鲜培养液100 μL/孔，同时加入5FC 10 μL(4 mmol/L，该浓度下5FC对CCL-187细胞无杀伤作用)，37℃培养48 h后，每孔加入10 μL MTT(5 mg/ml)，37℃孵育4 h，吸去上清，每孔加入100 μL DMSO，振荡2 min，在酶标仪上测定A<sub>540nm</sub>，同时用PBS作空白对照，5FC作阴性对照。

## 2 结果

2.1 ND-1scFv-CD融合基因表达载体的构建和序列测定 将克隆至pMD18-T Vector中具有正确序列的CD基因经过再次PCR，引入酶切位点及Linker序列，将该

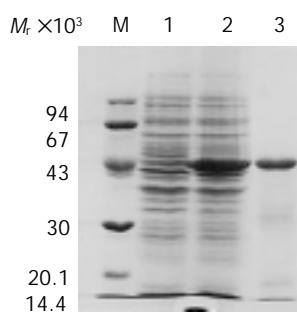
序列与载有 ND-1scFv 基因的 PET-28a(+) - ND-1scFv 同时进行 Sal / Hind 双酶切, 连接后, ND-1scFv 与 CD 通过一柔性 Linker 拼接为 ND-1scFv-CD 基因, 连接体转化 E.coli BL21, 随机挑取菌落, 提取质粒以酶切鉴定。1% 琼脂糖电泳显示, 经 Sal / Hind 双酶切, 在 500 bp 左右呈现一明显条带, 提示 CD 片段被克隆入 pET-28a(+) - ND-1scFv 载体, 且插入方向正确。同时经 EcoR / Sal 和 EcoR / Hind 酶切, 分别在 750 bp 和 1 200 bp 处呈现一单一条带, 表明 ND-1scFv-CD 基因已构建到 pET-28a(+)载体, 且 ND-1scFv 和 CD 连接方向及顺序正确(图 1)。序列测定表明, ND-1scFv-CD 基因全长 1 269 bp, scFv 基因在上游, 片段长度 732 bp, CD 基因在下游, 片段长度 477 bp, 中间为 18 个 bp 的柔性序列, 两侧为 Hind 和 EcoR 位点。



M:DNA Marker;1:ND-1scFv-CD/EcoR 和 Hind ;2:ND-1scFv/EcoR 和 Sal ;3:ND-1scFv-CD/Sal 和 Hind

图 1 质粒 pET-28a(+)-ND-1scFv-CD 的双酶切结果。

**2.2 ND-1scFv-CD 基因的表达** 将构建正确的表达质粒 pET-28a(+) - ND-1scFv-CD 转化宿主菌 BL21, 以 1 mmol/L IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 检测显示, 经诱导的菌体裂解物在 Marker 43KD 附近有一新的条带, 且呈高表达。pET-28a(+)载体在外源基因插入部位的上游有一编码 His-Tag 小肽的基因, 因而, 在 IPTG 诱导下表达的是 ND-1scFv-CD 蛋白与 His-Tag 及其上游序列的融合蛋白, 相对分子量 47 KD(ND-1scFv 26KD, His-tag + 上游序列 4 KD, CD 17 KD), 电泳结果所示与该融合蛋白的理论推算值相符(图2)。凝胶灰度扫描结果显示表达量占菌体总蛋白量的 27 %。



M:蛋白 Marker ;1:诱导前菌体蛋白 ;2:诱导后 ND-1scFv-CD 蛋白表达 ;3:纯化后的 ND-1scFv-CD 蛋白

**2.3 表达产物的变性、纯化和复性** SDS-PAGE 检测显示, 经 IPTG 诱导后的菌体裂解物上清中未见可溶性蛋白条带, 故推断 ND-1scFv-CD 蛋白主要以包涵体形式存在。通过盐酸胍变性处理使包涵体溶解, 借助能与 His 序列特异结合的 Ni-NTA 亲和层析柱对变性的包涵体蛋白进行纯化, 获得了高纯度的 ND-1scFv-CD(图 2)。

**2.4 ND-1scFv-CD 免疫活性** ELISA 定量检测显示, ND-1scFv 与 CD 重组而表达的融合蛋白仍具有与靶细胞的结合活性, 其免疫活性未见明显下降。

表 1 酶联免疫黏附法测定 ND-1scFv-CD 免疫活性

Sample	$A_{450\text{nm}} (\bar{x} \pm s)$	
	CCL-187	HeLa
ND-1scFv	0.95 ± 0.16	0.19 ± 0.03
ND-1scFv-CD	0.74 ± 0.15	0.17 ± 0.03
PBS	0.14 ± 0.03	0.13 ± 0.01

**2.5 ND-1scFv-CD/5FC 介导的体外细胞毒作用** 将 ND-1scFvCD 融合蛋白与细胞孵育 2 h 后, 加入 CD 的前体药 5FC, 同时以单独加入 5FC 作为对照, 测定对细胞的杀伤活性。表 2 结果显示, 在 4 mmol/L 使用浓度下, 单独加入 5FC 对 CCL-187 及 HeLa 细胞均无明显杀伤作用, 而预先与 ND-1scFv-CD 融合蛋白作用后, 5FC 表现出对细胞的杀伤活性, 且对表达有 ND-1 相应抗原的 CCL-187 的杀伤活性明显优于非靶向的 HeLa 细胞。提示 scFv-CD 融合蛋白具有一定的酶活性, 可将 5FC 转化为 5FU 而杀伤细胞, 并具明显靶向作用。

表 2 ND-1scFv-CD/5FC 系统对细胞的杀伤作用(%)

Sample	Inhibition rate ( $\bar{x} \pm s$ )	
	CCL-187	HeLa
ND-1scFv-CD+5FC	24.5 ± 2.78	4.5 ± 0.31
5FC	-	1.5 ± 0.05

### 3 讨论

将抗体与其他效应分子结合构建具有导向性的双功能分子是目前抗体应用研究的热点<sup>[14,15]</sup>, 抗体基因与酶基因融合表达融合蛋白是 ADEPT 策略的一个新思路, 其优势不仅在于可对抗体及具有催化功能的部分进行改造, 改变体内动力学性质, 还在于可获得高效均匀的产物, 避免了常规化学偶联方法导致的产物异质性的问题<sup>[16]</sup>。本实验首次将抗人大肠癌单克隆抗体 ND-1 的单链抗体基因与酵母胞嘧啶脱氨酶基因融合, 构建了高效表达的 pET-28a(+) - ND-1scFv-CD 融合蛋白表达载体, 在大肠杆菌中的表达量高达 27 %, 经纯化后纯度达 87 %, 而且整个体系具有操作简单, 重复性好的特点, 不仅可有效克服抗体-酶直接偶联带来的产物异质性等弊病, 提高产物的特异性, 并可为相应药物制

剂的规范化和产业化提供可能，同时也为其他双功能效应分子的构建提供了简洁、高效的方法。

活化酶在肿瘤组织的选择性积聚是ADEPT策略成功的关键因素之一。人体组织中广泛存在的酶通常缺乏特异性，会引起肿瘤外组织的毒副作用，而胞嘧啶脱氨酶在哺乳动物组织中不存在，它来源于细菌和真菌，是嘧啶合成补救代谢途径的关键酶，可将5FC水解为抗癌药5-FU，将其用于ADEPT可避免药物在其他组织的激活<sup>[17-21]</sup>。人们最初是将细菌CD用于ADEPT系统，但在随后的体内实验中发现，哺乳动物肠道系统存在有相同细菌，可将5FC转化为5FU，这样在治疗中就难以保证产生足够的5FU而对正常细胞无损，因而，1997年Erbs et al<sup>[22,23]</sup>首次从啤酒酵母中克隆出CD基因，随后在真核系统中获得表达，并广泛用于基因介导的酶解前药疗法GDEPT<sup>[24,25]</sup>，相关实验同时证实了酵母胞嘧啶脱氨酶在该系统中优于细菌胞嘧啶脱氨酶的体内抑瘤作用<sup>[26-28]</sup>。本实验首次将克隆的酵母基因与单链抗体基因融合用于ADEPT系统。免疫活性检测显示，ND-1scFv-CD融合蛋白保持了良好的免疫活性，同时CD组成的ADEPT系统对表达有相应抗原的CCL-187产生了一定的杀伤作用，而且这种杀伤作用具有明显的靶向专一性。

ADEPT系统的有效性在于高特异地激活前体药，使其定向释放以杀伤靶细胞。本实验中ND-1scFv与CD基因融合后，其表达蛋白仍保留了与原scFv相似的免疫活性，与5FC构成的ADEPT系统亦表现出对表达相应抗原细胞的靶向杀伤作用，同时在光镜下也可观察到被作用细胞呈现的细胞凋亡特征<sup>[29]</sup>，与5FU游离药物的作用相似，这说明该融合蛋白具有酶活性，可使5FC转化为5FU，从而杀伤细胞，但其作用强度尚不如5FU游离药物，只有24.5%，提示ND-1scFv-CD中的CD部分未获得最佳的酶活性。有研究指出，scFv与效应分子连接后产生的空间位阻有可能影响分子活性，已有报道通过加长二者之间Linker序列的长度而优化蛋白结构域的有效形成<sup>[30]</sup>。本实验在两效应分子间采用了广为接受的由6个氨基酸组成的Linker，是否可通过加长该序列而获得更为理想的双功能效应分子将有待进一步探讨。

本实验通过基因工程技术成功地构建了抗人大肠癌单链抗体与胞嘧啶脱氨酶的融合基因，并在大肠杆菌中进行了高效表达，融合蛋白的抗体部分显示了良好的免疫活性，所连接的酶结构也表现出初步的功能，为该体系最终的实际应用奠定了基础，经进一步提高酶活性，可望成为良好的大肠癌治疗试剂。

#### 4 参考文献

- Chen BM, Cheng TL, Tzou SC, Roffler SR. Potentiation of antitumor immunity by antibody-directed enzyme prodrug therapy. *Int J Cancer* 2001;94:850-858
- Xu G, McLeod HL. Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2001;7:3314-3324
- Houba PH, Boven E, van der Meulen-Muileman IH, Leenders RG, Scheeren JW, Pinedo HM, Haisma HJ. Pronounced antitumor efficacy of doxorubicin when given as the prodrug DOX-GA3 in combination with a monoclonal antibody beta-glucuronidase conjugate. *Int J Cancer* 2001;91:550-554
- Napier MP, Sharma SK, Springer CJ, Bagshawe KD, Green AJ, Martin J, Stribbling SM, Cushen N, O'Malley D, Begent RH. Antibody-directed enzyme prodrug therapy: efficacy and mechanism of action in colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:765-772
- Syrigos KN, Epenetos AA. Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review of the experimental and clinical considerations. *Anticancer Res* 1999;19:605-613
- Cheng TL, Wei SL, Chen BM, Chern JW, Wu MF, Liu PW, Roffler SR. Bystander killing of tumour cells by antibody-targeted enzymatic activation of a glucuronide prodrug. *Br J Cancer* 1999;79:1378-1385
- Dubowchik GM, Walker MA. Receptor-mediated and enzyme-dependent targeting of cytotoxic anticancer drugs. *Pharmacol Ther* 1999;83:67-123
- Senter PD, Springer CJ. Selective activation of anticancer prodrugs by monoclonal antibody-enzyme conjugates. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;53:247-264
- Syrigos KN, Deonarian DP, Epenetos AA. Use of monoclonal antibodies for the diagnosis and treatment of bladder cancer. *Hybridoma* 1999;18:219-224
- Sperker B, Murdter TE, Backman JT, Fritz P, Kroemer HK. Expression of active human beta-glucuronidase in Sf9 cells infected with recombinant baculovirus. *Life Sci* 2002;71:1547-1557
- Monks NR, Blakey DC, East SJ, Dowell RI, Calvete JA, Curtin NJ, Arris CE, Newell DR. DNA interstrand cross-linking and TP53 status as determinants of tumour cell sensitivity in vitro to the antibody-directed enzyme prodrug therapy ZD2767. *Eur J Cancer* 2002;38:1543-1552
- Graaf Md M, Boven E, Scheeren HW, Haisma HJ, Pinedo HM. Beta-glucuronidase-mediated drug release. *Curr Pharm Des* 2002;8:1391-1403
- Tietze LF, Herzig T, Fecher A, Haunert F, Schuberth I. Highly selective glycosylated prodrugs of cytostatic CC-1065 analogues for antibody-directed enzyme tumor therapy. *Chem Biochem* 2001;2:758-765
- Helfrich W, Haisma HJ, Magdolen V, Luther T, Bom VJ, Westra J, van der Hoeven R, Kroesen BJ, Molema G, de Leij L. A rapid and versatile method for harnessing scFv antibody fragments with various biological effector functions. *J Immunol Methods* 2000;237:131-145
- Matthey B, Engert A, Klimka A, Diehl V, Barth S. A new series of pET-derived vectors for high efficiency expression of *Pseudomonas exotoxin*-based fusion proteins. *Gene* 1999;229:145-153
- Kerr DE, Vrudhula VM, Svensson HP, Siemers NO, Senter PD. Comparison of recombinant and synthetically formed monoclonal antibody-beta-lactamase conjugates for anticancer prodrug activation. *Bioconjug Chem* 1999;10:1084-1089
- O'Boyle KP, Senter PD, Bhargava K, Chun S, Anthony G, Markowitz AL, Wadler S. Effects of a hybrid recombinant human alpha interferon (A/D) on in vitro cytotoxicity and in vivo localization of monoclonal antibody L6-cytosine deaminase conjugate in a colon cancer model. *Cancer Biother Radiopharm* 1998;13:33-42
- Aboagye EO, Artemov D, Senter PD, Bhujwalla ZM. Intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil by monoclonal antibody-cytosine deaminase conjugates: noninvasive detection of prodrug activation by magnetic resonance spectroscopy and spectroscopic imaging. *Cancer Res* 1998;58:4075-4078
- King I, Bermudes D, Lin S, Belcourt M, Pike J, Troy K, Le T, Ittensohn M, Mao J, Lang W, Runyan JD, Luo X, Li Z, Zheng LM. Tumor-targeted salmonella expressing Cytosine deaminase as an anticancer agent. *Hum Gene Ther* 2002;13:1225-1233
- Shen LZ, Wu WX, Xu DH, Zheng ZC, Liu XY, Ding Q, Hua YB, Yao K. Specific CEA-producing colorectal carcinoma cell killing with recombinant adenoviral vector containing cytosine deaminase gene. *World J Gastroenterol* 2002;8:270-275
- Akimoto M, Miyahara T, Arai J, Akimoto A, Hamada H, Yoshida Y, Yoshimura N. A new delivery system for 5-fluorouracil using prodrug and converting enzyme. *Br J Ophthalmol* 2002;86:581-586
- Eubs P, Exinger F, Jund R. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* FCY1 gene encoding cytosine deaminase and its homologue FCA1 of *candida albicans*. *Curr Genet* 1997;31:1-6

- 23 Hayden MS, Linsley PS, Wallace AR, Marquardt H, Kerr DE. Cloning, overexpression, and purification of cytosine deaminase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif* 1998;12:173-184
- 24 Nyati MK, Symon Z, Kievit E, Dornfeld KJ, Rynkiewicz SD, Ross BD, Rehemtulla A, Lawrence TS. The potential of 5-fluorocytosine/cytosine deaminase enzyme prodrug gene therapy in an intrahepatic colon cancer model. *Gene Ther* 2002;9:844-849
- 25 Zhang Y, Wang J, Zhou H, Zhai Y. Study on the in vivo killing activity of YCD/5-FC gene therapy system on K562B cells. *Zhonghua Xueyexue Zazhi* 2002;23:173-175
- 26 Kievit E, Nyati MK, Ng E, Stegman LD, Parsels J, Ross BD, Rehemtulla A, Lawrence TS. Yeast cytosine deaminase improves radiosensitization and bystander effect by 5-fluorocytosine of human colorectal cancer xenografts. *Cancer Res* 2000;60:6649-6655
- 27 Kievit E, Bershad E, Ng E, Sethna P, Dev I, Lawrence TS, Rehemtulla A. Superiority of yeast over bacterial cytosine deaminase for enzyme/prodrug gene therapy in colon cancer xenografts. *Cancer Res* 1999;59:1417-1421
- 28 Hamstra DA, Rice DJ, Fahmy S, Ross BD, Rehemtulla A. Enzyme/prodrug therapy for head and neck cancer using a catalytically superior cytosine deaminase. *Hum Gene Ther* 1999;10:1993-2003
- 29 Zhang SN, Yuan SZ, Zhu ZH, Wen ZF, Huang ZQ, Zeng ZY. Apoptosis induced by 5-flucytosine in human pancreatic cancer cells genetically modified to express cytosine deaminase. *Acta Pharmacol Sin* 2000;21:655-659
- 30 Liu ZG, Yu WY, Wang X. The construction and expression of two humanized scFv-urokinase fusion genes. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2000;16:514-516

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次

2003 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2003.htm> 2002 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm> 2001 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm> 2000 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2000.htm> 1999 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1999.htm> 1998 华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1998.htm> 1997 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1997.htm> 1996 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1996.htm> 1995 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1995.htm> 1994 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1994.htm> 1993 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1993.htm>

2003 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2003.htm> 2002 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm> 2001 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm> 2000 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2000.htm> 1999 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1999.htm> 1998 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1998.htm> 1997 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1997.htm> 1996 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1996.htm> 1995 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1995.htm>

以上电子版如您需要请 email 回复, 免费提供您使用。Email 地址: [wjg@wjgnet.com](mailto:wjg@wjgnet.com)。以后将新出版的世界华人消化杂志(月刊 15 日出版)和 World J Gastroenterol 电子版(月刊 15 日出版)电子版用 email 发给您收。希望您推荐 10 位消化专业工作者的 email 地址, 让您的朋友也能获得电子版。

# IFN- $\gamma$ 基因转染抗大肠癌细胞的作用机制

吴文溪,丁强,沈历宗,华一兵,许德华,刘新垣

吴文溪,丁强,沈历宗,华一兵,南京医科大学第一附属医院普外科 江苏省南京市 210029  
许德华,刘新垣,中国科学院上海生物化学研究所 上海市 200031  
吴文溪,男,1947-1生,江苏省无锡人,汉族,硕士,教授,主任医师。  
项目负责人:吴文溪,210029,江苏省南京市,南京医科大学第一附属医院普外科。wuwexi@yahoo.com  
电话:025-6619960  
收稿日期:2002-07-01 接受日期:2002-07-30

## Effect of expression of interferon- $\gamma$ gene in inhibition of growth of colon cancer cell

Wen-Xi Wu,Qiang Ding, Li-Zong Shen,Yi-Bing Hua,De-Hua Xu,  
Xin-Yuan Liu

Wen-Xi Wu, Qiang Ding, Li-Zong Shen, Yi-Bing Hua, Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China  
De-Hua Xu, Xin-Yuan Liu, Shanghai Institute of Biochemistry, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China  
Correspondence to: Wen-Xi Wu , Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. wuwexi@yahoo.com  
Received:2002-07-01 Accepted:2002-07-30

### Abstract

AIM:To investigate the effect of expression of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in tumor cell and its inhibitory effect on the growth of tumor cell.

METHODS:pcDNA3-IFN- $\gamma$  vector containing IFN- $\gamma$  gene was constructed and transfected into LOVO, SW620, HCT116BG and Hela cell lines by lipofectamine, respectively. The expression of IFN- $\gamma$ , CEA and HLA-DR in transfected cells were tested. Both the number of apoptosis of and the proportion of cell cycles of tumor cells were measured to investigate the anti-tumor effect of IFN- $\gamma$  gene therapy.

RESULTS:LOVO and HCT116BG transfected cell lines had high expression of CEA, the average level of CEA was significantly increased from  $26.02 \pm 6.76$  to  $38.85 \pm 7.07 \mu\text{g/l}$  ( $P < 0.05$ ). However, there was no detectable increase in the supernatants of Hela, SW620 cell lines that naturally expressed little of CEA. Flow cytometry analysis showed that HLA-DR expression rate ( $11.67 \pm 7.20$ ) was significantly higher than that prior gene transfection ( $3.91 \pm 3.61$ ) ( $P < 0.01$ ), and the IFN- $\gamma$  gene transfer effectively induced the apoptosis of tumor cells, the proportion of DNA synthesis phase was decreased gradually after IFN- $\gamma$  gene transfer, which indicated that the synthesis of DNA and growth of tumor cells were repressed.

CONCLUSION:IFN- $\gamma$  gene therapy enhanced the expression of antigens on cell surface and thus induced powerful antitumor immunity. Repressing of synthesis of DNA, inducing the apoptosis of tumor cells and inhibiting the prolif-

eration of tumor cells might be anti-tumor mechanisms of IFN- $\gamma$ .

Wu WX,Ding Q, Shen LZ, Hua YB, Xu DH, Liu XY. Effect of expression of interferon- $\gamma$  gene in inhibition of growth of colon cancer cell. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(3):294-297

### 摘要

目的:通过检测IFN- $\gamma$  基因转染对大肠癌细胞表面抗原的表达情况、对细胞的生长抑制、细胞周期的影响情况，初步探讨IFN- $\gamma$  基因治疗抗肿瘤作用的机制。

方法:制备含人IFN- $\gamma$  基因的真核表达质粒pcDNA-3-IFN- $\gamma$ ，利用阳离子脂质体将其转染进入人大肠癌细胞株LOVO、SW620、HCT116BG及人宫颈癌细胞株HeLa，检测基因转染后IFN- $\gamma$  基因的表达情况，同时检测基因转染对大肠癌细胞CEA、HLA-DR抗原表达的诱导作用和细胞凋亡及细胞周期的变化。

结果:基因转染后，原来高表达CEA的细胞株(LOVO、HCT116BG)其上清中CEA含量增加明显(从 $21.25 \pm 6.76 \mu\text{g/l}$ 增加到 $34.96 \pm 7.07 \mu\text{g/l}$   $P < 0.05$ )，而原来低表达甚至不表达CEA的细胞株(HeLa、SW620)其上清CEA含量则无明显增加( $P > 0.05$ )。各细胞株表面的HLA-DR的表达量在导入IFN- $\gamma$  基因后明显增强(平均表达率从 $3.91 \pm 3.61\%$ 增加到 $11.67 \pm 7.20\%$   $P < 0.01$ )。通过对细胞的凋亡情况和细胞周期的变化显示:转染IFN- $\gamma$  基因后促进了LOVO细胞的凋亡(各时段平均凋亡率对照组与治疗组分别为 $8.27 \pm 5.62\%$ 与 $15.32 \pm 11.41\%$   $P < 0.05$ )，细胞的S期比例随作用时间延长而呈逐渐降低趋势，显示了基因转染后DNA的合成代谢受到抑制。

结论:IFN- $\gamma$  基因转染后可有效增强大肠癌细胞表面抗原的表达，诱导机体产生抗肿瘤免疫应答；并可能通过抑制细胞DNA的合成，促进细胞的凋亡，抑制肿瘤细胞的增生等机制发挥抗肿瘤作用。

吴文溪,丁强,沈历宗,华一兵,许德华,刘新垣. IFN- $\gamma$  基因转染抗大肠癌细胞的作用机制. 世界华人消化杂志 2003;11(3):294-297  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/294.htm>

### 0 引言

肿瘤细胞靶向的细胞因子基因治疗是肿瘤治疗领域的研究热点<sup>[1-5]</sup>。IFN- $\gamma$  在肿瘤的治疗中起着独特的作用<sup>[6-8]</sup>，将其基因导入肿瘤细胞内使之表达，以提高患者自身抗肿瘤免疫能力，在当前肿瘤基因治疗中占

有重要的地位<sup>[9-11]</sup>。大肠癌是国内外常见的恶性肿瘤，随着生活水平的提高，其发病率呈逐年上升趋势<sup>[12-16]</sup>。我们构建了含 IFN- $\beta$  基因的真核表达质粒 pcDNA3-IFN- $\beta$ ，并利用阳离子脂质体 Lipofectamine 将其转导进入大肠癌细胞株，通过检测 IFN- $\beta$  基因的转染、表达情况，对细胞表面抗原表达的影响及肿瘤细胞的凋亡和细胞周期的变化，探讨其抗肿瘤作用的机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 携带人 IFN- $\beta$  基因的质粒 pLXSN-IFN- $\beta$ ，克隆用质粒 pBluescript，腺病毒穿梭质粒 pAdE1CMV，真核表达质粒 pcDNA-3 由中科院上海生物化学研究所提供。人大肠癌细胞株 LOVO, SW620, HCT116BG 及人宫颈癌细胞株 HeLa 由上海生化所传代保存，各细胞株经检测无支原体污染。阳离子脂质体 Lipofectamine 购自 Gibco 公司；人 IFN- $\beta$  ELISA 试剂盒购自晶美生物公司；RNA 抽提试剂盒(Trizol)、cDNA 第一条链合成试剂盒(superscript preamplification system for first strand cDNA synthesis)、PCR 试剂盒及内切酶均购自 Sangon 公司；IFN- $\beta$  基因引物由上海生工公司合成，序列为：5' 引物: 5' -CTGCCAGGAC CCATATGTACA-3'；3' 引物: 5' -GATGCTCTTCG ACCTCGAAACA-3'。

1.2 方法 构建携带人 IFN- $\beta$  干扰素的真核表达质粒 pcDNA3-IFN- $\beta$ ，经酶切鉴定后，大量扩增和纯化，质粒的制备、扩增、纯化均按《分子克隆实验指南》所示方法进行。分别取生长旺盛的 LOVO, SW620, HCT116BG 细胞接种至 6 孔板中，每孔  $2 \times 10^5$  个细胞，37℃，50 ml/l CO<sub>2</sub> 孵育 12 h，至细胞长至 80% 融合时进行转染，利用空白载体 pcDNA-3 质粒进行对照。转染方法按照 Lipofectamine 操作手册进行。收集基因转染后 24 h 的大肠癌细胞，按试剂盒所示方法用 PCR, RT-PCR 对 hIFN- $\beta$  基因的整合和表达进行鉴定。PCR 反应条件：94℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环。利用双抗体夹心 ELISA 法测定基因转染后 4, 12, 24, 48, 72, 96, 120 h 的细胞培养上清中 IFN- $\beta$  的活性，测定方法按照 ELISA 试剂盒说明书进行。分别取生长旺盛的 LOVO, SW620, HCT116BG, HeLa 细胞接种至 6 孔板中，每孔  $2 \times 10^5$  个细胞，37℃，50 ml/l 孵育 12 h，至细胞 80% 融合时利用阳离子脂质体转染 IFN- $\beta$  基因，分别收集基因转染后 48 h 的细胞和细胞培养上清，利用相同培养条件下未进行基因转染的细胞和细胞培养上清作对照，放射免疫法测定细胞培养上清中 CEA 含量；流式细胞仪检测细胞表面 HLA-DR 的表达情况。放免测定由复旦大学附属中山医院核医学科完成；流式细胞仪检测 HLA-DR 由中科院上海细胞所流式细胞室完成。取生长旺盛的 LOVO 细胞接种至 6 孔板中，每孔  $2 \times 10^5$  个细胞，按照上述细胞培养条件，至细胞 80% 成片时利用阳离子脂质体转染 IFN- $\beta$  基因，分别收集基因转染后 24, 48, 72,

96, 120 h 的细胞，利用相同培养条件下未进行基因转染的细胞作对照，利用流式细胞仪检测细胞凋亡情况和细胞周期的变化。流式细胞仪检测细胞凋亡由中科院上海细胞所流式细胞室完成。

统计学处理 采用配对资料 t 检验、方差分析和秩和检验。

## 2 结果

pcDNA3-IFN- $\beta$  载体的结构示意图如图 1 所示。经 Hind 和 Xba I 双酶切后可得到 501 bp 的 IFN- $\beta$  片段(图 2)。基因转染后 4 h 细胞上清内即可检测到 IFN- $\beta$  活性，24 h 达到最大值，上清中 IFN- $\beta$  活性持续 6 d 仍未见明显下降(图 3)。转染空白质粒载体和单独受 Lipofectamine 作用的细胞株，其培养上清中均未检测到 IFN- $\beta$  活性。不同的细胞株所分泌的 IFN- $\beta$  的量不同，显示了细胞株之间生物学特性的差异。

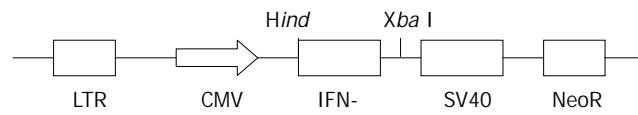
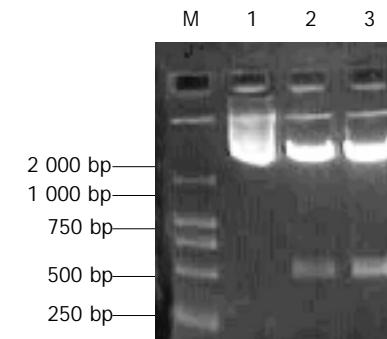


图 1 pcDNA3-IFN- $\beta$  载体的结构示意图



M:DNA Marker DL2000; 1:未经酶切的质粒 pcDNA3-IFN- $\beta$ ; 2, 3:经 Hind III 和 Xba I 双酶切后的电泳图谱  
图 2 pcDNA3-IFN- $\beta$  载体酶切鉴定图。

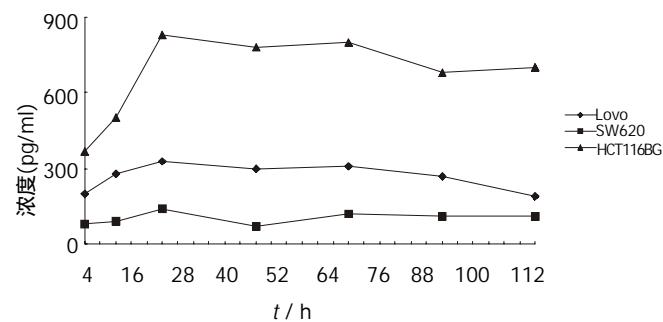


图 3 基因转染后细胞上清中的 IFN- $\beta$  浓度。

2.1 基因转染后细胞 CEA 的变化 利用放射免疫法测定细胞上清中 CEA 的含量，由(图 4)可以看出，经基因转染后，原来高表达 CEA 的细胞株(LOVO, HCT116BG)其上清中 CEA 含量增加明显( $P < 0.05$ )，而原来低表达甚

至不表达CEA的细胞株(HeLa, SW620)其上清CEA含量则无明显增加( $P > 0.05$ )。

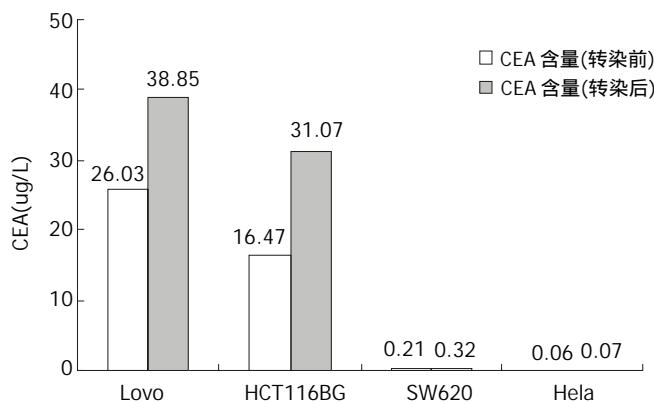


图4 基因转染前后细胞分泌CEA的含量变化。

**2.2 基因转染后HLA-DR的表达情况** 导入IFN-基因后，四株细胞HLA-DR平均表达率从 $3.91 \pm 3.61\%$ 增加到 $11.67 \pm 7.20\%$ ( $P < 0.01$ )。

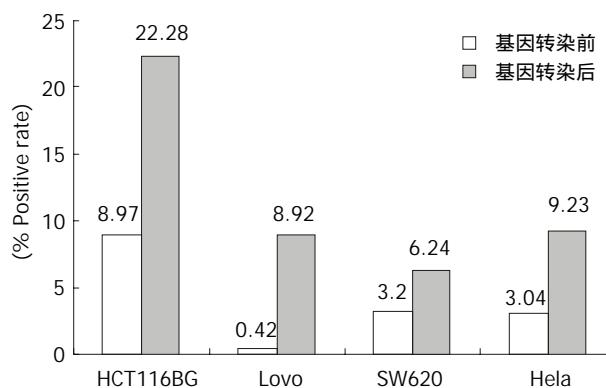


图5 基因转染前后细胞表面HLA-DR的表达情况。

**2.3 IFN-基因转染后细胞的凋亡与周期** 转染IFN-基因后促进了LOVO细胞的凋亡(图6)。转染基因后5d各时段平均凋亡率对照组与治疗组分别为 $8.27 \pm 5.62\%$ 与 $15.32 \pm 11.41\%$ ( $P < 0.05$ )。转染IFN-基因后细胞的S期比例随作用时间而呈逐渐降低趋势(表1)，显示DNA的合成代谢受到抑制，从而抑制了肿瘤细胞的增生。

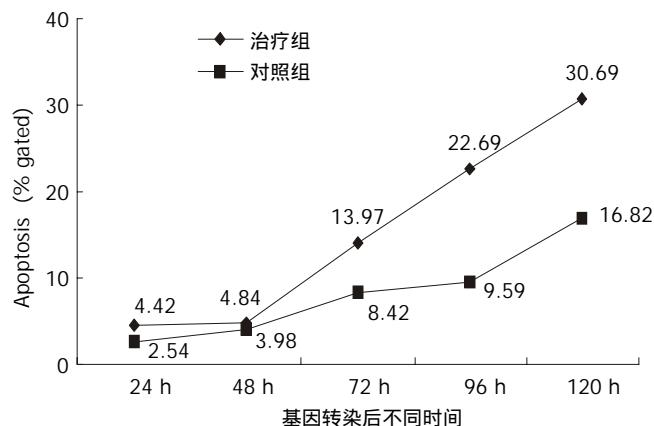


图6 基因转染后Lovo细胞凋亡情况检测。

表1 基因转染对LOVO细胞周期的影响

作用时间(h)	细胞周期比例(%)		
	G0-G1	S	G2-M
24	58.74	24.18	17.08
48	61.86	21.88	16.25
72	59.74	18.09	22.16
96	64.44	15.22	20.34

### 3 讨论

我们将IFN-基因导入大肠癌细胞中，观察和检测基因的转染、表达及对肿瘤细胞的作用。结果表明，IFN-基因可以被有效地转染进入大肠癌细胞内并顺利得到表达，不同的细胞株其分泌的IFN-的量不同，显示了细胞株之间生物学特性的差异；一次有效的基因转染可以使细胞持续分泌IFN-达1wk之久而滴度未见明显下降。

IFN-在肿瘤免疫中起扩大作用<sup>[17-26]</sup>，是干扰素家族中唯一能调节MHC-抗原表达的，有研究表明，人类大肠癌细胞的HLA抗原异常表达与肿瘤细胞DNA含量有关，HLA-DR异常表达的分化程度愈高，预后愈好。HLA抗原的表达率愈高，则肿瘤的转移率愈低<sup>[27-29]</sup>。MHC-类分子表达与否及其表达水平，直接决定免疫应答的发生及其强度。IFN-通过受体激活细胞内信号传导途径，作用于HLA基因的转录水平，加速HLA的转录过程，引起HLA表达增高<sup>[30-35]</sup>。本实验中，IFN-基因被导入不同的大肠癌细胞株中，各细胞株表面HLA-DR的表达量均明显增加，以HCT116BG和LOVO细胞株增加最为显著。IFN-可以增加许多肿瘤表面抗原的表达，人类CEA抗原为一180KD糖蛋白，在许多肿瘤中均有表达，构建表达CEA蛋白的瘤苗作为肿瘤基因治疗的方法之一已屡见报道<sup>[36-41]</sup>，本实验中，原先表达CEA抗原的LOVO、HCT116BG细胞株在导入IFN-基因后，细胞所分泌的CEA的量明显增加。而原先不表达或低表达CEA抗原的SW620、HeLa细胞株在导入治疗基因后，CEA的表达未见改变。

我们还发现，经过IFN-基因作用后的肿瘤细胞凋亡明显，在对细胞周期变化的分析中，可以看出经过基因转染后的肿瘤细胞，其S期呈逐渐减少趋势，表明肿瘤细胞的DNA合成受到了抑制，从而影响了肿瘤细胞的分裂和增生。IFN-是直接引起细胞凋亡，还是通过其他的机制(激活其他细胞因子，激活凋亡基因等)尚有待研究，有报道IFN-可直接增加抑癌基因如IRF-1和PKB基因的表达而抑制肿瘤的产生<sup>[42-45]</sup>。

### 4 参考文献

- Xu CT, Huang LT, Pan BR. Current gene therapy for stomach carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:752-759
- Wu MY, Chen MH, Liang YR, Meng GZ, Yang HX, Zhuang CX. Experimental and clinicopathologic study on the relationship between transcription factor Egr1 and esophageal carcinoma.

- 3 *World J Gastroenterol* 2001;7:490-495  
范应方,黄宗海. 结直肠癌基因治疗研究进展. 世界华人消化杂志 2001;9:427-430
- 4 Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Cao YZ. Inhibiting effect of antisense oligonucleotides phosphorothioate on gene expression of TIMP1 in rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:363-369
- 5 Wang XW, Yuan JH, Zhang RG, Guo LX, Xie Y, Xie H. Antihepatoma effect of alphafetoprotein antisense phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides in vitro and in mice. *World J Gastroenterol* 2001; 7:345-351
- 6 Yu ZC, Ding J, Pan BR, Fan DM, Zhang XY. Expression and bioactivity identification of soluble MG7 scFv. *World J Gastroenterol* 2002;8: 99-102
- 7 刘海峰,刘为纹,房殿春. 抗 Fas mAb 和 IFN 联合诱导胃癌细胞凋亡的实验研究. 世界华人消化杂志 2000; 8: 1361-1364
- 8 Song YH, Lin JS, Liu NZ, Kong XJ, Xie N, Wang NX, Jin YX, Liang KH. AntiHBV hairpin ribozyme mediated cleavage of target RNA in vitro. *World J Gastroenterol* 2002;8:91-94
- 9 郭善禹,顾琴龙,刘炳亚,朱正纲,尹浩然,林言箴. TK基因联合mIL2基因治疗胃癌的实验研究. 世界华人消化杂志 2000;8:974-978
- 10 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma: treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- 11 Dai WJ, Jiang HC. Advances in gene therapy of liver cirrhosis:a review. *World J Gastroenterol* 2001;7:1-8
- 12 冯润华,李建芳,刘炳亚,朱正纲,尹浩然. 人胃癌细胞端粒酶 RNA 组分hTR基因片段的克隆及其正反义真核表达载体的构建. 世界华人消化杂志 2001; 9: 1409-1414
- 13 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
- 14 Tang YC, Li Y, Qian GX. Reduction of tumorigenicity of SMMC7721 hepatoma cells by vascular endothelial growth factor antisense gene therapy. *World J Gastroenterol* 2001;7:22-27
- 15 吴文溪,沈历宗,刘新垣,丁强,王学浩,姚坤. 含胞嘧啶脱氨酶基因的靶向腺病毒载体的构建及应用. 实用癌症杂志 2002;17:233-237
- 16 沈历宗,吴文溪,丁强,许德华,郑仲承,刘新垣,华一兵. 人γ干扰素基因修饰的结肠癌细胞株的建立. 世界华人消化杂志 2001; 9: 1310-1312
- 17 Wilcox TA, Files DB, Wang H, Tamada K, Johnson AJ, Pease LR, Rodriguez M, Cuo J, Chen LP. Impaired infiltration of tumor-specific cytolytic T cells in the absence of interferon- $\gamma$  despite their normal maturation in lymphoid organs during CD137 monoclonal antibody therapy. *Cancer Res* 2002;8:4413-4418
- 18 Odin L, Favrot M, Poujol D, Michot JP, Moingeon P, Tartaglia J, Puisieux I. Canarypox virus expressing wild type p53 for gene therapy in murine tumors mutated in p53. *Cancer Gene Therapy* 2001;8:87-98
- 19 Pulaski BA, Smyth MJ, Suzanne OR. Interferon - $\gamma$ -dependent phagocytic cells are a critical component of innate immunity against metastatic mammary carcinoma. *Cancer Res* 2002;8:4406-4412
- 20 Ueno M, Koyama F, Yamada Y, Fujimoto H, Takayama T, Kamada K, Naito A, Hirao S, Mukogawa T, Hamada H, Nakajima Y. Tumorspecific chemoradiogene therapy for colorectal cancer cells using adenovirus vector expressing the cytosine deaminase gene. *Anticancer Res* 2001;21:2601-2608
- 21 Gri G, Chiodoni C, Gallo E, Stoppacciaro A, Liew FY, Colombo MP. Antitumor effect of interleukin-12 in the absence of endogenous IFN- $\gamma$ : a role for intrinsic tumor immunogenicity and IL-15. *Cancer Res* 2002;8:4390-4397
- 22 Ruehlmann JM, Xiang R, Niethammer AG, Ba Y, Pertl U, Dolman CS, Gillies SD, Reisfeld RA. MIG (CXCL9) chemokine gene therapy combines with antibodycytokine fusion protein to suppress growth and dissemination of murine colon carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:8498-8503
- 23 BergmannLeitner ES, Abrams SI. Treatment of human colon carcinoma cell lines with antineoplastic agents enhances their lytic sensitivity to antigenspecific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2001;50:445-455
- 24 Demtroder KB, Christensen LL, Olesen SH, Frederiksen CM, Laiho P, Aaltonen LA, Laurberg S, Sorensen FB, Hagemann R, Orntoft TF. Gene expression in colorectal cancer. *Cancer Res* 2002;8:4352-4363
- 25 Cheng WF, Huang CF, Hsu KF, Chai CY, He L, Polo JM, Slater LA, Ling M, Wu TC. Cancer immunotherapy using sindbis virus replicon particles encoding a VP22-antigen fusion. *Human Gene Therapy* 2002;13:553-568
- 26 Scanlan MJ, Welt S, Gordon CM, Chen YT, Gure AO, Stockert E, Jungbluth AA, Ritter G, Jager E, Knuth A, Old LJ. Cancer -related serological recognition of human colon cancer:identification of potential diagnostic and immunotherapeutic targets. *Human Gene Therapy* 2002;8:4041-4047
- 27 Higginbotham JN, Seth P, Blaese M, Ramsey WJ. The release of inflammatory cytokines from human peripheral blood mononuclear cells in vitro following exposure to adenovirus variants and capsid. *Human Gene Therapy* 2002;13:129-141
- 28 Dorsey R, Kundu N, Yang QY, Tannenbaum CS, Sun H, Hamilton TA, Fulton AM. Immunotherapy with interleukin-10 depends on the CXC chemokines inducible protein-10 and monokine induced by IFN- $\gamma$ . *Cancer Res* 2002;8:2606-2610
- 29 Sung MW, Chen SH, Thung SN, Zhang DY, Huang TG, Mandel JP, Woo SLC. Intratumoral delivery of adenovirus -mediated interleukin-12 gene in mice with metastatic cancer in the liver. *Human Gene Therapy* 2002;13:731-743
- 30 Eslahi NK, Muller S, Nguyen L, Wilson E, Thull N, Rolland A, Pericle F. Fusogenic activity of vesicular stomatitis virus glycoprotein plasmid in tumors as an enhancer of IL12 gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2001; 8:55-62
- 31 Schroers R, Huang XF, Hammer J, Zhang JW, Chen SY. Identification of HLA DR7-restricted epitopes from human telomerase reverse transcriptase by CD4+ T-helper cells. *Cancer Res* 2002;8:2600-2605
- 32 Padovan E, Terracciano LG, Gerta U, Jacobs B, Reschner A, Bolli M, Spagnoli GC, Borden EC, Heberer M. Interferon stimulated gene 15 constitutively produced by melanoma cells induces E-cadherin expression on human dendritic cells. *Cancer Res* 2002;8:3453-3458
- 33 Dauty E, Behr JP, Remy JS. Development of plasmid and oligonucleotide nanometric particles. *Gene Therapy* 2002;9:743-748
- 34 Fajac I, Grosse S, Briand P, Monsigny M. Targeting of cell receptors and gene transfer efficiency: a balancing act. *Gene Therapy* 2002;9:740-742
- 35 Cornetta K, Smith FO. Regulatory issues for clinical gene therapy trials. *Human Gene Therapy* 2002;13:1143-1149
- 36 Kagawa S, He C, Gu J, Koch P, Rha SJ, Roth JA, Curley SA, Stephens LC, Fang B. Antitumor activity and bystander effects of the tumor necrosis factorrelated apoptosisinducing ligand (TRAIL) gene. *Cancer Res* 2001; 61:3330-3338
- 37 Kircheis R, Wightman L, Kursar M, Ostermann E, Wagner E. Tumor-targeted gene delivery:an attractive strategy to use highly active effector molecules in cancer treatment. *Gene Therapy* 2002;9:731-735
- 38 Qiao J, Doubrovin M, Sauter BV, Huang Y, Guo ZS, Balatoni J, Akhurst T, Blasberg RG, Tjuvajev JG, Chen SH, Woo SLC. Tumor-specific transcriptional targeting of suicide gene therapy. *Gene Therapy* 2002;9:168-175
- 39 Nikitina EY, Chada S, Cacho CM, Fang B, Zhang R, Roth JA, Gabrilovich DJ. An effective immunization and cancer treatment with activated dendritic cells transduced with full-length wild-type p53. *Gene Therapy* 2002;9:245-352
- 40 Gough MJ, Melcher AA, Ahmed A, Crittenden MR, Riddle DS, Linardakis E, Ruchatz AN, Emiliusen LM, Vile RG. Macrophages orchestrate the immune response to tumor cell death. *Cancer Res* 2001;61:7240-7247
- 41 Cao YJ, Shibata T, Rainov NG. Liposome-mediated transfer of the bcl-2 gene results in neuroprotection after in vivo transient focal cerebral ischemia in an animal model. *Gene Therapy* 2002;9:415-419
- 42 Yamazaki M, Zhang R, Straus FH, Messina M, Robinson BG, Hashizume K, Degroot LJ. Effective gene therapy for medullary thyroid carcinoma using recombinant adenovirus inducing tumor-specific expression of interleukin-12. *Gene Therapy* 2002;9:64-74
- 43 Prudhomme GJ, Chang YG, Li XY. Immunoinhibitory DNA vaccine protects against autoimmune diabetes through cDNA encoding a selective CTLA-4(CD152) ligand. *Human Gene Therapy* 2002;13:395-406
- 44 Block A, Freund CT, Chen SH, Nguyen KP, Finegold M, Windler E, Woo SL. Gene therapy of metastatic colon carcinoma: regression of multiple hepatic metastases by adenoviral expression of bacterial cytosine deaminase. *Cancer Gene Ther* 2000; 7:438-445
- 45 Huang Y, Horvath CM, Waxman S. Regrowth of 5fluorouracil treated human colon cancer cells is prevented by the combination of interferon-gamma indomethacin and phenylbutyrate. *Cancer Res* 2000;60:3200-3206

# TRAIL 对结肠癌细胞株 SW480 的细胞毒作用

李小安,房殿春,杨柳芹,张汝刚,司佩任

李小安,房殿春,杨柳芹,张汝刚,司佩任,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心 重庆市 400038  
李小安,男,1968年生,安徽省东至县人,汉族,2001年第三军医大学博士研究生毕业,现为成都军区总医院主治医师,主要从事消化系疾病诊治研究.  
全军“十五”科研基金资助课题, NO.01MA172  
项目负责人:房殿春,400038,重庆市,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心. fangdianchun@hotmail.com  
电话:023-68754124 传真:023-68754124  
收稿日期:2002-07-31 接受日期:2002-08-16

## Cytotoxicity of TRAIL on colon cancer cell line SW480

Xiao-An Li,Dian-Chun Fang,Liu-Qin Yang,Ru-Gang Zhang,  
Pei-Ren Si

Xiao-An Li,Dian-Chun Fang,Liu-Qin Yang,Ru-Gang Zhang,Pei-Ren Si,  
Department of Gastroenterology,Southwest Hospital,Third Military Medical University,Chongqing,400038, China  
Correspondence to:Dian-Chun Fang,Department of Gastroenterology,  
Southwest Hospital,Third Military Medical University,Chongqing,  
400038,China. fangdianchun@hotmail.com  
Received:2002-07-31 Accepted:2002-08-16

### Abstract

AIM:To study cytotoxic effect of TRAIL on colon cancer cell line SW480.

METHODS:The viability of SW480 cells was measured by MTT assay and the apoptotic rate was determined by TUNEL method.

RESULTS:Results of TUNEL and MTT assay showed that TRAIL had high antitumor activity in a time- and concentration-dependent manner. Survival rate of SW480 cells after TRAIL (1 000 µg/L) treatment was 18.7 %. The apoptotic rates of SW480 cells after exposure TRAIL at concentration of 0.50, 150,500,1 500 and 5 000 µg/L were 6.7 %,29.4 %,42.8 %, 50.8 %,84.6 % and 87.4 %, respectively. The apoptotic rates of SW480 cells after treatment with 500 µg/L TRAIL for 0,6,12,18,24 and 30 hours were 7.8 %,21.4 %,41.8 %, 60.6 %,73.8 % and 77.3 %, respectively.

CONCLUSION:The results demonstrate that TRAIL can induce apoptosis and destruction of SW480 cells, and is a potential new cytotoxic drug in cancer therapy.

Li XA,Fang DC,Yang LQ,Zhang RG,Si PR. Cytotoxicity of TRAIL on colon cancer cell line SW480. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(3):298-301

### 摘要

目的:观察 TRAIL 对结肠癌细胞株 SW480 的细胞毒作用.

方法:采用 MTT 法检测 TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞存活分数的影响;TUNEL 法检测 TRAIL 对结肠癌 SW480 细

胞凋亡率的影响.

结果:TRAIL 能有效地杀伤结肠癌 SW480 细胞, MTT 法显示 1 000 µg/L 的 TRAIL 作用 24 h SW480 细胞存活分数仅为 18.7 %. TUNEL 法均显示 0 , 50 , 150 , 500 , 1 500 , 5 000 µg/L TRAIL 蛋白诱导结肠癌 SW480 细胞的凋亡率分别为 6.7 % , 29.4 % , 42.8 % , 50.8 % , 84.6 % 和 87.4 % ; 500 µg/L TRAIL 蛋白于 0 , 6 , 12 , 18 , 24 和 30 h 诱导结肠癌 SW480 细胞的凋亡率分别为 7.8 % , 21.4 % , 41.8 % , 60.6 % , 73.8 % 和 77.3 %. TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞的作用存在较好的量效关系和时效关系.

结论:TRAIL 能通过诱导细胞凋亡的方式杀伤 SW480 细胞, 有可能成为有效的抗结肠癌新药.

李小安,房殿春,杨柳芹,张汝刚,司佩任. TRAIL 对结肠癌细胞株 SW480 的细胞毒作用. 世界华人消化杂志 2003;11(3):298 - 301

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/298.htm>

### 0 引言

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand , TRAIL)是 TNF 家族的新成员, 其基因是 Wiley 小组于 1995 年克隆和命名的.与 TNF 和 FasL 不同, TRAIL 仅诱导被病毒感染的细胞、转化细胞和肿瘤细胞的凋亡, 而对正常细胞几乎无杀伤作用<sup>[1-4]</sup>. 目前大肠癌的治疗仍以手术切除为首选<sup>[5,6]</sup>, 晚期的疗效仍不理想, 因此探索新的有效的治疗手段已成为大肠癌研究领域的热点之一<sup>[7-13]</sup>, TRAIL 独特的生物学特点给肿瘤治疗带来了新的希望.我们在国内较早地利用大肠杆菌表达、并成功分离纯化出有活性的可溶性 TRAIL 蛋白(氨基酸 114-281 , 带六聚组氨酸尾)<sup>[14]</sup>. 现进一步研究 TRAIL 对结肠癌细胞株 SW480 的细胞毒作用, 希图为 TRAIL 的临床应用提供实验依据.

### 1 材料和方法

1.1 材料 可溶性 TRAIL 蛋白(氨基酸 114-281 , 带六聚组氨酸尾)由本实验室制备; MTT 购自上海生物工程技术公司; TUNEL 原位凋亡检测试剂盒购自罗氏公司; RPMI1640 培养基购自 Sigma 公司; 结肠癌细胞株 SW480 由本实验室保种. SW480 细胞培养于含 100 ml/L 灭活的小牛血清、100 KU/L 青霉素和链霉素的 RPMI1640 培养液中, 培养条件为 37 °C 50ml/L 饱和湿度, 每 2-3 d 用 2.5 g/L 胰酶消化, 以 1 : 3-1 : 5 传代.

## 1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测 TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞存活分数的影响 TRAIL 对 SW480 细胞存活分数的量效关系按 10、30、100、300、1 000、3 000  $\mu\text{g/L}$  给予 TRAIL, 同时设对照, 18 h 后测值<sup>[4]</sup>; TRAIL 对 SW480 细胞存活分数的时效关系按每孔加 TRAIL 1 000  $\mu\text{g/L}$ , 取孵育 0、6、12、18、24、30 h 细胞分别测值, 每个时段均设对照。细胞长至对数生长期时, 以 2.5 g/L 胰蛋白酶消化细胞, 用含 50 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 配成单个细胞悬液, 按每孔  $3 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板, 每孔终体积为 200  $\mu\text{L}$ ,  $\text{CO}_2$  孵育箱内培养 2~3 d 后加上述各组药物。测值 4 h 前每孔加 5 g/L 浓度的 MTT 20  $\mu\text{L}$ , 孵育后吸去孔内上清, 每孔加 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 振荡 10 min, 酶联免疫检测仪测  $A_{570}$  值。细胞存活分数(survival fraction) = 实验组  $A_{570}$  / 对照组  $A_{570}$  × 100 %。

1.2.2 TUNEL 法检测 TRAIL 对 SW480 细胞凋亡率的影响 TRAIL 对 SW480 凋亡率的量效关系按 0、50、150、500、1 500、5 000  $\mu\text{g/L}$  的剂量给予 TRAIL, 18 h 后测凋亡率; TRAIL 对 SW480 细胞凋亡率的时效关系按每孔加 TRAIL 1 000  $\mu\text{g/L}$ , 取孵育 0、6、12、18、24、30 h 细胞分别测凋亡率。将无菌的盖玻片置于 6 孔板中, 每孔 1 片。取对数生长期细胞以 2.5 g/L 胰蛋白酶消化细胞, 用 100 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 配成单个细胞悬液, 稀释成  $5 \times 10^8/\text{L}$ , 取 0.5 mL 滴于盖玻片上, 37 °C, 50 mL/L  $\text{CO}_2$ , 饱和湿度下孵育 2 h 后, 每孔加培养液 2 mL, 培养 1 d 后, 每孔加入上述浓度的药物。TUNEL 法检测细胞凋亡率按 TUNEL 试剂盒说明操作, DAB 显色后, 高倍镜(400 ×)下随机数 200 个细胞, 共数 5 个视野, 记下凋亡细胞数和未凋亡细胞数。细胞凋亡率(apoptosis rate) = 凋亡细胞数 / (凋亡细胞数 + 未凋亡细胞数) × 100 %。

## 2 结果

2.1 TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞存活分数的影响 不同剂量的 TRAIL 与结肠癌 SW480 细胞共同孵育 18 h 后, 细胞存活分数从 10  $\mu\text{g/L}$  的 98.8 % 下降至 3 000  $\mu\text{g/L}$  的 16.0 %, 其量效关系曲线近似标准的“S”形, 近似直线部分位于 100~1 000  $\mu\text{g/L}$  之间(图 1)。1 000  $\mu\text{g/L}$  的 TRAIL 作用于细胞, 细胞的存活分数随时间的延长而减少, 从 6 h 的 65.3 % 到 30 h 的 16.6 %。1 000  $\mu\text{g/L}$  的 TRAIL 作用 24 h 即达到满意的效果, 其存活分数为 18.7 %(图 2)。

2.2 TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞凋亡率的影响 0, 50, 150, 500, 1 500, 5 000  $\mu\text{g/L}$  TRAIL 蛋白诱导结肠癌 SW480 细胞的凋亡率分别为 6.7 %, 29.4 %, 42.8 %, 50.8 %, 84.6 % 和 87.4 %, 显示有较好的量效关系(图 3)。采用 500  $\mu\text{g/L}$  TRAIL 蛋白于 0, 6, 12, 18, 24 和 30 h 诱导结肠癌 SW480 细胞的凋亡率分别为 7.8 %, 21.4 %, 41.8 %, 60.6 %, 73.8 % 和 77.3 %,

显示有效好的时效关系(图 4)。

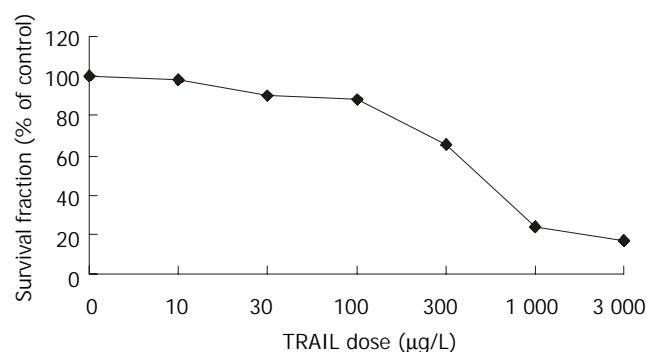


图 1 TRAIL 对结肠癌细胞 SW480 存活分数的量效关系。

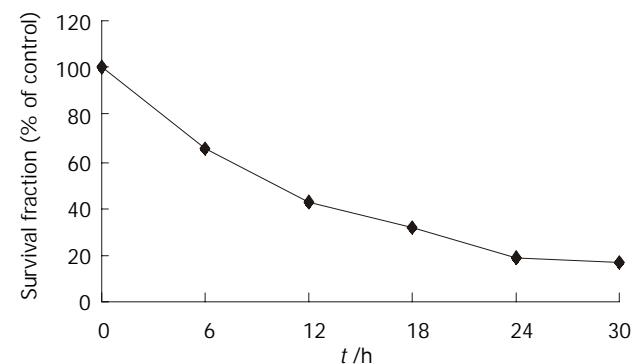


图 2 TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞存活分数的时效关系。

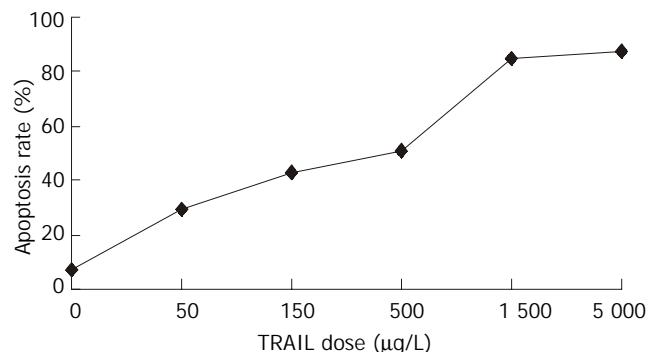


图 3 TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞凋亡率的量效关系。

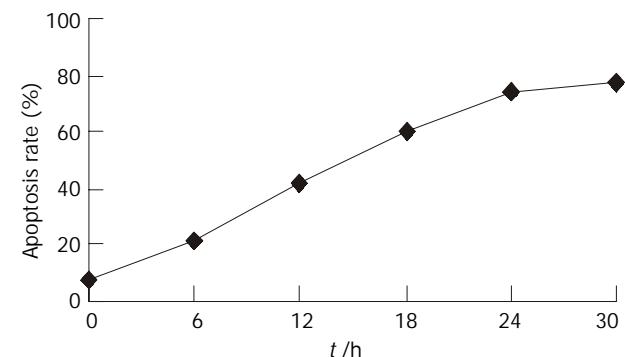


图 4 TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞凋亡率的时效关系。

## 3 讨论

与 TNF 家族的其他成员 TNF 或 Fas 不同, TRAIL 能选

择性地杀死肿瘤细胞，而对正常细胞的影响很小<sup>[15-17]</sup>，目前国外认为 TRAIL 极有可能成为新一代的抗肿瘤药物。我们在国内较早地完成了可溶性 TRAIL(氨基酸 114-281，带六聚组氨酸尾)的表达、分离纯化和鉴定工作<sup>[14]</sup>，在此基础上我们研究了 TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞的作用。MTT 的结果表明，TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞存活分数存在较好的量效关系和时效关系。不同剂量的 TRAIL 与结肠癌 SW480 细胞共同孵育 18 h 后，细胞存活分数从 10 μg/L 的 98.8 % 降至 3 000 μg/L 的 16.9 %；1 000 μg/L 的 TRAIL 作用于细胞，细胞的存活分数随时间的延长而减少，从 6 h 的 65.3 % 下降到 30 h 的 16.6 %。以上结果表明，较小剂量的 TRAIL 在很短的时间内对 SW480 细胞有强烈的杀伤作用。TUNEL 法表明 TRAIL 诱导的 SW480 细胞凋亡也具有很好的量效和时效关系，进一步证明了 TRAIL 对 SW480 细胞的杀伤作用。TUNEL 法是检测凋亡的经典方法，在本文中，该方法得到的结果与 MTT 法的结果基本一致，因此可以认为，TRAIL 是通过诱导细胞凋亡的方式杀伤 SW480 细胞的<sup>[18-23]</sup>。

TRAIL 诱导细胞凋亡的机制尚未完全明了。研究表明，其主要通过两条途径调控细胞凋亡，亦即 caspase 途径<sup>[24-27]</sup> 和 NF-κB 途径<sup>[28]</sup>。TRAIL 有 5 种受体，即 DR4，DR5，DcR1，DcR2 和 OPG。TRAIL 通过与 DR4 和 DR5 结合诱导肿瘤细胞凋亡，但与 DcR1、DcR2 和 OPG 结合并不能诱导细胞凋亡<sup>[29]</sup>，DcR1 和 DcR2 受体启动子的高甲基化可下调其在神经母细胞中的表达<sup>[30]</sup>。尽管本文的结果表明 TRAIL 可以诱导 SW480 细胞凋亡，但 TRAIL 受体在 SW480 细胞中的表达如何及 TRAIL 通过那条途径诱导细胞凋亡尚需进一步研究。

尽管最近发现正常人的肝、肾和关节软骨细胞对 TRAIL 也很敏感<sup>[31-33]</sup>，有可能给 TRAIL 的临床应用带来障碍。但最近 Ozoren et al<sup>[34]</sup> 发现 caspase-9 的抑制剂 Z-LEHD-FMK 可以保护正常人的肝细胞，而不影响 TRAIL 对一些肿瘤细胞的杀伤作用。近年国外关于 TRAIL 抗肿瘤方面的文章也几乎成倍增长，TRAIL 依然被认为有可能成为最有效的抗肿瘤药物。因此，我们的研究为 TRAIL 将来应用于结肠癌的治疗提供了实验基础。

#### 4 参考文献

- 1 Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy. *Apoptosis* 2002;7:449-459
- 2 Poulaki V, Mitsiades CS, Kotoula V, Tseleni-Balafouta S, Ashkenazi A, Koutras DA, Mitsiades N. Regulation of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Am J Pathol* 2002;161:643-654
- 3 Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3:L673-682
- 4 Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of Apoptosis by Apo-2 Ligand, a new Member of the Tumor Necrosis Factor Cytokine Family. *J Biol Chem* 1996;271:12687-12690
- 5 刘飞龙,柳文保,阮辉,郝胜华,秦仁义,戴植本. 结肠肛管吻合术治疗中下段直肠癌 52 例. 世界华人消化杂志 2002;10:604-605
- 6 Makin GB, Breen DJ, Monson JRT. The impact of new technology on surgery for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:612-621
- 7 李新丰,王高雄,陈骥,洪本祖. 区域化疗对结肠癌术后复发及肝转移的影响. 世界华人消化杂志 1999;7:958-959
- 8 王青,吴金生,赖大年,马庆久,要秀,潘伯荣. 人直肠癌细胞 HR-8348 导入 p16 基因对细胞周期的影响及其意义. 世界华人消化杂志 1999;7:1084
- 9 黄宗海,钱伟峰,迟德彪,蒋泽生. HSVtk/GCV 体外诱导人大肠癌 LoVo 细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2001;9:194-197
- 10 李学农,丁彦青,周军. 3, 4', 5- 三羟基芪 -3-β- 单 -D- 葡萄糖苷对大肠癌细胞系蛋白激酶 C 的抑制效应. 世界华人消化杂志 2001;9:198-201
- 11 胡建昆,陈志新,陈佳平,严律南,毛咏秋,邹立群,王朝华. 大肠癌化疗药物敏感性与癌细胞 DNA 含量的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:713-714
- 12 罗和生,李瑾. 丁酸钠和阿司匹林对结肠癌细胞小肠三叶肽表达的影响. 世界华人消化杂志 2002;10:465-467
- 13 Cao GW, Qi ZT, Pan X, Zhang XQ, Miao XH, Feng Y, Lu XH, Kuriyama S, Du P. Gene therapy for human colorectal carcinoma using human CEA promoter contro led bacterial ADP-ribosylating toxin genes human CEA: PEA & DTA gene transfer. *World J Gastroenterol* 1998;4:388-391
- 14 李小安,房殿春,杨仕明. TRAIL 蛋白的表达、纯化和抗肿瘤活性. 第三军医大学学报 2001;23:1058-1060
- 15 Evdokiou A, Bouralexis S, Atkins GJ, Chai F, Hay S, Clayer M, Findlay DM. Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Int J Cancer* 2002;99:491-504
- 16 Griffith TS, Fialkov JM, Scott DL, Azuhata T, Williams RD, Wall NR, Altieri DC, Sandler AD. Induction and regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand-mediated apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:3093-3099
- 17 Plasilova M, Zivny J, Jelinek J, Neuwirtova R, Cermak J, Necas E, Andera L, Stopka T. TRAIL (Apo2L) suppresses growth of primary human leukemia and myelodysplasia progenitors. *Leukemia* 2002;16:67-73
- 18 Kim JY, Kim YH, Chang I, Kim S, Pak YK, Oh BH, Yagita H, Jung YK, Oh YJ, Lee MS. Resistance of mitochondrial DNA-deficient cells to TRAIL: role of Bax in TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene* 2002;21:3139-3148
- 19 Inoue H, Shiraki K, Ohmori S, Sakai T, Deguchi M, Yamanaka T, Okano H, Nakano T. Histone deacetylase inhibitors sensitize human colonic adenocarcinoma cell lines to TNF-related apoptosis inducing ligand-mediated apoptosis. *Int J Mol Med* 2002;9:521-525
- 20 Fulda S, Meyer E, Debatin KM. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* 2002;21:2283-2294
- 21 Kim Y, Suh N, Sporn M, Reed JC. An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:22320-22329
- 22 LeBlanc H, Lawrence D, Varfolomeev E, Totpal K, Morlan J, Schow P, Fong S, Schwall R, Sinicropi D, Ashkenazi A. Tumor-cell resistance to death receptor-induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nat Med* 2002;8:274-281
- 23 Wei XC, Wang XI, Chen K, Zhang L, Liang Y, Lin XL. Killing effect of TNF-related apoptosis inducing ligand regulated by tetracycline on gastric cancer cell line NCI-N87. *World J Gastroenterol* 2001;7:559-562
- 24 Lee MW, Park SC, Kim JH, Kim IK, Han KS, Kim KY, Lee WB, Jung YK, Kim SS. The involvement of oxidative stress in tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in HeLa cells. *Cancer Lett* 2002;182:75-82
- 25 Munshi A, McDonnell TJ, Meyn RE. Chemotherapeutic agents enhance TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002; 50: 46-52
- 26 Fulda S, Kufer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin KM. Sensitization for death receptor-

- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 2001;20:5865-5877
- 27 Yuan XJ, Whang YE. PTEN sensitizes prostate cancer cells to death receptor-mediated and drug-induced apoptosis through a FADD-dependent pathway. *Oncogene* 2002;21:319-327
- 28 Fulda S, Kufer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin KM. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 2001;20:5865-5877
- 29 Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptor:signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308
- 30 van Noesel MM, van Bezouw S, Salomons GS, Voute PA, Pieters R, Baylin SB, Herman JG, Versteeg R. Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation. *Cancer Res* 2002;62:2157-2161
- 31 Jo M, Kim TH, Seol DW, Espen JE, Dorko K, Billiar TR, Strom SC. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 2000; 6:564-567
- 32 Nesterov A, Ivashchenko Y, Kraft AS. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) triggers apoptosis in normal prostate epithelial cells. *Oncogene* 2002;21:1135-1140
- 33 Pettersen I, Figenschau Y, Olsen E, Bakkelund W, Smedsrød B, Sveinbjörnsson B. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptosis in human articular chondrocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:671
- 34 Ozoren N, Kim K, Burns TF, Dicker DT, Moscioni AD, El-Deiry WS. The caspase 9 inhibitor Z-LEHD-FMK protects human liver cells while permitting death of cancer cells exposed to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res* 2000;60:6259-6265

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志®

本刊讯 世界华人消化杂志® 被美国《化学文摘》(Chemical Abstracts,CA)、荷兰《医学文摘库 / 医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica ,EM)》和俄罗斯《文摘杂志》收录。国内被以下检索系统收录，分别为中国科技论文统计与分析（科技部列选为中国科技论文统计源期刊之一），中国学术期刊文摘，中国生物医学文献光盘数据库，中文科技资料目录医药卫生，解放军医学图书馆 CMCC 系统，世界消化学网数据库，中国医学文摘外科学分册（英文版），中国医学文摘内科学分册(英文版)，国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊。世界华人消化杂志®（原刊名新消化病学杂志）1995 年度，1998 年度，1999 年度，2000 年度 2001 年度，分别被评为山西省一级期刊。中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告：2001 年度世界华人消化杂志® 总被引频次 6468，影响因子 3.733，即年指标 0.747，他引总引比 0.2，海外作者论文比 0.012，地区分布数 29，基金和资助论文比例 0.176，指标综合加权评分 76.96。世界华人消化杂志® 大 16 开，128 页，月刊，定价 24.00 元 / 期，邮发代号 82-262.E-mail: wcjd@wjgnet.com  
<http://www.wjgnet.com>

(世界胃肠病学杂志社 2002-11-08)

• 大肠癌 LARGE INTESTINAL CANCER •

# 大肠癌组织微卫星不稳与 hMLH1 和 hMSH2 基因启动子区甲基化状态

房殿春,杨仕明,杨建民,刘海峰,彭贵勇,肖天利,汪荣泉,刘为纹

房殿春,杨仕明,杨建民,刘海峰,彭贵勇,肖天利,汪荣泉,刘为纹,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心 重庆市 400038  
房殿春,男,1951年生,吉林省长春市人,汉族,1989年第三军医大学博士研究生毕业,现为第三军医大学西南医院全军消化科中心主任、教授、主任医师、博士生导师、中华医学会消化病学会常委,中华医学学会消化内镜学会常委。项目负责人:房殿春,400038,重庆市,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心。fangdianchun@hotmail.com  
电话:023-6875424 传真:023-8754124  
收稿日期:2002-07-31 接受日期:2002-08-16

## Methylation of hMLH1 and hMSH2 promoter in colorectal cancer with microsatellite instability

Dian-Chun Fang, Shi-Ming Yang, Jian-Min Yang, Hai-Feng Liu, Gui-Yong Peng, Tian-Li Xiao, Rong-Quan Wang, Wei-Wen Liu

Dian-Chun Fang, Shi-Ming Yang, Jian-Min Yang, Hai-Feng Liu, Gui-Yong Peng, Tian-Li Xiao, Rong-Quan Wang, Wei-Wen Liu, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Correspondence to: Dian-Chun Fang, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. fangdianchun@hotmail.com  
Received: 2002-07-31 Accepted: 2002-08-16

### Abstract

AIM: To explore methylation of hMLH1 and hMSH2 promoter with microsatellite instability (MSI) in colorectal carcinomas.

METHODS: Methylation of hMLH1 and hMSH2 promoter was measured with methylation-specific PCR; MSI was analyzed by PCR-based methods.

RESULTS: No methylation of hMLH1 and hMSH2 promoter was found in 10 normal colorectal mucosas. Seventy-six cases of sporadic colorectal carcinoma were studied for methylation of hMLH1 and hMSH2 promoter and MSI. Methylation of hMLH1 promoter was detected in 8 (10.5%) colorectal carcinomas and none in hMSH2. Frequency of hMLH1 methylation on right-sided colorectal cancer (23.1%) was significantly higher than that on left one (4.0%,  $P < 0.05$ ). MSI was detected in at least one locus in 26.3% (20/76) of the tumors analyzed with five microsatellite markers. Frequency of hMLH1 methylation in gastric cancer with MSI-H (80.0%) was significantly higher than that in gastric cancer with MSI-L (20.0%,  $P < 0.01$ ) and with MSS (10.7%,  $P < 0.001$ ).

CONCLUSION: Methylation of hMLH1 promoter is related to right-sided colorectal cancer and involved in the MSI pathway.

Fang DC, Yang SM, Yang JM, Liu HF, Peng GY, Xiao TL, Wang RQ, Liu WW. Methylation of hMLH1 and hMSH2 promoter in colorectal cancer with microsatellite instability. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(3):302-305

### 摘要

目的:探讨大肠癌组织微卫星 DNA 不稳与 hMLH1 和

hMSH2 基因启动子区甲基化状态的关系。

方法:采用 PCR 为基础的方法检测微卫星 DNA 不稳;采用甲基化特异性 PCR 方法检测 hMLH1 和 hMSH2 基因启动子区的甲基化状态。

结果:正常大肠黏膜未见 hMLH1 和 hMSH2 基因启动子区的高甲基化。76 例大肠癌中检出 hMLH1 高甲基化 8 例,占 10.5%,而且均为去甲基化和高甲基化并存,未见有 hMSH2 高甲基化者。检出 MSI 20 例,检出率为 26.3%。将 MSI 分为高频率 MSI(MSI-H, 2 个位点)10 例、低频率 MSI(MSI-L), 仅为 1 个位点 10 例和 MSI 阴性(MSS)56 例三组,结果右侧大肠癌 hMLH1 高甲基化检出率(23.1%)显著高于左侧大肠癌(4.0%,  $P < 0.05$ )。MSI-H 组 hMLH1 高甲基化的检出率(8/10)显著高于 MSI-L(2/10)和 MSS 组(6/56,  $P < 0.01 - 0.001$ )。

结论:hMLH1 高甲基化与右侧大肠癌的发生有关,可能参与了 MSI 病理途径,而 hMSH2 甲基化状态可能与 MSI 途径无关。

房殿春,杨仕明,杨建民,刘海峰,彭贵勇,肖天利,汪荣泉,刘为纹。大肠癌组织微卫星不稳与 hMLH1 和 hMSH2 基因启动子区甲基化状态。世界华人消化杂志 2003;11(3):302-305

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/302.htm>

### 0 引言

基因不稳在肿瘤的发生中起重要作用。这种基因不稳可以表现为两种不同的形式,亦即染色体不稳和微卫星不稳(MSI)<sup>[1-8]</sup>。微卫星不稳是错配修复基因缺陷(MMR)的重要标记,研究发现 90% 以上的遗传性非息肉性直结肠癌(HNPCC)可检出 MSI,且多伴有错配修复基因 hMLH1 和 hMSH2 基因的种系突变,而少有其他错配修复基因的突变<sup>[9-15]</sup>。业已发现,大肠癌发生过程中导致错配修复基因失活的另一方式为 DNA 甲基化的改变,这种改变常伴有错配修复基因表达的丢失<sup>[16-18]</sup>。为探讨大肠癌组织甲基化改变与微卫星不稳的关系,我们进一步检测了大肠癌组织 hMLH1 和 hMSH2 基因启动子区的甲基化状态。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料 76 例大肠癌及相应正常组织均为外科手术切

除标本, 标本切除后立即置-80℃冻存备用。每例组织行冰冻切片HE染色, 以确定肿瘤细胞的丰度。DNA提取采用蛋白酶K消化, 酚/氯仿提取法。76例大肠癌中, 男48例, 女28例, 年龄32-88(平均58.6)岁。所有患者均无肿瘤家族史, 亦未接受过放疗和化疗。

## 1.2 方法

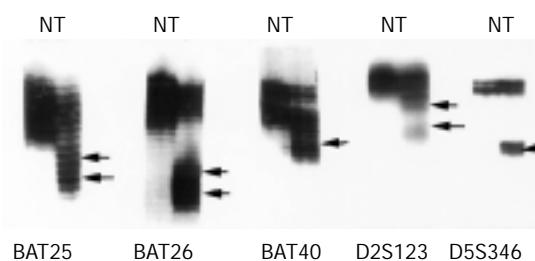
1.2.1 甲基化特异PCR(MSP) hMLH1和hMSH2基因CpG岛DNA甲基化类型参照文献采用甲基化特异性PCR(MSP)方法进行检测<sup>[19]</sup>。用于hMLH1去甲基化反应的引物序列为5'-TTTTGA TGTAGATGTTTATTAGGGTTGT-3'(正义), 5'-ACCA CCTCATCATTAACCA CCCACA-3'(反义); 用于甲基化反应所用引物序列为5'-ACGTAG ACCTTTATTAGGGTCGC-3'(正义); 5'-CCTCATCGTAACCTACCCGCG-3'(反义); 用于hMSH2去甲基化反应的引物序列为5'-GGTTGTTGTGGTTGGATGTT GTTT-3'(正义), 5'-CAACTACAAACATCTCCTTCA ACTACACCA-3'(反义); 用于甲基化反应所用的引物序列为5'-TCGTGGTCGGACGTCG TTC-3'(正义), CAACGCTCCTCGACTACACCG-3'(反义)。MSP的检测步骤、PCR的反应条件和电泳方法见文献[8]。

1.2.2 微卫星不稳(MSI)的检测 包括5个微卫星位点: BAT25, BAT26, BAT40, D2S123, 和D5S346。检测方法、步骤见前文<sup>[1]</sup>。与正常组织相比, 若肿瘤组织出现泳动的条带即判断为MSI。根据每例肿瘤组织突变型微卫星位点的多少, 将其分为高频率MSI(MSI-H, 2个位点)、低频率MSI(MSI-L, 仅为1个位点)和MSI阴性(MSS)3组(图1)。

统计学处理 采用 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.05$ 为有显著差别。

## 2 结果

2.1 大肠癌hMLH1甲基化状态 为检测hMLH1和hMSH2基因启动子区甲基化状态, 我们采用甲基化特异性PCR检测了hMLH1和hMSH2基因5'CpG甲基化状态。所扩增的hMLH1区域为CpG岛最密集区域<sup>[19]</sup>。正常大肠黏膜未见hMLH1和hMSH2启动子区甲基化现象, 76例大肠癌中发现高甲基化8例, 占10.5%, 而且均为去甲基化和高甲基化并存(图1)。68例大肠癌均有hMSH2基因5'CpG岛去甲基化, 未发现有甲基化现象。hMLH1甲基化与临床病理参数的关系见表1。由表1可见, 右侧大肠癌甲基化的检出率显著高于左侧大肠癌( $P < 0.05$ )。76例大肠癌中至少有1个位点检出MSI者20例(26.3%), 右侧大肠癌MSI的检出率显著高于左侧大肠癌( $P < 0.05$ , 表1)。



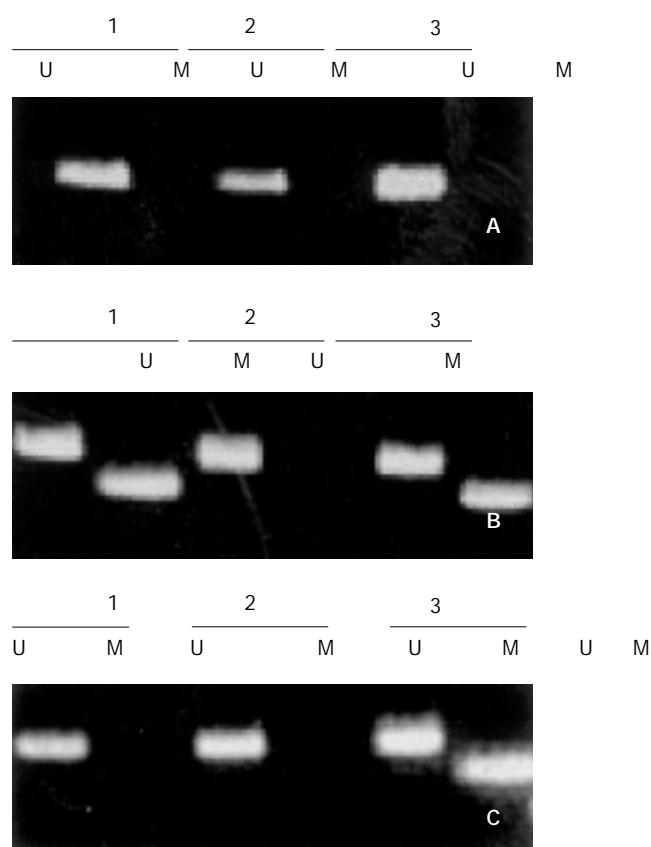
N:正常组织; T:肿瘤组织  
图1 大肠癌微卫星不稳定性检测结果。

表1 hMLH1突变和MSI与临床病理参数的关系

病理参数	n	MLH1 甲基化(%)	MSI(%)
肿瘤大小	<5 cm	48	5(10.4)
	>5 cm	28	3(10.7)
肿瘤部位	右侧	26	6(23.1) <sup>a</sup>
	左侧	50	2(4.0)
分化程度	高	22	2(9.1)
	中	34	4(11.8)
	低	12	1(8.3)
黏液腺癌	8	1(12.5)	2(25.0)
浆膜浸润	无	42	4(9.5)
	有	34	4(11.8)
淋巴结转移	无	43	5(11.7)
	有	33	3(9.1)
临床分期	Ⅰ期	46	4(8.7)
	Ⅲ期	38	4(10.5)

<sup>a</sup>P < 0.05, vs 左侧大肠癌。

2.2 hMLH1甲基化与MSI状态的关系 根据MSI检出位点的多少, 将76例大肠癌中分为MSI-H 10例(13.2%)、MSI-L 10例(13.2%)、MSS 56例(73.7%)。10例MSI-H组中有8例为hMLH1启动子区高甲基化, 与MSI-L组(2/10)和MSS组(6/56)相比差别非常显著( $P < 0.01-0.001$ ), 而MSI-L与MSS组相比差别则无显著意义( $P > 0.05$ )。



A:正常大肠黏膜未见高甲基化; B:MSI-H大肠癌hMLH1甲基化状态, 例1、3表现高甲基化和去甲基化并存; C:MSI-L大肠癌hMLH1甲基化状态, 例3表现为高甲基化和去甲基化并存; U:意指未甲基化; M意指甲基化  
图2 大肠癌hMLH1和hMSH2甲基化检测结果。

### 3 讨论

我们采用甲基化特异PCR检测了大肠癌组织hMLH1和hMSH2的甲基化状态，76例大肠癌检出hMLH1高甲基化10例，检出率为10.5%，hMSH2未发现有高甲基化者，此结果与文献[20-22]报告的检测结果相一致。文献报告MSI-H胃癌与hMLH1启动子区高甲基化有关，而与hMLH1基因突变无关<sup>[23]</sup>；还有文献报告，MSI-L胃癌虽然在临床表型方面与MSI-H胃癌有明显不同，但在hMLH1甲基化改变方面具有与MSI-H胃癌相似的特点<sup>[24]</sup>。从本文大肠癌资料来看，10例MSI-H大肠癌中有8例(80.0%)表现为hMLH1启动子区的高甲基化，提示hMLH1启动子区高甲基化与MSI-H大肠癌密切相关。但MSI-H大肠癌高甲基化的检出率显著高于MSI-L和MSS大肠癌，而MSI-L大肠癌hMLH1启动子区高甲基化的检出率与MSS大肠癌相比无显著差异，提示MSI-H大肠癌在hMLH1启动子区高甲基化方面与MSI-L和MSS大肠癌有明显不同，而MSI-L大肠癌可能涉及到一条与MSS大肠癌相似的分子途径，此与我们对不同MSI状态胃癌发生分子途径的研究结果相一致<sup>[25-28]</sup>。

现已明确大肠癌可分为高频率MSI(MSI-H)，低频率MSI(MSI-L)和无MSI(MSS)3种类型，不同MSI类型大肠癌临床病理特点也不尽相同。Hawkins et al<sup>[21]</sup>检测426例散发性大肠癌CpG岛甲基化状态，发现CpG岛甲基化与右侧大肠癌、女性、老年患者、高分化或黏液性肿瘤、肿瘤组织有较多淋巴细胞浸润、野生型p53和K-ras突变、微卫星不稳有关，预后较好。本研究发现呈高甲基化状态大肠癌多以右侧多见，与文献[29-31]报告的结果一致。但未发现hMLH1基因甲基化状态与组织学类型、肿瘤浸润深度、有无淋巴结转移和临床病理分期有明确相关关系，提示大肠癌hMLH1甲基化状态对预测患者预后的价值有限。有作者检测MSI+大肠癌细胞株hMLH1的甲基化状态发现，肿瘤细胞均表现为高甲基化类型，而无去甲基化现象<sup>[32]</sup>，而本文原发MSI+大肠癌却表现为hMLH1启动子区的甲基化和去甲基化并存现象。肿瘤组织中的非甲基化部分可能与原发肿瘤中存在非肿瘤细胞成分，如间质细胞、炎细胞和血管细胞等有关，这些细胞普遍存在原发肿瘤中，而不存在于培养的细胞株中，由此导致了肿瘤细胞株仅表现为高甲基化，而大肠癌组织中却表现为高甲基化和去甲基化共存现象。

基因不稳在大肠癌的发生中起重要作用。这种基因不稳可以分为两种不同的形式，即染色体不稳和微卫星不稳。前者包括MSS和MSI-L组的多数大肠癌，APC/MCC、DCC和p53抑癌基因的丢失在其发生发展中起重要作用；而后者包括少数MSI-H大肠癌，由于错配修复基因突变导致了广泛的MSI。我们进一步分析了hMLH1和hMSH2启动子区甲基化与两条病理途径的关系，发现hMLH1启动子高甲基化通常发生在MSI-H大肠癌，提示hMLH1启动子高甲基化与微卫星不稳

途径有关。文献报告hMLH1启动子区甲基化与hMLH1基因mRNA和蛋白表达的减少有关，而hMLH1启动子去甲基化可以导致肿瘤细胞hMLH1蛋白的再表达，进而恢复MMR活性。由于DNA甲基化状态可被逆转，因此针对基因甲基化的靶向治疗已引起人们的重视。通过恢复未发生突变或丢失，而仅仅被抑制的生长调控基因的表达而恢复细胞正常生长调控功能，从而可达到治疗的目的。

### 4 参考文献

- 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 Clin Pathol* 1999;52:504-508
- Fang DC, Yang SM, Zhou XD, Wang DX, Luo YH. Telomere erosion is independent of microsatellite instability but related to loss of heterozygosity in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:522-526
- Martins C, Kedda MA, Kew MC. Characterization of six tumor suppressor genes and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in southern African blacks. *World J Gastroenterol* 1999;5:470-476
- Wu BP, Zhang YL, Zhou DY, Gao CF, Lai ZS. Microsatellite instability, MMR gene expression and proliferation kinetics in colorectal cancer with familial predisposition. *World J Gastroenterol* 2000;6:902-905
- 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和抑癌基因杂合缺失.世界华人消化杂志 1999;7:479-481
- Fang DC, Luo YH, Liu R, Lu WW. Study on the relationship between the point mutation of ras oncogenes and the prognosis of patient with gastric cancer. *World J Gastroenterol* 1997;3:19-21
- 张立力,张振书,张亚历,吴保平,郭文,刘晓霞,周殿元.多原发大肠癌微卫星不稳定性研究.世界华人消化杂志 1999;7:397-399
- 纪小龙.微卫星不稳定性:基因研究的新热点.世界华人消化杂志 1999;7:372-374
- Wahlberg SS, Schmeits J, Thomas G, Loda M, Garber J, Syngal S, Kolodner RD, Fox E. Evaluation of microsatellite instability and immunohistochemistry for the prediction of germ-line MSH2 and MLH1 mutations in hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Res* 2002;62:3485-3492
- Terdiman JP, Gum JR Jr, Conrad PG, Miller GA, Weinberg V, Crawley SC, Levin TR, Reeves C, Schmitt A, Hepburn M, Slesinger MH, Kim YS. Efficient detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene carriers by screening for tumor microsatellite instability before germline genetic testing. *Gastroenterology* 2001;120:21-30
- Kruger S, Plaschke J, Pistorius S, Jeske B, Haas S, Kramer H, Hinterseher I, Bier A, Kreuz FR, Theissig F, Saeger HD, Schackert HK. Seven novel MLH1 and MSH2 germline mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Hum Mutat* 2002;19:82
- Loukola A, Eklin K, Laiho P, Salovaara R, Kristo P, Jarvinen H, Mecklin JP, Launonen V, Altonen LA. Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res* 2001;61:4545-4549
- Caldes T, Godino J, de la Hoya M, Garcia Carbonero I, Perez Segura P, Eng C, Benito M, Diaz-Rubio E. Prevalence of germline mutations of MLH1 and MSH2 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families from Spain. *Int J Cancer* 2002;98:774-779
- Berends MJ, Hollema H, Wu Y, van Der Sluis T, Mensink RG, ten Hoor KA, Sijmons RH, de Vries EG, Pras E, Mourits MJ, Hofstra RM, Buys CH, Kleibeuker JH, van Der Zee AG. MLH1 and MSH2 protein expression as a pre-screening marker in hereditary and non-hereditary endometrial hyperplasia and cancer. *Int J Cancer* 2001;92:398-403
- Zhao B, Wang ZJ, Xu YF, Wan YL, Li P, Huang YT. Report of 16 kindreds and one kindred with hMLH1 germline mutation. *World J Gastroenterol* 2002;8:263-266
- Deng G, Peng E, Gum J, Terdiman J, Slesinger M, Kim YS. Methylation of hMLH1 promoter correlates with the gene silenc-

- ing with a region-specific manner in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002;86:574-579
- 17 Hawkins N, Norrie M, Cheong K, Mokany E, Ku SL, Meagher A, et al. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology* 2002; 122:1376-1387
- 18 Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Research* 1997;57: 808-811
- 19 Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821-9826
- 20 Norrie MW, Hawkins NJ, Todd AV, Meagher AP, O'Connor TW, Ward RL. The role of hMLH1 methylation in the development of synchronous sporadic colorectal carcinomas. *Dis Colon Rectum* 2002;45:674-680
- 21 Hawkins N, Norrie M, Cheong K, Mokany E, Ku SL, Meagher A, O'Connor T, Ward R. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology* 2002;122:1376-1387
- 22 Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Ichikawa A, Maekawa M, Shitoh K, Igarashi S, Kotake K, Koyama Y, Nagai H. Extensive methylation of hMLH1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. *Gastroenterology*
- 23 Bevilacqua RA, Simpson AJ. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. *Int J Cancer* 2000;87:200-203
- 24 Pinto M, Oliveira C, Machado JC, Cirnes L, Tavares J, Carneiro F. MSI-L gastric carcinomas share the hMLH1 methylation status of MSI-H carcinomas but not their clinicopathological profile. *Lab Invest* 2000;80:1915-1923
- 25 周晓东,房殿春. 胃癌D17S261和D17S799位点二核苷酸重复序列不稳定性的意义. 世界华人消化杂志 1998;6:318-320
- 26 房殿春,周晓东. 胃肠道肿瘤微卫星DNA不稳定性研究进展. 世界华人消化杂志 1998;6(特刊):66-68
- 27 房殿春,罗元辉,杨仕明,刘为纹. 胃癌微卫星不稳极其相关突变研究. 中华医学杂志 1999;79:920-922
- 28 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
- 29 Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002;21:5427-5440
- 30 Iacobetta B. Are there two sides to colorectal cancer? *Int J Cancer* 2002;101:403-408
- 31 Jass JR, Whitehall VL, Young J, Leggett BA. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 2002;123:862-876
- 32 Herman JG, Umar A, Polyak K. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:6870-6875

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

## • 消息 •

### 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快

截止到 2002 年 7 月 , 中国被著名检索系统 SCI 收录的科技期刊数从 63 种增加到了 67 种 . 从制作 SCI 的美国 ISI ( 美国科学情报所 ) 发布的 JCR ( 期刊引证报告 ) 上的数据看 , 有指标数据的 59 种我国科技期刊中 , 80% 以上的期刊影响因子呈上升趋势 ; 约 90% 的总被引频次都提高了 .

在 2001 年的 JCR 中 , 总被引频次超过 1000 次的中国科技期刊有 4 个 , 他们是《高等学校化学学报》( 中文版 )( 1959 次 ), 《科学通报》( 1628 次 ), 《物理学报》( 中文版 )( 1227 次 ), 《中国物理快报》( 1215 次 )

首次有两个中国科技期刊的影响因子超过 1 , 他们是《细胞研究》( 2.102 ) 和《世界胃肠病学杂志》( 1.445 ) 这两种期刊均为中国英文版科技期刊 .

从期刊影响因子在本学科的排位看 , 进入 SCIE 的我国科技期刊 , 有 8 个期刊排在本学科的中上水平 , 他们是《力学学报》, 《高等学校化学学报》( 中文版 ), 《中国物理》, 《中国物理快报》, 《科学通报》, 《中国科学 B 》, 《中国科学 E 》, 《中国有色金属学报》 .

在本学科国际期刊中 , 我国有 10 个期刊被引频次位于中上水平的 . 他们是 : 《科学通报》, 《高等学校化学学报》( 中文版 ), 《中国科学 A 》, 《物理学报》( 中文版 ), 《中华医学杂志》, 《化学学报》( 中文版 ), 《中国物理快报》, 《中国有色金属学报》( 英文版 ), 《中国科学 B 》, 《中国药理学报》 .

在 SCI 网络版收录的中国科技期刊中 , 有 25 个期刊是由中国科学出版社出版的 , 其中在 JCR 中有指标的期刊有 18 个 .

另外 , 除 SCI 系统外 , 中国科技期刊被其他几个重要国际检索系统收录的数量也呈上升趋势 . 例如 , 在反映工程技术论文的历史超百年的检索系统《 EI 》( 工程索引 ) 中 , 中国被收录的科技期刊从最少时的 40 种 , 增加到了 2000 年的 104 种 . 这也直接反映了我国科技期刊被国际认可的程度 .

国家科技部中国科技信息研究所 , 每年对我国科技期刊在国内的情况做出统计分析 , 定期出版《中国科技期刊引证报告》 . 以 2000 年数据看 , 我国科技期刊的平均影响因子由上一年的 0.208 上升到 0.240 , 其中影响因子超过 1 的有 20 个 ; 总被引频次的平均值达到了 192.2 次 , 总被引频次超过 1000 次的期刊有 25 个 , 其中《科学通报》的总被引频次达到了 2979 次 .

目前 , 我国科技期刊数量已达到 4600 余种 , 已经形成了一定的规模 , 而且门类相对齐全 , 为我国基础研究的发展和科研成果转化生产力做出了重要的贡献 , 但我们承认中国的科技期刊发展水平与世界发达国家之间存在较大的差距 . 随着中国加入 WTO , 对于中国的科技期刊 , 既是机遇又是挑战 . 我们相信 , 通过我国学术界和编辑部门的共同努力 , 一定会在不远的将来产生一批具有国际水准的科技期刊 .

(2002-11-08)

• 大肠癌 LARGE INTESTINAL CANCER •

# 大肠肿瘤 COX - 2 的表达与临床病理特征的关系

刘建平,朱兆华

刘建平,朱兆华,中山大学附属第二医院消化内科 广东省广州市 510120  
刘建平,男,1972-11-07生,湖南省新化县人,汉族,1995年苏州医学院毕业,  
2002-06中山大学医学院硕士毕业,住院医师,主要从事消化道肿瘤诊治的研究。  
项目负责人:朱兆华,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。

电话:020-81332490

收稿日期:2002-07-16 接受日期:2002-07-30

## Correlation of COX-2 expression and clinicopathological features of colorectal cancer

Jian-Ping Liu,Zhao-Hua Zhu

Jian-Ping Liu, Zhao-Hua Zhu, Department of Gastroenterology, The second affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Correspondence to: Zhao-Hua Zhu, Department of Gastroenterology, The second affiliated hospital, Sun Yat-Sen University, 107 YangJiang lu, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Received:2002-07-16 Accepted:2002-07-30

### Abstract

AIM: To investigate the expression of COX-2 on different stages of colorectal cancer and the correlation between the expression of COX-2 and its clinicopathological features.

METHODS: The expression of COX-2 was determined by immunohistochemical staining in seventy-six surgical specimens of colorectal cancer (late stage 44 and early stage 32), 33 adenomas and 18 normal colonic mucosal tissues were biopsied endoscopically. The correlation of COX-2 with the survival rate was evaluated with Kaplan-Meier survival curves and Cox proportional hazards regression.

RESULTS: The degree of expression of COX-2 was categorized into 4 grades ranged from “ - ” to “ + + + ”, the expression grades in series in normal colonic mucosal tissues was 83.3 %, 16.7 %, 0 %, 0 %, respectively; that in adenomas was 12.1 %, 42.4 %, 36.4 %, 9.1 %, respectively. The difference of the expression of COX-2 between late stage and early stage of colorectal cancer, and that between the late stage of cancer and adenoma were statistically significant ( $P < 0.01$ ); however, no significant difference in the expression of COX-2 between early stage of cancer and adenoma was observed. A significant difference in the survival curves between low COX-2 expression group and high COX-2 expression group was showed by Kaplan-Meier survival analysis ( $P < 0.05$ ). Cox proportional hazards regression indicated that the correlation of the expression of COX-2 with the poor long-term prognosis was existed with a hazard ratio of 2.665 unadjusted for other variables ( $P < 0.05$ ); the expression of COX-2 was an independent risk factor for poor prognosis.

CONCLUSION: The expression of COX-2 is gradually up-regulated in the evolution of normal epithelium to adenoma

or from early stage to advanced stage of colorectal cancer. The expression of COX-2 is an independent risk factor of poor prognosis for postoperative patients with advanced colorectal cancer.

Liu JP, Zhu ZH. Correlation of COX-2 expression and clinicopathological features of colorectal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(3): 306-309

### 摘要

目的:观察 COX-2 在大肠肿瘤不同发展阶段的表达 , 研究 COX-2 的表达与大肠肿瘤各临床病理特征之间的关系 .

方法:使用免疫组化染色法分别研究了 76 例外科手术切除的原发性大肠癌石蜡标本(早期大肠癌 32 例 , 进展期大肠癌 44 例)、 33 例大肠腺瘤、 18 例正常大肠黏膜活检组织中 COX-2 蛋白的表达 ; 采用 K-M 半参数法和 Cox 模型分析 COX-2 蛋白的表达与进展期大肠癌预后的关系 .

结果:依表达程度由(-)至(++)四级计算 , COX-2 的表达率在正常结肠黏膜中分别为 83.3 %, 16.7 %, 0 %, 0 %; 在结肠腺瘤中分别为 12.1 %, 42.4 %, 36.4 %, 9.1 %; 早期结肠癌中分别为 6.3 %, 28.1 %, 46.9 %, 18.7 %; 在进展期结肠癌中分别为 6.8 %, 20.5 %, 18.2 %, 54.5 %. 除腺瘤组与早期癌组中 COX-2 的表达率无差别外 , 其余两两之间 COX-2 的表达率均有显著性差异( $P < 0.01$ ). 生存分析显示 , COX-2 高表达组与低表达组之间的生存曲线有显著性差异( $P < 0.05$ ). Cox 模型中单因素分析显示 COX-2 表达的死亡风险比为 2.665( $P < 0.05$ ) ; 多因素分析显示 COX-2 表达是与进展期大肠癌术后患者预后相关的独立危险因素 .

结论:COX-2 的表达在由正常大肠黏膜至大肠腺瘤和早期癌至进展期大肠癌发展过程中呈上调趋势 . COX-2 的表达是一种影响进展期大肠癌术后患者预后的独立危险因素 .

刘建平,朱兆华. 大肠肿瘤 COX - 2 的表达与临床病理特征的关系. 世界华人消化杂志 2003;11(3):306-309

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/306.htm>

### 0 引言

环氧化酶(COX)是 - 完整的膜结合蛋白 , 为花生四烯酸(AA)合成前列腺素(PGs)过程中的一个重要的限速酶<sup>[1]</sup>. 已知其有二种异构形式 , 即 COX-1 和 COX-2. COX-1 属结构型酶 . COX-2 属诱导型酶 , 由位于染色体 1q25.2-25.3 的“迅速应答基因”所编码<sup>[2]</sup> , 其亚细胞定位在内质网

和核膜<sup>[3]</sup>, 在正常组织中不表达或微弱表达, 受生长因子和/或细胞因子、炎症递质、一氧化氮、血清素、促肿瘤剂、癌基因等因素刺激后 COX-2 mRNA 很快增加, 升高可达 20~40 倍, 并在升高水平上维持 6~8 h, 24 h 后降至基础水平<sup>[4,5]</sup>. COX-2 在多种肿瘤的发生、发展过程中起重要的作用<sup>[6~14]</sup>. 但是仍不清楚 COX-2 在人大肠肿瘤发生、发展过程中的确切作用机制<sup>[15]</sup>. 此外关于 COX-2 的表达与大肠肿瘤临床病理特征的关系, 文献报道结果不一.

## 1 材料和方法

1.1 材料 本院 1992/2001 年外科手术切除的原发性大肠癌石蜡标本共 76 例(早期大肠癌 32 例, 进展期大肠癌 44 例). 进展期大肠癌(下简称进展期癌)组:男 23 例, 女 21 例; 年龄 23~75, 平均  $58 \pm 12$  岁; 癌灶  $6.0 \pm 3.3$  cm. 早期大肠癌(下简称早期癌)组:男 25 例, 女 7 例; 年龄 33~78, 平均  $58 \pm 13$  岁; 癌灶  $2.4 \pm 1.0$  cm. 44 例进展期癌患者均有随访资料, 随访时间 36~70 mo, 平均  $42 \pm 20$  mo. 而 32 例早期癌患者中失访 5 例, 随访时间 4~113 mo, 随访超过 36 mo 者仅 17 例. 内镜下息肉摘除术切下的大肠腺瘤 33 例. 男 16 例, 女 17 例. 年龄 20~79, 平均  $57 \pm 12$  岁. 癌灶平均  $1.2 \pm 0.9$  cm. 内镜下取正常人大肠黏膜活检组织 18 例, 经组织病理学确认为正常肠黏膜组织. COX-2 兔抗人单克隆抗体(浓缩液)(SC-7951)、UltraSensitive™ S-P(Rabbit)免疫组化试剂盒(SP-9001)均购自北京中山生物技术有限公司.

1.2 方法 采用链霉菌抗生物素蛋白-生物素过氧化物酶免疫组化染色方法检测 COX-2 蛋白的表达<sup>[16]</sup>. 实验步骤依照 S-P 试剂盒说明进行. COX-2 蛋白阳性染色定位于细胞质(呈棕黄色颗粒)或核膜(如图 1). 参照 Sheehan (JAMA)、Hao<sup>[17,18]</sup> 分类方法, 根据肿瘤细胞中 COX-2 蛋白染色的范围, 将染色分为 4 级: 阳性细胞百分率 <1% 作为(-); 阳性细胞百分率 1~19% 作为(+); 阳性细胞百分率 20~49% 作为(++)；阳性细胞百分率 50% 作为(+++); 仅将(++)与(+++)级考虑为高表达, 归为高表达组; 将(-)与(+)级考虑为低表达, 归为低表达组.

统计学处理 计量资料用 t 检验, 记数资料用 R × C 列联表的 Fisher 精确概率法检验; 生存曲线应用 log-rank 检验. 用 SPSS10.0 和 SAS8.1 统计软件分析.

## 2 结果

棕黄色染色主要局限于细胞胞质, 少数出现于核膜. COX-2 蛋白表达可见于大肠肿瘤细胞、炎症细胞、单核细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞及成纤维细胞, 以大肠肿瘤细胞为主. COX-2 在正常大肠黏膜中不表达或微弱表达; 除早期癌组与腺瘤组中 COX-2 表达无统计学差异外; 其余组两两之间比较均有显著性差异( $P < 0.01$ ).(表 1)

表 1 大肠肿瘤中 COX-2 的表达

分组	n	-	+	++	+++
进展期癌	44	3(6.8)	9(20.5)	8(18.2)	24(54.5) <sup>b</sup>
早期癌	32	2(6.3)	9(28.1)	15(46.9)	6(18.7) <sup>b,d</sup>
腺瘤	33	4(12.1)	14(42.4)	12(36.4)	3(9.1) <sup>b,d</sup>
正常黏膜	18	15(83.3)	3(16.7)	0(0)	0(0)

<sup>b</sup>P <0.01 vs 正常黏膜, <sup>d</sup>P <0.01 vs 进展期癌.

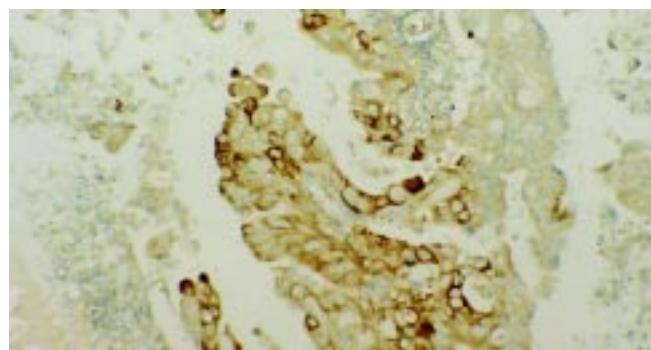


图 1 大肠腺癌细胞 COX-2 胞质染色( $\times 200$ ).

2.1 COX-2 表达与大肠肿瘤临床病理特征的关系 COX-2 表达与进展期大肠癌被研究的各项临床病理特征无关. COX-2 的表达与早期大肠癌被研究的各项临床病理特征无关. COX-2 的表达与腺瘤被研究的各项临床病理特征无关.

2.2 COX-2 表达与进展期大肠癌患者的预后 因为早期癌组资料中随访时间超过 3 a 的样本量少, 死亡例数少(仅 3 例), 不满足生存分析的统计学要求, 故不予分析. 44 例进展期大肠癌患者中死亡 16 例, 生存 28 例, 其中 COX-2 高表达组( $n=32$ )死亡 15 例, COX-2 低表达组( $n=12$ )死亡 1 例. Kaplan-Meier 非参数法结果表明 3 a 累计生存率在 COX-2 低表达组为 100%; 而在 COX-2 高表达组为 62.5%. 经 log-rank 检验, COX-2 高表达组与低表达组的生存曲线有显著性差异( $\chi^2 = 5.20$ ,  $P = 0.0225$ )(图 2). 单因素分析结果显示淋巴结转移、Dukes 分期、COX-2 表达等 3 项因素均能影响进展期大肠癌患者生存时间. 分析远处转移因素时, 因为远处转移患者中无 COX-2 低表达病例, 回归系数为零, 不能在单因素分析中体现出该因素的死亡风险比(表 2). 多因素分析显示淋巴结转移、远处转移与 Dukes 分期三因素之间有显著相关. 其中, 淋巴结转移与远处转移的 Pearson 相关系数为 0.411; 远处转移与 Dukes 分期的 Pearson 相关系数为 0.628; 而淋巴结转移与 Dukes 分期的 Pearson 相关系数为 0.876; 经检验其  $P < 0.01$ . 而前三项因素与 COX-2 表达这一因素之间的相关程度均较低( $P > 0.05$ ). 提示在影响进展期大肠癌患者术后生存率的危险因素中, COX-2 的表达是一项独立的危险因素. 使用 Forward LR 方法分析, 经筛查变量, 结果只有 Dukes 分期和 COX-2(分为 - - +++) 四级)两项变量进入

Cox回归方程，表明淋巴结转移和远处转移是与Dukes分期高度相关的因素，实际上被包含在Dukes分期这一因素中，因而在Cox回归分析中被剔出。控制Dukes分期因素在平均水平后得出的COX-2在回归方程中的死亡风险比为2.248(表3)。

表2 单因素分析中各因素死亡风险比结果

	Exp(B)	95% CI for Exp(B)	P value
COX-2	2.665	1.160-6.125	0.021
Dukes分期	4.229	1.869-9.572	0.001
淋巴结转移	4.286	1.481-12.405	0.007
远处转移	1.000	0.025-40.540	1.000
分布部位	0.896	0.336-2.389	0.826
癌灶大小	1.012	0.860-1.189	0.890
分化程度	1.380	0.511-3.724	0.525
年龄	1.013	0.970-1.058	0.569
性别	2.023	0.691-5.925	0.199

Exp(B):危险比(死亡风险比); CI:可信区间; p value : P值。

表3 多因素分析中死亡风险比结果

r	S <sub>x</sub>	Wald	df	Sig	Exp(B)	95%CI for Exp(B)		
						Lower	Upper	
COX-2	0.810	0.419	3.731	1	0.053	2.248	0.988	5.114
杜克分期	1.279	0.401	10.184	1	0.001	3.592	1.638	7.879

Wald:χ<sup>2</sup>统计量；df:自由度；Sig:显著性检验值；Exp(B):危险比(死亡风险比)。

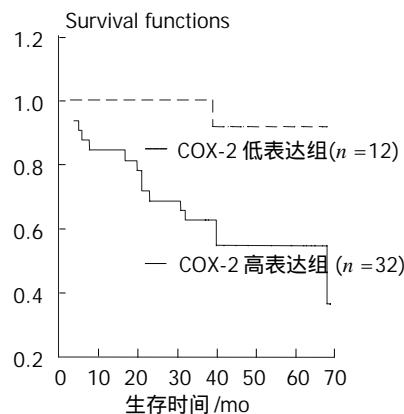


图2 Kaplan-Meier非参数法生存曲线图。

### 3 讨论

流行病学调查显示，长期规则服用NSAID人群中大肠癌的发病率下降40-50%<sup>[19]</sup>，且下降程度与所服用NSAID呈时间和剂量依赖性<sup>[20]</sup>，长期服用舒林酸(sulindac)使家族性腺瘤性息肉病患者的结肠息肉体积明显缩小，数量减少<sup>[21]</sup>，目前认为NSAID是通过抑制COX-2的表达进而诱导肿瘤细胞的凋亡，抑制生长因子及其受体等机制而发挥抗肿瘤作用<sup>[22-27]</sup>。多发性结肠腺瘤性息肉动物模型APC<sup>716</sup>小鼠的COX-2基因被敲除(knock out)后，其后代发生结肠腺瘤性息肉的数目减少，体积亦减小<sup>[28]</sup>，证实COX-2在大肠息肉形成的早期阶段发挥关键作用<sup>[29]</sup>；特异性的COX-2抑制剂塞来希布(celecoxib)可显著抑制结肠腺癌的发生<sup>[30]</sup>。COX-2的表达在从正常黏膜至不典型增生以至癌变发展过程中呈逐渐上调趋势，85-95%的大肠腺癌和40-50%的大肠腺瘤有COX-2蛋白的水平增高<sup>[31,32]</sup>，86%(12/14)的大肠癌和43%(6/14)的大肠腺瘤COX-2 mRNA水平明显增高<sup>[33]</sup>。国内学者报道：COX-2 mRNA表达在30%(3/10)的大肠腺瘤和70.8%(17/24)-90%(27/30)的大肠腺癌中明显增高，而正常黏膜中无表达或表达很弱<sup>[11,34]</sup>。

文献报道：COX-2的表达与腺瘤的大小和不典型增生程度无关，与腺癌的分化程度、分布部位、淋巴结转移及Dukes分期无关<sup>[5,35]</sup>。我们研究的结果支持上述观点，但我们也发现COX-2的表达与大肠肿瘤的部分临床病理特征有关系，其中较有意义的是发现早期癌与进展期癌之间COX-2的表达有显著性差异，这一结果再次表明过少的样本数难以得出有价值的统计学结论，不采用较细的分层分析而轻易合并资料将在统计学上丢失有益的信息。多数研究在分析大肠癌COX-2的表达与其发展阶段的关系时，常因早期癌(A1期)例数少，不能分析早期癌与进展期癌之间COX-2表达是否存在差异。此外我们在比较32例早期癌与44例进展期癌COX-2的表达时，曾将COX-2的表达简单分为高表达组和低表达组，未发现早期癌与进展期癌之间COX-2的表达有显著性差异，然而将COX-2的表达按染色的程度分为“- - + +”四个等级进行分析后，就发现早期癌与进展期癌之间COX-2的表达有显著性差异(P=0.006)。这一结果也符合编码COX-2蛋白的“迅速应答基因”的反应特点<sup>[2]</sup>。

近年有些学者注意到，COX-2的表达与大肠癌的预后相关。大肠癌5a累计生存率在COX-2低表达组患者中为91.6%，而高表达组患者仅40.5%<sup>[17]</sup>。COX-2的表达与大肠癌的淋巴结转移、异时肝转移(metachronous liver metastasis)相关，并且COX-2的表达是异时肝转移的独立危险因子<sup>[36]</sup>。Tomozawa et al<sup>[37]</sup>认为COX-2的表达与大肠癌的术后复发相关：大肠癌术后复发率在COX-2高表达组明显高于COX-2低表达组，是与预后相关的独立危险因子。本研究结果支持这一观点。

### 4 参考文献

- 1 蔡歌, 沈志祥. 前列腺素与结直肠肿瘤. 世界华人消化杂志 2001; 9:431-434
- 2 Kosaka T, Miyata A, Ihara H, Hara S, Sugimoto T, Takeda O, Takahashi E, Tanabe T. Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase. Eur J Biochem 1994;221:889-897
- 3 Morita I, Schindler M, Reger MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. J Biol Chem 1995;270:10902-10908
- 4 Kinoshita T, Takahashi Y, Sakashita T, Inoue H, Tanabe T, Yoshimoto T. Growth stimulation and induction of epidermal

- growth factor receptor by overexpression of cyclooxygenases 1 and 2 in human colon carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1438:120-130
- 5 Hla T, Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7384-7388
- 6 Wu QM, Li SB, Wang Q, Wang DH, Li XB, Liu CZ. The expression of COX-2 in esophageal carcinoma and its relation to clinicopathologic characteristic. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:11-14
- 7 Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schror K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 1999;59:198-204
- 8 Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1999;59:987-990
- 9 邹恒骏, 于连珍, 孙亮, 缪琨, 白剑峰, 张小勇, 吕秀珍, 赵志泉. 胃癌及癌旁组织中 COX-2 基因蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2000; 8:578-579
- 10 Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 1997;57:1276-1280
- 11 Shen ZX, Cao G, Sun J. The clinical and pathology effect of COX-2 mRNA expression in colorectal cancers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1082-1084
- 12 Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Schramm U, Wolff HH. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 1998;58:4997-5001
- 13 Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:455-460
- 14 Shiota G, Okubo M, Noumi T, Noguchi N, Oyama K, Takano Y, Yashima K, Kishimoto Y, Kawasaki H. Cyclooxygenase-2 expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1999; 46:407-412
- 15 Vainio H. Is COX-2 inhibition a panacea for cancer prevention? *Int J Cancer* 2001;94:613-614
- 16 Pagano M, 张世馥. 细胞周期 - 材料和方法. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000:10-12
- 17 Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ, Murray FE. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *JAMA* 1999; 282:1254-1257
- 18 Hao X, Bishop AE, Wallace M, Wang H, Willcocks TC, Maclouf J, Polak JM, Knight S, Talbot IC. Early expression of cyclooxygenase-2 during sporadic colorectal carcinogenesis. *J Pathol* 1999;187:295-301
- 19 Kune GA, Kune S, Watson LF. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations, and medications: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Cancer Res* 1988;48:4399-4404
- 20 Rosenberg L, Palmer JR, Zauber AG, Warshauer ME, Stolley PD, Shapiro S. A hypothesis: nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of large-bowel cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83:355-358
- 21 Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993;328:1313-1316
- 22 Sun B, Wu YL, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhang YP, Zhong J. Effects of Sulindac on growth inhibition and apoptosis induction in human gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:997-1002
- 23 Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu JY. Growth inhibition and apoptosis induction of Sulindac on Human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:796-800
- 24 Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;93:705-716
- 25 Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappie O, Messerini L, Vannacci A, Sardi I, Baroni G, Boddi V, Mazzanti R, Masini E. Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 2001;121:1339-1347
- 26 Daniel TO, Liu H, Morrow JD, Crews BC, Marnett LJ. Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res* 1999;59:4574-4577
- 27 Tian G, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Yue H, Li JY, Mei Q. Effect of Nimesulid on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:483-487
- 28 Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996;87:803-809
- 29 Bamba H, Ota S, Kato A, Adachi A, Itohama S, Matsuzaki F. High expression of cyclooxygenase-2 in macrophages of human colonic adenoma. *Int J Cancer* 1999;83:470-475
- 30 Reddy BS, Hirose Y, Lubet R, Steele V, Kelloff G, Paulson S, Seibert K, Rao CV. Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, administered during different stages of carcinogenesis. *Cancer Res* 2000;60:293-297
- 31 Boolbol SK, Dannenberg AJ, Chadburn A, Martucci C, Guo XJ, Ramonetti JT, Abreu-Goris M, Newmark HL, Lipkin ML, DeCosse JJ, Bertagnolli MM. Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 1996;56:2556-2560
- 32 DuBois RN, Shao J, Tsuji M, Sheng H, Beauchamp RD. G1 delay in cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cancer Res* 1996;56:733-737
- 33 Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994;107:1183-1188
- 34 Gao SK, Liu ZB, Zhao JX, Wan YL, Liu YC, Xiu WH. Expression of cyclooxygenase-2 gene in human colorectal tumors. *Chin J Gen Surg* 2000;15:663-667
- 35 Maekawa M, Sugano K, Sano H, Miyazaki S, Ushijima M, Fujita S, Gotoda T, Yokota T, Ohkura H, Kakizoe T, Sekiya T. Increased expression of cyclooxygenase-2 to -1 in human colorectal cancers and adenomas, but not in hyperplastic polyps. *Jpn J Clin Oncol* 1998;28:421-426
- 36 Yamauchi T, Watanabe M, Kubota T, Hasegawa H, Ishii Y, Endo T, Kabeshima Y, Yorozuya K, Yamamoto K, Mukai M, Kitajima M. Cyclooxygenase-2 expression as a new marker for patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2002;45:98-103
- 37 Tomozawa S, Tsuno NH, Sunami E, Hatano K, Kitayama J, Osada T, Saito S, Tsuruo T, Shibata Y, Nagawa H. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000; 83:324-328

# 胃癌中 18 号染色体的杂合性丢失研究

任群,王振宁,罗阳,敖杨,鲁冲,姜莉,徐惠绵,张学

任群,王振宁,罗阳,敖杨,鲁冲,姜莉,徐惠绵,张学,中国医科大学医学基因组学研究室、卫生部细胞生物学重点实验室 辽宁省沈阳市 110001  
任群,女,1969-4-5生,辽宁省丹东人,汉族,1995年中国医科大学硕士毕业,现为中国医科大学细胞生物学博士研究生,主要从事胃癌分子病理学研究.国家杰出青年科学基金资助课题, No.30125017  
项目负责人:张学,110001,辽宁省沈阳市,中国医科大学医学基因组学研究室、卫生部细胞生物学重点实验室. xzhang@mail.cmu.edu.cn  
电话:024-23256666-5532  
收稿日期:2003-01-11 接受日期:2003-02-19

## Loss of heterozygosity on chromosome 18 in microdissected gastric cancer cells

Qun Ren,Zhen-Ning Wang,Yang Luo,Yang Ao,Chong Lu,Li Jiang,Hui-Mian Xu,Xue Zhang

Qun Ren, Zhen-Ning Wang, Yang Luo, Yang Ao, Chong Lu, Li Jiang, Hui-Mian Xu, Xue Zhang, The Research Center for Medical Genomics, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Supported by the National Science Fund for Distinguished Young Scholars, No. 30125017  
Correspondence to: Dr. Xue Zhang, Research Center for Medical Genomics, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. xzhang@mail.cmu.edu.cn  
Received:2003-01-11 Accepted:2003-02-19

### Abstract

AIM: To detect loss of heterozygosity (LOH) on chromosome 18 in primary gastric carcinomas.

METHODS: Short insertion deletion polymorphism (SIDP) markers on chromosome 18 were analyzed using high fidelity-whole genome amplification (HF-WGA) and denatured high pressure liquid chromatography (DHPLC) to detect LOH in gastric cancer cells purified by laser capture microdissection (LCM).

RESULTS: LOH in 3 (MID148, MID150 and MID352) of 9 SIDP loci was found. Three of 10 samples of gastric cancer showed LOH at the same SIDP locus (MID150) (30 %) and one of them also demonstrated LOH at the other 2 SIDP loci (MID148, MID352). No LOH was detected in 6 of 9 SIDP loci.

CONCLUSION: Detection of LOH in cancer cells can be achieved by the combination of LCM, HF-WGA and the analysis of SIDP marker by DHPLC. This study provides an alternative new way to map tumor suppressor genes on chromosome 18.

Ren Q, Wang ZN, Luo Y, Ao Y, Lu C, Jiang L, Xu HM, Zhang X. Loss of heterozygosity on chromosome 18 in microdissected gastric cancer cells. Shijie Huaren Zazhi 2003;11(3):310-313

### 摘要

目的:检测原发性胃癌组织中 18 号染色体的杂合性丢失 (loss of heterozygosity , LOH)情况。

方法:联合应用激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)- 高可信度全基因组扩增(high fidelity-whole genome amplification , HF-WGA)- 变性高效液相色谱(denatured high pressure liquid chromatography , DHPLC)方法 , 检测胃癌中 18 号染色体上短插入 / 缺失多态(short insertion deletion polymorphism , SIDP ) 标记的 LOH.

结果: 在所检测的10例胃癌组织中3例呈现SIDP位点LOH (30 %);9个SIDP位点中3个(MID148、MID150和MID352)发生LOH , 其中MID150位点LOH见于3例胃癌组织.在1例胃癌组织中3个SIDP位点同时呈现LOH.

结论:联合应用 LCM 和 HF-WGA , 经 DHPLC 分析 SIDP 标记 , 可进行肿瘤细胞中 LOH 检测. 本研究为 18 号染色体上胃癌相关抑癌基因的研究提供一种新技术策略.

任群,王振宁,罗阳,敖杨,鲁冲,姜莉,徐惠绵,张学. 胃癌中 18 号染色体的杂合性丢失研究. 世界华人消化杂志 2003;11(3):310-313  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/310.htm>

### 0 引言

肿瘤是多种基因变化的参与和积累的结果. 揭示这些基因变化的规律 , 不仅可以阐明癌变的机制 , 更可以协助肿瘤的诊断、治疗和预后判断. 胃癌是严重威胁人类健康的恶性疾病 , 是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一 , 其发病率呈明显的上升趋势<sup>[1-4]</sup>. 同其他恶性肿瘤一样 , 胃癌的发生也是由多因素参与 , 并经历了多阶段的演变过程 , 涉及到多种癌基因的激活和抑癌基因的失活<sup>[5-26]</sup>. 现已明确在胃癌发生发展过程中 , c-met , c-myc , ras , c-erbB-2 等癌基因 , p53 , p16 , Rb , DCC , APC 等抑癌基因 , 以及肿瘤转移相关基因 nm23 , CD44 , CDH1 等有结构或表达的异常. 这些异常或影响细胞的异型增生 , 或涉及分化程度与浸润和转移等生物学行为的改变. 虽然有上述众多的相关研究 , 但胃癌发生发展的完整的分子机制远未阐明. 因此进一步确定胃癌最常见丢失或失活的抑癌基因 , 将其定位、分离 , 并研究其生物学功能 , 进一步揭示胃癌发生发展的分子机制是当务之急. 胃癌细胞有明显染色体片段丢失 , 胃癌杂合性缺失(loss of heterozygosity , LOH)发生率可高达 50 %<sup>[27,28]</sup> , 染色体 18q 是最常见的丢失区域 , 这表明在 18 号染色体长臂上可能存在有一种或几种肿瘤抑制基因 , 他的丢失与胃癌的发生发展密切相关. 为探讨 18 号染色体杂合性丢失在胃癌发生

发展中的作用, 我们联合应用激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)、高可信度全基因组扩增(high fidelity-whole genome amplification, HF-WGA)和变性高效液相色谱(denatured high pressure liquid chromatography, DHPLC)技术对胃癌中 18 号染色体短插入 / 缺失多态(short insertion deletion polymorphism, SIDP)标记的杂合性丢失进行分析。

## 1 材料和方法

1.1 材料 中国医科大学附属第一医院肿瘤科住院患者的手术切取胃癌组织标本 10 例, 切取原发性胃癌组织和距癌组织 1 cm 以上的癌旁正常组织。所有患者术前均未接受放疗和化疗。

1.2 方法 按 LCM 方法提取 DNA。手术切取新鲜胃癌和癌旁正常组织标本, 立即 OCT 包埋, 放入液氮中保存, 行 8 μm 厚连续冰冻切片, 常规行 HE 染色。第一张封片镜下明确病理诊断, 其余切片不封片, 采用 LCM 系统, 分别捕获癌细胞和正常胃黏膜细胞, 至覆盖乙酸乙烯酯薄膜的塑料帽表面, 将塑料帽盖于预先加有 50 μL 裂解缓冲液(1 × Pyrobest™ 缓冲液, 4 mg/mL 蛋白酶 K, 5 % Tween20)的 0.5 mL 的 Eppendorf 管上。倒置 Eppendorf 管, 48 水浴 14 h, 94 10 min 终止反应。以我室自建方法行高可信度全基因组扩增: 取 5 μL 上述的 DNA 样品, 加入 10 × Pyrobest™ 缓冲液 5 μL, 100 mol/L 的核苷酸随机引物 (N15) 10 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μL 和 Pyrobest™ DNA 聚合酶 1 μL, 最后加水至反应体积 50 μL。PCR 扩增 50 循环: 94

1 min, 37 2 min, 以 0.1 /s 速率缓慢升温至 55 , 延伸 4 min 后, 再升温至 68 1 min。产物 DNA 于 -20 储存。18 号染色体 SIDP 标记引物碱基序列来源于网上数据库(表 1), 由大连宝生物公司合成。PCR 反应体系为 20 μL, 含全基因组扩增产物 1 μL, 2.5 μmol/L dNTPs 1.6 μL, 10 μmol/L 的引物混合物 4 μL, Taq DNA 聚合酶 0.1 μL, 10 × PCR 缓冲液 2 μL (含有 MgCl<sub>2</sub> 1.5 μmol/L, Tris-HCl 10 μmol/L, KCl 50 μmol/L), 95 预变性 2 min, 95 变性 30 s, 55 退火 75 s, 72 延伸 25 s, 共重复 35 个循环。最后在 72 延伸 6 min。PCR 产物不需纯化处理, 取 8 μL PCR 产物行 DHPLC 分析, 以非变性温度进行检测, 流动相为 0.1 mol/L 三乙酸基乙胺(TEAA, pH 7.0)和 25 % 乙腈, 按不同梯度进行混合, 柱温 50 , 流速 0.9 mL/min。取经 DHPLC 检测有 LOH 的标本的 PCR 产物 5 μL, 加入变性缓冲液(95 % 甲酰胺, 10 mmol/L EDTA, 0.05 % 溴酚蓝, 0.05 % 二甲苯蓝)稀释 5 倍, 98 变性 10 min, 取 2-3 μL 上样于含 7 mol/L 尿素的 6 % 变性聚丙烯酰胺凝胶, 室温恒压 450V, 电泳 2.5 h, 取下凝胶以硝酸银染色后观察结果。

## 2 结果

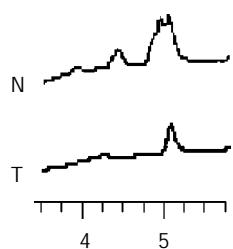
2.1 全基因组扩增产物的 DHPLC 分析结果 正常组织 DNA 等位片段为杂合子者(即色谱峰数目为 2 个或 2 个以上)可提供判断 LOH 信息。共检测 10 例胃癌组织标本及其相应的正常组织标本, 将肿瘤组织与其相应正常组织相比, DNA 的扩增产物的 DHPLC 色谱峰数目减少或色谱峰相对高度减少 50 % 以上判定为 LOH(图 1)。结

表 1 引物的一般情况

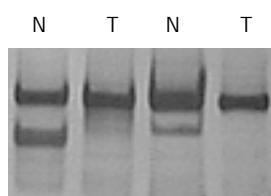
名称	引物序列(5' - 3')	产物的长度(bp)
MID24	MID24-F:5' - CAGTCAAAGCCTCATTTCTTAA-3'	155-159
	MID24-R:5' - TCACAAAGGAAATGTTCTTTAC-3'	
MID25	MID25-F:5' - TCAACAGTTTGATATACAAAA-3'	129-130
	MID25-R:5' - TAAGCCCTTTATTTTCTAAC-3'	
MID148	MID148-F:5' - CAAAGCCATTCCAAAGTTAA-3'	134-138
	MID148-R:5' - TATTGTCCAGCCTATTGCA-3'	
MID149	MID149-F:5' - TTTGAACACATTCTGGAGG-3'	115-127
	MID149-R:5' - TTGAAGATAATCGATCCAA-3'	
MID150	MID150-F:5' - GACGAATGCAGAACACTTCT-3'	106-112
	MID150-R:5' - AATCTGAGGGAGCTGAGTAAC-3'	
MID151	MID151-F:5' - AAAATGTGTGTTGCACTG-3'	79-82
	MID151-R:5' - AAACCTCATCCAGATTAAATGC-3'	
MID298	MID298-F:5' - AACATTGGCGTTCTAGTG-3'	131-135
	MID298-R:5' - TGTTGTTTCAAGCATTAA-3'	
MID352	MID352-F:5' - CATTCACTGTTGATTGCGA-3'	98-101
	MID352-R:5' - ATGCTCCTATGTTGACTGG-3'	
MID487	MID487-F:5' - AGTTGTGCACCCAAGAGAG-3'	74-78
	MID487-R:5' - TATGACGGAAGAAAATGAGC-3'	

果表明有3例胃癌组织的MID150位点的PCR产物的DHPLC峰型呈现LOH(30%)。其中1例同时在另外2个SIDP位点(MID148、MID352)DHPLC色谱峰型也呈现LOH。9个位点中有6个位点(MID24, MID25, MID149, MID151, MID298, MID487)的PCR产物的DHPLC色谱峰型未见异常。

**2.2 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果分析** 取5对经DHPLC检测峰型表现为LOH的PCR产物，将肿瘤组织与其相应的正常组织DNA的PCR结果相比较，若肿瘤样品某一等位基因条带消失或相对密度减少50%以上，记为LOH(图2)。结果可见5例癌组织PCR产物与其相应正常组织相比，癌组织DNA的扩增条带消失，表现为LOH。



T:胃癌组织；N:配对癌旁正常组织  
图1 DHPLC检测的LOH。



T:胃癌组织；N:配对癌旁正常组织  
图2 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后硝酸银染色的LOH。

### 3 讨论

近年来肿瘤分子生物学研究表明，肿瘤的发生发展是个多阶段、多步骤的过程，涉及多种癌基因的激活和抑癌基因的失活。抑癌基因是野生型的等位基因，肿瘤细胞中抑癌基因突变失活常常表现为一个等位基因丢失(alloetic loss)和另一个存留等位基因(retained allele)失活性突变。其中，等位基因丢失就是由肿瘤细胞中多见的染色体缺失所致，他同时还会伴有抑癌基因座位相邻区域的杂合性缺失。LOH是指肿瘤基因组中特定染色体上某种DNA多态标记(如RFLP和微卫星多态标记)的等位基因片段由同一患者正常组织基因组的两种变成一种，即等位基因型由杂合子变成纯合子。LOH是肿瘤细胞中染色体缺失的结果，提示所检查DNA多态标记附近存在抑癌基因。因此，肿瘤组织LOH分析为定位和发现抑癌基因的有效手段。

众所周知，肿瘤细胞并非孤立存在于组织中，而是依存于多种不同类型细胞相互构成的三维空间中。用传统方法从磨碎组织中提取DNA，因各种细胞成分混杂难免造成检测结果的偏差。因此，肿瘤组织中细胞的

异质性已成为分子病理学和肿瘤基因组学研究的突出问题。本实验运用LCM技术，捕获单个肿瘤细胞，从而避免了异质细胞对实验结果的干扰。同时为了克服LCM技术分离目的细胞的数量有限性，本实验对LCM分选的细胞进行高可信度的全基因组扩增。因其有简便、精确、高效和可靠等特点，可广泛应用于肿瘤细胞基因的杂合性丢失的检测。

传统的杂合性丢失的检测方法多为聚丙烯酰胺凝胶电泳加硝酸银染色的方法，存在费时、费力、有毒操作等许多弊端，本实验采用DHPLC技术检测LOH，PCR产物不需纯化处理，可直接行DHPLC分析，完全自动化检测，每20 min即可检测一个样品，满足肿瘤基因组学研究中对高通量检测技术的需求，其省时省力的同时，可精确、高效的进行LOH的检测，可以与传统的聚丙烯酰胺凝胶电泳加硝酸银染色的方法相媲美。

胃癌的发生发展中，经常发生18号染色体的LOH<sup>[29,30]</sup>，常见的杂合性丢失为18q和17p，并发现在18q的杂合性丢失比17p的杂合性丢失在胃癌的发展过程中更早出现。目前定位于18q的候选抑癌基因主要有3个，即DCC基因，DPC4基因，JV18-1基因或MADR2基因。DCC基因是在研究大肠癌时发现并命名的，有研究表明DCC基因LOH是胃癌的晚期改变，与病情进展相关<sup>[31,32]</sup>。DPC4基因，主要是在前列腺癌中检测中发现的，其在胃癌的发生中也起重要作用<sup>[33-35]</sup>。JV18-1基因或MADR2基因，主要是编码一个DPC4相关蛋白的基因，其与胃癌发生发展的关系尚不明确。另外，有报道发现18q12.2区域也常常发生胃癌LOH，其中的抑癌基因尚未被克隆出来。

本实验选用18号染色体上的9个短插入/缺失多态(SIDP)标记，对10例原发性胃癌进行了LOH的研究，结果表明在MID150位点处发生LOH的频率最高(3/10)，其次在MID148位点和MID352位点也可见LOH(1/10)，而其他位点在本实验中未检测到LOH。推测胃癌中18号染色体的MID150位点LOH较常见，该染色体位点上有可能存在与胃癌发生和发展的抑癌基因。这个抑癌基因是否为胃癌常见缺失基因，还需要进一步研究，加以证实。

我们的研究也尝试将LCM、HF-WGA和DHPLC技术相结合，应用于肿瘤细胞LOH检测，建立了准确、高效、快速的胃癌相关抑癌基因定位方法，其应用将有助于肿瘤基因组学和分子病理学中对抑癌基因定位与功能的研究。

### 4 参考文献

- 吴云林,陈颖.早期胃癌的临床筛选研究.世界华人消化杂志 2002; 10:1372-1375
- 程时丹,吴云林,章永平,乔敏敏,郭强苏.胃癌多药耐药细胞药物积累的异常.世界华人消化杂志 2001;9:131-134
- 房殿春.基因不稳定在胃癌发生中的作用.世界华人消化杂志 2003;11:1-5

- 4 房静远. 胃癌发生中后生修饰的异常. 世界华人消化杂志 2002;10:749-752
- 5 王东旭, 房殿春, 刘为纹. 胃黏膜肠化及异型增生和胃癌组织中多基因异常. 世界华人消化杂志 2000;8:855-859
- 6 Gao HJ,Yu LZ,Bai JF,Peng YS,Sun G,Zhao HL,Miu K,Lu 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
- 7 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和抑癌基因杂合缺失. 世界华人消化杂志 1999;7:479-481
- 8 Wang DX,Fang DC, Liu WW, Luo YF, Lu R. A study on the loss of heterozygosity of multiple tumor suppressor genes in gastrointestinal metaplasia. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 1999;28:264-267
- 9 施秀清, 李功, 李春生, 倪灿荣, 栾汎, 曲阳. 胃癌中癌基因 ras c - myc mRNA 表达的临床意义. 华人消化杂志 1998;6:123-124
- 10 王维, 罗和生, 余保平. 胃癌及癌前病变中 hTERT 基因和 c - myc 蛋白的表达意义. 世界华人消化杂志 2002;10:258-261
- 11 Tsugawa K,Yonemura Y,Hirono Y,Fushida S,Kajii 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
- 12 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
- 13 朱华乔, 罗和生, 于保平. cFLIP 基因表达与胃癌的关系研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1329-1330
- 14 费素娟, 陈玉林, 林志发, 陈淑敏, 刘广珍. 胃癌及癌前病变 ras P12,P53 的表达意义. 世界华人消化杂志 2001;9:465-466
- 15 李晓清, 郝丽萍, 张小丽, 龚飞跃, 郭惠学, 伍尤龙. 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
- 16 孙秀菊, 孙开来, 付浩, 王舒宝, 陈峻青. 胃癌细胞 nm23H1 基因表达与体内外侵袭力的关系. 世界华人消化杂志 2003;11:10-13
- 17 Chen GY,Wang DR.The expression and clinical significance of CD44v in human gastric cancers. *World J Gastroenterol* 2000;6:125-127
- 18 孙喜文, 申宝忠, 石美森, 戴旭东. CD44v6 基因表达与胃癌危险因素的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:1129-1132
- 19 周永宁, 徐采朴, 韩彪, 王金穗, 房殿春, 彭贵勇, 杨建民, 刘海峰. 胃癌 E - 钙粘蛋白表达与临床病理学的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:1121-1124
- 20 郑志红, 孙秀菊, 邱广蓉, 刘言厚, 王梅先, 孙开来. 胃癌癌前和发展阶段中 E - cadherin 基因的突变. 世界华人消化杂志 2002;10:153-156
- 21 张晓梅, 沈守荣, 王晓艳, 王洁如, 李江. 胃癌和大肠癌中肿瘤相关基因 NGX6 的表达. 世界华人消化杂志 2002;10:873-876
- 22 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 杨仕明, 汪荣泉. 胃癌前组织和胃癌中 Bax 基因表达及其与细胞凋亡的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:665-668
- 23 崔大祥, 闫小君, 张沥, 赵景蓉, 江梅, 郭曼海, 张玲霞, 白西平, 苏成芝. 胃癌及癌前病变黏膜中呈高表达 6 个基因片段的筛选及其临床意义. 世界华人消化杂志 1999;7:770-772
- 24 汪波, 石灵春, 张维彬, 肖楚梅, 吴继锋, 董聿明. 胃癌及癌前病变中抑癌基因 P16 表达的意义. 世界华人消化杂志 2001;9:39-42
- 25 陈世耀, 王吉耀, 纪元, 张希德, 朱畴文. 幽门螺杆菌与蛋白激酶 C 在胃癌及癌前病变基因突变中的作用. 世界华人消化杂志 2001;9:302-307
- 26 张林, 付红梅, 金树珍, 黄润, 周成刚. P53 过度表达及细胞外基质与胃癌分化、浸润和转移的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:992-996
- 27 Kawabata K, Yamamoto T, Hara A, Shimizu M, Yamada Y, Matsunaga K, Tanaka T, Mori H. Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F334 rats. *Cancer Letters* 2000;157:15-21
- 28 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 CA11 的功能研究. 世界华人消化杂志 2002;10:525-529
- 29 de Manzoni G, Tomezzoli A, Di Leo A, Moore PS, Talamini G, Scarpa A. Clinical significance of mutator phenotype and chromosome 17p and 18q allelic loss in gastric cancer. *British J Surgery* 2001;88:419-425
- 30 Yustein AS, Harper JC, Petroni GR, Cummings OW, Moskaluk CA, Powell SM. Allelotyping of gastric adenocarcinoma. *Cancer Research* 1999;59:1437-1441
- 31 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
- 32 Fang DC,Jass JR,Wang DX.Loss of heterozygosity and loss of expression of the DCC gene in gastric cancer.*J Clin Pathol* 1998;51:593-596
- 33 Schwarte-Waldhoff I, Klein S, Blass-Kampmann S, Hintelmann A, Eilert C, Dreschers S, Kalthoff H, Hahn SA, Schmiegel W. DPC4/SMSD4 mediated tumor suppression of colon carcinoma cells is associated with reduced urokinase expression. *Oncogene* 1999;18:3152-3158
- 34 Iacobuzio-Donahue CA,Wilentz RE,Argani P,Yeo CJ,Cameron JL, Kern SE,Hruban RH. Dpc4 protein in mucinous cystic neoplasms of the pancreas-Frequent loss of expression in invasive carcinomas suggests a role in genetic progression. *Am J Surg Pathol* 2000;24:1544-1548
- 35 Xu X,Brodie SG,Yang X,Im YH,Parks WT,Chen L,Zhou YX, Weinstein M,Kim SJ,Deng CX.Haploid loss of the tumor suppressor Smad4/Dpc4 initiates gastric polyposis and cancer in mice. *Oncogene* 2000;19:1868-1874

# MUC5AC、MUC6 核粘蛋白合成肽诱导小鼠抗肿瘤免疫反应

汪荣泉,房殿春,刘为纹

汪荣泉,房殿春,刘为纹,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心 重庆市 400038  
汪荣泉,男,1968-7-14生,汉族,1992年第三军医大学本科毕业,1999年第三军医大学博士研究生毕业,副教授,主要从事消化系统疾病的研究。  
项目负责人:房殿春,400038,重庆市,中国人民解放军第三军医大学西南医院消化科. fangdianchun@hotmail.com  
电话:023-68773055  
收稿日期:2002-08-10 接受日期:2002-08-23

## Anti-tumor immunity in mice induced by synthetic polypeptides of MUC5AC and MUC6 apomucins

Rong-Quan Wang,Dian-Chun Fang,Wei-Wen Liu

Rong-Quan Wang,Dian-Chun Fang,Wei-Wen Liu,Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038,China  
Correspondence to:Dr. Dian-Chun Fang, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038,China. fangdianchun@hotmail.com  
Received:2002-08-10 Accepted:2002-08-23

### Abstract

AIM:To evaluate the immune response and anti-tumor activity induced by synthetic polypeptides of MUC5AC and MUC6 apomucins in mice.

METHODS:The cellular and humoral immunity induced by MUC5AC and MUC6 synthetic polypeptides were examined in mouse,proliferation of lymphocyte and cytotoxicity of T lymphocytes were assessed by <sup>3</sup>H-TDR incorporation assay.

RESULTS:The conjugated MUC5AC and MUC6 synthetic polypeptides could induce B cells in mice to produce high titre antibodies against the immunized peptides and delayed-type hypersensitivity. But they could not induce significant proliferation of lymphocyte and specific cytotoxic T-lymphocytes (CTL) *in vitro* against 7901 gastric cancer cells. This may be caused by the experimental design, inefficient epitope of synthetic polypeptides, or MHC restriction.

CONCLUSION:MUC5AC-KLH and MUC6-KLH synthetic polypeptide conjugates can induce cellular and humoral immunity other than cytotoxic T lymphocytes of anti-tumor effect.

Wang RQ, Fang DC, Liu WW. Anti-tumor immunity in mice induced by synthetic polypeptides of MUC5AC and MUC6 apomucins. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(3):314-317

### 摘要

目的:探讨 MUC5AC , MUC6 核粘蛋白合成肽在诱导小鼠抗肿瘤免疫反应中的作用.

方法:采用动物实验方法观察 MUC5AC 和 MUC6 黏核蛋白的合成肽诱导小鼠的细胞和体液免疫反应及其淋巴细胞体外抗肿瘤作用.

结果:MUC5AC , MUC6 合成肽可诱导小鼠产生相应的抗体及迟发型过敏反应 , 但不能产生脾淋巴细胞的明显增生及体外抗 7901 胃癌细胞株的作用.

结论:MUC5AC , MUC6 合成肽免疫小鼠可引发体液及细胞免疫反应 , 但尚不足以产生淋巴细胞毒作用.

汪荣泉,房殿春,刘为纹. MUC5AC、MUC6 核粘蛋白合成肽诱导小鼠抗肿瘤免疫反应. 世界华人消化杂志 2003;11(3):314-317

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/314.htm>

### 0 引言

粘蛋白表达于多种人类正常腺上皮组织及部分腺癌 , 其分子结构是近年来研究的热点. 目前已克隆出至少17种人粘蛋白基因及其他动物的类似物(MUC1-17) , 其中以 MUC1-MUC6 研究最为深入<sup>[1-5]</sup>. MUC1 核粘蛋白及其糖链成份 , 甚至 MUC1 的 DNA 疫苗已提示具有诱发机体的细胞免疫和体液免疫作用 , 部分基于 MUC1 分子所设计的黏液瘤苗已进入了临床 、 期验证 , 有的已用于临床<sup>[6-8]</sup>. 国内马运国研究提示 , MUC2、MUC3 核粘蛋白可诱发抗肿瘤细胞免疫<sup>[9]</sup>. 其中的 MUC2 与 MUC1 和 MUC3 不同 , 他却是一种分泌型粘蛋白分子 , 由于其可能具有诱发机体抗肿瘤细胞免疫的作用 , 这也促使我们对其他的分泌型粘蛋白分子 MUC5AC、MUC6 进行研究. MUC5AC、MUC6 编码的核粘蛋白在正常细胞内是被高度糖基化后才被分泌出细胞外 , 所以很少暴露于免疫系统 , 肿瘤细胞内 MUC5AC、MUC6 的编码产物由于他们的不完全糖基化 , 使核粘蛋白的表位易于暴露 , 从而可能激发机体的抗肿瘤免疫反应<sup>[8,9]</sup>. 为了进一步明确粘蛋白介导的杀伤肿瘤细胞作用 , 及其诱发免疫反应的有效肽成份 , 本研究以体外合成的 MUC5AC、MUC6 黏蛋白合成肽免疫小鼠 , 以证实其是否具有与 MUC1 , MUC2、MUC3 相似的诱发小鼠抗肿瘤免疫反应 , 藉以探索新的黏液瘤苗用于胃癌的治疗.

## 1 材料和方法

1.1 材料 MUC5AC 粘蛋白核心肽 TTSTTSAPTTs , MUC6 粘蛋白核心肽 SFQTTTYPTPSHPQTTLp , 皆由巴塞罗那自动化大学临床医学研究所 de Bolos Carme 博士惠赠. 合成肽用 ABI430A 合成仪经固相方法合成 , 粗肽经高效液相色谱法测定其纯度超过 80 % , 再进一步以反向固相色谱法纯化均匀的产物 , 最后经氨基酸分析和电子喷雾物质光谱鉴定合成肽氨基酸序列的正确性<sup>[10]</sup>. 6-8 周龄 Balb/c 小鼠(47 只)购自第三军医大学动物饲养中心 , 随机分成 11 组 , 每组 3-5 只 , 雌雄搭配. 福氏佐剂和福氏不完全佐剂按常规方法自制 , 其中的液体石蜡油、羊毛脂由本院药房提供 , 而结核杆菌疫苗由重庆市沙坪坝区小龙坎防疫站惠赠. 胰蛋白酶 , KLH 购自 Sigma 公司 , <sup>3</sup>H-TDR 购自中国原子能研究所 , RPMI1640 购自 Gebco 公司 , 重组人 IL-2 购自第三军医大学免疫学教研室.

1.2 方法 MUC5AC 、 MUC6 合成肽与 KLH 的连接按戊二醛连接法进行. MUC5AC , MUC6 合成肽溶于去离子水 , MUC5AC 合成肽中(2.9 mg)加入去离子水(1.45 mL) , MUC6 合成肽(4.4 mg)中加入去离子水(2.2 mL). 连接反应: MUC5AC 合成肽 1.45 mg(0.725 mL)加入 KLH 1.45 mg 和 3g·L<sup>-1</sup> 戊二醛 0.3 mL 组成反应液(1.17 mL). MUC6 合成肽 2.2 mg(1.1 mL)加入 KLH 2.2 mg 和 3g·L<sup>-1</sup> 戊二醛 0.44 mL 组成反应液(1.76 mL). 反应液经室温下搅拌反应 2 h , 加入 1 mol/L 甘氨酸 0.25 mL 阻断未反应的戊二醛. MUC5AC-KLH , MUC6-KLH 用 PBS 液透析过夜后 , 分别获得相对纯化的 MUC5AC-KLH 和 MUC6-KLH. 实验动物分 11 组 , 皮下注射免疫源. 组 1(5 只): MUC5AC-KLH(10 μg)加佐剂 0.25 mL; 组 2(3 只): MUC5AC-KLH(20 μg)加佐剂 0.25 mL ; 组 3(3 只): MUC5AC-KLH(30 μg)加佐剂 0.25 mL; 组 4(5 只): MUC6-KLH(10 μg)加佐剂 0.25 mL; 组 5(3 只): MUC6-KLH(20 μg)加佐剂 0.25 mL; 组 6(3 只): MUC6-KLH(30 μg)加佐剂 0.25 mL; 组 7(5 只): MUC5AC(10 μg); 组 8(5 只): MUC6(10 μg); 组 9(5 只): KLH(10 μg); 组 10(5 只): 佐剂 0.25 mL; 组 11(5 只): 生理盐水 0.25 mL. 第 1 次免疫时应用完全福氏佐剂 , 2 wk 后第 2 次免疫 , 应用不完全福氏佐剂 , 2 wk 后再免疫第 3 次 , 以后隔 1 wk 免疫 1 次 , 共 3 次 , 每次均用不完全福氏佐剂. 最后 1 次免疫后 1 wk 按要求安乐处死小鼠 , 收集小鼠血清作 ELISA 以检测抗 MUC5AC 和 MUC6 合成肽的抗体 , 取小鼠脾脏并分离其淋巴细胞 , 测定淋巴细胞增生试验及其肿瘤细胞杀伤活性试验.

1.2.1 血清学试验 血清中抗 MUC5AC , MUC6 合成肽抗体的检测采用 EILISA 法. MUC5AC , MUC6 合成肽(10 μg/ 孔)包被在酶联板上 , 系列稀释的血清与包被的抗原孵育过夜 , 辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG 二抗(购自北京中山公司)室温孵育 3 h , 每孔加入底物(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 OPD)(300 μL) 反应. 以上各步之间均采用 PBS-Tween20 缓冲液冲洗各孔 3 次 , 每次 3 min. 每孔加入

3 mol/L NaOH(50 μL) 终止反应 , 测定波长 449 nm 处各孔的吸光度 A.

1.2.2 T 淋巴细胞试验 第 2 次免疫后 10 d 行迟发型皮肤过敏试验 , 在小鼠的脚掌内平均注射抗原 8 μg(溶于 PBS 内) , 24 h 和 48 h 后用游标卡尺测量各只经注射处的小鼠脚掌厚度. 末次免疫 1wk 后按要求安乐处死小鼠并无菌取脾 , 分离单个核细胞 , 体外培养于 RPMI1640 培养液(含 100 mL·L<sup>-1</sup> 小牛血清蛋白) , 其中含 MUC5AC 和 MUC6 合成肽(5 mg/L) 和 -hIL-2 100 mg/L , 并以 2 × 10<sup>5</sup> 个细胞 / 孔 加入 96 孔培养板上 , 在 37 °C 和 50 mL/L CO<sub>2</sub> 条件下孵育 3 d , 加入 18.5 kBq/L [<sup>3</sup>H]-TDR 18 h 后 , 用多头细胞收集仪收集细胞于 49 型玻璃纤维滤纸上 , 60 °C 烘干 , 膜片置闪烁杯中 , 每杯中加闪烁液 4 mL. 液闪仪测各管的 Bq 值.

1.2.3 细胞毒测定 取对数生长期的胃癌细胞株 7901 , 调成 1 × 10<sup>9</sup>/L 浓度 , 加入 <sup>3</sup>H-TDR 740 kBq/L , 置 37 °C 水浴中温育 4 h , 每隔 15 min 振荡 1 次 , 离心洗涤 3 次 , 配成所需浓度待用. 效应细胞杀伤活性的测定采用 <sup>3</sup>H-TDR 释放法微量细胞毒试验进行检测 , <sup>3</sup>H-TDR 标记的靶细胞配成 1 × 10<sup>9</sup>/L 浓度 , 待测效应细胞样本配成 5 × 10<sup>6</sup>/ml , 于 96 孔平底培养板中每孔加靶细胞及待测效应细胞各 0.1 ml , 此为实验组 ; 自然释放组不加效应细胞 , 用 RPMI1640 培养液 0.1 mL 代替 , 每组设 3 个复孔 , 置饱和湿度、 37 °C 、 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 4 h , 于培养终止前 30 min 每孔加 2 % 胰酶 10 μL , 消化 30 min , 用冷 Hanks 液 50 μL/ 孔终止消化. 经多头细胞收集器将样品收集于 49 型玻璃纤维滤纸上 . 60 °C 烘干 , 膜片置闪烁杯中 , 每杯中加闪烁液 4 mL , 液闪仪测各管 Bq 值. 效应细胞的杀伤活性用细胞毒指数(CI)表示. CI% = 1 - (实验组 Bq 值 - 本底 Bq 值) ÷ (自然释放组 Bq 值 - 本底 Bq 值) × 100 %. 效应细胞培养上清杀伤活性的测定 , 靶细胞的标记同前 , 收获培养一定时间的效应细胞(淋巴细胞)培养上清分别加入到含 <sup>3</sup>H-TDR 标记靶细胞的 96 孔培养板内 , 0.1 mL/ 孔 , 每组设 3 个复孔 , 置饱和湿度 , 在 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中于 37 °C 条件下培养 16-18 h , 多头细胞收集器收集细胞 , 用液闪仪测定残留靶细胞的 <sup>3</sup>H-TDR 掺入量. 阴性对照组加标记的靶细胞 0.1 mL/ 孔 , 以 RPMI1640 培养液代替效应细胞上清. 杀伤活性(%) = 1 - (实验组 Bq 值 ÷ 阴性对照组 Bq 值) × 100 %. 胃癌细胞株 7901 , Kato-3 中粘蛋白 MUC1 , MUC2 , MUC3 , MUC5AC , MUG6 核粘蛋白的表达采用免疫组化方法 , 方法同前<sup>[11,12]</sup>.

统计学处理 所得数据用 t 检验 , P < 0.05 为相差显著 ; P < 0.01 为相差非常显著.

## 2 结果

胃癌细胞株 7901 细胞中 MUC5AC , MUC6 核粘蛋白表达为强阳性或中等度阳性 , 故下列实验采用 7901 细胞株为细胞毒试验的靶细胞.

2.1 小鼠血清中抗 MUC5AC、抗 MUC6 合成肽的抗体 经 ELISA 法检测免疫后小鼠血清中抗 MUC5AC，抗 MUC6 合成肽的抗体，结果免疫原为单纯佐剂、单纯 KLH 和生理盐水的小鼠无抗 MUC5AC，抗 MUC6 合成肽的抗体产生；免疫原为单纯 10 μg 的 MUC5AC，MUC6 合成肽(连接型)，20 μg，30 μg 的 MUC5AC，和 20 μg，30 μg 的 MUC6 合成肽(非连接型)的小鼠均产生了相应的抗 MUC5AC，抗 MUC6 合成肽的抗体。这说明 MUC5AC、MUC6 的连接型和非连接型均能诱导小鼠的体液免疫反应并产生其相应的抗体。

2.2 小鼠皮肤迟发型过敏反应 经刺激原刺激后 24 h 和 48 h 测定小鼠脚掌厚度，MUC5AC，MUC6 合成肽与 KLH 的连接型小鼠的脚掌厚度较 MUC5AC，MUC6 合成肽的非连接型组、单纯 KLH 组、单纯生理盐水组和单纯佐剂组明显厚，这说明 MUC5AC，MUC6 合成肽与 KLH 的连接型加佐剂免疫小鼠后产生了皮肤迟发型过敏反应。而单纯 MUC5AC，单纯 KLH 和单纯佐剂均不能产生皮肤迟发型过敏反应，单纯 MUC6 合成肽则可能产生皮肤迟发型过敏反应。由于皮肤迟发型皮肤过敏反应是细胞免疫反应的表现形式，故 MUC5AC，MUC6 合成肽与 KLH 的连接型加佐剂可以诱导小鼠的细胞免疫反应(表 1)。

表 1 免疫小鼠的皮肤迟发过敏反应

Group	Immunogen	Stimulus	24 h 脚掌厚度 (n=5, $\bar{x} \pm s$ , mm)	48 h 后的脚掌厚度 (n=5, $\bar{x} \pm s$ , mm)
1 MUC5AC - KLH+adjuvant	MUC5AC	29.9 ± 0.9 <sup>b</sup>	30 ± 1.9 <sup>b</sup>	
2 MUC6-KLH+adjuvant	MUC6	28 ± 3.4 <sup>a</sup>	32 ± 3.5	
3 MUC5AC	MUC5AC	18 ± 1.6	21 ± 1.6	
4 MUC6(10 μg)	MUC6	22 ± 2.5	29 ± 1.8	
5 Saline	MUC5AC	19 ± 1.8	22 ± 1.6	
6 KLH	KLH	22 ± 0.6	23 ± 1.8	
7 adjuvant	MUC6	20 ± 1.8	22 ± 2.1	

<sup>b</sup>P < 0.01 vs 3,5,6,7 组；<sup>a</sup>P < 0.05 vs 4,5,6,7 组。

2.3 小鼠脾淋巴细胞的增生反应 MUC5AC，MUC6 合成肽的连接型与佐剂组和单纯合成肽、生理盐水和单纯佐剂组相比，他们淋巴细胞的<sup>3</sup>H-TDR 标记率无差别，而<sup>3</sup>H-TDR 标记率(Bq)反映了培养中的淋巴细胞的增生反应能力，这提示我们，尽管 MUC5AC，MUC6 合成肽的连接型可以诱导小鼠的体液免疫和细胞免疫反应，但我们所设计的实验并没有发现其免疫小鼠的淋巴细胞增生率较其他组高，具体的原因目前并不清楚，可能与所用的佐剂或使用免疫原的量较少有关。所以我们分别用 10，20，30 μg 的 MUC5AC，MUC6 合成肽的连接型与佐剂免疫不同的小鼠，并在同一条条件下测定各小鼠脾淋巴细胞的<sup>3</sup>H-TDR 标记率，结果 30 μg 组较 10，20 μg 组有增高的趋势，但经统计学分析他们之间并没有显著差别(P > 0.05)，进而提示小鼠淋巴细

胞的增生率与 MUC5AC，MUC6 合成肽的连接型抗原加入量之间可能无关。

2.4 小鼠脾淋巴细胞的细胞毒测定 MUC5AC，MUC6 合成肽的连接型与佐剂组和单纯合成肽、生理盐水和单纯佐剂组相比，小鼠脾细胞及其培养上清在体外对胃癌细胞株 7901 无明显的杀伤作用。这提示 MUC5AC，MUC6 合成肽的连接型虽然可以一定程度上诱导机体的体液免疫和细胞免疫应答，但我们设计的 MUC5AC，MUC6 合成肽尚不足以诱导小鼠的抗肿瘤免疫反应。将来使用其他不同的 MUC5AC，MUC6 合成肽分子的实验及实验方法的改进是需要的。

### 3 讨论

一些人类肿瘤抗原已被证明可诱发机体的细胞免疫和体液免疫反应，而细胞免疫在抑制肿瘤生长中起重要作用。

本研究证明，MUC5AC，MUC6 合成肽与 KLH 的连接型加用福氏佐剂不仅可以诱发小鼠的体液免疫，还可诱发细胞免疫反应，但不能诱导小鼠淋巴细胞在体外的增生反应，因而不能使小鼠淋巴细胞或其培养上清产生体外杀伤肿瘤细胞活性，而单纯应用 MUC6，MUC5AC 合成肽组小鼠不能产生皮肤迟发性过敏反应，这说明 KLH 和佐剂在诱发细胞免疫中起了很重要的作用，可能是起加强抗原提呈的作用。粘蛋白在癌变时可发生质和量的改变，出现新的抗原表位。由于 MUC1 是最先与机体免疫系统接触的细胞表面分子之一，且含有许多连续重复序列，可作为一种抗原使 T 细胞的 TCR 交联，从而不需要 MHC 的参与就可活化细胞毒淋巴细胞(CTL)，即他对 CTL 的活化是非 MHC 限制性的。因此 MUC1 是肿瘤主动特异性免疫治疗理想的靶分子<sup>[6-8]</sup>。目前已设计了多种基于 MUC1 的免疫原，如表达 MUC1 的细胞、从癌细胞中纯化的 MUC1、重组核心蛋白、转染细胞产生的 MUC1 糖型、含有连续重复序列的肽或糖肽，表达 MUC1 cDNA 的重组病毒，合成的糖链疫苗、MUC1 核酸疫苗、抗 MUC1 抗体，作为一种新的黏液瘤苗用于肿瘤治疗的研究，其中含连续重复序列的肽，合成的糖链疫苗和抗 MUC1 抗体已应用于临床，并取得了一定的结果<sup>[11]</sup>。

属于粘蛋白家族的 MUC2，MUC3，MUC4，MUC5 和 MUC6 粘蛋白同样在肿瘤中是不完全糖基化的，而正常组织是高度糖基化的，并且 MUC2，MUC5 和 MUC6 这些粘蛋白与 MUC1 粘蛋白不同，他们不存在细胞表面，而是以分泌型粘蛋白存在于人体的一些腔道内，几无可能暴露于免疫系统。所以进一步研究这些粘蛋白前体是否可诱发抗肿瘤的免疫反应，对探索一些新的粘蛋白瘤苗具有潜在的价值。国内袁玫 et al<sup>[9]</sup> 研究提示，MUC2 和 MUC3 可能诱发细胞免疫，证据主要是(1)核心肽加 Detox 免疫小鼠后，皮内注射 MUC2 或 MUC3 都可诱发皮肤迟发过敏反应；(2)抗 MUC2 及

MUC3的抗体都可不同程度地阻断核心肽的免疫小鼠的淋巴细胞毒作用。而我们用 MUC5AC , MUC6 合成肽免疫小鼠引发了体液和细胞免疫反应,但尚不足以产生淋巴细胞毒作用,究其原因,可能与(1)所使用的佐剂是福氏佐剂,这种佐剂主要引起体液免疫反应,这被我们的ELISA检测结果证实,细胞免疫很弱,而马远国及其他报道所采用的佐剂为专门诱发细胞免疫反应为主的佐剂,如 Detox 和 QS-21<sup>[12]</sup>; (2)采用检测细胞毒的方法,<sup>51</sup>Cr 释放法可能比<sup>3</sup>H-TDR 释放法更敏感。所以进一步改进实验的设计方法进行研究还是需要的。此外合成肽的连接型(与 KIH 相连)能产生高滴度的抗体,这对于设计合成新的黏液瘤苗是必须的;(3) de Bolos 所设计的合成肽主要目的是制备其相应的检测抗体,可能在诱导细胞免疫方面的作用较弱,所以进一步使用不同合成肽分子的实验是必须的。

#### 4 参考文献

- 1 Hanisch FG, Muller S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology* 2000;10:429-449
- 2 Velcich A, Yang WC, Heyer J, Fragale A, Nicholas C, Viani S, Kucherlapati R, Lipkin M, Yang K, Augenlicht L. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the Mucin Muc2. *Science* 2002; 295:1726-1729
- 3 Williams SJ, Wreschner DH, Tran M, Eyre HJ, Sutherland GR, McGuckin MA. MUC13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells. *J Biol Chem* 2001;276: 18327-18336
- 4 Perrais M, Pigny P, Buisine MP, Porchet N, Aubert JP, Van Seuningen-Lempire I. Aberrant expression of human mucin gene MUC5B in gastric carcinoma and cancer cells. Identification and regulation of a distal promoter. *J Biol Chem* 2001;276:15386-15396
- 5 Gum JR Jr, Crawley SC, Hicks JW, Szymkowski DE, Kim YS. MUC17, a novel membrane-tethered mucin. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 466-475
- 6 Zhang SL, Graeber LA, Hellings F, Ragupathi G, Adluri S, Lloyd KO, Livingstone PO. Augmenting the immunogenicity of synthetic MUC1 peptide vaccines in mice. *Cancer Res* 1996;56:3315-3319
- 7 Graham RA, Burchell JM, Beverly P, Taylor-Papadimitriou J. Intramuscular immunization with MUC1 cDNA can protect C57 mice challenged with MUC1-expressing syngeneic mouse tumor cells. *Int J Cancer* 1996;65:664-670
- 8 Balloul JM, Acres RB, Geist M, Dott K, Stefani L, Schmitt D, Drillien R, Spehner D, McKenzie I, Xing PX. Recombinant MUC1 vaccinia virus: a potential vector for immunotherapy of breast cancer. *Cell Mol Biol* 1994;40:49-59
- 9 袁政,马远国,费丽华. 人癌相关粘蛋白前体诱发小鼠抗肿瘤免疫反应的研究. 中华肿瘤杂志 1996;18:419-421
- 10 de Bolos C, Garrido M, Real FX. MUC6 apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the human stomach. *Gastroenterology* 1995;109: 723-734
- 11 Kontani K, Taguchi O, Ozaki Y, Hanaoka J, Tezuka N, Sawai S. Novel vaccination protocol consisting of injecting MUC1 DNA and nonprimed dendritic cells at the same region greatly enhanced MUC1-specific antitumor immunity in a murine model. *Cancer Gene Ther* 2002;9:330-337
- 12 Mitchell MS. Cancer vaccines, a critical review—Part II. *Curr Opin Investig Drugs* 2002;3:150-158

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单 (2002-07-19)

本刊讯 美国《医学索引》(Index Medicus / MEDLINE , IM )是世界上公认的重要的医学检索工具,由世界上最大的医学信息中心 - 美国国立医学图书馆 ( National Library of Medicine , NLM )编辑出版.2002 年度美国国立医学图书馆收录我国医学期刊 58 种,分别为法医学杂志 ( 中 ),湖南医科大学学报 ( 中 ),华西口腔医学杂志 ( 中 ),华西医科大学学报 ( 中 ) 环境科学 ( 中 ),临床耳鼻咽喉科杂志 ( 中 ),色谱 ( 中 ),生理科学进展 ( 中 ),生理学报 ( 中 ) 生物工程学报 ( 中 ),生物化学与生物物理杂志 ( 中 ),生物医学工程学杂志 ( 中 ) 实验生物学报 ( 中 ),世界胃肠病学杂志 ( 英 ),同济医科大学学报 ( 英 ),微生物学报 ( 中 ) 卫生研究 ( 中 ),细胞研究 ( 英 ),香港医学杂志 ( 英 ) 亚洲男科学杂志 ( 英文版 ),亚洲太平洋公共健康杂志 ( 英 ),眼科学报 ( 中 ),药学学报 ( 中 ),遗传学报 ( 中 ),应用生态学报 ( 中 ) 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 ( 中 ),中国科学 ( C 编 ) ( 英 ),中国修复重建外科杂志 ( 中 ) 中国药理学报 ( 英 ),中国医疗器械杂志 ( 中 ),中国医学科学院学报 ( 英 ),中国医学科学院学报 ( 中 ),中国应用生理学杂志 ( 中 ),中国中西医结合杂志 ( 中 ),中国中药杂志 ( 中 ) 中华病理学杂志 ( 中 ),中华创伤杂志 ( 英 ),中华妇产科杂志 ( 中 ),中华肝脏病杂志 ( 中 ) 中华结核和呼吸杂志 ( 中 ),中华口腔医学杂志 ( 中 ),中华内科杂志 ( 中 ),中华烧伤杂志 ( 中 ),中华实验和临床病毒学杂志 ( 中 ),中华外科杂志 ( 中 ),中华血液学杂志 ( 中 ),中华眼科学杂志 ( 中 ),中华医学遗传学杂志 ( 中 ),中华医学杂志 ( 英 ),中华医学杂志 ( 中 ),中华预防医学杂志 ( 中 ),中华整形烧伤外科杂志 ( 中 ),中药材 ( 中 ),中医杂志 ( 英 ).

(世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

# 胰腺癌 p57<sup>kip2</sup> 和 p27<sup>kip1</sup> 蛋白的表达及与临床病理关系研究

岳 辉,于皆平,曹玉华,赵 昕

岳辉,曹玉华,赵昕,沈阳军区总医院消化内科 辽宁省沈阳市 110016  
于皆平,武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060  
岳辉,男,1962-12-07生,辽宁省辽阳市人,汉族。1987年在中国医科大学医学系本科毕业,1990年中国医科大学医学硕士研究生毕业,2002年武汉大学医学博士研究生毕业,副主任医师,主要从事消化道肿瘤基础及临床研究。  
项目负责人:岳辉,110016,辽宁省沈阳市沈河区文化路83号,沈阳军区总医院消化内科。yh12070430@sina.com.  
电话:024-23056031 传真:024-83910176  
收稿日期:2002-10-08 接受日期:2002-10-29

## Expression of p57<sup>kip2</sup> and p27<sup>kip1</sup> proteins and its relationship with clinicopathology in human pancreatic cancer

Hui Yue,Jie-Ping Yu,Yu-Hua Cao,Xin Zhao

Hui Yue, Yu-Hua Cao, Xin Zhao, Department of Gastroenterology, General Hospital of Shenyang Military Command, Shenyang 110016, Liaoning Province, China  
Jie-Ping Yu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China  
Correspondence to: Dr. Hui Yue, Department of Gastroenterology, General Hospital of Shenyang Military Command, Shenyang 110016, Liaoning Province, China. yh12070430@sina.com  
Received:2002-10-08 Accepted:2002-10-29

## Abstract

AIM: To investigate the effects of p57<sup>kip2</sup> and p27<sup>kip1</sup> proteins on the development and progression of pancreatic cancer.

METHODS: Expression of p57<sup>kip2</sup> and p27<sup>kip1</sup> proteins in tumor and adjacent tissues of 32 patients with pancreatic cancer were detected by SP immunohistochemical technique.

RESULTS: p57<sup>kip2</sup> protein positive rate in tumor tissues of pancreatic cancer was 46.9 %, which was lower than that in adjacent pancreatic tissues (75.0 %) ( $\chi^2=5.317, P < 0.05$ ), p57<sup>kip2</sup> protein expression correlated remarkably with tumor cell differentiation ( $\chi^2=4.979, P < 0.05$ ), but did not correlate with lymph node metastasis ( $\chi^2=3.698, P < 0.05$ ); p27<sup>kip1</sup> protein positive rate in the tumor tissues was 56.3 %, which was lower than that in adjacent pancreatic tissues (84.4 %) ( $\chi^2=6.063, P < 0.05$ ). p27<sup>kip1</sup> expression was correlated remarkably with tumor cell differentiation and lymph node metastasis ( $\chi^2=5.776; \chi^2=4.097, P < 0.05$ ). p57<sup>kip2</sup> protein positive rate (50.0 %) in p27<sup>kip1</sup> protein positive group was higher than that (42.9 %) in p27<sup>kip1</sup> protein negative group, and there was no significant correlation between the two groups ( $r=0.19657, P > 0.05$ ).

CONCLUSION: p57<sup>kip2</sup> and p27<sup>kip1</sup> proteins may play an important role in carcinogenesis and progression of human pancreatic cancer. Decreased expression of p57<sup>kip2</sup> and p27<sup>kip1</sup> proteins is subject to the development of pancreatic cancer

and determination of cell differentiation degree, and helpful to evaluate prognosis of the diseases.

Yue H, Yu JP, Cao YH, Zhao X. Expression of p57<sup>kip2</sup> and p27<sup>kip1</sup> proteins and its relationship with clinicopathology in human pancreatic cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(3):318-320

## 摘要

目的:探讨p57<sup>kip2</sup>和p27<sup>kip1</sup>蛋白在胰腺癌发生发展中的作用及与临床病理特征的关系。

方法:采用免疫组化技术SP法,检测p57<sup>kip2</sup>和p27<sup>kip1</sup>蛋白在32例胰腺癌组织和癌旁胰腺组织中的表达情况。

结果:p57<sup>kip2</sup>蛋白阳性表达率在胰腺癌组织中为46.9%,显著低于癌旁胰腺组织(75.0%)( $\chi^2=5.317, P < 0.05$ ),并与胰腺癌组织分化程度有关( $\chi^2=4.979, P < 0.05$ ),而与淋巴结转移无关( $\chi^2=3.698, P > 0.05$ )。p27<sup>kip1</sup>蛋白阳性表达率在胰腺癌组织中为56.3%,显著低于癌旁胰腺组织(84.4%)( $\chi^2=6.063, P < 0.05$ ),并与胰腺癌组织分化程度和淋巴结转移均有关( $\chi^2=5.776; \chi^2=4.097, P < 0.05$ )。p27<sup>kip1</sup>阳性胰腺癌组p57<sup>kip2</sup>蛋白表达阳性率50.0%高于p27<sup>kip1</sup>阴性胰腺癌组p57<sup>kip2</sup>蛋白表达阳性率42.9%,但二者无显著相关( $r=0.19657, P > 0.05$ )。

结论:p57<sup>kip2</sup>和p27<sup>kip1</sup>蛋白的低表达可能与胰腺癌发生发展密切相关;p57<sup>kip2</sup>和p27<sup>kip1</sup>蛋白表达均降低有助于胰腺癌的发生及细胞分化程度及预后的判定。

岳辉,于皆平,曹玉华,赵昕. 胰腺癌 p57<sup>kip2</sup> 和 p27<sup>kip1</sup> 蛋白的表达及与临床病理关系研究. 世界华人消化杂志 2003;11(3):318-320

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/318.htm>

## 0 引言

胰腺癌的发病率在世界范围内均有增加,而且预后差<sup>[1-3]</sup>。p57<sup>kip2</sup>和p27<sup>kip1</sup>蛋白是细胞周期抑制蛋白,他们抑制细胞周期G<sub>1</sub>期向S期的转换,从而抑制细胞增生。但细胞周期G<sub>1</sub>/S期负向调控因子p57<sup>kip2</sup>和p27<sup>kip1</sup>蛋白表达与胰腺癌关系的研究很少,我们采用免疫组化技术SP法检测胰腺癌组织和癌旁组织p57<sup>kip2</sup>和p27<sup>kip1</sup>蛋白的表达,旨在探讨二者在胰腺癌的发生发展中的作用及与临床病理特征的关系。

## 1 材料和方法

1.1 材料 沈阳军区总医院和中国医科大学第一临床学院手术切除胰腺癌标本32例,男20例,女12例;年龄

26-72岁(平均59.9岁). 所有术前均未经放、化疗. 其中高分化胰腺癌19例, 中低度分化胰腺癌13例, 12例有淋巴结转移. 抗 p57<sup>kip2</sup> 鼠抗人单克隆抗体(57P06)、抗 p27<sup>kip1</sup> 鼠抗人单克隆抗体(DCS-72.F6)和SP试剂盒(UltraSensitive™)及3,3-二氨基联苯胺(DAB)显色试剂均购自福州迈新生物技术公司, 即用型.

**1.2 方法** 所有标本分别在癌灶中央、癌旁组织常规取材, 甲醛固定, 石蜡包埋, 制备成4 μm厚连续切片. 采用免疫组化技术为链霉亲和素-生物素过氧化物酶复合物(S-P)法, 以高温高压行抗原修复, 以PBS代替一抗作为空白对照, 以已知p57<sup>kip2</sup>、p27<sup>kip1</sup>阳性切片作为阳性对照. p57<sup>kip2</sup>和p27<sup>kip1</sup>蛋白以胞核或胞质染色为棕黄色颗粒者为阳性反应细胞, 400倍显微镜下每张载玻片计数5个视野, 每个视野100个细胞, 依据染色阳性细胞所占细胞的百分比, 将结果分为阴性(-):标本中无阳性反应细胞或<10%; 阳性(+):按标本中阳性细胞所占细胞的百分比分为:+10-25%, ++25-50%, +++>50%.

统计学处理 SAS System (Release6.12)统计软件包,  $\chi^2$ 检验和确切概率法, 显著性水准为P<0.05.

## 2 结果

**2.1 p57<sup>kip2</sup>蛋白的表达** p57<sup>kip2</sup>蛋白定位于正常胰腺细胞和阳性病例的胰腺癌细胞核或胞质中, 呈较细的棕黄色颗粒, 但以细胞核染色为主, 见图1. 胰腺癌组织中p57<sup>kip2</sup>蛋白阳性表达率为46.9%显著低于癌旁胰腺组织(75.0%)( $\chi^2=5.317$ , P<0.05). 中低分化胰腺癌组织p57<sup>kip2</sup>蛋白阳性表达率为23.1%显著低于高分化者(63.2%)( $\chi^2=4.979$ , P<0.05). 有淋巴结转移组p57<sup>kip2</sup>蛋白阳性表达率为25.0%低于无淋巴结转移组(60.0%), 但二组无显著差异( $\chi^2=3.698$ , P>0.05).

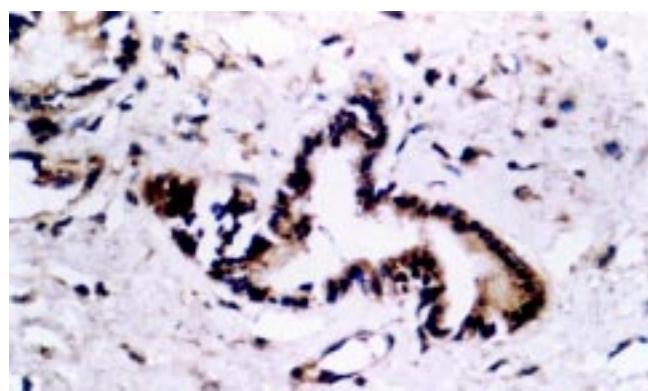


图1 p57<sup>kip2</sup>蛋白在胰腺癌组织中的表达 SP × 400.

**2.2 p27<sup>kip1</sup>蛋白的表达** p27<sup>kip1</sup>蛋白定位于正常胰腺细胞和阳性病例的胰腺癌细胞核或胞质中, 呈较细的棕黄色颗粒, 但以细胞核染色为主, 见图2. 胰腺癌组织中p27<sup>kip1</sup>蛋白阳性表达率为56.3%显著低于癌旁胰腺组织(84.4%)( $\chi^2=6.063$ , P<0.05). 中低分化胰腺癌组织p27<sup>kip1</sup>蛋白阳性表达率为30.8%显著低于高分化者(73.7%)

( $\chi^2=5.776$ , P<0.05). 有淋巴结转移组p27<sup>kip1</sup>蛋白阳性表达率为33.3%显著低于无淋巴结转移组(70.0%)( $\chi^2=4.097$ , P<0.05).

**2.3 胰腺癌组织 p27<sup>kip1</sup> 与 p57<sup>kip2</sup> 蛋白表达的关系** p27<sup>kip1</sup>阳性胰腺癌组 p57<sup>kip2</sup>蛋白表达阳性率(50.0%)高于p27<sup>kip1</sup>阴性胰腺癌组 p57<sup>kip2</sup>蛋白表达阳性率(42.9%), 但二者无相关( $r=0.19657$ , P>0.05). 见表1.

表1 胰腺癌组织 p27<sup>kip1</sup> 和 p57<sup>kip2</sup> 表达的关系

p27 <sup>kip1</sup>	n	p57 <sup>kip2</sup>				阳性表达率(%)
		-	+	++	+++	
-	32	17	11	3	1	
-	14	8	4	2	0	42.9
+	8	6	2	0	0	50.0
++	8	3	3	1	1	
+++	2	0	2	0	0	

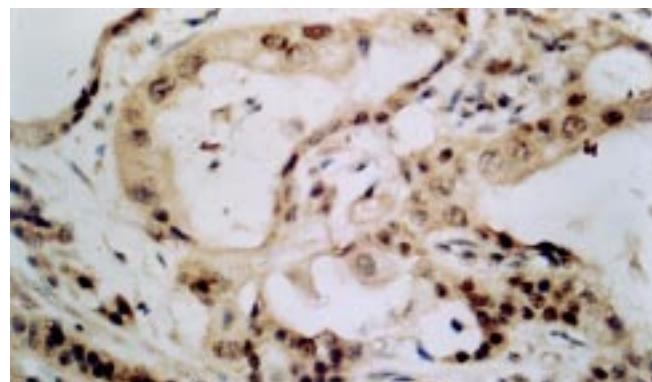


图2 p27<sup>kip1</sup>蛋白在胰腺癌组织中的表达 SP × 400.

## 3 讨论

近年的细胞周期调控研究证实细胞周期G<sub>1</sub>期的调控是由多种细胞周期调控因子参与的复杂过程, 而且细胞周期G<sub>1</sub>期调控异常与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[4-10]</sup>. p57<sup>kip2</sup>蛋白是细胞周期负性调控因子, 其基因定位于11p15.5染色体, 为p57<sup>kip2</sup>基因的表达产物, 属CIP/KIP家族, 与p21, p57功能相似<sup>[11,12]</sup>. Lee et al<sup>[13]</sup>认为p57<sup>kip2</sup>基因在肿瘤的发生发展中起着重要作用, 而且其抑癌作用可能是其产物p57<sup>kip2</sup>蛋白与Cyclin-CDK复合物结合, 阻止细胞增生, 从而使细胞周期停滞在G<sub>1</sub>期. Kondon et al<sup>[14]</sup>认为在正常情况下, p57<sup>kip2</sup>基因为父源等位基因被印记, 母源基因表达, 在一些肿瘤中存在p57<sup>kip2</sup>基因印记缺失(loss of imprinting, LOI)或印记错误, 导致基因表达下降. Matsumoto et al<sup>[15]</sup>采用免疫组化技术研究92例食管鳞状细胞癌p57<sup>kip2</sup>蛋白阳性表达率为43.3±3.2%, 其后关于p57<sup>kip2</sup>蛋白在大肠癌、上皮性卵巢肿瘤、肝癌、甲状腺癌、肝外胆管癌及肝内胆管癌表达研究相继被报道<sup>[16-24]</sup>, 但p57<sup>kip2</sup>蛋白表达与胰腺癌的关系很少被报道<sup>[25]</sup>. 本结果显示胰腺癌组织中p57<sup>kip2</sup>蛋白表达阳性率显著低于癌旁胰腺组织, 胰

腺癌组织中 p57<sup>kip2</sup> 蛋白表达强度随着恶性程度的增高而降低，但 p57<sup>kip2</sup> 蛋白的低表达或缺失与淋巴结转移无显著相关，提示 p57<sup>kip2</sup> 蛋白的表达降低与胰腺癌的发生、恶性程度的判定有关，而与淋巴结转移无关。p27<sup>kip1</sup> 蛋白是 Polyak et al [26] 于 1994 年用转化生长因子 - $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 处理生长抑制细胞及接触生长抑制的细胞株中发现的一种相对分子量为 27kd 的耐热细胞周期抑制蛋白，是 p27<sup>kip1</sup> 基因的表达产物，亦属 CIP/KIP 家族；国外学者认为 p27<sup>kip1</sup> 基因在肿瘤的发生发展中起着重要作用，但很少发现有 p27<sup>kip1</sup> 基因的缺失和突变，认为其抑癌作用可能是其产物 p27<sup>kip1</sup> 蛋白在转录后水平以化学剂量方式与 Cyclin-CDK 复合物结合，阻止细胞增生，从而使细胞周期停滞在 G<sub>1</sub> 期[27]。在多种肿瘤中，已有 p27<sup>kip1</sup> 蛋白表达水平低下或缺失的报道[28-30]，但 p27<sup>kip1</sup> 蛋白在胰腺癌组织中的表达仅见国外一篇报道[31]。本研究结果显示胰腺癌组织中 p27<sup>kip1</sup> 蛋白表达阳性率显著低于癌旁胰腺组织，胰腺癌组织中 p27<sup>kip1</sup> 蛋白表达强度随着恶性程度的增高而降低，p27<sup>kip1</sup> 蛋白的低表达或缺失与淋巴结转移有关，提示 p27<sup>kip1</sup> 蛋白的表达降低与胰腺癌的发生、恶性程度的判定及淋巴结转移有密切的关系。这与 Thomas et al [32] 研究 p27<sup>kip1</sup> 蛋白的表达与大肠癌转移的关系所得到的结论一致。p27<sup>kip1</sup> 蛋白表达阳性组 p57<sup>kip2</sup> 蛋白阳性表达率高于 p27<sup>kip1</sup> 蛋白表达阴性组 p57<sup>kip2</sup> 蛋白阳性表达率，但两组无显著相关，提示 p57<sup>kip2</sup> 和 p27<sup>kip1</sup> 蛋白可能在不同的细胞周期途径上发挥其抑癌作用。

总之，p57<sup>kip2</sup> 和 p27<sup>kip1</sup> 可能与胰腺癌发生发展密切相关；p57<sup>kip2</sup> 和 p27<sup>kip1</sup> 蛋白表达均降低有助于胰腺癌的发生和恶性程度及预后的判定，但 p57<sup>kip2</sup> 蛋白低表达与胰腺癌淋巴结转移无关。

#### 4 参考文献

- 1 Conlon KC, Klinstra DS, Brenna MF. Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma: clinicopathological analysis of 5-year survivors. *Ann Surg* 1996; 223:273-279
- 2 Spanknebel K, Conlon KC. Advances in the surgical management of pancreatic cancer. *Cancer J* 2001; 7:312-323
- 3 Karpoff HM, Klimstra DS, Brennan MF, Conlon KC. Results of total pancreatectomy for adenocarcinoma of the pancreas. *Arch Surg* 2001; 136:44-47
- 4 Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockent E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264:436-444
- 5 Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinase(CDKs), growth suppressor and cyclin dependent kinase inhibitors(CDKIs). *J Oncogene* 1995; 11:211-219
- 6 Sherr CJ. G<sub>1</sub> phase progression: cyclins on cue. *Cell* 1994; 79:551-555
- 7 Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274:1672-1677
- 8 Kamb A. Cell-cycle regulators and cancer. *J Trends Genet* 1995; 11:136-140
- 9 Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer : Cyclins and CDK inhibitors come of age. *Cell* 1994; 79:573-576
- 10 Clurman BE, Roberts JM. Cell cycle and cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:1499-1504
- 11 Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ. p57<sup>kip2</sup> a structurally distinct member is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 1995; 9:650-662
- 12 Orlow I, Iavarone A, Crider-Miller SJ, Bonilla F, Latres E, Lee MH, Gerald WL, Massague J, Weissman BE, Cordon-Cardo C. Cyclin-dependent kinase inhibitor p57<sup>kip2</sup> in soft tissue sarcoma and Wilms tumor. *Cancer Res* 1996; 56:1219-1221
- 13 Lee MH, Reynisdottir I, Massague J. Cloning of p57<sup>kip2</sup>, a cyclin dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 1995; 9:639-649
- 14 Kondo M, Matsuka S, Uchida K, Osada H, Nagatake M, Takagi K, Harper JW, Takahashi T, Elledge SJ. Selective maternal allele loss in human lung cancers of the maternally expressed p57<sup>kip2</sup> gene at 11p15.5. *Oncogen* 1996; 12:1365-1368
- 15 Matsumoto M, Farihata M, Ohtsuki Y, Sasaguri S, Ogoshi S. Immunohistochemical characterization of p57<sup>kip2</sup> expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2000; 20:1947-1952
- 16 Noura S, Yamamoto H, Sekimoto M, Takemasa I, Miyake Y, Ikenaga M, Matsuura N, Monden M. Expression of second class of KIP protein p57KIP2 in human colorectal carcinoma. *Int J Oncol* 2001; 19:39-47
- 17 Ito Y, Takeda T, Sakon M, Tsujimoto M, Monden M, Matsuura N. Expression of p57/Kip2 protein in hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2001; 61:221-225
- 18 Nakai S, Masaki T, Shiratori Y, Ohgi T, Morishita A, Kurokohchi K, Watanabe S, Kuriyama S. Expression of p57(KIP2) in hepatocellular carcinoma: relationship between tumor differentiation and patient survival. *Int J Oncol* 2002; 20:769-775
- 19 Schwarze SR, Shi Y, Fu VX, Watson PA, Jarrard DF. Role of cyclin-dependent kinase inhibitors in the growth arrest at senescence in human prostate epithelial and uroepithelial cells. *Oncogene* 2001; 20:8184-8192
- 20 Ito Y, Yoshida H, Nakano K, Kobayashi K, Yokozawa T, Hirai K, Matsuzaka F, Matsuura N, Kuma K, Miyachi A. Expression of p57/Kip2 protein in normal and neoplastic thyroid tissues. *Int J Mol Med* 2002; 9:373-376
- 21 Rosenberg E, Demopoulos RI, Zeleniuch-Jacquotte A, Yee H, Sorich J, Speyer JL, Newcomb EW. Expression of cell cycle regulators p57(KIP2), cyclin D1, and cyclin E in epithelial ovarian tumors and survival. *Hum Pathol* 2001; 32:808-813
- 22 Ito Y, Takeda T, Sasaki Y, Sakon M, Yamada T, Ishiguro S, Imaoka S, Tsujimoto M, Monden M, Matsuura N. Expression of p57/Kip2 protein in extrahepatic bile duct carcinoma and intrahepatic cholangiocellular carcinoma. *Liver* 2002; 22:145-149
- 23 Zhou Y, Gao SS, Li YX, Fan ZM, Zhao X, Qi YJ, Wei JP, Zou JX, Liu G, Jiao LH, Bai YM, Wang LD. Tumor suppressor gene p16 and Rb expression in gastric cardia precancerous lesions from subjects at a high incidence area in northern China. *World J Gastroenterol* 2002; 8:423-425
- 24 Lee MH, Yang HY. Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58:1907-1922
- 25 Ito Y, Takeda T, Wakasa K, Tsujimoto M, Matsuura N. Expression of p57/Kip2 protein in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 2001; 23:246-250
- 26 Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. p27<sup>kip1</sup>, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; 8:9-22
- 27 Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of p27<sup>kip1</sup>, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994; 78:59-66
- 28 Mayr B, Wilhelm B, Reifinger M, Brem G. Absence of p21 WAF1 and p27 kip1 gene mutations in various feline tumors. *Vet Res Commun* 2000; 24:115-124
- 29 Guo SS, Wu X, Shimoide AT, Wong J, Sawicki MP. Anomalous overexpression of p27(Kip1) in sporadic pancreatic endocrine tumors. *J Surg Res* 2001; 96: 284-288
- 30 Canavese G, Azzoni C, Pizzi S, Corleto VD, Pasquali C, Davoli C, Crafa P, Delle FG, Bordi C. p27: a potential main inhibitor of cell proliferation in digestive endocrine tumors but not a marker of benign behavior. *Hum Pathol* 2001; 32:1094-1101
- 31 Hu YX, Watanabe H, Li P, Wang Y, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Sawabu N. An immunohistochemical analysis of p27 expression in human pancreatic carcinomas. *Pancreas* 2000; 21:226-230
- 32 Thomas GV, Szigeti K, Murphy M, Draetta G, pagano M, Loda M. Down-regulation of p27 is associated with development of colorectal adenocarcinoma metastases. *Am J Pathol* 1998; 153: 681-687

# 重组复制缺陷型腺病毒基因治疗肝纤维化的研究与应用

林 勇,陈伟忠,谢渭芬,张忠兵

林勇,陈伟忠,谢渭芬,张忠兵,中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科 上海市 200003  
上海市青年科技启明星计划资助项目, No.00QB14054  
全军医药卫生科研基金课题面上项目, No. 01MA153  
项目负责人:谢渭芬,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。weifexie@yahoo.com  
电话:021 - 63610109 - 73251 传真:021 - 68452002  
收稿日期:2002-08-10 接受日期:2002-08-23

## 摘要

肝纤维化的特征性变化是肝内细胞外基质的过多沉积。抑制肝星形细胞的激活和细胞外基质的合成,促进基质降解和肝细胞再生是肝纤维化治疗的重要方法。近年来,针对上述环节构建重组复制缺陷型腺病毒表达不同外源基因产物基因治疗肝纤维化研究取得了较大的进展。本文对重组腺病毒的结构、构建以及抗肝纤维化作用和安全性研究作一综述。

林勇,陈伟忠,谢渭芬,张忠兵. 重组复制缺陷型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(3): 321 - 325  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/321.htm>

## 0 引言

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是肝脏对慢性损伤的一种修复反应,是慢性肝病共有的病理改变,其特征性改变是肝内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过多沉积。近年来,针对肝纤维化发生的各个环节,如抑制肝星形细胞(hepatitis stellate cell, HSC)激活和ECM合成,促进基质降解和肝细胞再生等方面,构建了各种携带外源目的基因的病毒载体,为肝纤维化的基因治疗提供了有力的手段<sup>[1-4]</sup>。由于复制缺陷型腺病毒能较好地克服以往病毒载体的缺点,加之其具有宿主范围广、可感染分裂期及静止期细胞、包装容量大、不发生整合、繁殖滴度高、性质稳定等优点,业已成为基因治疗中被广泛应用的载体系统。随着腺病毒载体广泛应用于基因治疗等医学研究领域,构建重组腺病毒的方法也有了新的突破<sup>[5,6]</sup>。本文将应用重组复制缺陷型腺病毒基因治疗肝纤维化的研究进展作一综述。

1 腺病毒的结构和重组复制缺陷型腺病毒的构建方法  
人腺病毒(adenovirus, Ad)是一群分布广泛的呼吸道病毒,无包膜的对称 20 面体。Ad 基因组为双股 DNA,呈线性,36 Kb,分早期转录区和晚期转录区,前者有 E1、E2、E3、E4 四个区,编码病毒调节蛋白;后者分 L1、L2、L3、L4、L5 五个区,编码病毒结构蛋白。目前对人腺病毒的分子生物学特性研究最为详

细的是人腺病毒 2 型(adenovirus type 2, Ad2)和人腺病毒 5 型(Ad5),大多数腺病毒载体就是以 Ad2 和 Ad5 为基础构建的。为了在病毒基因组的特定位点插入目的基因,并得到能够表达外源基因的重组病毒,传统方法通常造成 E1 和 / 或 E3 区缺失,使病毒复制缺陷,同时在 E1、E2、E3、E4 等位置将含有外源基因的酶切片段与腺病毒基因组片段在 DNA 连接酶的作用下,直接进行体外连接,然后转染细胞;或将带有外源基因和同源区的穿梭质粒与病毒的核酸大片段共转染哺乳动物包装细胞 293 或 911,在相关酶系的作用下,通过同源重组机制获得表达外源基因的复制缺陷型重组病毒<sup>[7-10]</sup>。这两种方法繁琐低效的缺点限制了腺病毒载体的更广泛应用。随着腺病毒载体基因治疗研究的不断深入,构建重组腺病毒的方法有了很大的改进。Okada et al<sup>[11]</sup>通过同源重组产生的复制缺陷型腺病毒 AVC2. null 感染 293 细胞,分离 AVC2. null DNA- 蛋白质复合物,使用二种黏端酶酶切得到非互补 5' 黏末端,再与同样酶切处理的外源基因片段直接相连。因为只有通过外源基因才能将 DNA- 蛋白质复合物的左右臂端连接起来,故不再需要对病毒进行筛选和噬斑纯化,缩短了构建的过程。

He et al<sup>[12]</sup>建立了在大肠杆菌内重组腺病毒的 pAdEasy 系统。通过已插入外源目的基因的穿梭质粒腺病毒的左臂和右臂同源区与骨架载体上腺病毒基因组在大肠杆菌内同源重组,由于借助了细菌细胞内高度有效的同源重组机制并能进行抗生素筛选,可以在很短的时间内得到所需要的重组腺病毒质粒,再通过 Pac

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,在适当的包装细胞内就可得到表达外源基因的重组腺病毒。同时利用在同源重组时整合入腺病毒骨架中的绿色荧光蛋白(GFP),可以直接地观察转染和感染的效率,大大方便了腺病毒的重组与纯化。与传统方法相比,新的构建重组腺病毒的策略具有其他策略不可比拟的优势<sup>[13,14]</sup>。

## 2 重组腺病毒在肝纤维化基因治疗中的应用

由于肝纤维化的发展涉及多个环节,许多学者设计并构建了围绕肝纤维化相关环节的多种重组复制缺陷型腺病毒,并通过重组腺病毒将外源目的基因导入细胞或动物体内,以达到抑制纤维生成,促进肝细胞再生和肝脏结构重建的效果。一系列体内和体外实验显示重组腺病毒在肝纤维化基因治疗中有着很好的治

疗效果和应用前景，也为肝纤维化的治疗提供了新的思路<sup>[15]</sup>。

**2.1 抑制HSC活性和ECM合成** HSC的激活是肝纤维化发生的中心环节，其激活过程分为启动阶段和持续阶段。前者指基因表达和表型的早期变化使其具有对细胞因子和刺激的反应性，后者指由于这些刺激的作用而维持HSC的激活状态并导致ECM合成。抑制静止的HSC转变为活化的肌成纤维样细胞是抗肝纤维化治疗的一个重要途径<sup>[16]</sup>。

内皮素-1(endothelin-1, ET-1)是调节HSC收缩的主要因子。其受体有ET<sub>A</sub>和ET<sub>B</sub>二种，广泛存在于肝脏各种细胞，但以HSC最为丰富<sup>[17]</sup>。Yu et al<sup>[18]</sup>研究发现，一氧化氮(NO)能有效地缓解ET-1所引起的HSC的收缩，利用重组腺病毒构建含有鼠神经元一氧化氮合酶同工酶(nNOS) cDNA的表达载体Ad. nNOS，体外转染至肝细胞、肝窦内皮细胞和HSC，结果均有NOS表达，其中HSC表达量最高。经股静脉注射Ad. nNOS至肝损伤大鼠，能明显地促进NO的合成，抑制ET-1的表达，缓解由ET-1介导的HSC收缩和激活；同时明显减轻肝硬化小鼠肝内血流阻力和门脉压力。

抑制ECM的产生一直是抗肝纤维化治疗的主要目标，包括抑制TGF $\beta$ 1等细胞因子的活性，或直接抑制ECM的合成和修饰<sup>[17,19-21]</sup>。Qi et al<sup>[22]</sup>利用复制缺陷型腺病毒载体(E1和E3区缺失)，构建由巨细胞病毒增强子和肌动蛋白启动子驱动的缺失型II型TGF- $\beta$ 受体重组腺病毒(该缺失型受体可与野生型TGF- $\beta$ 受体竞争结合TGF- $\beta$ ，但无激活作用，从而阻断TGF- $\beta$ 的活性)，经门静脉注射治疗二甲基亚硝胺(DMN)肝损伤大鼠，免疫组化显示可显著抑制肝脏I型胶原、FN、TGF- $\beta$ 1等表达，治疗组肝纤维化仅为对照组的22%，大鼠生存率明显提高。Ueno et al<sup>[23]</sup>将可溶性缺失型II型TGF- $\beta$ 受体重组腺病毒AdTbeta-ExR(该载体插入的外源目的基因表达的产物含有II型TGF- $\beta$ 受体的膜外区，可与人IgG Fc端相结合)注射至肝纤维化小鼠肝脏以外的其他器官如骨骼肌，表达产物-缺失型II型TGF- $\beta$ 受体亦可在3 wk内检测到，通过阻断TGF- $\beta$ 的传导信号，明显地减少了肝纤维化小鼠肝脏羟脯氨酸的合成，同时未出现明显副作用。研究发现，一些具有抗炎作用的细胞因子亦能影响肝纤维化的进程，部分细胞因子则可抑制HSC的激活和ECM的合成<sup>[24-26]</sup>。Zhang et al<sup>[27]</sup>将携带有鼠-干扰素(IFN- $\gamma$ )cDNA的重组腺病毒载体体外转染至正常小鼠肝细胞株BNL CL.2，然后将这些肝细胞通过脾脏内注射移植于肝纤维化小鼠，治疗4 wk后肝纤维化小鼠肝脏中I型和III型胶原表达明显下降；通过RNA斑点杂交方法检测到治疗组小鼠肝脏中TGF- $\beta$ 1和其受体的表达亦明显下降。

**2.2 促进ECM降解** 肝纤维化的实质是慢性肝损伤的修复反应，导致以胶原为主的ECM各成分合成增多，降解相对不足，致使ECM在肝内过多沉积。因此，促进

ECM各成分的降解无疑是抗肝纤维化治疗的另一重要途径<sup>[28]</sup>。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一组锌酶，是降解胶原、蛋白多糖等ECM的主要蛋白酶。MMPs至少包括3类：间质型胶原酶、IV型胶原酶和基质溶素。肝纤维化早期，MMPs轻度增高，而肝纤维化中晚期MMPs活性则明显降低，以致ECM合成超过降解，引起ECM大量沉积。通过调节MMPs活性，有助于增加基质的降解，促进肝纤维化的逆转。纤溶酶原激活剂(plasminogen activator, PA)包括组织型(tissue-type plasminogen activator, tPA)和尿激酶型(urokinase-type plasminogen activator, uPA)两种。tPA主要参与纤溶过程，而uPA主要作用于生理病理条件下细胞迁移、组织重建、肿瘤浸润及转移等过程，包括ECM的降解，也参加部分纤溶过程。通常uPA蛋白合成后，穿过内质网膜并通过高尔基体分泌至细胞外。目前研究证实，纤溶酶原激活剂/纤溶酶系统是调节MMPs活性和ECM降解的关键因素。MMPs以酶原的形式分泌，在纤溶酶的作用下，伴随失去约10 kD的片段而被激活；同时纤溶酶也可直接降解ECM。纤溶酶由uPA所激活，而被纤溶酶原激活剂抑制因子1(PAI-1)所抑制<sup>[29]</sup>。Lieber et al<sup>[30]</sup>构建了uPA的腺病毒表达载体，同时在uPA的cDNA两端进行了修饰：氨基端加入RR固定信号序列，羧基端加入了KDEL信号序列，使外源表达的uPA蛋白的两端可以与内质网膜上的跨膜蛋白相结合，从而固定于细胞内，由分泌型转变为非分泌型。研究显示经过上述修饰后，uPA蛋白保留在细胞内，可激活MMPs，降解ECM，并促进肝细胞再生，同时由于uPA蛋白不分泌到细胞外，因而避免了对凝血功能的影响，这一点对于有凝血功能障碍的肝硬化患者尤为重要。

Salgado et al<sup>[31]</sup>研究了这种非分泌型的uPA重组腺病毒对肝纤维化小鼠的治疗作用。发现通过髂静脉注射uPA重组腺病毒后，可增强纤溶酶和MMP-2的活性，进而促进ECM各种成分的降解，与对照组相比，治疗后10 d肝纤维化程度降低85%，纤维化肝脏-SMA阳性细胞仅为对照组的50%；同时肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)及其c-met受体表达增加，肝细胞增生明显增强，这可能与uPA激活HGF并形成双链的活性产物有关，此外还可能与ECM降解导致肝组织结构改建和血管新生，使肝细胞增生空间扩大有关。

**2.3 促进肝细胞再生** HGF最初作为肝细胞强效的促分裂剂而应用于肝功能衰竭的治疗。HGF由728个氨基酸组成，活性成分是由 $\alpha$ 链(64 kDa)和 $\beta$ 链(34 kDa)组成的异源二聚体，其前体分布于肝脏、脾脏、肾脏以及肾上腺等组织，最终于肝脏中被灭活。亦有实验证明，HGF可抑制HSC的激活和ECM的合成，具有一定的抗肝纤维化作用<sup>[32-37]</sup>。Phaneuf et al<sup>[38]</sup>构建了由CMV驱

动并插入人 HGF cDNA 的重组腺病毒 Ad.CMV. rhHGF , 分别以 $(1\text{-}4) \times 10^{11}$ pfu 静脉注射正常小鼠 , 5 d 后发现治疗组小鼠肝细胞 DNA 合成和肝脏重量明显增多 , 并有剂量依赖性 . 在  $3 \times 10^{11}$ pfu 剂量下 , 作用最为明显 , 肝脏重量增加至 130 % ; 更为重要的是 , 治疗组中腺病毒的肝脏毒性明显低于对照组 , 说明外源表达的 HGF 可缓解腺病毒本身对肝脏的损伤 .

研究显示 , 激活的 TGF- $\beta$  可诱发肝细胞的凋亡 , 抑制肝细胞的再生<sup>[39]</sup> . Nakamura et al<sup>[40]</sup> 将缺失 II 型 TGF- $\beta$  受体重组腺病毒质粒 AdTbeta-TR 经静脉注入肝纤维化小鼠 , 不仅可以阻止 TGF- $\beta$  与野生型受体结合 , 减轻基质的沉积 , 还可明显促进肝细胞的再生 .

细胞周期的研究发现 , 培养细胞在 G1 期 , 通过一些基因的表达 , 可诱发细胞由 G1 期向 S 期转化 , 复制增生 . Nelsen et al<sup>[41]</sup> 将体外构建的含有 cyclin E 和 skp2 的表达载体 (cyclin E 和 skp2 可促进细胞由 G1 期进入 S 期 ) 转染至肝细胞 , 可在无促有丝分裂剂的情况下促进肝细胞增生 , 为肝细胞再生提供了新的方法 .

端粒和端粒酶与细胞增生密切相关<sup>[42\text{-}44]</sup> . 端粒酶维持端粒长度是促进细胞增生的重要机制 , 永生化细胞和恶性肿瘤细胞往往通过激活端粒酶来维持端粒长度并阻止细胞死亡<sup>[45\text{-}49]</sup> . Rudolph et al<sup>[50]</sup> 研究认为肝纤维化进程中端粒长度逐渐缩短 , 是影响肝细胞再生并加重肝纤维化程度的主要因素之一 . 该学者将腺病毒介导的大鼠端粒酶模板 RNA 基因 , 经尾静脉注射导入肝纤维化大鼠肝脏 , 发现可恢复肝细胞端粒酶活性和端粒长度 , 促进肝细胞再生 , 抑制 TGF- $\beta$ 1 表达 , 显著减轻纤维化程度 , 肝纤维化进程和肝功能衰竭得到明显抑制 . 利用端粒酶进行基因治疗研究的不断深入有望为慢性肝病或其他终末期肝功能衰竭提供更有效的手段<sup>[51,52]</sup> .

肝细胞移植是恢复肝细胞功能、减轻肝纤维化发展的极有前途的治疗方法之一 , 目前主要的问题是供体肝细胞短缺、体外不易培养以及移植后免疫排斥反应<sup>[53,54]</sup> . 近研究研究表明 : 通过构建带有减轻免疫原性和促进肝细胞增生的重组腺病毒 , 可明显提高肝细胞移植的治疗效果 . Okada et al<sup>[55]</sup> 构建了 CMV 启动子驱动的 IL-10 重组腺病毒 AdCMVvIL-10 , 体外感染异源供体肝细胞后 , 移植注射于脾脏 , 异体免疫排斥反应受到抑制 , 供体肝细胞的存活期明显延长 , 接近自体肝细胞移植的效果 .

促进移植肝细胞在受体肝脏内增生是提高肝细胞移植水平的重要途径 . 一些研究认为 , 供体肝细胞进入受体肝脏生长增生的数目一般不超过 0.5 % , 主要原因可能是受体肝脏内缺乏移植肝细胞增生的刺激因素<sup>[56\text{-}59]</sup> . Vrancken et al<sup>[60]</sup> 将构建的非分泌型的 uPA 重组腺病毒 Ad.PGK-muPA 以  $5 \times 10^9$ pfu 效价经门静脉注射入待移植小鼠 , 2 d 后行肝细胞移植 , 结果发现供体肝细胞在 Ad.PGK-muPA 注射组增生的数目是对照组的

20 倍 . 引起肝细胞增生的原因最初认为是由于外源表达的 uPA 可将肝细胞内的纤溶酶原转变为纤溶酶 , 继而产生许多活性蛋白 , 对受体肝细胞产生毒性作用 , 产生了促进肝细胞生长的刺激因素 , 从而诱发移植肝细胞的增生 . 此外 uPA 可将单链无活性的 HGF 转变为具有活性的双链成分 , 进一步促进肝细胞生长 . 近 , 许多学者深入探讨了肝细胞再生的机制 , 认为外源导入促进细胞增生的基因可明显提高移植肝细胞的功能和存活时间 , 提高肝细胞移植的治疗效果<sup>[61\text{-}63]</sup> .

### 3 腺病毒用于肝纤维化基因治疗疗效和安全性的评价

鉴于腺病毒载体在肝纤维化基因治疗中的广泛应用 , 许多学者对其疗效和安全性进行了充分评估<sup>[64\text{-}66]</sup> . Connelly<sup>[67]</sup> 认为将携带外源基因的重组复制缺陷型腺病毒直接导入肝细胞是进行基因治疗很有前途的方法 , 许多体内实验均证明腺病毒治疗的高效性 ; 但瞬时导入重组腺病毒 , 外源基因持续表达不超过 1 mo , 同时腺病毒载体的免疫原性和肝脏毒性也是需要解决的问题 . 一些学者认为重组腺病毒进入血液循环后 , 主要集中于肝脏表达 , 可引起肝脏的急性损伤 , 但仅仅是一种非特异性免疫反应 , 多由中性粒细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞的激活和一些趋化因子的释放所致 . Nakatani et al<sup>[68]</sup> 进一步研究评价了重组腺病毒基因治疗肝硬化的疗效和安全性 . 静脉注射仅表达 lacZ 的重组腺病毒 4 d 后 , 发现 lacZ 基因在肝硬化小鼠肝细胞中的表达是正常小鼠的 2.5 倍 ; 血清肝功能指标升高不明显 ; 组织病理学仅在正常小鼠肝脏中出现轻型肝炎的病理变化 ( 肝细胞增生和炎细胞浸润 ) , 肝硬化小鼠未出现新的明显的病理改变 ; 各种免疫学指标亦未有显著变化 , 动物实验证实严重肝病利用腺病毒载体静脉注射进行基因治疗是安全有效的 .

总之 , 近年来肝纤维化治疗已取得很大的进展 , 分子生物学技术的飞速发展为肝纤维化的基因治疗提供了新的思路<sup>[69\text{-}71]</sup> . 围绕抑制 ECM 生成、增加 ECM 降解和促进肝细胞再生等方面构建相应的重组复制缺陷型腺病毒在体外和动物实验中显示出较好的治疗效果 . 随着基因工程、细胞因子生物学和基质生物学等研究的不断深入 , 将会进一步发现和构建更多低毒、高效、简易的载体系统 , 为肝纤维化治疗带来新的希望 .

### 4 参考文献

- Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science* 1993; 260:926-932
- Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanism and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328:1828-1835
- Fujimoto J, Kaneda Y. Reversing liver cirrhosis: impact of gene therapy for liver cirrhosis. *Gene Ther* 1999;6: 305-306
- Rockey DC. Gene therapy for hepatic fibrosis-bringing treatment into the new millennium. *Hepatology* 1999;30:816-818
- West J, Rodman DM. Gene therapy for pulmonary diseases. *Chest* 2001;119:613-617
- 潘欣,潘卫,柯重伟,张斌,曹广文,戚中田. 腺病毒载体介导四环素调控的DT/V EGFR 体系的基因治疗. 世界华人消化杂志 2000;8: 1121-1126

- 7 Nasz I, Adam E. New developments and trends in adenovirus research. *Orv Hetil* 1997;138:2711-2724
- 8 Kochanek S. High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Hum Gene Ther* 1999;10:2451-2459
- 9 Thomas CE, Schiedner G, Kochanek S, Castro MG, Lowenstein PR. Peripheral infection with adenovirus causes unexpected long-term brain inflammation in animals injected intracranially with first-generation, but not with high-capacity, adenovirus vectors: toward realistic long-term neurological gene therapy for chronic diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7482-7487
- 10 Zheng BJ, Graham FL, Prevec L. Transcription units of E1a, E1b and pIX regions of bovine adenovirus type 3. *J Gen Virol* 1999;80 (Pt 7):1735-1742
- 11 Okada T, Ramsey WJ, Munir J, Wildner O, Blaese RM. Efficient directional cloning of recombinant adenovirus vectors using DNA-protein complex. *Nucleic Acids Res* 1998;26:1947-1950
- 12 He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2509-2514
- 13 Graham FL. Adenovirus vectors for high-efficiency gene transfer into mammalian cells. *Immunol Today* 2000;21:426-428
- 14 Ng P, Parks RJ, Cummings DT, Evelegh CM, Graham FL. An enhanced system for construction of adenoviral vectors by the two-plasmid rescue method. *Hum Gene Ther* 2000;11:693-699
- 15 Fujimoto J. Gene therapy for liver cirrhosis. *J Gastro Hep* 2000;15 (Suppl): D33-36
- 16 Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:618-633
- 17 Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999; 19:129-140
- 18 Yu Q, Shao R, Qian HS, George SE, Rockey DC. Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat liver ameliorates portal hypertension. *J Clin Invest* 2000;105:741-748
- 19 刘芳,刘金星. 转化生长因子 $\beta$ 1在肝纤维化中的作用. 世界华人消化杂志 2000;8:86-88
- 20 Bernasconi P, Torchiana E, Confalonier P, Brugnoni R, Barresi R, Mora M, Comelio F, Morandi R, Mantegazza R. Expression of transforming growth factor-beta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. *J Clin Invest* 1995;96:1137-1144
- 21 Murawaki Y, Nishimura Y, Ikuta Y, Idobe Y, Kitamura Y, Kawasaki H. Plasma transforming growth factor-beta 1 concentrations in patients with chronic viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:680-684
- 22 Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, Takeshita A, Ueno H. Blockade of type II transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *J Cell Biol* 1999; 5:2345-2349
- 23 Ueno H, Sakamoto T, Nakamura T, Qi Z, Astuchi N, Takeshita A, Shimizu K, Ohashi H. A soluble transforming growth factor beta receptor expressed in muscle prevents liver fibrogenesis and dysfunction in rats. *Hum Gene Ther* 2000;11:33-42
- 24 Howard M, O Garra A. Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today* 1992;13:198-200
- 25 Thompson K, Maltby J, Fallowfield J, McAulay M, Millward-Sadler H, Sheron N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology* 1998;28:1597-1606
- 26 Thompson KC, Trowern A, Fowell A, Marathe M, Haycock C, Arthur MJ, Sheron N. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation In vitro. *Hepatology* 1998;28:1518-1524
- 27 Zhang L, Mi J, Yu Y, Yao H, Chen H, Li M, Cao X. IFN- $\gamma$  gene therapy by intrasplenic hepatocyte transplantation: a novel strategy for reversing hepatic fibrosis in *Schistosoma japonicum*-infected mice. *Parasite Immunol* 2001;23:11-17
- 28 Shetty K, Wu GY, Wu CH. Gene therapy of hepatic diseases: prospects for the new millennium. *Gut* 2000;46:136-139
- 29 Irigoyen JP, Munoz-Canoves P, Montero L, Koziczk M, Nagamine Y. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci* 1999;56:104-132
- 30 Lieber A, Peeters MJ, Gown A, Perkins J, Kay MA. A modified urokinase plasminogen activator induces liver regeneration without bleeding. *Hum Gene Ther* 1995;6:1029-1037
- 31 Salgado S, Garcia J, Vera J, Siller F, Bueno M, Miranda A, Segura A, Grijalva G, Segura J, Orozco H, Hernandez-Pando R, Fafutis M, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Liver cirrhosis is reverted by urokinase-type plasminogen activator gene therapy. *Mol Ther* 2000;2:545-551
- 32 Boros P, Miller CM. Hepatocyte growth factor: a multifunctional cytokine. *The Lancet* 1995;345:293-295
- 33 Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-66
- 34 Borset M, Hjorth-Hansen H, Seidel C, Sundan A, Waage A. Hepatocyte growth factor and its receptor c-met in multiple myeloma. *Blood* 1996;88:3998-4004
- 35 Zarnegar R, Michalopoulos GK. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol* 1995;129:1177-1180
- 36 Itakura A, Kurauchi O, Morikawa S, Okamura M, Furugori K, Mizutani S. Involvement of hepatocyte growth factor in formation of bronchoalveolar structures in embryonic rat lung in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:98-103
- 37 Shiota G, Wang TC, Nakamura T, Schmidt EV. Hepatocyte growth factor intransgenic mice: effects on hepatocyte growth, liver regeneration and gene expression. *Hepatology* 1994;19:962-972
- 38 Phaneuf D, Chen SJ, Wilson JM. Intravenous injection of an adenovirus encoding hepatocyte growth factor results in liver growth and has a protective effect against apoptosis. *Mol Med* 2000;6:96-103
- 39 Schrum LW, Bird MA, Salcher O, Burchardt ER, Grisham JW, Brenner DA, Rippe RA, Behrns KE. Autocrine expression of activated transforming growth factor-beta(1) induces apoptosis in normal rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280: G139-148
- 40 Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 2000; 32:247-255
- 41 Nelsen CJ, Hansen LK, Rickheim DG, Chen C, Stanley MW, Krek W, Albrecht JH. Induction of hepatocyte proliferation and liver hyperplasia by the targeted expression of cyclin E and skp2. *Oncogene* 2001;20:1825-1831
- 42 Mitra N, Horikawa I, Nishimoto A, Ohmura H, Ito H, Hirohashi S, Shay JW, Oshimura M. Progressive telomere shortening and telomerase reactivation during hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;93:56-62
- 43 Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW 2nd, Greider CW, DePinho RA. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 1998;392:569-574
- 44 Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998;279:349-352
- 45 Hytioglou P, Kotoulas V, Thung SN, Tsokos M, Fiel MI, Papadimitriou CS. Telomerase activity in precancerous hepatic nodules. *Cancer* 1998;82:1831-1838
- 46 Kojima H, Yokosuka O, Kato N, Shiina S, Imazeki F, Saisho H, Shiratori Y, Omata M. Quantitative evaluation of telomerase activity in small liver tumors: analysis of ultrasonography-guided liver biopsy specimens. *J Hepatol* 1999; 31:514-520
- 47 Ogami M, Ikura Y, Nishiguchi S, Kuroki T, Ueda M, Sakurai M. Quantitative analysis and in situ localization of human telomerase RNA in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 1999;79:15-26
- 48 Yakoob J, Hu GL, Fan XG, Zhang Z. Telomere, telomerase and digestive cancer. *World J Gastroenterol* 1999; 5: 334-337
- 49 Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bacchetti S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 1995; 85:2315-2320
- 50 Rudolph KL, Chang S, Millard M, Schreiber-Agus N, DePinho RA. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science* 2000;287:1253-1258
- 51 Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, Katayama R, Kimura T. Reconstituting telomerase activity using the telomerase catalytic subunit prevents the telomere shortening and replicative senescence in human osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2001;16:1453-1464
- 52 Hagmann M. New genetic tricks to rejuvenate ailing livers. *Sci-*

- ence 2000;287:1185-1187
- 53 Alison MR, Poulsom 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
- 54 Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, Dabeva MD, Shafritz DA. Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 1998;153:319-329
- 55 Okada Y, Saito S, Fujisawa K, Fujiwara T, Tanaka N. Adenovirus-mediated viral IL-10 gene transfer prolongs survival of xenogeneic spheroidal aggregate-cultured hepatocytes. *Transpl Int* 2000;13(Suppl 1): S485-493
- 56 Strom SC, Chowdhury JR, Fox IJ. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin Liver Dis* 1999;19:39-48
- 57 Ohashi K, Park F, Kay MA. Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application. *J Mol Med* 2001;79:617-630
- 58 Sterling RK, Fisher RA. Liver transplantation. Living donor, hepatocyte, and xenotransplantation. *Clin Liver Dis* 2001;5:431-460
- 59 Guha C, Roy-Chowdhury N, Jauregui H, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte-based gene therapy. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:51-57
- 60 Vrancken Peeters MJ, Patijn GA, Lieber A, Perkins J, Kay MA. Expansion of donor hepatocytes after recombinant adenovirus-induced liver regeneration in mice. *Hepatology* 1997;25:884-888
- 61 Song E, Chen J, Antus B, Su F, Wang M, Exton MS. Adenovirus-mediated Bcl-2 gene transfer inhibits apoptosis and promotes survival of allogeneic transplanted hepatocytes. *Surgery* 2001;130: 502-511
- 62 Mignon A, Guidotti JE, Mitchell C, Fabre M, Wernet A, De La Coste A, Soubrane O, Gilgenkrantz H, Kahn A. Selective repopulation of normal mouse liver by Fas/CD95-resistant hepatocytes. *Nat Med* 1998; 4:1185-1188
- 63 Grompe M, Laconi E, Shafritz DA. Principles of therapeutic liver repopulation. *Semin Liver Dis* 1999;19:7-14
- 64 Barnett BG, Crews CJ, Douglas JT. Targeted adenoviral vectors. *Biochim Biophys Acta* 2002;1575:1-14
- 65 Garcia-Banuelos J, Siller-Lopez F, Miranda A, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion. *Gene Ther* 2002;9:127-134
- 66 Zhang H, Lin C, Wei Y. Safety evaluation of Ad-ASmyc in vitro and in vivo. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2000;22:116-119
- 67 Connelly S. Adenoviral vectors for liver-directed gene therapy. *Curr Opin Mol Ther* 1999;1:565-572
- 68 Nakatani T, Kuriyama S, Tominaga K, Tsujimoto T, Mitoro A, Yamazaki M, Tsujinoue H, Yoshiji H, Nagao S, Fukui H. Assessment of efficiency and safety of adenovirus mediated gene transfer into normal and damaged murine livers. *Gut* 2000;47:563-570
- 69 Dai WJ, Jiang HC. Advances in gene therapy of liver cirrhosis: a review. *World J Gastroenterol* 2001;7:1-8
- 70 Wu GY, Wu CH. Gene therapy and liver diseases. *World J Gastroenterol* 1998; 4(Suppl 2): 18-19
- 71 王福生, 吴祖泽. 肝纤维化和肝硬变基因治疗的研究现状. 世界华人消化杂志 2000;8:371-373

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology®

本刊被美国科学情报研究所 (ISI) 2001 年《期刊引用报告》(Journal Citation Reports, JCR®) 报道我国科技期刊 59 种, 其中包括医学领域 3 种, 分别为 WJG® 影响因子 1.445, 中国药理学报英文版影响因子 0.631, 中华医学杂志英文版影响因子 0.108。Science Citation Index- Expanded (SCI-E®) 收录世界领先的胃肠病学和肝病学杂志 44 种, 其中包括 WJG®. Current Contents/Clinical Medicine®(即时目次 / 临床医学) 收录世界领先的 1130 种期刊和书所登载的文章、社论、会议摘要、评论及其他重要信息的完整的书刊目次信息。其中收录世界领先的胃肠病学和肝病学杂志 36 种, 其中包括 WJG®. Clinical Medicine Citation Index® 收录世界领先的胃肠病学和肝病学杂志 43 种, 其中包括 WJG®. WJG® 由 122 位胃肠病学者组成的编委会, 分布在 65 个国家和地区, 其中包括 53 个国家的胃肠病学会主席。53 个国家和地区胃肠病学会为 WJG® 的合作伙伴。WJG® 被美国《医学索引》(Index Medicus / MEDLINE)、美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库 / 医学文摘》(EMBASE/Excerpta Medica, EM) 和俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journal, AJ) 收录。国内被中国科学引文索引、中国科技论文统计与分析、世界消化学网数据库、国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊。WJG®, 1999 年度, 2000 年度, 2001 年度被评为山西省一级期刊。中华人民共和国科学技术部, 国科发财字[2001]340 号文件 2001-09-10 关于公布科技期刊方阵名单的通知。按照期刊方阵入选要求和比例, 经部门推荐、专家评审, 最终从推荐名单中选出科技期刊 716 种进入中国期刊方阵, 其中“双高”期刊 40 种, “双奖”期刊 58 种, “双百”期刊 122 种, “双效”期刊 496 种。WJG® 在众多消化类期刊中唯一进入双百期刊行列。中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告: 2001 年 WJG® 总被引频次 1844, 影响因子 2.92, 即年指标 0.694, 他引总引比 0.52, 地区分布数 20, 基金和资助论文比例 0.549, 海外作者论文数 0.353, 指标综合加权评分 57.268。WJG® 2003 年月刊, 大 16 开, 256 页 / 期, 定价 50.00 元 / 期, 邮发代号 82-261。

E-mail: wjg@wjgnet.com http://www.wjgnet.com

(世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

# TGF-β1 与肝纤维化

姜 虹,李定国

姜虹,上海第二医科大学附属新华医院 上海市 200092  
李定国,上海第二医科大学附属新华医院 上海市 200092  
项目负责人:李定国,200092,上海市,上海第二医科大学附属新华医院。  
电话:021-65793562  
收稿日期:2002-05-16 接受日期:2002-07-06

## 摘要

肝纤维化是各种致病因子持续作用于肝脏，导致慢性肝损伤后的共同结果，多种细胞因子参与肝纤维化的发生，其中，转化生长因子β1(transforming growth factor β1, TGF-β1)起关键性的作用。TGF-β1是具有多种生物学功能的细胞因子，可调节细胞的生长、分化、基质产生和凋亡；在胚胎生长发育过程中，对模型形成和组织特异性分化起重要作用；在成人，与组织修复和免疫系统调节过程有关。TGF-β1可以存在于所有的组织中，但在骨、肺、肾及胎盘组织中比较丰富。TGF-β1大多由实质细胞产生，亦可由浸润细胞，如淋巴细胞、单核细胞/巨噬细胞和血小板产生及释放。TGF-β1的信号转导由细胞膜上的跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体介导，在胞质内信号由递质Smads介导转导至细胞核，影响特异性基因表达。本文从TGF-β1的细胞来源、信号转导、激活肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)、促进细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积和活性调节方面对其在肝纤维化的发生机制中的重要作用作一综述。

姜虹,李定国.TGF-β1 与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2003;11(3):326-329  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/326.htm>

## 0 引言

肝纤维化是各种致病因子持续作用于肝脏，导致慢性肝损伤后的共同结果<sup>[1,2]</sup>，多种细胞因子参与肝纤维化的发生<sup>[3-6]</sup>，其中，转化生长因子β1(transforming growth factor β1, TGF-β1)起关键性的作用<sup>[7,8]</sup>。TGF-β1是一大家族的前体物质，这个家族包括TGF-βs、激活素、抑制素(inhibins, 睾丸分泌的水溶性激素)、骨骼形成蛋白和苗勒抑制物(müllerian-inhibiting substance)。它们具有多种生物学作用，可作用于多种细胞，调节细胞的生长、分化、基质产生和凋亡；在胚胎生长发育过程中，对模型形成和组织特异性分化起重要作用；在成人，与组织修复和免疫系统调节过程有关<sup>[7-10]</sup>。

TGF-β1可以存在于所有的组织中，但在骨、肺、肾及胎盘组织中比较丰富。TGF-β1大多由实质细胞产生，亦可由浸润细胞，如淋巴细胞、单核细胞/巨噬细胞和血小板产生及释放。在损伤或炎症时，所有这

些细胞都是TGF-β1的潜在来源。TGF-β1可调节细胞的生长和细胞形态学发生；TGF-β1是大多数细胞的生长抑制剂，尤其是那些上皮或内皮源的细胞；TGF-β1通过诱导几种基质成份的表达而促进基质的产生，同时，TGF-β1通过抑制蛋白水解酶的活性而抑制基质的降解；此外，TGF-β1还对免疫系统调节过程起作用<sup>[11,12]</sup>。

在生理条件下，细胞外基质的产生有利于组织的损伤修复，但在病理条件下，过量的TGF-β1将导致细胞外基质的过度产生而发生纤维化。

## 1 TGF-β1 概要

1984年，人们从血小板中提取出一种物质，由于其能够刺激正常细胞在琼脂中生长，就像病毒转化一样，故被命名为转化生长因子β。在哺乳动物中，TGF-β有三种异构体，TGF-β1、2和3。TGF-β1是由391个氨基酸组成的一个TGF-β1前体分子，可被蛋白水解酶分解成多个肽片断和一个112个氨基酸的亚单位，TGF-β1前体分子包括无活性相关肽(latency-associated peptide, LAP)及活性TGF-β1：LAP是一个二聚肽，位于TGF-β1前体分子的N-末端；活性TGF-β1，是一个25Kd的二聚体蛋白质，由二个亚单位以二硫键相链接，位于TGF-β1的C-末端；LAP非共价性包围TGF-β1。在体内，TGF-β1通常以无活性TGF-β1形式存在的，无活性TGF-β1是一个分子量>225Kd的复合物：主要成份为一个分子量为125-210Kd的具有多个结构域的糖蛋白，称之为TGF-β1结合蛋白(latent transforming growth factor β binding protein, LTBP)，迄今为止已发现其有4种异构体(LTBP1、2、3和4)，LTBP1、3、4的第三个8个半胱氨酸的重复序列和LAP共价结合。LTBP阻止TGF-β1和丝/苏氨酸激酶受体结合<sup>[13-20]</sup>。

## 2 TGF-β1 的细胞来源

在肝脏，TGF-β1的细胞来源，以往认为只有非实质细胞：窦内皮细胞、Kupffer细胞及HSC表达TGF-β1 mRNA。Bissell et al<sup>[21]</sup>研究证实肝细胞亦表达TGF-β1 mRNA。当组织受损伤时，这些细胞的TGF-β1 mRNA和蛋白质的表达增加，并分泌TGF-β1而启动修复过程。肝细胞分泌的TGF-β1完全是无活性形式的，而非实质细胞分泌的TGF-β1有50-90%是活性形式的。无活性的TGF-β1必须活化为有活性的TGF-β1才能发挥作用。

在体外, 无活性的 TGF-β1 可以利用加热、提高 pH 值和各种蛋白酶作用使其活化, 而在体内, 其活化的机制尚未完全阐明, 可能依赖于蛋白水解酶的分解作用<sup>[21]</sup>。

### 3 TGF-β1 的信号转导

3.1 TGF-β1 的受体类型 TGF-β1 至少和三种膜蛋白相结合, 被分别被命名为 I型、II型和 III型受体, 他们存在于所有的细胞中, I型、II型受体是跨膜丝氨酸 / 苏氨酸激酶<sup>[22]</sup>; III型受体, 亦称为多聚糖, 是一个膜锚着蛋白多糖, 他无信号转导结构但可递呈 TGF-β1 给其他受体<sup>[23]</sup>, III型受体介导 TGF-β1 的细胞外基质的合成和降解作用, II型受体介导 TGF-β1 的细胞生长和分化作用。

3.2 TGF-β1受体的激活 TGF-β1首先直接与细胞膜上的 III型受体结合, 然后再与 I型受体结合, 最后形成了一个由2个 I型 TGF-β1受体(TβR-I)和2个 II型 TGF-β1受体(TβR-II)组成的异四聚体复合物<sup>[24-26]</sup>。I型、II型受体均以低聚体形式存在于细胞膜上, III型受体在缺乏 I型受体的情况下不能和 TGF-β1 结合。在复合物中, TβR-II 磷酸化 TβR-I 富含甘氨酸和丝氨酸的区域(Gs domain, Gs 区域), 从而使 TβR-II 活化。磷酸化的 III型受体将信号传递到下游底物中, 从而启动了信号转导链锁的第一步<sup>[27-30]</sup>。

3.3 信号由细胞膜转导至细胞核 - Smads 是胞质递质 SMAD 家族蛋白在 TGFβ 超家族蛋白介导的信号由细胞质转移至细胞核的过程中具有关键作用。Smad 的分子量为 42-60 kd, 有两个类似的区域位于 N 末端和 C 末端, 分别被命名为 MH1 和 MH2, 中间由一个脯氨酸序列连接。在无活性状态时, Smad 的 MH1 和 MH2 区域相互连接, 被受体活化后相互连接的区域断开, 形成异聚体物质, 转移至细胞核, 影响靶基因的转录。迄今为止, 已知 Smads 家族的成员有 9 个(Smad1、2、3、4、5、6、7、8 和 9), 不同的成员在信号转导中起不同的作用。Smad1、2、3 和 5 相互作用, 并可被特异性的活化 III型受体磷酸化, 因此, 其作用是通道限制性的; Smad4 的作用不同于 Smad 家族的其他成员, 他是迄今为止所发现的唯一一个共同递质(common-mediator), 他和磷酸化的通道限制性 Smads (Smad2 和 3)相结合形成异低聚体复合物后, 转运至细胞核中激活转录应答; Smad6 和 7 则是信号转导过程中的抑制剂。当细胞膜上的 TGF-β1 受体被激活后, 胞质中的通道限制性 Smads 和活化的 III型受体结合, 从而被磷酸化而活化, 磷酸化的 Smads 和 Smad4 结合形成异低聚体复合物后, 转运至细胞核, 在胞核中, 直接或和其他DNA结合蛋白一起与DNA结合而影响特异性基因的表达; 抑制性 Smads 与受体结合后则阻碍通道限制性 Smads 的磷酸化和信号转导活性<sup>[31-34]</sup>。

### 4 TGF-β1 在肝纤维化中的作用

研究证实, 急性病变中, TGF-β1 的产生是一过性的, 在慢性病中, TGF-β1 则持续产生。适量的 TGF-β1 有利于细胞的创伤愈合, 但过多的 TGF-β1 则导致纤维化。TGF-β1 在纤维化的起始和持续发展中起关键作用<sup>[11]</sup>, 表现在:(1)刺激 HSC 转化为肌成纤维样细胞, 后者产生 ECM<sup>[35]</sup>; (2)诱导基质基因的表达, 包括胶原、蛋白多糖和结构性糖蛋白<sup>[36]</sup>; (3)抑制基质降解<sup>[36]</sup>。

4.1 刺激 HSC 转化为肌成纤维细胞 肝细胞受到各种慢性损伤后, 由非实质细胞、浸润细胞和肝细胞分泌的 TGF-β1 或无活性 TGF-β1 (后者可在细胞外被活化为活性 TGF-β1), 通过旁分泌作用激活 HSC。在 HSC 激活开始阶段, 首先发生基因表达及表型的改变, 表现为:(1)转录活化; (2)信号分子活化及诱导早期结构基因的表达; (3)胞膜上表达细胞因子、生长因子受体(如血小板衍生生长因子受体、转化生长因子受体、血管内皮生长因子受体等), 使其产生对这些递质分子的应答能力; (4)增生活化为肌成纤维细胞<sup>[37]</sup>。在持续激活阶段中, HSC 发生一系列表型改变:(1)细胞肥大, 粗面内质网增多, 维生素 A 脂滴消失; (2)局部细胞增生, <sup>3</sup>H 胸腺嘧啶核苷酸的摄入增多; (3)纤维化发生的增强, 原位杂交法提示基质成份增多, 包括硫酸乙酰肝素、皮肤素和硫酸软骨素等蛋白多糖、层粘连蛋白、细胞纤维结合素、韧黏素等; (4)表达平滑肌样特征: 包括 平滑肌肌动蛋白、细丝的显著表达。此时的 HSC 具有了细胞增生和促进纤维化的作用<sup>[38]</sup>。因此, HSC 在肝纤维化形成过程中具有特别重要的意义。当肝受到各种损伤时, HSC 活化并转化为肌成纤维细胞后, 细胞能够增生、游动、增强收缩能力及大量合成生长因子细胞因子和细胞外基质<sup>[39-44]</sup>。

4.2 诱导基质基因的表达 纤维化是 ECM 过度沉积的结果。广义的 ECM 包括以下几种成分:(1)胶原蛋白(collagen, Col): 目前发现人体共有 19 种, 即 Col-I、II、III、IV、V、VI、IX、X、XI、XII、XIII、XIV、XV、XVI、XVII、XVIII、XIX、XIX、XIX、XIX 等胶原蛋白; (2)非胶原糖蛋白: 有十余种, 包括纤维连接蛋白、层粘连蛋白(laminin, LN)、血栓黏附素等; (3)蛋白多糖: 主要包括透明质酸(hyaluronic acid, HA)、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸乙酰肝素、硫酸角质素、硫酸肝素等 6 种<sup>[45]</sup>。体内和体外试验均证实: TGF-β1 可以引起 ECM, 包括胶原、基底膜、间质基质的 mRNA 的累积、基因转录及蛋白质表达<sup>[36]</sup>; 损伤肝中最主要的基质成份 I型胶原 mRNA, 在与 TGF-β1 共同培养的鼠肝细胞中有所增加; 慢性肝病患者的肝组织样本中 TGF-β1 mRNA 的总量与 I型胶原 mRNA 的表达水平呈正相关<sup>[11]</sup>; I型胶原存在时, HSC 则很快被激活并大量合成 ECM; 若减少胶原成分的 mRNA 转录, 则能减少 ECM 成分的表达<sup>[46-50]</sup>。肝纤维化时, 早期以 I型胶原增加为主, 后期 II型胶原增加占优势。

4.3 抑制基质降解 基质降解的抑制包括两方面的因素:

基质金属蛋白酶(metrix metalloproteinases, MMPs)的活性下降、组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP)的活性增加。基质金属蛋白酶家族至少包括3类:间质型胶原酶(MMP1)、 $\alpha_2$ 型胶原酶(MMP2)和基质溶素,一种酶切割一种或数种细胞外基质成份。TGF- $\beta$ 1降低MMP1、MMP2 mRNA和增加组织金属蛋白酶抑制剂(TIMP)mRNA的表达,并降低MMP1、MMP2的活性,使胶原的合成多于降解,导致胶原纤维的过度沉积,肝窦毛细血管化和胶原化,从而促进肝纤维化的发展<sup>[51]</sup>。间质的胶原化环境不仅与肝纤维化的发生有关,而且促进细胞的转化<sup>[52]</sup>。

### 5 TGF- $\beta$ 1活性的调节

在体内,对TGF- $\beta$ 1的产生、分泌和活化等过程的调节均可影响TGF- $\beta$ 1的活性,但TGF- $\beta$ 1活性的调节主要在其活化过程中完成<sup>[53]</sup>。(1)TGF- $\beta$ 1 mRNA的表达:各种损伤和攻击,可使TGF- $\beta$ 1 mRNA和蛋白质的表达增加。研究证实:机械拉力,尤其是周期性的,可增加肾小球系膜和血管平滑肌TGF- $\beta$ 1的产生;流体切力及机械负荷的增加,可使培养的成骨细胞产生TGF- $\beta$ 1;在细胞外,促进TGF- $\beta$ 1产生的细胞信号分子有血管紧张素(angiotensin, A<sub>1</sub>)和血栓素(thromboxane, Tx);此外,TGF- $\beta$ 1还通过自分泌和旁分泌反馈途径增加TGF- $\beta$ 1的产生<sup>[36]</sup>。(2)无活性TGF- $\beta$ 1的活化,其机制尚未完全阐明,Breitkopf et al<sup>[14]</sup>证实:LTBP在TGF- $\beta$ 1的细胞外活化过程中起重要作用。无活性的TGF- $\beta$ 1分泌后迅速通过LTBP和细胞外基质非共价结合<sup>[53]</sup>。在培养液中,LTBP被蛋白水解酶分解后,释放可溶性的TGF- $\beta$ 1<sup>[14]</sup>。Breitkopf et al<sup>[14]</sup>还提出:由于肌成纤维细胞能分泌无活性TGF- $\beta$ 1和 $\alpha_2$ 型纤溶酶原激活抑制剂,而后者与LTBP在纤溶酶的作用下从基质中释放的过程有关,因此,肌成纤维细胞在TGF- $\beta$ 1的细胞外活化过程中起一定的作用。TGF- $\beta$ 1局部活化过程中,进一步促进各种细胞反应,并且在TGF- $\beta$ 受体表达下降与肝细胞凋亡二者相关性方面起一定作用<sup>[54]</sup>。(3)调节TGF- $\beta$ 1受体的活性:由于TGF- $\beta$ 1受体广泛存在,故调节受体的活性可以调节TGF- $\beta$ 1的作用<sup>[53]</sup>。但其具体过程尚未阐明。(4)TGF- $\beta$ 1本身活性可以通过被可溶性受体及其他蛋白,如 $\alpha_2$ 微球蛋白等结合而抑制<sup>[52]</sup>。(5)TGF- $\beta$ 1分泌后的分布位置与其活性作用有关。Bedossa et al<sup>[55]</sup>证实:TGF- $\beta$ 1局限于肝小叶及纤维间隔的边界,这个边界正是活跃的纤维化发生的地方,与TGF- $\beta$ 1作为细胞外基质产生的强刺激物是一致的。(6)调节细胞膜表面受体的表达。Date et al<sup>[56]</sup>证实在损伤肝中TGF- $\beta$ 1的信号转导活性可由不同的受体表达来调节,他们发现在CCL<sub>4</sub>肝纤维化模型鼠中,肝细胞表面的TGF- $\beta$ 1 $\alpha_1$ 型、 $\alpha_2$ 型受体下调,从而可解释肝细胞增生与TGF- $\beta$ 1表达及细胞外基质沉积增加这一矛盾现象。Bedossa et al<sup>[55]</sup>还证实:在肝细胞癌中,肿瘤

细胞的膜表面不再表达TGF- $\beta$ 1 $\alpha_1$ 型受体,从而使TGF- $\beta$ 1抑制肝细胞生长的功能消失,导致癌细胞无控制地生长。并认为, $\alpha_1$ 型受体的缺乏是由于受体蛋白质胞内加工处理及由胞质转运至胞核的缺陷造成的<sup>[55]</sup>。

### 6 TGF- $\beta$ 1和临床

尽管调节TGF- $\beta$ 1活性的机制尚未阐明,但降低TGF- $\beta$ 1活性仍可作为抗纤维化的一种治疗途径。如可溶性TGF- $\beta$ 1型受体阻止TGF- $\beta$ 1与膜受体结合并抑制TGF- $\beta$ 1的活化;可溶性 $\alpha_1$ 型受体与TGF- $\beta$ 1有高度亲和力,可阻止TGF- $\beta$ 1的活化;在TGF- $\beta$ 1活化过程中释放的LAP亦可用于阻止TGF- $\beta$ 1的活化;类维生素A-类固醇受体超家族也许参与TGF- $\beta$ 1转录后调节,控制这一过程可能减少TGF- $\beta$ 1的产生<sup>[11]</sup>。

尽管目前已有TGF- $\beta$ 1的肽类拮抗剂,但因TGF- $\beta$ 1的受体存在于大多数细胞中,全身的抑制可能导致自身免疫性疾病和细胞的退化,故作用于肝的内皮素/内皮素受体系统的内皮素受体拮抗剂受到广泛的青睐,并已进入2或3期临床试验阶段<sup>[57]</sup>。内皮素受体拮抗剂不仅具有抗肝纤维化的作用,还能降低门脉压力。此外,LTBP在TGF- $\beta$ 1的细胞外活化中起重要作用,由于LTBPs和原纤维和的结构上的高度同源性,LTBPs被认为是细胞外基质的组成成份,而参与形成肝纤维化,因此,抑制LTBPs的合成与分解亦可具有抗肝纤维化的作用<sup>[14]</sup>。

总之,TGF- $\beta$ 1在肝纤维化的发生机制中具有关键作用。但其确切机制仍有待于进一步阐明。例如TGF- $\beta$ 1的活化;TGF- $\beta$ 1受体活化后信号由胞质转运至胞核的过程;TGF- $\beta$ 1活性的调节等。

### 7 参考文献

- 1 姜慧卿,张晓岚. 肝纤维化的发生机制. 世界华人消化杂志 2000; 8:687-89
- 2 白文元,姚希贤,冯丽英. 肝纤维化的研究现状. 世界华人消化杂志 2000;8:1267-1268
- 3 Huang X,Li DG,Wang ZR,Wei HS,Cheng JL,Zhan YT,Zhou X,Xu QF,Li X,Lu HM.Expression changes of activin A in the development of hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:37-41
- 4 Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999; 19:129-140
- 5 Koziel MJ. Cytokines in viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 1999;19: 157-169
- 6 安永,别平. 细胞因子与肝再生. 世界华人消化杂志 2001;9:575-578
- 7 Bedossa P, Paradis V. Transforming growth factor-beta (TGF-beta): a key-role in liver fibrogenesis. *J Hepatol* 1995;22:37-42
- 8 刘芳,刘金星. 转化生长因子 $\beta$ 1在肝纤维化中的作用. 世界华人消化杂志 2000;8:86-88
- 9 Bonewald LF. Regulation and regulatory activities of transforming growth factor beta. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1999;9:33-44
- 10 Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390:465-471
- 11 Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994;331:1286-1292
- 12 Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA. TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell* 1990;63:245-247
- 13 Olofsson A, Ichijo H, Moren A, ten Dijke P, Miyazono K, Heldin

- CH. Efficient association of an amino-terminally extended form of human latent transforming growth factor-beta binding protein with the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1995;270:31294-31297
- 14 Breitkopf K, Lahme B, Tag CG, Gressner AM. Expression and matrix deposition of latent transforming growth factor beta binding proteins in normal and fibrotic rat liver and transdifferentiating hepatic stellate cells in culture. *Hepatology* 2001;33:387-396
- 15 Kanzaki T, Olofsson A, Moren A, Wernstedt C, Hellman U, Miyazono K, Claesson-Welsh L, Heldin CH. TGF-beta 1 binding protein: a component of the large latent complex of TGF-beta 1 with multiple repeat sequences. *Cell* 1990;61:1051-1061
- 16 Moren A, Olofsson A, Stenman G, Sahlin P, Kanzaki T, Claesson-Welsh L, ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH. Identification and characterization of LTBP-2, a novel latent transforming growth factor-beta-binding protein. *J Biol Chem* 1994;269:32469-32478
- 17 Yin W, Smiley E, Germiller J, Mecham RP, Florer JB, Wenstrup RJ, Bonadio J. Isolation of a novel latent transforming growth factor-beta binding protein gene (LTBP-3). *J Biol Chem* 1995;270:10147-10160
- 18 Giltay R, Kostka G, Timpl R. Sequence and expression of a novel member (LTBP-4) of the family of latent transforming growth factor-beta binding proteins. *FEBS Lett* 1997;411:164-168
- 19 Michel K, Roth S, Trautwein C, Gong W, Flemming P, Gressner AM. Analysis of the expression pattern of the latent transforming growth factor beta binding protein isoforms in normal and diseased human liver reveals a new splice variant missing the proteinase-sensitive hinge region. *Hepatology* 1998;27:1592-1599
- 20 Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Molecular and functional aspects of latent transforming growth factor-beta binding protein: just a masking protein? *Cell Tissue Res* 1999;297:363-370
- 21 Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll RJ. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 1995;96:447-455
- 22 Ebner R, Chen RH, Lawler S, Zioncheck T, Deryck R. Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF-beta or activin. *Science* 1993;262:900-902
- 23 Lopez-Casillas F, Payne HM, Andres JL, Massague J. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* 1994;124:557-568
- 24 Henis YI, Moustakas A, Lin HY, Lodish HF. The types II and III transforming growth factor-beta receptors form homo-oligomers. *J Cell Biol* 1994;126:139-154
- 25 Chen RH, Deryck R. Homomeric interactions between type II transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* 1994;269:22868-22874
- 26 Luo K, Lodish HF. Signaling by chimeric erythropoietin-TGF-beta receptors: homodimerization of the cytoplasmic domain of the type I TGF-beta receptor and heterodimerization with the type II receptor are both required for intracellular signal transduction. *EMBO J* 1996;15:4485-4496
- 27 Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 1994;370:341-347
- 28 Feng XH, Deryck R. Ligand-independent activation of transforming growth factor (TGF) beta signaling pathways by heteromeric cytoplasmic domains of TGF-beta receptors. *J Biol Chem* 1996;271:13123-13129
- 29 Wieser R, Wrana JL, Massague J. GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *EMBO J* 1995;14:2199-2208
- 30 Attisano L, Wrana JL, Montalvo E, Massague J. Activation of signaling by the activin receptor complex. *Mol Cell Biol* 1996;16:1066-1073
- 31 Matsuzaki K, Date M, Furukawa F, Tahashi Y, Matsushita M, Sugano Y, Yamashiki N, Nakagawa T, Seki T, Nishizawa M, Fujisawa J, Inoue K. Regulatory mechanisms for transforming growth factor beta as an autocrine inhibitor in human hepatocellular carcinoma: implications for roles of smads in its growth. *Hepatology* 2000;32:218-227
- 32 Muro-Cacho CA, Rosario-Ortiz K, Livingston S, Munoz-Antonia T, Defective transforming growth factor beta signaling pathway in head and neck squamous cell carcinoma as evidenced by the lack of expression of activated Smad2. *Clin Cancer Res* 2001;7:1618-1626
- 33 Itoh S, Landstrom M, Hermansson A, Itoh F, Heldin CH, Heldin NE, ten Dijke P. Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *J Biol Chem* 1998;273:29195-29201
- 34 Deryck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 1998;95:737-740
- 35 Pinzani M. Novel insights into the biology and physiology of the Ito cell. *Pharmacol Ther* 1995;66:387-412
- 36 Branton MH, Kopp JB. TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect* 1999;1:1349-1365
- 37 杨文卓, 曾民德. 肝纤维化的发病机制及病理生理. 国外医学消化分册 2000;4:217-221
- 38 Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993;328:1828-1835
- 39 Huang GC, Zhang JS, Zhang YE. Effects of retinoic acid on proliferation, phenotype and expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in TGF-β1-stimulated rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2000;6:819-823
- 40 王晓玲, 刘平, 刘成海, 刘成. 拆方扶正化瘀方对肝细胞及肝星状细胞功能的影响. 世界华人消化杂志 1999;7:663-665
- 41 王炯, 李定国, 陆汉明, 孙志广, 蒋祖民, 徐芹芳, 顾鹤定, 陈颖伟. 脂蛋白、钙拮抗剂对大鼠贮脂细胞的影响. 世界华人消化杂志 1999;7:57-59
- 42 Wu CH. Fibrodynamics-elucidation of the mechanisms and sites of liver fibrogenesis. *World J Gastroenterol* 1999;5:388-390
- 43 Pinzani M, Marra F, Carloni V. Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver* 1998;18:2-13
- 44 黄光存, 张锦生. 肝星状细胞激活的细胞内信号转导. 世界华人消化杂志 2001;9:1056-1060
- 45 姚树坤, 殷飞. 肝纤维化的早期诊断. 世界华人消化杂志 2000;8:681-683
- 46 Rockey DC, Maher JJ, Jarnagin WR, Gabbiani G, Friedman SL. Inhibition of rat hepatic lipocyte activation in culture by interferon-gamma. *Hepatology* 1992;16:776-784
- 47 Mallat A, Preaux AM, Blazejewski S, Rosenbaum J, Dhumeaux D, Mavier P. Interferon alfa and gamma inhibit proliferation and collagen synthesis of human Ito cells in culture. *Hepatology* 1995;21:1003-1010
- 48 Lortat-Jacob H, Baltzer F, Desmouliere A, Peyrol S, Grimaud JA. Lobular—but not periovular—inhibition of collagen deposition in the liver of *S. mansoni* infected mice using interferon-gamma. *J Hepatol* 1997;26:894-903
- 49 Baroni GS, D'Ambrosio L, Curto P, Casini A, Mancini R, Jezequel AM, Benedetti A. Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology* 1996;23:1189-1199
- 50 Cales P. Apoptosis and liver fibrosis: antifibrotic strategies. *Biomed Pharmacother* 1998;52:259-263
- 51 方步武, 刘平, 刘成, 徐列明. 基质金属蛋白和肝纤维化. 中华消化杂志 1998;8:239-241
- 52 Williams E, Iredale J. Hepatic regeneration and TGF-beta: growing to a prosperous perfection. *Gut* 2000;46:593-594
- 53 Taipale J, Saharinen J, Hedman K, Keski-Oja J. Latent transforming growth factor-beta 1 and its binding protein are components of extracellular matrix microfibrils. *J Histochem Cytochem* 1996;44:875-889
- 54 Oberhammer F, Bursch W, Tiefenbacher R, Froschl G, Pavelka M, Purchio T, Schulte-Hermann R. Apoptosis is induced by transforming growth factor-beta 1 within 5 hours in regressing liver without significant fragmentation of the DNA. *Hepatology* 1993;18:1238-1246
- 55 Bedossa P, Peltier E, Terris B, Franco D, Poynard T. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and TGF-beta 1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers. *Hepatology* 1995;21:760-766
- 56 Date M, Matsuzaki K, Matsushita M, Tahashi Y, Furukawa F, Inoue K. Modulation of transforming growth factor beta function in hepatocytes and hepatic stellate cells in rat liver injury. *Gut* 2000;46:593-594
- 57 Schuppan D, Koda M, Bauer M, Hahn EG. Fibrosis of liver, pancreas and intestine: common mechanisms and clear targets? *Acta Gastroenterol Belg* 2000;63:366-370

# 肝肾综合征的治疗进展

张斌,万谋彬,王灵台

张斌,万谋彬,中国人民解放军第二军医大学附属长海医院感染科  
上海市 200433  
王灵台,上海中医药大学附属曙光医院肝病科 上海市 200021  
项目负责人:张斌,200433,上海市长海路 174 号,中国人民解放军第二军医大学附属长海医院感染科。  
收稿日期:2002-07-01 接受日期:2002-08-02

## 摘要

肝肾综合征(HRS)是继发于肝硬化、重型肝炎等严重肝病肝功能失代偿情况下的肾功能衰竭综合征,其死亡率很高,目前仍缺乏确切有效的治疗方法。除对基础肝病的积极治疗外,肝移植对HRS有明确疗效,TIPS、MARS、血管活性药物等治疗可暂时改善肾功能,也可作为肝移植的辅助治疗措施。本文就HRS治疗方面的进展情况进行综述。

张斌,万谋彬,王灵台. 肝肾综合征的治疗进展. 世界华人消化杂志 2003;11 (3):330-333  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/330.htm>

## 0 引言

肝肾综合征(hepatorenal syndrome, HRS)是继发于肝硬化、重型肝炎等严重肝病肝功能失代偿的肾功能衰竭综合征,其肾脏的损害为功能性改变,是可逆的<sup>[1-11]</sup>。HRS 的发病机制还不十分清楚,可能与门脉高压后全身小动脉扩张有关,造成体循环血管总阻力的下降和动脉低血压,使动脉有效循环量相对不足,导致肾脏血管收缩,使肾灌注不足,最终导致肾衰的发生<sup>[12-22]</sup>。HRS 的死亡率很高,在一项肝硬化合并腹水患者的大样本随访研究中,1 a、5 a 后发生 HRS 的比例分别为 18 % 和 39 %,患者平均生存时间仅为 1.7 wk,或 10 wk 的死亡率高达 90 %<sup>[23]</sup>。目前仍缺乏确切有效治疗 HRS 的方法,肝移植被认为是治疗 HRS 有明确疗效的方法,但是其远期疗效不够理想<sup>[24,25]</sup>,经颈静脉肝内门体分流术(transjugular intrahepatic portasystemic shunt, TIPS)、分子黏附再循环系统(molecular adsorbent re-circulating system, MARS)及血管活性药物等治疗可暂时改善肾功能,也可作为肝移植的辅助措施<sup>[26-31]</sup>,以下就这方面的进展情况进行综述。

## 1 水及电解质平衡

从血流动力学角度分析,HRS 主要有两种类型,一种为低排高阻型,与短期内大量体液丢失有关,在 HRS 中较少见,这种类型经扩容治疗后肾功能改善较为显著;另一种为高排低阻型,相对多见,可能与肝病患者病情发展过程中体内假性神经递质增加有

关,可导致中枢及交感神经系统功能紊乱,并导致血管扩张,使全身有效循环量相对不足,这种类型对扩容治疗的疗效不明显。因而目前对扩容的治疗效果仍有争议,虽部分患者在扩容后可出现肾功能的改善,但如果尿量未增加而导致容量负荷增加,则有出现肺水肿的可能,并可能加重稀释性低钠血症,导致血浆渗透压下降,细胞外水分向细胞内转移,并渗入浆膜腔,肾组织细胞内水分增加,影响肾小球循环血供,进一步加重 HRS。另外需要高度重视低钠血症的纠正,采用高渗盐水对 HRS 可能有一定的改善作用,但目前对此仍有争议。

## 2 血管活性药物

### 2.1 肾血管扩张剂

2.1.1 多巴胺及多巴酚丁胺 可以扩张肾血管并增加心排血量,改善肾血流量及滤过率,建议采用小剂量多巴胺(< 5 ug·kg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>)进行治疗;后者为 β 受体兴奋剂,也有增加肾血流量及尿量的作用。二者联合使用较好,但疗效报道不一。

2.1.2 前列腺素类 Bataller et al<sup>[32]</sup>认为肝功能紊乱可影响到肾脏中前列腺素的合成和释放,导致 HRS 患者肾脏产生前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)和 6-oxo-PGF<sub>1</sub> 减少。另外,肝硬化腹水患者使用可以抑制环氧合酶的非类固醇类消炎药,可以促进 HRS 的发生。但也有学者提出相反意见,如 Clewell et al<sup>[33]</sup>研究表明,静脉内给予 PGs 或口服米索前列醇,对改善 HRS 患者的肾功能没有确切的疗效。

2.1.3 内皮素拮抗剂 内皮素具有收缩肾血管的作用,使用内皮素拮抗剂可以达到扩张肾脏血管的目的。Soper et al<sup>[34]</sup>用内皮素 A- 受体拮抗剂 BQ-123 治疗 3 例酒精性肝硬化合并 HRS 的患者,取得了一定疗效,但由于病例数较少,还不能肯定其疗效。

2.1.4 抗氧化剂 Holt et al<sup>[35]</sup>对 12 例 HRS 患者给予一种抗氧化剂 N- 乙酰半胱氨酸进行静注治疗,疗程 5 d,尽管肝功能或全身血液动力学没有变化,但是肌酐清除率从(24 ± 3) ml/min 改善为(43 ± 4) ml/min,提示其具有减轻氧化剂损害的作用,对肾功能也有一定的改善作用。但这些也是初步的研究结果,还需要进一步临床对照研究来证实。

2.1.5 其他 如 654-2 具有扩张肾血管的作用,患者狂躁时可改用东莨菪碱治疗。

### 2.2 血管收缩剂

**2.2.1 抗利尿类药物** 抗利尿类药物有血管收缩作用，对于肝硬化合并肾功能损害的患者可以增加内脏和全身血管的阻力，从而使全身循环血容量进行重新分布。通过静脉注射抗利尿激素-1受体激活剂8-鸟氨酸抗利尿激素或鸟氨酸加压素后，仅4 h后就可以改善全身血压及肾脏的灌注压，并进一步增加了肾脏血流量和肾小球滤过率<sup>[36]</sup>，注射超过48 h后可以进一步改善肾功能，对肾素-血管紧张素系统和交感神经系统的活性均有显著的抑制作用，有利于改善肾血流和肾小球滤过率。在配合使用白蛋白进行扩充血容量治疗的基础上，注射鸟氨酸加压素(ornipressin)治疗至第15天时，肾功能的改善会更加显著，但是由于全身血管收缩可以出现局部组织的缺血性萎缩，如肌肉坏死性肠炎、萎缩性心脏病及口咽部溃疡等，因而限制了这种治疗的进一步推广。但是，注射另一种抗利尿类药物特利加压素(terlipressi)48 h后，可以改善肾功能，但没有以上的严重副作用<sup>[37]</sup>，值的进一步推广使用。另外特利加压素联合应用白蛋白或其他有扩张肾脏血管作用的药物，如低剂量的多巴胺，其效果会更好<sup>[38]</sup>。

### 2.2.2 - 肾上腺素兴奋剂 米多君(midodrine)是一种

- 肾上腺素兴奋剂，可以改善肝硬化患者的全身和肾脏血流动力学，但是对于HRS患者没有这样的效果<sup>[39]</sup>，但当米多君与扩容药物及奥曲肽(Octreotide，一种生长抑素类似物)进行联合治疗时，对全身和肾脏的血流动力学和尿钠排泄等均有显著的改善作用，Angeli et al<sup>[40]</sup>联合使用奥曲肽、米多君和白蛋白治疗5例HRS，疗程为20 d，结果发现，患者尿量、肾血流量及肾小球滤过率(GFR)等均有明显改善，且在提高生存率方面优于用小剂量多巴胺和扩容治疗。

## 3 经颈静脉肝内门体分流术(transjugular intrahepatic portosystemic shunt, TIPS)

TIPS插入治疗可以降低门脉压力，使一部分内脏血容量直接回到体循环中，从而可以在一定程度上限制血液中具有血管活性作用的神经体液因子对内脏的作用，因而对肾脏血流动力学也有一定的改善作用<sup>[41-52]</sup>。然而TIPS不是对每一个HRS患者的肾功能均有改善作用，而仅仅是对于部分敏感者有效，目前对于适合TIPS治疗的适应证还不确定，也许与肾脏损害程度和黄疸水平有一定关系，这些还需要进行进一步的临床研究，而且他也不能将患者肾功能恢复到完全正常的水平，这可能与TIPS导致的急性高动力循环有关<sup>[53]</sup>。

TIPS对于患者的生存是否有改善，目前结论报道不一，如Rossle et al<sup>[54]</sup>认为HRS合并难治性腹水患者接受TIPS治疗的生存情况可以得到改善，要显著好于接受腹腔穿刺放腹水治疗的患者；Spahr et al<sup>[55]</sup>报道1例肝硬化合并HRS的患者接受TIPS治疗后尿量增多，肾功能明显改善，而Lebrec et al<sup>[56]</sup>研究认为TIPS治疗远期疗效不理想，他们对25例难治性腹水的患者进行

TIPS治疗，其中8例为合并黄疸且肝功能为Child C级，接受TIPS的患者2a死亡率为56%，显著高于接受重复大量穿刺放腹水的患者(29%)。最近，Brensing et al<sup>[57]</sup>在一项大样本TIPS治疗HRS的研究中，2a生存率为35%，并按HRSⅠ、Ⅱ型进行进一步研究，Ⅱ型患者的1a生存为70%，显著高于Ⅰ型的20%，Cox回归分析结果发现，HRS类型和血胆红素水平是TIPS治疗后生存的独立因素。

## 4 分子黏附再循环系统(molecular adsorbent recirculating system, MARS)

分子黏附再循环系统(MARS)是一种改良的透析治疗方法，它应用含白蛋白的透析液，可以选择性地清除与白蛋白结合的物质，它采用一个透析设备，含有通透性不均匀的聚合树脂透析膜(聚砜类渗透膜)，在患者血液和膜的透析液侧均用人血白蛋白。在透析过程中，一个密闭的透析环路可以将与白蛋白结合的毒素从血浆中黏附在膜上，与白蛋白结合的毒素与透析膜黏附后经过持续不断的解离而得以清除。水溶性的毒素也可以被活性炭柱和离子交换树脂黏附后进行清除，这个系统与一个连续的静脉血液滤过系统连接，以利于清除分子量<50 kd的物质<sup>[58-61]</sup>。

Mitzner et al<sup>[62]</sup>比较了MARS透析和传统血液透析方法在HRS治疗中的疗效，结果发现MARS显著好于传统透析方法，其中MARS透析治疗组可以较显著的减少血清胆红素水平和肌酐水平[从(3.8 ± 1.6) mg/dL到(2.3 ± 1.5) mg/dL]，因而延长了生存时间，但是，2 wk生存率仍然低于40%。MARS还有许多其他优点，如接受治疗的患者在治疗过程中可以保持平均动脉压的稳定，还可清除许多细胞因子，如TNF和IL-6，这些物质与引起血管扩张物质的产生有关，因而对HRS的改善有好处<sup>[63]</sup>。目前MARS是一种暂时性的支持治疗，可作为拟行肝移植的HRS过渡性治疗。

## 5 肝移植

目前认为肝移植是治疗HRS具有明确疗效的方法<sup>[64-69]</sup>，但是患者接受肝脏移植后，生存率要显著低于肾功能正常的移植患者，而且他们肾功能恢复正常的时间要慢数月或数年，因而疗效并不十分理想，而且肝移植不容易被每一个患者乐意接受，因而对合并HRS患者采用肝移植并不十分适合<sup>[70-71]</sup>，该方法还在进一步的完善中。

总之，HRS仍然是医学的难题，目前尚缺乏疗效理想的治疗手段，本文中的许多治疗措施有助于延长患者的生命，尤其是肝移植已经显示出良好的运用前景，随着临床的进一步完善，其疗效还将进一步提高。但是，这些治疗方法需要有所选择的运用，个体的疗效差异较大，目前还没有一个明确的使用标准，因而需要在临床中进行不断的研究。HRS是一个综合性的

治疗，上述方法仅仅是治疗中的一个部分，而常规性治疗和良好的护理在治疗中具有基础性的作用，不能被忽视。由于HRS可因过度利尿、大量放腹水、出血、感染及肾脏损害药物的使用等因素诱发，因而尽可能地避免诱发和加重HRS的各种因素在总体治疗中具有十分重要的作用。目前肝移植尽管技术日趋成熟，但是受到器官供体、费用及手术并发症等多种因素的限制，因而不能很好的推广，而且HRS患者经过长期的慢性疾病过程，最后发展到肝肾功能衰竭期，即使肝移植手术十分成功，但其疗效仍要大打折扣。TIPS、MRAS及血管活性药物的使用等可以一定程度上改善HRS的肾功能，也可以作为肝移植的辅助治疗措施，为肝移植的成功开展创造条件，但是这些治疗手段与肝移植技术一样，仍然在不断的发展和完善中，相信随着医学技术水平的不断提高，HRS的治疗效果还会有很大的提高。

## 6 参考文献

- 1 Epstein M. Hepatorenal syndrome: emerging perspectives. *Semin Nephrol* 1997;17:563-575
- 2 Wong F, Blendis L. Pathophysiology and treatment of hepatorenal syndrome. *Gastroenterologist* 1998;6:122-135
- 3 Bataller R, Arroyo V, Gines P, Sort P. Hepatorenal syndrome. *Forum (Genova)* 1998;8:62-81
- 4 Worman HJ, Feng L, Mamiya N. Molecular biology and the diagnosis and treatment of liver diseases. *World J Gastroenterol* 1998;4:185-191
- 5 Eckardt KU. Renal failure in liver disease. *Intensive Care Med* 1999;25:5-14
- 6 Kuzela L, Oltman M, Novotna T, Vavrecka A. Hepatorenal syndrome. *Bratisl Lek Listy* 2000;101:639-644
- 7 Bataller R, Gines P, Arroyo V, Rodes J. Hepatorenal syndrome. *Clin Liver Dis* 2000;4:487-507
- 8 Gines P. Diagnosis and treatment of hepatorenal syndrome. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000;14:945-957
- 9 Arroyo V, Jimenez W. Complications of cirrhosis. II. Renal and circulatory dysfunction. Lights and shadows in an important clinical problem. *J Hepatol* 2000;32(Suppl):157-170
- 10 Briglia AE, Anania FA. Hepatorenal syndrome. Definition, pathophysiology, and intervention. *Crit Care Clin* 2002;18:345-373
- 11 Blaise P, Moonen M, Rorive G. Update on hepatorenal syndrome. *Nephrologie* 2002;23:11-17
- 12 Fernandez-Rodriguez CM, Prada IR, Prieto J, Montuenga LM, Elssasser T, Quiroga J, Moreiras M, Andrade A, Cuttitta F. Circulating adrenomedullin in cirrhosis: relationship to hyperdynamic circulation. *J Hepatol* 1998;29:250-256
- 13 Gines P, Sort P. Pathophysiology of renal dysfunction in cirrhosis. *Digestion* 1998;59(Suppl 2):11-15
- 14 Pasqualetti P, Festuccia V, Collacciani A, Acitelli P, Casale R. Circadian rhythm of arginine vasopressin in hepatorenal syndrome. *Nephron* 1998;78:33-37
- 15 Gentilini P, Laffi G, La Villa G, Raggi VC. Pathogenetic factors and clinical elements in ascites and hepatorenal syndrome during liver cirrhosis. *Ann Ital Med Int* 1999;14:264-284
- 16 Kes P. Hepatorenal syndrome: new perspectives in pathophysiology and management. *Acta Med Croatica* 2000;54:165-167
- 17 Knotek M, Rogachev B, Schrier RW. Update on peripheral arterial vasodilation, ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *Can J Gastroenterol* 2000;14(Suppl D):112D-121D
- 18 Saracyn M. Hepatorenal syndrome—pathogenesis and clinical aspects. *Pol Arch Med Wewn* 2001;106:1087-1092
- 19 Wong F, Blendis L. New challenge of hepatorenal syndrome: prevention and treatment. *Hepatology* 2001;34:1242-1251
- 20 Gines P, Guevara M. Good news for hepatorenal syndrome. *Hepatology* 2002;36:504-506
- 21 Moreau R. Hepatorenal syndrome in patients with cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:739-747
- 22 Kramer L, Horl WH. Hepatorenal syndrome. *Semin Nephrol* 2002;22:290-301
- 23 Gines A, Escorsell A, Gines P, Salo J, Jimenez W, Inglada L, Navasa M, Claria J, Rimola A, Arroyo V. Incidence, predictive factors, and prognosis of the hepatorenal syndrome in cirrhosis with ascites. *Gastroenterology* 1993;105:229-236
- 24 Planas R, Bataller R, Rodes J. Hepatorenal Syndrome. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2000;3:445-450
- 25 Arroyo V, Guevara M, Gines P. Hepatorenal syndrome in cirrhosis: pathogenesis and treatment. *Gastroenterology* 2002;122:1658-1676
- 26 Bataller R, Gines P, Guevara M, Arroyo V. Hepatorenal syndrome. *Semin Liver Dis* 1997;17:233-247
- 27 Moore K. The hepatorenal syndrome. *Clin Sci (Lond)* 1997;92:433-443
- 28 Walter E. Therapy of hepatorenal syndrome. *Schweiz Rundsch Med Prax* 1997;86:102-103
- 29 Gentilini P, La Villa G, Casini-Raggi V, Romanelli RG. Hepatorenal syndrome and its treatment today. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:1061-1065
- 30 Dagher L, Patch D, Marley R, Moore K, Burroughs A. Review article: pharmacological treatment of the hepatorenal syndrome in cirrhotic patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:515-521
- 31 Carreiro G, Moreira AL, Murad FF, Azevedo F, Coelho HS. TIPS -Transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *Arq Gastroenterol* 2001;38:69-80
- 32 Bataller R, Sort P, Gines P, Arroyo V. Hepatorenal syndrome: definition, pathophysiology, clinical features and management. *Kidney Int Suppl* 1998;66:S47-53
- 33 Clewell JD, Walker-Renard P. Prostaglandins for the treatment of hepatorenal syndrome. *Ann Pharmacother* 1994;28:54-55
- 34 Soper CP, Latif AB, Bending MR. Amelioration of hepatorenal syndrome with selective endothelin-A antagonist. *Lancet* 1996;347:1842-1843
- 35 Holt S, Goodier D, Marley R, Patch D, Burroughs A, Fernando B, Harry D, Moore K. Improvement in renal function in hepatorenal syndrome with N-acetylcysteine. *Lancet* 1999;353:294-295
- 36 Lenz K, Hortnagl H, Druml W, Reither H, Schmid R, Schneeweiss B, Laggner A, Grimm G, Gerbes AL. Ornipressin in the treatment of functional renal failure in decompensated liver cirrhosis. Effects on renal hemodynamics and atrial natriuretic factor. *Gastroenterology* 1991;101:1060-1067
- 37 Hadengue A, Gadano A, Moreau R, Giostra E, Durand F, Valla D, Erlinger S, Lebrec D. Beneficial effects of the 2-day administration of terlipressin in patients with cirrhosis and hepatorenal syndrome. *J Hepatol* 1998;29:565-570
- 38 Gulberg V, Bilzer M, Gerbes AL. Long-term therapy and retreatment of hepatorenal syndrome type 1 with ornipressin and dopamine. *Hepatology* 1999;30:870-875
- 39 Angeli P, Volpin R, Piovan D, Bortoluzzi A, Craighero R, Bottaro S, Finucci GF, Casiglia E, Sticca A, De Toni R, Pavan L, Gatta A. Acute effects of the oral administration of midodrine, an alpha-adrenergic agonist, on renal hemodynamics and renal function in cirrhotic patients with ascites. *Hepatology* 1998;28:937-943
- 40 Angeli P, Volpin R, Gerunda G, Craighero R, Roner P, Merenda R, Amadio P, Sticca A, Caregaro L, Maffei-Faccioli A, Gatta A. Reversal of type 1 hepatorenal syndrome with the administration of midodrine and octreotide. *Hepatology* 1999;29:1690-1697
- 41 Lerut J, Goffette P, Laterre PF, Donataccio M, Reynaert MS, Otte JB. Sequential treatment of hepatorenal syndrome and posthepatitis cirrhosis by intrahepatic portosystemic shunt (TIPSS) and liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 1995;42:985-987
- 42 Rovira E, Moles JR, Hinojosa J, Primo J, Gonzalo F, Albert A. Dysfunction of a TIPS (transjugular intrahepatic porto-systemic shunt) and chylous ascites. *Rev Esp Enferm Dig* 1997;89:475-477
- 43 Stanley AJ, Redhead DN, Hayes PC. Review article: update on the role of transjugular intrahepatic portosystemic stent-shunt (TIPSS) in the management of complications of portal hypertension. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:261-272
- 44 Wong F. Transjugular intrahepatic portosystemic stent shunt for hepatorenal syndrome and ascites. *Digestion* 1998;59(Suppl 2):41-44

- 45 Guevara M, Gines P, Bandi JC, Gilabert R, Sort P, Jimenez W, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Arroyo V, Rodes J. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt in hepatorenal syndrome: effects on renal function and vasoactive systems. *Hepatology* 1998;28:416-422
- 46 Textor HJ, Brensing KA, Wilhelm K, Strunk H, Block W, Raab P, Hofer U, Muller-Miny H, Layer G, Schiedermeier P, Schuller H, Sauerbruch T, Schild HH. TIPSS: technical and clinical results after 4 years. *Röfo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahrt* 1998;168:361-368
- 47 Rossle M, Siegerstetter V, Huber M, Ochs A. The first decade of the transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS): state of the art. *Liver* 1998;18:73-89
- 48 Ong JP, Sands M, Younossi ZM. Transjugular intrahepatic portosystemic shunts (TIPS): a decade later. *J Clin Gastroenterol* 2000;30:14-28
- 49 Rosch J, Keller FS. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt: present status, comparison with endoscopic therapy and shunt surgery, and future prospectives. *World J Surg* 2001;25:337-345
- 50 Schepke M, Sauerbruch T. Transjugular portosystemic stent shunt in treatment of liver diseases. *World J Gastroenterol* 2001;7:170-174
- 51 Teng GJ, Bettmann MA, Hoopes PJ, Yang L. Comparison of a new stent and Wallstent for transjugular intrahepatic portosystemic shunt in a porcine model. *World J Gastroenterol* 2001;7:74-79
- 52 Chutaputti A. Management of refractory ascites and hepatorenal syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:456-461
- 53 Wong F, Sniderman K, Liu P, Allidina Y, Sherman M, Blendis L. Transjugular intrahepatic portosystemic stent shunt: effects on hemodynamics and sodium homeostasis in cirrhosis and refractory ascites. *Ann Intern Med* 1995;122:816-822
- 54 Rossle M, Ochs A, Gulberg V, Siegerstetter V, Holl J, Deibert P, Olschewski M, Reiser M, Gerbes AL. A comparison of paracentesis and transjugular intrahepatic portosystemic shunting in patients with ascites. *N Engl J Med* 2000;342:1701-1707
- 55 Spahr L, Fenyves D, N'Guyen VV, Roy L, Legault L, Dufresne MP, Pomier-Layrargues G. Improvement of hepatorenal syndrome by transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *Am J Gastroenterol* 1995;90:1169-1171
- 56 Lebrec D, Giuly N, Hadengue A, Vilgrain V, Moreau R, Poynard T, Gadano A, Lassen C, Benhamou JP, Erlinger S. Transjugular intrahepatic portosystemic shunts: comparison with paracentesis in patients with cirrhosis and refractory ascites: a randomized trial. French Group of Clinicians and a Group of Biologists. *J Hepatol* 1996;25:135-144
- 57 Brensing KA, Textor J, Perz J, Schiedermaier P, Raab P, Strunk H, Klehr HU, Kramer HJ, Spengler U, Schild H, Sauerbruch T. Long term outcome after transjugular intrahepatic portosystemic stent-shunt in non-transplant cirrhotics with hepatorenal syndrome: a phase II study. *Gut* 2000;47:288-295
- 58 Aviles J, Macia M, Morales S, Perez F, Moreno A, Navarro J, Navazo L, Garcia J. Efficiency of dialysis with albumin in the treatment of patients with advanced hepatic insufficiency: initial experience with the MARS system in Spain. *Nefrologia* 2001; 21:376-385
- 59 Mitzner SR, Klammt S, Peszynski P, Hickstein H, Korten G, Stange J, Schmidt R. Improvement of multiple organ functions in hepatorenal syndrome during albumin dialysis with the molecular adsorbent recirculating system. *Ther Apher* 2001;5:417-422
- 60 Mitzner SR, Stange J, Klammt S, Peszynski P, Schmidt R, Noldge-Schomburg G. Extracorporeal detoxification using the molecular adsorbent recirculating system for critically ill patients with liver failure. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(Suppl 17):S75-82
- 61 Stange J, Hassanein TI, Mehta R, Mitzner SR, Bartlett RH. The molecular adsorbents recycling system as a liver support system based on albumin dialysis: a summary of preclinical investigations, prospective, randomized, controlled clinical trial, and clinical experience from 19 centers. *Artif Organs* 2002;26: 103-110
- 62 Mitzner SR, Stange J, Klammt S, Risler T, Erley CM, Bader BD, Berger ED, Lauchart W, Peszynski P, Freytag J, Hickstein H, Loock J, Lohr JM, Liebe S, Emmrich J, Korten G, Schmidt R. Improvement of hepatorenal syndrome with extracorporeal albumin dialysis MARS: results of a prospective, randomized, controlled clinical trial. *Liver Transpl* 2000;6:277-286
- 63 Awad SS, Sawada S, Soldes OS, Rich PB, Klein R, Alarcon WH, Wang SC, Bartlett RH. Can the clearance of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 be enhanced using an albumin dialysate hemodiafiltration system? *ASAIO J* 1999;45:47-49
- 64 de Oliveira e Silva A, de Melo CR, dos Santos TE, Cardoso ES, Copstein JL, Santos Junior ED, meniconi MT, Abensur H, Noronha IL, Araujo MR, Romao Junior JE, D'Albuquerque LA. Reversal of hepatorenal syndrome after liver transplantation. Considerations about 3 patients. *Arq Gastroenterol* 1997;34:235-240
- 65 Zhang SG, Wu MC, Tan JW, Chen H, Yang JM, Qian QJ. Expression of perforin and granzyme B mRNA in judgement of immunosuppressive effect in rat liver transplantation. *World J Gastroenterol* 1999;5:217-220
- 66 He XS, Huang JF, Chen GH, Zheng KL, Ye XM. A successful case of combined liver and kidney transplantation for autosomal dominant polycystic liver and kidney disease. *World J Gastroenterol* 1999;5:79-80
- 67 Riordan SM, Williams R. Transplantation of primary and reversibly immortalized human liver cells and other gene therapies in acute liver failure and decompensated chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2000;6:636-642
- 68 He XS, Huang JF, Chen GH, Fu Q, Zhu XF, Lu MQ, Wang GD, Guan XD. Orthotopic liver transplantation for fulminant hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2000;6:398-399
- 69 Davis CL, Gonwa TA, Wilkinson AH. Pathophysiology of renal disease associated with liver disorders: implications for liver transplantation. Part I. *Liver Transpl* 2002;8:91-109
- 70 Brown RS Jr, Lombardero M, Lake JR. Outcome of patients with renal insufficiency undergoing liver or liver-kidney transplantation. *Transplantation* 1996;62:1788-1793
- 71 Jeyarajah DR, Gonwa TA, McBride M, Testa G, Abbasoglu O, Husberg BS, Levy MF, Goldstein RM, Klントmalm GB. Hepatorenal syndrome: combined liver kidney transplants versus isolated liver transplant. *Transplantation* 1997;64:1760-1765

# 血管紧张素与肝纤维化

李乾,张桂英,李新华

李乾,张桂英,李新华,中南大学湘雅医院消化内科 湖南省长沙市 410008  
项目负责人:张桂英,410008,湖南省长沙市,中南大学湘雅医院消化内科.  
liqian0816@hotmail.com  
电话:0731-4327249  
收稿日期:2002-06-12 接受日期:2002-07-09

## 摘要

局部血管紧张素与组织纤维化和/或重构过程有关,肝星状细胞可表达血管紧张素受体,故血管紧张素与肝纤维化的形成关系密切。血管紧张素通过促进肝星状细胞发生,影响转化生长因子 $\beta$ 、基质金属蛋白酶及其组织抑制物的合成、活化,参与肝纤维化形成。本文就细胞因子、肝星状细胞、基质金属蛋白酶及其组织抑制物在肝纤维化过程中的作用及与血管紧张素的关系研究进展作一综述。

李乾,张桂英,李新华. 血管紧张素与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2003;11(3):334-337  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/334.htm>

## 0 引言

血管紧张素Ⅱ(angiotensin II, Ang II)通过血管收缩和钠潴留来维持血压和体液内环境的血流动力学作用早以得到证实<sup>[1]</sup>;Ang II尚有上调细胞因子、促进细胞增生和调节细胞外基质代谢等非血流动力学作用<sup>[2]</sup>,其在心、肾和肝纤维化形成过程中可能具有重要作用。临床在使用血管紧张转化酶抑制剂(angiotensin-converting enzyme inhibitors, ACEI)和Ang II受体拮抗剂过程中发现,二者均存在抗心、肾纤维化作用。肝与心、肾在纤维化过程中具有一些相同的机制<sup>[3]</sup>,应用ACEI和Ang II拮抗剂有可能为抗肝纤维化治疗提供新的思路。目前在肝纤维化形成过程中细胞因子、肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC),基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)及基质金属蛋白酶组织抑制物(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP)正成为研究的热点<sup>[4]</sup>。

## 1 血管紧张素Ⅱ与肝星状细胞发生

HSC位于肝细胞与肝窦内皮细胞之间的Disse腔内,正常时呈静止状态,肝损伤过程中,静止的HSC被致病因子激活经表型转化而成为肌成纤维细胞样细胞(myofibroblast-like cells, MFB),表达 $\alpha$ -平滑肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)及结蛋白(desmin)等标志物,并过多产生和沉积大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM),进而促进肝纤维化形

成,可以说HSC的激活是肝纤维化形成的中心环节<sup>[5-8]</sup>。活化后的HSC通过凋亡转归,凋亡的机制仍不清楚,有研究表明HSC通过表达Fas且对Fas配体的刺激应答而进入凋亡<sup>[9]</sup>。故促进HSC凋亡已成为抗纤维化治疗的重要课题。

Ang II在HSC激活,凋亡过程中均起重要作用。目前研究的比较多的是Ang II在HSC激活、凋亡过程中作用,其机制可以通过下述几个方面证实:(1)HSC膜上存在有Ang II作用的受体:目前发现人和动物均存在血管紧张素1受体(angiotensin 1, AT<sub>1</sub>)和血管紧张素2受体(angiotensin 2, AT<sub>2</sub>),AT<sub>1</sub>受体主要存在于系膜细胞和HSC等,用放射性同位素标记的Ang II与HSC的结合实验表明AT<sub>1</sub>受体介导了Ang II的大部分生物学作用<sup>[10, 11]</sup>,且这些作用能被特异性的AT<sub>1</sub>受体拮抗剂如洛沙坦(Iosartan)所阻断<sup>[12, 13]</sup>;AT<sub>2</sub>受体存在于胚胎细胞,其生物学作用不清楚<sup>[14]</sup>。(2)Ang II能引起HSC内的Ca<sup>2+</sup>增加和HSC收缩。肝损伤时,静止的HSC被激活经表型转化而成为MFB,其表达 $\alpha$ -SMA、Desmin是HSC激活和具有收缩性的标志。Ang II可引起MFB内Ca<sup>2+</sup>增加而致细胞出现收缩反应<sup>[15]</sup>;Ang II引起HSC内的Ca<sup>2+</sup>增加是通过L-TypeCa<sup>2+</sup>通道,许多实验已证实激活的HSC有大量的L-TypeCa<sup>2+</sup>通道存在<sup>[16, 17]</sup>。HSC的收缩有利于HSC向损伤部位移动发挥生物学作用,同时对肝内血液循环(尤其门静脉)起重要作用;无论是动物或人离体实验均表明Ang II处理的HSC能增加肝内血管的阻力,影响肝内微循环,进一步促进和加重了肝纤维化的形成,而ACEI、Ang II受体拮抗剂具有相反的作用<sup>[18-20]</sup>;(3)Ang II对HSC的增生活化起重要作用<sup>[21]</sup>。Ang II对许多类型细胞包括HSC有促有丝分裂的作用<sup>[20, 22]</sup>,用氢的同位素标记的胸腺苷混合于Ang II处理的HSC中,发现HSC的DNA合成增加,进一步发现HSC数量也是明显增加的。Ang II激活HSC增生是通过激活MAPK途径来实现,使用MAPK通道特异性阻滞剂PD98059能明显阻断Ang II的促有丝分裂作用<sup>[21]</sup>;(4)Ang II通过促进TGF-β合成及活化间接促进了HSC的激活(详见下文)。(5)Ang II可能阻止HSC的凋亡。早期发现Ang II可通过AT<sub>1</sub>型受体(AT<sub>1</sub>R)抑制血管平滑肌细胞(VSMC)凋亡,且这种抗细胞凋亡作用可被Losartan阻断<sup>[23]</sup>,其机制通过抑制环鸟苷酸(cGMP)的信号系统<sup>[24]</sup>,刺激VSMC分泌抑制凋亡因子并表达凋亡因子受体<sup>[25, 26]</sup>;刺激血管壁产生细胞外基质分子与整合素结合调节酪氨酸磷酸酶抑制VSMC的凋亡<sup>[27]</sup>;还可能通过影响凋亡

相关基因表达而调节 VSMC 的凋亡<sup>[28]</sup>. HSC 也表达 AT<sub>1</sub>R , Ang 可能通过 AT<sub>1</sub>R 阻止 HSC 的凋亡 , ACEI 和 Ang 拮抗剂能否通过促进 HSC 凋亡发挥抗肝纤维化作用 ? 尚需要进一步的研究 .

## 2 血管紧张素Ⅱ与转化生长因子β

目前证实有多种细胞因子参与复杂的 HSC 激活调节网络<sup>[29]</sup>进而促进肝纤维化的形成 , 其中 TGF-β 是最主要的细胞因子之一<sup>[30,31]</sup>. 活性 TGF-β 在肝纤维化形成过程中的作用包括 : TGF-β 与 HSC TGF-β 受体结合激活 HSC<sup>[32-34]</sup> ; TGF-β 通过诱导其他生长因子的产生及 HSC 上受体表达<sup>[33]</sup>来进一步调控 HSC 的增生活化 ; TGF-β<sub>1</sub> 可调节 ECM 产生 , 沉积和降解<sup>[35-37]</sup>. 目前通过对 TGF-β<sub>1</sub> 基因进行转基因动物研究已可以产生肝纤维化模型<sup>[38]</sup> , 这已从基因水平证实了 TGF-β 与肝纤维化的密切关系 .

Ang 与细胞因子关系非常密切 , 目前研究较多的是 Ang 与 TGF-β<sub>1</sub> 的相互作用 . (1)Ang 可调节细胞因子 TGF-β<sub>1</sub> 的合成 . 早期用 Ang 直接刺激体外培养的血管平滑肌细胞、心肌细胞可表达 TGF-β<sub>1</sub><sup>[39,40]</sup> , 给离体肾脏灌注 Ang 也可以明显增强 TGF-β<sub>1</sub> 的产生和活性<sup>[41,42]</sup> ; 其后发现 Ang 可上调前胶原 和 TGF-β<sub>1</sub> 的 mRNA 在 HSC 的表达<sup>[43]</sup> ; 动物实验表明 ACEI 可通过抑制 Ang 的产生从而减少 TGF-β<sub>1</sub> 的 mRNA 表达及激活激肽释放酶 - 激肽系统刺激前列腺素(PG) 的合成<sup>[44]</sup> 来减轻肝纤维化 ; Powell 等通过基因型分析技术发现 TGF-β<sub>1</sub> 和血管紧张素基因高表达型与肝纤维化的发展高度相关<sup>[45]</sup> ; 在纤维化过程中 Ang 是通过 AT<sub>1</sub> 受体来参与 TGF-β<sub>1</sub> 上调的表达<sup>[46,47]</sup> , 进而促进了肝纤维化的形成 . Ang 诱导 TGF-β<sub>1</sub> 高表达依赖细胞内 p38-MAPK 激酶途径<sup>[48]</sup>. (2)Ang 可促进 TGF-β 的活化 . Anderson 和 Gibbons 报道 Ang 可以通过增加 TGF-β mRNA 的表达水平诱导系膜细胞 , 内皮细胞等产生和分泌 TGF-β , 包括有活性和潜活的 TGF-β , 更重要的是增加 TGF-β 从潜活的形态向活性转化<sup>[49,50]</sup> ; Ang 还可通过 PA/PAI 系统切掉潜活相关肽(latency associated peptide , LAP) , 使潜活 TGF-β 变成具有生物活性的 TGF-β<sup>[51]</sup>. (3) Ang 可上调 TGF-β<sub>1</sub> 受体(TGF-β<sub>1</sub>R) 的表达 . Siegert et al<sup>[52]</sup> 发现将 Ang 和 VSMC 共同培育 , 可显著增加 VSMC 的 TGF-β<sub>1</sub>R 的表达 , 且随共同培育的时间延长 , TGF-β<sub>1</sub>R 表达逐渐增加 , 这促进了靶细胞对 TGF-β<sub>1</sub> 作用的敏感性 . HSC 在激活启动阶段也表达 TGF-β<sub>1</sub>R , 推测 Ang 可通过上调 TGF-β<sub>1</sub>R 的表达来增强 TGF-β<sub>1</sub> 的生物学活性 . (4)Ang 通过 TGF-β<sub>1</sub> 诱导 ECM 的合成 . 早期发现外源性 Ang 可诱导培养的心肌间质纤维母细胞纤维连接蛋白 mRNA 的表达 , 应用 Ang 拮抗剂 Losartan 可逆转心肌纤维化和 型胶原及 TGF-β<sub>1</sub> 的表达<sup>[53]</sup> . 在肝纤维化过程中 TGF-β<sub>1</sub> 是 ECM 产生 , 沉积和降解的主要细胞因子 , Ang 可通过 TGF-β<sub>1</sub>

诱导 ECM 的合成 . (5) Ang 与 TGF-β 可互相调节彼此的表达 . TGF-β 能引起肾素释放 , 将 TGF-β 加入短期培养的近肾小球细胞能增加这些细胞释放肾素<sup>[54]</sup> , 进一步转化为 Ang 又促进 TGF-β 的合成 , 这可能是一种正反馈效应 , 推测也是原发肝损伤因素停止后肝纤维化仍继续进展的原因之一 .

## 3 血管紧张素Ⅱ与基质金属蛋白酶及其组织抑制物

MMP 是一个 Zn<sup>2+</sup> 依赖性多基因家族酶 , 是细胞外基质的主要降解酶 , 几乎能降解细胞外基质的所有成分 , 在正常稳定状态组织中 MMP 表达量极少 , 而在炎性细胞因子、激素、生长因子刺激下和细胞转化过程其表达量上升 . 目前已发现近二十种 MMP 可分成 :(1) 间质胶原酶(MMP-1 、 MMP-8 、 MMP-13) , 主要降解 、 型胶原 ;(2) 明胶酶(MMP-2 、 MMP-9) 降解明胶、基底膜 型胶原及弹性蛋白<sup>[55]</sup> ;(3) 基质分解素(MMP-3 、 MMP-10) , 主要分解蛋白多糖、糖蛋白和 型胶原及明胶 ;(4) 膜型基质金属蛋白酶(MT-MMP) ;(5) 其他酶类<sup>[56]</sup> . MMP 主要由 HSC 分泌合成 , 合成的 MMP 以 Pro MMP 存在 , 大多数 MMP 必须经活化后才能发挥降解细胞外基质的作用 . TIMP 有 TIMP1-4 , TIMP 主要在酶原活化及活化后的 MMP 阶段抑制 MMP 的活性 ; 随着肝纤维化的进展 , TIMP 表达增加<sup>[57]</sup> , 或 MMP 活性降低同时 TIMP 的表达上调 , 导致 TIMPS/MMP 比值增加 , 胶原降解减少<sup>[58,59]</sup> , 又进一步加速了肝纤维化的形成 .

Ang 在肝纤维化时对 MMP 及 TIMP 的作用目前仍研究不多 , 已有的研究表明 :(1)Ang 对 MMP 的合成及活化作用具有双重性 . 一方面 , Ang 能降低 MMP-1 的合成及活性 . Funck et al<sup>[60]</sup> 在心肌胶原基质重构中发现 Ang 明显降低的 MMP-1 的活性 , 而 PGE2 明显增加 MMP-1 的活性 . Brilla et al<sup>[61]</sup> 也发现 Ang 能抑制 MMP-1 降解胶原的活性 , 而 ALD 不能 . Leeheyet al<sup>[62]</sup> 发现 Ang 可促进基质蛋白的合成 , 抑制基质蛋白降解酶中的胶原酶活性 . 其机制可能是 Ang 通过诱导细胞蛋白激酶 C 水平的变化 , 进而影响 MMP 基因调控序列中的转录因子<sup>[63]</sup> 来调控 MMP 的表达 . 另一方面 , Ang

又可增加 MMP 的合成及活性 . 体外细胞研究中卡托普利能抑制明胶酶 A 的合成 . Jonsson et al<sup>[64]</sup> 发现在胆管结扎所致的胆汁性肝纤维化大鼠模型组中 MMP-2 、 MMP-9 活性明显高于卡托普利治疗组 . 卡托普利通过其自由巯基与 ACE 活力部位 Zn<sup>2+</sup> 结合而抑制其活性 , 同样也与 Zn<sup>2+</sup> 依赖的 MMP 活力中心 Zn<sup>2+</sup> 结合而抑制其活性<sup>[65,66]</sup> , 认为这一机制有利于 ACEI 在肝纤维化早期阻止正常基底膜降解、破坏 , 从而抑制 HSC 的活化 . 故而推测不同的 MMP 在纤维化形成的不同阶段其作用可能不同 . (2) Ang 通过调控 PA/PAI 系统参与 MMP 瀑布系统的激活 . Jonsson et al<sup>[64]</sup> 发现 Ang 可通过调节 PA/PAI 系统参与 MMP 的激活 , 增强 MMP 对胶原的降解 , 进而阻止组织纤维化<sup>[67]</sup> ; (3) Ang 可增加 TIMP 的表达 .

Diamond et al<sup>[68]</sup>在研究间质性肾纤维化时就发现Ang促进TGF-β表达的同时也促进MMP和TIMP的表达，认为Ang可能通过MMP和TIMP的作用参与肾纤维化的形成。Ayan et al<sup>[69]</sup>在梗阻性肾病模型中发现肾素，血管紧张素原，TGF-β与TIMP-1平行增高，推测肾脏RAS上调增加了TGF-β与TIMP-1的表达，进而改变了ECM的生成和降解之间的平衡。另有研究发现AT1mRNA的表达与MMP-1的启动区，TIMP-2，TIMP-3的mRNA表达有密切联系<sup>[70]</sup>，也提示Ang通过AT1R参与TIMP的合成。(4)如前所述Ang还通过细胞因子、HSC调节MMP与TIMP的表达。

总之，Ang与肝纤维化过程中细胞因子、HSC，MMP，TIMP的关系非常密切，Ang在肝纤维化形成中起重要作用，进一步从基因、蛋白表达水平深入了解Ang在肝纤维化形成及相关的抑制剂抗肝纤维化的作用机制，尤其是ACEI和Ang拮抗剂对MMP及TIMP的作用机制，必将为肝纤维化的治疗带来更加光明的前景。

#### 4 参考文献

- 1 Suo M, Hautala N, Foldes G, Szokodi I, Toth M, Leskinen H, Uusimaa P, Vuolleentaho O, Nemer M, Ruskoaho H. Posttranscriptional control of BNP gene expression in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 2002;39:803-808
- 2 Border WA, Noble N. Maximizing hemodynamic-independent effects of Angiotensin II antagonists in fibrotic diseases. *Semin Nephrol* 2001; 21:563-572
- 3 Olaso E, Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 1998;29:836-847
- 4 姜慧卿,张晓岚.肝纤维化的发生机制.世界华人消化杂志 2000;8:687-689
- 5 朱永红,胡大荣.肝脏星形细胞系的建立及应用.世界华人消化杂志 1999;7:348-349
- 6 Burt AD. Pathobiology of hepatic stellate cells. *J Gastroenterol* 1999;34:299-304
- 7 王晓玲,刘平,刘成海,刘成.扶正化瘀方对肝细胞及肝星状细胞功能的影响.世界华人消化杂志 1999;7:663-665
- 8 朱永红,胡大荣,聂青和,刘国栋,谭朝霞.人肝脏星形细胞培养激活及其c-fos,c-jun的表达.世界华人消化杂志 2000;8:299-302
- 9 刘文滨,王吉耀. NF-κB与肝星状细胞凋亡.世界华人消化杂志 2001;9:1054-1055
- 10 Matsusaka T, Ichikawa I. Biological function of Angiotensin and its receptors. *Annu Rev Physiol* 1997;59:395-412
- 11 Ardaillou R. Angiotensin receptor. *J Am Soc Nephrol* 1999;10 (Suppl 1):S30-S39
- 12 Makita S, Nakamura M, Yoshida H, Hiramori K. Effect of Angiotensin receptor blocker on Angiotensin stimulated DNA synthesis of cultured human aortic smooth muscle cells. *Life Sci* 1995;56:383-388
- 13 Wei HS, Li DG, Lu HM. Effects of AT1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl(4). *World J Gastroenterol* 2000;6:540-545
- 14 Kelly DJ, Cox AJ, Tolcos M, Cooper ME, Wilkinson-Berka JL, Gilbert RE. Attenuation of tubular apoptosis by blockade of the renin-Angiotensin system in diabetic Ren-2 rats. *Kidney Int* 2002; 61:31-39
- 15 Pinzani M. Platelet-derived growth factor receptor expression in hepatic stellate cells: how too much of a good thing can be bad. *Hepatology* 1995;22:700-706
- 16 Bataller R, Nicolas JM, Gines P, Bataller R, Nicolas JM, Gines P, Esteve A, Nieves Gorbig M, Garcia-Ramallo E, Pinzani M, Ros J, Jimenez W, Thomas AP, Arroyo V, Rodes J. Contraction of human stellate cells activated in culture:a role for voltage-operated calcium channels. *J Hepatol* 1998;29:398-408
- 17 Gorbig MN, Gines P, Bataller R, Nicolas JM, Garcia-Ramallo E, Cejudo P, SanchoBru P, Jimenez W, Arroyo V, Rodes J. Atrial natriuretic peptide antagonizes endothelin-induced calcium increase and cell contraction in cultured human stellate cells. *Hepatology* 1999;30:501-509
- 18 Rockey DC, Weisiger RA. Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology* 1996;24:233-240
- 19 Schneider AW, Kalk JF, Klein CP. Effect of losartan, an Angiotensin receptor antagonist, on portal pressure in cirrhosis. *Hepatology* 2001;29:334-339
- 20 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001;34(4 Pt 1):745-750
- 21 Ramon B, Pere G, Josep M. Angiotensin induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;118:1149-1156
- 22 Takizawa T, Gu M, Chobanian AV, Brecher P. Effect of nitric oxide on DNA replication induced by Angiotensin in rat cardiac fibroblasts. *Hypertension* 1997;30:1035-1040
- 23 Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and Angiotensin II. *Cir Res* 1996;79:748-756
- 24 Bissell DM. Hepatic fibrosis as wound repair: a progress report. *J Gastroenterol* 1998;33:295-302
- 25 白文元,姚慧卿,冯丽英.肝纤维化的研究现状.世界华人消化杂志 2000;8:1267-1268
- 26 Fox JC, Shanley JR. Antisense inhibition of basic fibroblast growth factor induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996;271:12578-12584
- 27 Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *CELL* 1994;79:1157-1164
- 28 Diez J, Panizo A, Hernandez M, Vega F, Sola I, Fortuno MA, Pardo J. Is the regulation of apoptosis altered in smooth muscle cells of adult spontaneously hypertensive rats? *Hypertension* 1997; 29:776-780
- 29 deBlois D, Tea BS, Than VD, Tremblay J, Hamet P. Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1997;29:340-349
- 30 Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology* 2001;34:859-867
- 31 Kogure K, Zhang YQ, Maeshima A, Suzuki K, Kuwano H, Kojima I. The role of activin and transforming growth factor-beta in the regulation of organ mass in the rat liver. *Hepatology* 2000;31: 916-921
- 32 Ooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 2000;31:1094-1106
- 33 王波,王天才.转化生长因子与消化系疾病研究新进展.中华消化杂志 2001;21:491-494
- 34 黄耀煊,张桂霞,吕民生,范公恩,陈乃玲,邬光惠.转化生长因子TGF-β<sub>1</sub>在肝细胞性肝癌中表达增强.世界华人消化杂志 1999;7:150-152
- 35 Fibbi G, Pucci M, Grappone C, Pellegrini G, Salzano R, Casini A, Milani S, Del Rosso M, Fibbi G, Pucci M, Grappone C. Function of the fibrinolytic system in human Ito cells and its control by basic fibroblast and platelet-derived growthfactor. *Hepatology* 1999;29:868-878
- 36 Wells RG, Fibrogenesis V. TGF-beta signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G845-850
- 37 刘芳,刘金星,曹治宸,李兵顺,赵彩彦,孔丽,甄真.慢性肝病患者血清TGF-β<sub>1</sub>与肝纤维化指标和肝纤维化病理的关系.世界华人消化杂志 1999;7:519-521
- 38 Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgerisson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92: 2572
- 39 Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin

- stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor- $\beta$  expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1994;93:2431-2437
- 40 Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by Angiotensin II. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2000;22:709-723
- 41 Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 2001;38(3 Pt 2):635-638
- 42 魏红山, 李定国, 陆汉民. 血管紧张素对肝星状细胞增殖及胶原合成的影响. *中华消化杂志* 2001;9:133
- 43 Ohishi T, Saito H, Tsusaka K, Toda K, Inagaki H, Hamada Y, Kumagai N, Atsukawa K, Ishii H. Anti-fibrogenic effect of an Angiotensin converting enzyme inhibitor on chronic carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Hepatol Res* 2001;21:147-158
- 44 Cameron RG, Blendis LM, Neuman MG. Accumulation of macrophages in primary sclerosing cholangitis. *Clin Biochem* 2001;34:195-201
- 45 Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Sorhouse C, Purdie DM, Jonsson JR. Host genetic factor influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000;31:828-833
- 46 Kim SK, Ohta K, Hamaguichi A, Omura T, Yukimura T, Miura K, Inada Y, Ishimura Y. Angiotensin type 1 receptor antagonist inhibits the gene expression of transforming growth factor beta-1 and extracellular matrix in cardiac and vascular tissues of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;273:509-515
- 47 Anderson DO, Yeh WS. Angiotensin causes mesangial cell hypertrophy. *Hypertension* 1993;21:29-35
- 48 Wenzel S, Taimor G, Piper HM, Schluter KD. Redox-sensitive intermediates mediate Angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes. *FASEB J* 2001;15:2291-2293
- 49 Gibbons, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to Angiotensin II. *J Clin Invest* 1992;90:456-461
- 50 Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, Schwartz SM. Renal injury from Angiotensin mediated hypertension. *Hypertension* 1992;19:464-474
- 51 Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I, Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int* 1997;51:1376
- 52 Siegert A, Kitz E, Orth S, Wagner J. Differential regulation of transforming growth factor receptors by Angiotensin II and transforming growth factor-beta1 in vascular smooth muscle. *J Mol Med* 1999;77:437-445
- 53 Lim DS, Lutucuta S, Bachireddy P, Youker K, Evans A, Entman M, Roberts R. Angiotensin II blockade reverses myocardial fibrosis in a transgenic mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2001;103:789-791
- 54 陈修煦, 来茂德. 转化生长因子TGF- $\beta$ 研究进展. *世界华人消化杂志* 2000;8:1405-1409
- 55 陈华江, 王杰军. 基质金属蛋白酶的结构及其调节机制. *国外医学肿瘤分册* 2001;28:20-23
- 56 Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, Xu L, Wang LH, Lin HC, Friedman SL. DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J Clin Invest* 2001;108:1369-1378
- 57 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:373-384
- 58 杨文卓, 曾民德. 肝纤维化的发生机制及病理生理. *国外医学消化系疾病分册* 2000;20:216-221
- 59 黄宇琦, 王宇, 高毅, 魏银燕, 李朝龙, 杨继霞. A-干扰素对大鼠肝纤维化间质胶原酶基因表达的调控. *世界华人消化杂志* 2000;8:579-580
- 60 Funck RC, Willke A, Rupp H, Brilla CG. Regulation and role of myocardial collagen matrix remodeling in hypertensive heart disease. *Adv Exp Med Biol* 1997;432:35-44
- 61 Brilla CG, Schencking M, Scheer C, Rupp H. Spironolactone: renaissance of anti-aldosterone therapy in heart failure? *Schweiz Rundsch Med Prax* 1997;86:566-574
- 62 Leehey DJ, Singh AK, Alavi N, Singh R. Role of Angiotensin II in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2000;77:S93-98
- 63 李为民, 刘巍. 基质金属蛋白酶与心脏重构的关系. *国外医学心血管疾病分册* 2001;4:201-203
- 64 Jonsson JR, Clouston AD, Ando Y, Kelemen LI, Horn MJ, Adamson MD, Purdie DM, Powell EE. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2001;121:148-155
- 65 Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:639-652
- 66 Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J* 1998;12:1075-1095
- 67 Vaughan PE, Lazos SA, Tong K. Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. A potential link between the renin-Angiotensin system and thrombosis. *J Clin Invest* 1995;95:995-1001
- 68 Diamond JR, Ricardo SD, Klahr S. Mechanisms of interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Semin Nephrol* 1998;18:594-602
- 69 Ayan S, Roth JA, Freeman MR, Bride SH, Peters CA. Partial ureteral obstruction dysregulates the renal renin-Angiotensin system in the fetal sheep kidney. *Urology* 2001;58:301-306
- 70 Becker BN, Jacobson LM, Becker YT, Radke NA, Heisey DM, Oberley TD, Pirsch JD, Sollinger HW, Brazy PC, Kirk AD. Renin-Angiotensin system gene expression in post-transplant hypertension predicts allograft function. *Transplantation* 2000;69:1485-1491

# 细胞色素 P450 在药源性肝损伤中的作用

马小超，屠曾宏

马小超,屠曾宏,中国科学院上海药物研究所新药研究国家重点实验室 上海市 200031  
项目负责人:屠曾宏,200031,上海市,中国科学院上海药物研究所新药研究国家重点实验室。 zhtu@mail.shcnc.ac.cn  
电话:021-64311833 转 325  
收稿日期:2002-08-10 接受日期:2002-08-31

## 摘要

随着各种新药的广泛应用以及联合用药的增多,药源性肝损伤的发生率逐年增高。药源性肝损伤的发生与肝组织内高表达的细胞色素 P450(CYP450)密不可分。CYP450是参与药物 I 相代谢的主要酶系,部分药物经 CYP450 代谢产生反应性代谢产物,后者可与肝细胞内大分子物质共价结合,通过诱发免疫反应、引起脂质过氧化等不同的机制造成肝损伤。CYP450 的诱导和抑制以及 CYP450 表达的个体差异都与药源性肝损伤的发生有关。基于 CYP450 在药源性肝损伤中的作用,围绕 CYP450 进行的代谢酶研究和新药分子设计已经开展,这对预防和减少药源性肝损伤的发生有积极意义。

马小超,屠曾宏. 细胞色素P450在药源性肝损伤中的作用. 世界华人消化杂志 2003;11(3):338-341

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/338.htm>

## 0 引言

随着各种新药的广泛应用以及联合用药的增多,药源性肝损伤的发生率逐年增高。最近的报道显示,约 25% 爆发性肝衰竭患者和近 50% 肝功能异常患者与用药有关<sup>[1]</sup>。药源性肝损伤的发生与肝组织内细胞色素 P450 (CYP450) 的高表达密不可分<sup>[2]</sup>。CYP450 由结构和功能相关的基因超家族编码的同工酶组成,是参与药物 I 相代谢的主要酶系。根据这些基因所编码蛋白质的相似程度,可将他们分为不同家族,其中参与药物代谢的主要有 CYP1, 2, 3 家族<sup>[3]</sup>。大部分药物经 CYP450 代谢转化为无活性代谢产物排出体外,部分药物经 CYP450 代谢转化为活性代谢产物和反应性代谢产物,其中反应性代谢产物可与肝细胞内大分子结合,通过不同的机制造成肝损伤<sup>[4]</sup>。本文对 CYP450 在药源性肝损伤中的作用进行综述。

## 1 CYP450 介导药物的免疫毒性

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是一组病因不明、伴有明显自身免疫现象、以炎性坏死为主要病理改变的慢性肝脏疾病<sup>[5]</sup>。我国慢性肝病患者以病毒性肝炎为主,但肝炎病毒呈阴性的肝病患者也不为少

见,这其中一部分就是药物引起的 AIH。某些药物在 CYP450 作用下形成反应性代谢产物,后者与肝内蛋白共价结合形成蛋白复合物,如果这些蛋白复合物被有效的递呈到免疫系统,则可能被认为是异己而激发免疫反应,导致 AIH 的发生<sup>[6]</sup>。根据患者血清中自身抗体的差异, AIH 大致分为三型:I 型抗核抗体、抗平滑肌抗体阳性,抗肝肾微粒体抗体、抗可溶性肝抗原抗体阴性;II 型抗肝肾微粒体抗体阳性,抗核抗体、抗平滑肌抗体、抗可溶性肝抗原抗体阴性;III 型抗可溶性肝抗原抗体阳性,抗核抗体、抗平滑肌抗体、抗肝肾微粒体抗体阴性<sup>[7]</sup>。

抗核抗体是 AIH 中第一个被测出的自身抗体,与 I 型 AIH 相关<sup>[8]</sup>。抗核抗体有多种,包括抗核仁、抗核内蛋白、抗核膜抗体等。能引起血清中抗核抗体阳性的药物很多,如普鲁卡因酰胺,乙内酰脲,硫脲嘧啶等。抗平滑肌抗体常与抗核抗体同时出现,为 I 型 AIH 血清标志物,有时也是这类肝炎的唯一血清学指标。抗平滑肌抗体的主要靶抗原为 F- 肌动蛋白,与肝细胞质膜有密切的关系。抗肝肾微粒体抗体(liver/kidney microsomal autoantibody, LKM)是 II 型 AIH 的标志性抗体<sup>[9]</sup>。LKM 抗体分为三型,LKM-1 型的靶抗原是 CYP2D6,该酶参与阿米替林、派罗西汀、氯丙米嗪、苯乙双胍、氯胆平、噻吗洛尔等药物的代谢。LKM-2 型的靶抗原是 CYP2C9,该酶参与苯妥英、甲苯磺丁脲、S- 华法林、布洛芬、丙咪嗪、替尼酸等药物的代谢。LKM-3 型的靶抗原可能是 UDP- 葡萄糖醛酸基转移酶<sup>[10]</sup>。抗可溶性肝抗原抗体是 III 型 AIH 的标志性抗体,其抗原是胞质内一种可溶性的蛋白分子<sup>[11]</sup>。

替尼酸是引起 II 型 AIH 的典型药物,通常患者血清中抗肝肾微粒体 CYP2C9 抗体阳性,抗核抗体、抗平滑肌抗体、抗可溶性肝抗原抗体阴性。替尼酸经 CYP2C9 代谢产生反应性代谢产物,后者可选择性的与 CYP2C9 共价结合形成新的抗原,触发免疫反应,产生自身抗体。该抗体特异性的识别 CYP2C9,并与之形成抗原抗体复合物,通过抗体介导的细胞毒作用造成肝细胞损伤<sup>[12]</sup>。类似的抗 CYP450 抗体可见于接受双肼屈嗪治疗的患者。CYP1A2 参与双肼屈嗪反应性代谢物的产生,该代谢物与 CYP1A2 共价结合形成新抗原。双肼屈嗪的另一条代谢途径是乙酰化,产生无活性代谢产物。两条代谢通路相互竞争,当乙酰化代谢受阻时,肝损伤的可能性大为增加<sup>[13]</sup>。

除上述抗体外, AIH 患者血清中还可出现抗肝细

胞膜脂蛋白特异性抗体、抗去唾液酸糖蛋白抗体、抗中性粒细胞胞质抗体、抗线粒体抗体、抗细胞骨架蛋白抗体，以及其他抗 CYP450 抗体。氟烷的反应性代谢产物可与多种微粒体蛋白结合，其中 CYP2E1 是反应性代谢物和最相关自身抗体优先作用的靶分子<sup>[14]</sup>。氟烷在 CYP2E1 作用下形成三氟乙酰氯化物，后者与肝细胞内含赖氨酸残基的  $\alpha$ -氨基多肽结合，形成新的抗原，从而激起免疫反应。然而，抗体水平和损伤程度并不存在直接相关性<sup>[15]</sup>。同类麻醉剂如恩氟烷，异氟烷，七氟烷，地氟烷等，由于在肝内代谢极少，因此肝损伤的发生率较低<sup>[16]</sup>。

## 2 CYP450 介导药物的细胞毒性

某些药物在肝细胞内经 CYP450 代谢产生亲电子物、自由基、氨基等，他们可与肝细胞内大分子物质共价结合，引起膜系统脂质过氧化，破坏膜完整性和膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶系，扰乱细胞内外  $\text{Ca}^{2+}$  稳态，影响线粒体、内质网等重要细胞器的功能，并最终导致肝细胞损伤甚至死亡<sup>[17]</sup>。

**2.1 亲电子物** 亲电子物是一类因缺少电子而使整个分子部分或全部带正电的基团，这类分子可与细胞内含电子的基团(如大分子蛋白的巯基)共享电子而诱发毒性效应。当亲电子物的产生超过了谷胱甘肽(GSH)等的解毒能力时，就可能产生细胞毒性。例如对乙酰氨基酚，在正常情况下，绝大部分的对乙酰氨基酚与葡萄糖醛酸和硫酸结合而解毒，但也有一部分在 CYP1A2, 2E1 和 3A4 的作用下，转化为反应性代谢产物 NAPQI。在治疗剂量时，NAPQI 与 GSH 结合形成硫醇尿酸和半胱氨酸衍生物而解毒。但过量的服用对乙酰氨基酚可耗竭肝细胞内的 GSH，NAPQI 便与细胞内大分子结合，造成肝细胞损伤<sup>[18]</sup>。CYP450 的诱导剂可加重对乙酰氨基酚引起的肝损伤<sup>[19]</sup>，而及时使用 GSH 前体乙酰半胱氨酸或硫乙胺处理，则可减轻肝损伤<sup>[20]</sup>。

**2.2 自由基** 药物经 CYP450 氧化或还原后形成含不成对电子的代谢物称为自由基<sup>[21]</sup>。自由基可造成膜系统的不饱和脂肪酸过氧化，改变膜的流动性与通透性，使膜的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶失活，细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增加，进而激活  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性蛋白激酶和磷脂酶，促进花生四烯酸的代谢及氧自由基的生成。自由基损伤肝细胞的典型例子是四氯化碳，其在 CYP2E1 和 CYP3A4 参与下形成的自由基团(CCL3 $\cdot$ )作用于膜系统的不饱和脂肪酸的双键，产生过氧化作用，影响内质网、线粒体等细胞器的功能。内质网的损伤使蛋白质的合成减少，甘油三酯与蛋白质结合形成脂蛋白的过程受阻；同时线粒体的损伤可使脂肪的代谢降低，从而引起肝内脂肪积聚和脂肪变性，进一步则导致肝细胞坏死<sup>[22]</sup>。齐墩果酸可抑制 CYP2E1，减少四氯化碳分解和自由基产生，从而降低肝毒性<sup>[23]</sup>。

药物在氧化还原循环中形成的氧自由基也具有肝

毒性。阿霉素的代谢物能接受一个不成对电子形成自由基，后者与氧作用产生一个超氧阴离子，进而引起脂质过氧化和巯基氧化造成肝细胞损伤<sup>[24]</sup>。另外氧自由基可影响 CYP450 的活性，使 GSH 不能维持其还原状态而加重肝细胞损伤。而胰岛素样生长因子 -1 可增强肝细胞清除自由基的能力，因此具有肝细胞保护作用<sup>[25]</sup>。

## 3 CYP450 的诱导和抑制与药源性肝损伤

临床治疗过程中患者通常使用多种药物，而联合用药的患者肝损伤发生率更高，其主要原因是药物之间存在相互作用。药物之间相互作用的形式包括影响药物的蛋白结合率，影响药物的体内再分布，影响药物的排泄，而通过诱导或抑制 CYP450 影响药物代谢在药源性肝损伤中往往起决定性作用。对 CYP450 的诱导与抑制除了可改变药物代谢的速率外，对反应性代谢物的生成亦有重要影响<sup>[26]</sup>。

**3.1 CYP450 的诱导** CYP450 在进化过程中保守性差，常可被外源性物质(如某些亲脂性药物)诱导使其含量或活性增加。诱导的机制包括转录激活(CYP1A, CYP2C9, CYP3A4)，mRNA 稳定性增加(CYP2E1, CYP3A4)，酶蛋白稳定性增加(CYP2E1)。目前至少有 200 种药物已被证实具有诱导 CYP450 的作用，其中包括苯巴比妥、地西泮、酒精、苯妥英钠、利福平、灰黄霉素、安体舒通等<sup>[27]</sup>。CYP450 的诱导对代谢增毒的药物非常危险。异烟肼和利福平同为抗结核药，两药单独使用时肝损伤发生率较低。但临幊上往往需要两药联合使用，此时肝损伤发生率明显增加，发生时间亦提早<sup>[28]</sup>。研究证实利福平为 CYP450 诱导剂，与异烟肼合用时可加速后者代谢，从而增加肝毒性。

**3.2 CYP450 的抑制** 有些药物则可抑制 CYP450，使其含量或活性降低<sup>[29]</sup>。药物抑制 CYP450 有以下几种机制：(1)可逆的竞争性抑制：同一酶的二种底物竞争相同活性部位并互为抑制，例如 CYP3A 参与环孢素的代谢，而红霉素和酮康唑能竞争性结合 CYP3A，使环孢素的血药浓度上升。(2)可逆的非竞争性抑制：母药对 CYP450 无抑制作用，但其代谢产物可能与 CYP450 的亲和力较高，从而抑制母药的进一步代谢。随着代谢产物的消除，这种抑制作用将减弱。(3)不可逆的抑制：CYP450 因结构破坏或蛋白质修饰而永久失活，只有通过 CYP450 再生才能恢复酶的活性，例如马拉硫磷。(4)干扰蛋白质合成：金刚烷胺可抑制蛋白质 CYP450 的合成，从而抑制 CYP450 对相应底物的代谢活性。

与 CYP450 的诱导相比，CYP450 的抑制有更大的危险性，特别是对 CYP450 代谢依赖程度较高的药物，如咪拉地尔<sup>[30]</sup>。因此，FDA 在新药审批时已要求申报者提供该药代谢相关酶的特征以及其对 CYP450 的抑制情况。对于具有直接肝毒性的药物，如果其代谢相关 CYP450 被抑制，那么肝毒性的发生将不可避免。但近年来由于对新药筛选和评审的严格要求，此类药物很

难通过临床前实验和临床试验而上市，因此临幊上因CYP450抑制而引起肝损伤的发生率较低。

#### 4 CYP450的个体差异与药源性肝损伤

药源性肝损伤并没有发生在所有使用该类药物的个体，这与机体对药物反应的个体差异有关。大多数CYP450表现有临幊意义的遗传多态性，其中包括CYP1A1/2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8/9/19、CYP2D6、CYP2E1和CYP3A4/5/7<sup>[31]</sup>。当药物主要由这类酶代谢时，不同患者对同一药物的代谢可能有显著差异<sup>[32]</sup>。曲格列酮是过氧化物酶增生体激活受体配体，用于治疗II型糖尿病。2%的接受曲格列酮治疗的患者谷丙转氨酶异常升高，大约1/1250的患者出现黄疸，1/40 000-50 000的患者出现不可逆的肝衰竭<sup>[33,34]</sup>。CYP2C8，CYP3A4和CYP2C19介导了曲格列酮代谢为醌的过程，这些酶的多态性可能与其肝毒性有关<sup>[35]</sup>。对CYP450遗传多态性的深入研究有助于了解药源性肝损伤的发生和发展规律。目前研究较为广泛的两个酶是CYP2D6和CYP2C19。根据CYP2D6的基因多态性可将人群分为超快代谢型、高代谢型和低代谢型。在高加索人群中，约有5-10%的人为低代谢型，而在亚洲人群中，只有1-2%的人为低代谢型<sup>[36]</sup>。根据CYP2C19的基因多态性也可将人群分为高代谢型和低代谢型。在高加索人群中，大约有2-6%的人为低代谢型，而在亚洲人群中，约有14-22%的人为低代谢型<sup>[37]</sup>。基因多态性引起CYP450缺陷的分子机制已逐渐明了，例如氨基酸替换改变蛋白质稳定性或催化活性(CYP2C9/19，CYP2D6)，剪接位点突变引起外显子跳位(CYP2C19)，微卫星核苷酸重复、点突变引起过早终止编码、基因完全缺失(CYP2D6)等。

其他影响CYP450表达的因素有年龄、性别、营养状况以及疾病等。儿童CYP450表达不健全，需要代谢解毒的药物的肝毒性比成人发生率高，而代谢增毒的药物的肝毒性发生率较低，例如儿童服用对乙酰氨基酚过量时产生肝损伤的几率低于成年人。药源性肝损伤在老年人群众发病率较高，这并非是CYP450的活性减少，而与肝血流下降和肝体积减少有关，尤其是对高首过消除的药物<sup>[38]</sup>。低蛋白饮食的实验动物，其四氯化碳肝毒性比预期的低，这是因为营养状况较差时四氯化碳代谢酶活力下降，使毒性代谢产物生成量减少。原发性肝癌与正常肝组织进行免疫组化分析发现CYP3A在癌组织内表达明显降低，且失去了特征性分布，因此肝癌患者与正常人在药物代谢方面可能存在明显差异。

药源性肝损伤发生与否还与肝脏的耐受力有关。肝组织可分泌细胞因子对抗CYP450介导药物的免疫毒性和细胞毒性，例如IL-4，IL-6，IL-10，IL-13以及前列腺素。GSH有解毒和细胞保护作用，他的含量同样存在个体差异，低水平的还原型GSH将使肝损伤

的危险度增加<sup>[39]</sup>。免疫易感性因素还有待证实。

#### 5 CYP450的检测和药源性肝损伤的预测

目前多种体外代谢模型已用于临幊前药物代谢特性的高通量筛选，内容涉及参与代谢的CYP450种类，反应性代谢物的生成，CYP450的诱导和抑制等<sup>[40]</sup>。肝切片是常用的体外模型，他既保留了生理状态下药物进行生物转化时所需的酶和辅助因子，而且与体内的代谢环境较为相似<sup>[41]</sup>。除肝切片外，分离培养的肝细胞、微粒体以及重组的CYP450也经常用来进行体外药物代谢研究。Ishigam et al<sup>[42]</sup>用肝细胞和微粒体研究并得出Ki等参数来定量预测整体联合用药情况下的药代动力学参数的改变，以纠正联合用药时可能产生的不良反应。一种分析人外周粒细胞对药物及其代谢产物反应的方法已经建立，如果代谢产物是可疑的毒素，那么反应的发生必需肝微粒体和NADPH的存在。这种分析方法宿主依赖，在检测个体敏感性差异方面非常有前途<sup>[43]</sup>。

氨基比林呼气试验(ammopyne breath Test，ABT)可作为药物影响肝CYP450的判断指标，用于药源性肝损伤的预测<sup>[44]</sup>。氨基比林的生物转化由肝细胞完成，主要途径为N-去甲基化。催化氨基比林N-去甲基化的P450已知有CYPIA2、CYP2C9、CYP3A4等。由于多种CYP450催化氨基比林N-去甲基化，因此ABT可非选择性反映CYP450的数量与活性。CYP450诱导剂如苯巴比妥可增加ABT值，而CYP450抑制剂如西米替丁可降低ABT值。另外肝损伤时ABT可有下降，尽管整体上不如转氨酶敏感，但若ABT持续异常而转氨酶等指标已恢复，常提示肝损伤不可逆转。

#### 6 基于CYP450的药物设计

药源性肝损伤是药品上市后因安全问题而撤销的重要原因<sup>[45]</sup>，同样，许多体外高活性的化合物由于代谢物具有毒性而失去开发价值。因此，合理的药物设计应考虑到药物代谢途径及相关代谢特征，以增加代谢稳定性和降低毒性。在新药设计阶段，可针对先导化合物代谢过快或生成反应性代谢物的特性进行结构改造以获得安全稳定的候选物，也可合成有效代谢物或模拟有效代谢物的结构以获得新的候选物。这些候选物在体内不代谢或仅经水解酶代谢，避免了CYP450介导的反应性代谢物的产生，从而预防和降低肝毒性。目前临床使用的双磷酸盐和雷米芬太尼是成功的两个例子。基于药物之间的相互作用，Szklarz et al<sup>[46]</sup>采用定点突变的方法研究CYP3A4和CYP2B1的底物特异性，目的是了解CYP450诱导和抑制的分子机制并为靶向药物的分子结构设计提供帮助。

总之，CYP450在药源性肝损伤发生过程中发挥了重要作用。但目前关于CYP450仍有一些问题尚未完全解决，如CYP450三维结构的确定，CYP450的基因

定位及功能分析, CYP450 诱导和抑制的机制研究, CYP450个体差异的检测等。这些问题的解决将有助于进一步了解药源性肝损伤的发生和发展, 并对药源性肝损伤的预防和治疗起指导作用。

## 7 参考文献

- 1 Zimmerman HJ. Drug-induced liver disease. *Clin Liver Dis* 2000; 4:73-96
- 2 Pelkonen O, Raunio H. Metabolic activation of toxins: tissue-specific expression and metabolism in target organs. *Environ Health Perspect* 1997;105:767-774
- 3 Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Neupert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996;6:1-42
- 4 Riley RJ. The potential pharmacological and toxicological impact of P450 screening. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2001;4:45-54
- 5 Lewis JH. Drug-induced liver disease. *Med Clin North Am* 2000; 84:1275-1311
- 6 Van Pelt FN, Straub P, Manns MP. Molecular basis of drug-induced immunological liver injury. *Semin Liver Dis* 1995;15:283-300
- 7 Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG. International autoimmune hepatitis group report: a review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:929-938
- 8 Czaja AJ, Cassani F, Cataletta M, Valentini P, Bianchi FB. Anti-nuclear antibodies and patterns of nuclear immunofluorescence in type 1 autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1997;42:1688-1696
- 9 Muratori L, Lenzi M, Ma Y, Cataletta M, Mieli-Vergani G, Vergani D, Bianchi FB. Heterogeneity of liver/kidney microsomal antibody type 1 in autoimmune hepatitis and hepatitis C virus related liver disease. *Gut* 1995;37:406-412
- 10 Csepregi A, Nemesanszky E, Luettig B, Obermayer-Straub P, Manns MP. LKM3 autoantibodies in hepatitis C cirrhosis: a further phenomenon of the HCV-induced autoimmunity. *Am J Gastroenterol* 2001;96:910-911
- 11 Wies I, Brunner S, Henninger J, Herkel J, Kanzler S, Meyer zum Buschenfelde KH, Lohse AW. Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet* 2000; 355:1510-1515
- 12 Obermayer-Straub P, Strassburg CP, Manns MP. Autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2000;32:181-197
- 13 Boitier E, Beaune P. Cytochromes P450 as targets to autoantibodies in immune mediated diseases. *Mol Aspects Med* 1999;20: 84-137
- 14 Eliasson E, Kenna JG. Cytochrome P450 2E1 is a cell surface autoantigen in halothane hepatitis. *Mol Pharmacol* 1996;50:573-582
- 15 Furst SM, Luedke D, Gaw HH, Reich R, Gandolfi AJ. Demonstration of a cellular immune response in halothane-exposed guinea pigs. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;143:245-255
- 16 Kharasch ED. Metabolism and toxicity of the new anesthetic agents. *Acta Anaesthesiol Belg* 1996;47:7-14
- 17 Monks TJ, Lau SS. Reactive intermediates and their toxicological significance. *Toxicology* 1988;52:1-53
- 18 Rumack BH. Acetaminophen hepatotoxicity: the first 35 years. *J Toxicol Clin Toxicol* 2002;40:3-20
- 19 Sinclair J, Jeffery E, Wrighton S, Kostrubsky V, Szakacs J, Wood S, Sinclair P. Alcohol-mediated increases in acetaminophen hepatotoxicity: role of CYP2E and CYP3A. *Biochem Pharmacol* 1998;55:1557-1565
- 20 Kozer E, Koren G. Management of paracetamol overdose: current controversies. *Drug Saf* 2001;24:503-512
- 21 Fujita T. Formation and removal of reactive oxygen species, lipid peroxides and free radicals, and their biological effects. *Yakugaku Zasshi* 2002;122:203-218
- 22 Boll M, Weber LW, Becker E, Stampfli A. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. *Z Naturforsch* 2001;56:649-659
- 23 Jeong HG. Related Articles Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury. *Toxicol Lett* 1999;105: 215-222
- 24 Liu Y, Thurman RG. Potentiation of adriamycin toxicity by ethanol in perfused rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;263:651-656
- 25 Castilla-Cortazar I, Garcia M, Muguerza B, Quiroga J, Perez R, Santidrian S, Prieto J. Hepatoprotective effects of insulin-like growth factor I in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Gastroenterology* 1997;113:1682-1691
- 26 Lin JH, Lu AY. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 1998;35:361-390
- 27 Schuetz EG. Induction of cytochromes P450. *Curr Drug Metab* 2001;2:139-147
- 28 Campbell IA. Toxicity of isoniazid and rifampicin combination. *Thorax* 1995;50:814
- 29 Pelkonen O, Maenpaa J, Taavitsainen P, Rautio A, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* 1998;28:1203-1253
- 30 Krayenbühl JC, Vozeh S, Kondo-Oestreicher M, Dayer P. Drug-drug interactions of new active substances: Mibepradil example. *Eur J Clin Pharmacol* 1999;55:559-565
- 31 Fujieda M, Yamazaki H, Kamataki T. Genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes. *Gan To Kagaku Ryoho* 2002;29:663-668
- 32 Halpert JR, Domanski TL, Adali O, Biagini CP, Cosme J, Dierks EA, Johnson EF, Jones JP, Ortiz de Montellano P, Philpot RM, Sibbesen O, Wyatt WK, Zheng Z. Structure-function of cytochromes P450 and flavin-containing monooxygenases: implications for drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 1998;26:1223-1231
- 33 Murphy EJ, Davern TJ, Shakil AO, Shick L, Masharani U, Chow H, Freise C, Lee WM, Bass NM. Troglitazone-induced fulminant hepatic failure. Acute Liver Failure Study Group. *Dig Dis Sci* 2000; 45:549-553
- 34 Kohlroser J, Mathai J, Reichheld J, Banner BF, Bonkovsky HL. Hepatotoxicity due to troglitazone: report of two cases and review of adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *Am J Gastroenterol* 2000;95:272-276
- 35 Yamazaki H, Shibata A, Suzuki M, Nakajima M, Shimada N, Guengerich FP, Yokoi T. Oxidation of troglitazone to a quinone-type metabolite catalyzed by cytochrome P-450 2C8 and P-450 3A4 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 1999;27:1260-1266
- 36 Bertilsson L, Dahl ML, Dalen P, Al-Shurbaji A. Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 2002;53:111-122
- 37 Hasler JA. Pharmacogenetics of cytochromes P450. *Mol Aspects Med* 1999;20:12-24
- 38 Callaghan R, Desmond PV, Paull P, Mashford ML. Hepatic enzyme activity is the major factor determining elimination rate of high-clearance drugs in cirrhosis. *Hepatology* 1993;18:54-60
- 39 Hentze H, Gantner F, Kolb SA, Wendel A. Depletion of hepatic glutathione prevents death receptor-dependent apoptotic and necrotic liver injury in mice. *Am J Pathol* 2000;156:2045-2056
- 40 Rodrigues AD. Preclinical drug metabolism in the age of high-throughput screening: an industrial perspective. *Pharm Res* 1997; 14:1504-1510
- 41 Groneberg DA, Grosse-Siestrup C, Fischer A. In vitro models to study hepatotoxicity. *Toxicol Pathol* 2002;30:394-399
- 42 Ishigami M, Uchiyama M, Kondo T, Iwabuchi H, Inoue S, Takasaki W, Ikeda T, Komai T, Ito K, Sugiyama Y. Inhibition of in vitro metabolism of simvastatin by itraconazole in humans and prediction of in vivo drug-drug interactions. *Pharm Res* 2001;18:622-631
- 43 Knowles SR, Utrecht J, Shear NH. Idiosyncratic drug reactions: the reactive metabolite syndromes. *Lancet* 2000;356:1587-1591
- 44 Rating D, Langhans CD. Breath tests: concepts, applications and limitations. *Eur J Pediatr* 1997;156:18-23
- 45 Lin JH, Lu AY. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 1997;49:403-449
- 46 Szklarz GD, Halpert JR. Molecular basis of P450 inhibition and activation: implications for drug development and drug therapy. *Drug Metab Dispos* 1998;26:1179-1184

# 食管癌前病变中端粒酶的检测及意义

于会生,郑国升,孙金珍,郜群熬,许迎霞,刘红凌,李华,任冬霞,李素敏,黄明周

于会生,郑国升,孙金珍,许迎霞,刘红凌,李华,第一人民医院消化内科  
河南省洛阳市 471002  
郜群熬,李素敏,第一人民医院检验科 河南省洛阳市 471002  
任冬霞,黄明周,第一人民医院病理科 河南省洛阳市 471002  
河南省科委基金资助课题, No.203029  
项目负责人:于会生,471002;河南省洛阳市第一人民医院消化内科.  
lysdyrmyy@163.net  
电话:0379-3998700  
收稿日期:2002-10-08 接受日期:2002-10-18

## 摘要

**目的:**检测食管癌前病变组织端粒酶活性,结合病理细胞学检查,观察端粒酶活性改变对预后的影响。

**方法:**用以PCR为基础的端粒重复序列扩增法检测端粒酶活性。胃镜检查过程中发现可疑病变107例,活检留取组织标本,同时送病理细胞学和端粒酶检查。对癌前病变患者胃镜监督随访2 a。

**结果:**首次胃镜检查诊断食管癌36例,32例端粒酶阳性,癌前病变71例,13例端粒酶阳性,从食管慢性炎症 轻度非典型增生 中度非典型增生 重度非典型增生,各阶段端粒酶阳性率分别为6.1%(2/33),15.3%(2/13),33.3%(5/15),40%(4/10),中—重度非典型增生患者阳性率显著增高。对癌前病变患者随访过程中,8例拒绝随复杂胃镜,1例移居外地,1例意外死亡,61例完成随访,12例端粒酶阳性患者5例癌变3例愈合,49例阴性患者2例癌变24例愈合,两组预后存在显著差异,P=0.002。

**结论:**食管癌前病变中,部分端粒酶阳性,阳性率与组织分型相关。随访中绝大多数癌变患者表现为端粒酶阳性,端粒酶活性增加将标志食管癌的发生。

于会生,郑国升,孙金珍,郜群熬,许迎霞,刘红凌,李华,任冬霞,李素敏,黄明周. 食管癌前病变中端粒酶的检测及意义. 世界华人消化杂志 2003;11(3):342-343  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/342.htm>

## 0 引言

端粒酶是一种核糖核蛋白酶(ribonucleoprotein enzyme),能够合成端粒重复序列(TTAGGG)补充到染色体末端,稳定端粒的长度。端粒酶活性上调(up-regulation)与细胞永生化、肿瘤发生密切相关<sup>[1-6]</sup>。我们采用以PCR为基础的端粒重复序列扩增法(PCR-TRAP)测定食管癌前病变中的端粒酶活性,并胃镜随访观察这组患者的临床转归。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料 1999-11/2002-05 洛阳市第一人民医院胃镜

室检查食管黏膜可疑病变107例,男55例,女52例,年龄23-85(平均58.7)。食管黏膜白斑1例,黏膜红斑8例,黏膜糜烂35例,黏膜溃疡(伴或不伴糜烂)25例,增生隆起(伴或不伴糜烂、溃疡)38例,其中34例伴有不同程度的食管狭窄。发现可疑病变当即经胃镜活检钳取第1,3块置30 g/L甲醛液固定保存,送病理细胞学检查;第2,4块置PBS溶液保存,1 h内送端粒酶活性检测处理。端粒酶试验试剂盒由华美生物工程公司提供;PTC-51B型PCR循环仪;DDL-5冷冻离心机;SLT SPECTRA酶标仪等。

**1.2 方法** 采用PCR-TRAP法检测端粒酶活性<sup>[7]</sup>,组织样本(50 mg),PBS溶液洗1次,4℃10 000 r/min离心1 min,沉淀再洗涤、离心,弃洗液,加裂解液,置冰浴30 min,4℃,14 000 r/min离心20 min,取上清2 μL做PCR反应模板。在PCR反应管中各加入反应混合物45 μL,混匀,加入液体石蜡30 μL,离心数秒,置25℃水浴30 min。取出即可在PCR仪上循环。循环结束后,各孔加入100 μL杂交反应液B第1次反应,37℃恒温反应60 min,洗板,加显色剂A,B各一滴,37℃避光显色10 min,加终止液,在酶标仪上测得A值,判断端粒酶活性。存在癌前病变的患者都制定随访计划。按照病灶的内镜下表面和病理结果确定随访时间间隔。一般2-3 mo首次复查胃镜,之后6 mo复查1次胃镜。对于高度可疑食管癌的患者,短期复查(2-4 wk)。

**统计学处理** 采用χ<sup>2</sup>检验,P<0.05作为有显著意义的统计学标准。

## 2 结果

在病理科经专业医师对标本石蜡包埋、切片、HE染色,二位副主任医师以上职称的病理医师读片判断病理结果。诊断食管癌36例,其中鳞状细胞癌32例、腺癌2例、黏液细胞癌1例、未分化癌1例,早期癌5例、中晚期癌31例。诊断食管癌前病变71例,其中慢性炎症33例,慢性炎症伴轻度非典型增生13例,伴中度非典型增生15例,伴重度非典型增生10例。36例食管癌患者中,端粒酶阳性32例,阴性4例,阳性率88.9%。71例癌前病变患者中,端粒酶阳性13例,阴性58例,总的阳性率18.3%,癌前病变患者按病理组织分型端粒酶阳性率分别是:慢性炎症6.1%(2/33),轻度非典型增生15.4%(2/13),中度非典型增生33.3%(5/15),重度非典型增生40%(4/10)。食管癌、重度非典型增生、中度非典型增生分别与慢性炎症相比有显著统计学差

异,  $P = 0.001$ ,  $P = 0.018$ ,  $P = 0.022$ . 对癌前病变患者实行胃镜监督随访, 其中3例失去联系, 7例拒绝复查胃镜, 完成计划胃镜监督随访61例, 占89.7%, 其中端粒酶阳性12例, 阴性49例. 随访时间1~26 mo. 复查胃镜有27例完全恢复正常, 其中端粒酶阳性3例, 阴性24例; 有24例好转或无变化, 其中端粒酶阳性3例, 阴性21例; 病变加重3例, 其中端粒酶阳性1例, 阴性2例; 恶变7例, 其中端粒酶阳性5例, 阴性2例. 二组患者随访结果相比有显著性统计学差异,  $P = 0.002$ . 在随访的头3mo内有4例确诊为食管癌, 且均表现为端粒酶阳性.

### 3 讨论

端粒酶是一种特殊的DNA聚合酶, 端粒酶激活是细胞永生化的重要标志. 端粒酶活性在癌前病变中的研究已见很多报道<sup>[8-11]</sup>, 大多采用手术切除标本进行检查, 经胃镜活检对食管癌及癌前病变进行端粒酶活性检测国内未见文献报道. 我们采用活检标本, 用以PCR为基础的端粒重复序列扩增法检测食管癌及癌前病变中端粒酶的活性, 显示在食管癌、重度非典型增生、慢性炎症组织中端粒酶阳性率分别为88.9%、40%、6.1%. 这一结果与国内外文献[12-15]报道一致, 说明食管活检标本检测端粒酶活性的可行性. 癌前病变中检测端粒酶活性的主要目的在于观察端粒酶活性增加的患者是否增加癌变的危险, 活检标本检测方法对这一目标实现有重要价值<sup>[3,13,16]</sup>. 我们对检测的这部分癌前病变患者进行胃镜监督随访, 2a多时间内12例阳性患者5例癌变, 而49例阴性患者仅2例癌变, 而且阳性患者仅个别患者病灶恢复, 阴性组多数患者病灶恢复正常, 二组比较存在显著统计学差异. Morales、Tahara对检测患者随访观察发现相似的结果<sup>[3,17]</sup>. 可以看出端粒酶活性检测能够对病灶预后提供更准确的信息, 是癌前病变判断预后的重要因素.

在癌前病变中端粒酶出现阳性是一个值得思考的问题. 采用原位杂交方法检测癌前病变中端粒酶逆转录酶(hTERT)mRNA的表达, 在组织切片上清晰看到从轻度到重度非典型增生组织, hTERTmRNA表达的范围增加、染色加重<sup>[3,10,12,18,19]</sup>. 现在认为细胞癌变是一个多因素多阶段复杂过程, 在致癌因素的作用下, 细胞内抑癌基因、致癌基因、细胞因子等一系列复杂变化使hTERT活性增加, hTERT是端粒酶活性的限速酶, 他的活性增加使端粒酶活性上调<sup>[3,5,6,20,21]</sup>. 我们通过对患者的随访观察客观看到端粒酶阳性的癌前病变患者癌变率高, 同时我们注意到少数端粒酶阳性患者经恰当处理后, 病灶逐渐愈合, 说明端粒酶活性增加是细胞异型性达到一定程度的结果, 附合端粒酶活性受多种因子调节的观点. 另一方面, 食管癌发生存在多点位、多中心起源<sup>[22]</sup>, 我们采用PCR-TRAP方法检测端粒酶

活性所采用的标本与病理检查不是同一块标本, 可能有肿瘤细胞隐伏其中而出现阳性结果. 因此对于端粒酶阳性的癌前病变患者必需严格随访.

### 4 参考文献

- Shibuya K, Fujisawa T, Hoshino H, Baba M, Saitoh Y, Suzuki M, Hiroshima K, Ohwada H. Increased telomerase activity and elevated hTERT mRNA expression during multistage carcinogenesis of squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer* 2001;92:849-855
- Lord RV, Salonga D, Danenberg KD, Peters JH, DeMeester TR, Park JM, Johansson J, Skinner KA, Chandrasoma P, DeMeester SR, Bremner CG, Tsai PI, Danenberg PV. Telomerase reverse transcriptase expression is increased early in the Barrett's metaplasia, dysplasia, adenocarcinoma sequence. *J Gastrointest Surg* 2000;4:135-142
- 王淑珍. 端粒酶与癌前病变. 中国肿瘤临床与康复 1999;6:84-85
- Morales CP, Lee EL, Shay JW. In situ hybridization for the detection of telomerase RNA in the progression from Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Cancer* 1998;83:652-659
- 王伟, 刘俊平. 端粒酶和肿瘤. 世界华人消化杂志 2002;10:683-688
- 陈兵, 刘为纹, 房殿春. 端粒酶研究概况. 世界华人消化杂志 2001;9:441-446
- Kim NM, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011-2015
- Lancelin F, Anidjar M, Villette JM, Soliman A, Teillac P, Le Duc A, Fiet J, Cussenot O. Telomerase activity as a potential marker in preneoplastic bladder lesion. *BJU Int* 2000;85:526
- 张玲, 张伟国, 刘正. 端粒酶端粒酶蛋白催化亚基(hTRT)mRNA在口腔鳞癌形成过程中的表达. 华西口腔医学杂志 1999;17:307-309
- Koyanagi K, Ozawa S, Ando N, Mukai M, Kitagawa Y, Ueda M, Kitajima M. Telomerase activity as an indicator of malignant potential in iodine-nonreactive lesions of the esophagus. *Cancer* 2000;88:1524-1529
- 张登学, 张翠萍, 顾华丽, 唐晓燕, 刘海灵. 食管癌端粒酶活性的研究. 中华消化杂志 1999;19:300
- 张蕾, 温洪涛, 张云汉, 宋一民, 李靖若, 马冰. 食管黏膜不典型增生组织中端粒酶活性的定量及定性检测. 河南医科大学学报 2001;36:531-532
- Inai M, Kano M, Shimada Y, Sakurai T, Chiba T, Iimura M. Telomerase activity of the Lugol-stained and unstained squamous epithelia in the process of oesophageal carcinogenesis. *Br J Cancer* 2001;85:1006-1013
- 陈惠新, 凌红, 李韶光, 曾宏, 刘集鸿, 童志勇. 端粒酶在胃癌及癌前病变组织中的表达及其意义. 临床消化病杂志 2001;13:21-22
- 许争峰, 胡娅莉, 王迅美, 戴鲁琴, 韩克, 杜泽宝. 端粒酶在宫颈癌及癌前病变活检标本中的表达及意义. 中国优生与遗传杂志 2000;8:24-39
- 杨仕明, 房殿春, 罗元辉, 鲁荣, 刘为纹. 胃癌及癌前组织中端粒酶活性的检测及其临床意义. 中华医学杂志 1998;78:207-209
- Tahara H, Nakanishi T, Kitamoto M, Nakashio R, Shay JW, Tahara E, Kajiyama G, Ide T. Telomerase activity in human liver tissue: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:2734-2736
- 方向明, 于皆平, 罗和生. 大肠癌hTERT和P16表达与端粒酶活性的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:12-14
- 王维, 罗和平, 余保平. 胃癌及癌前病变中hTERT基因和c-myc蛋白的表达意义. 世界华人消化杂志 2002;10:258-261
- Yao XX, Yin L, Sun ZC. The expression of hTERT mRNA and cellular immunity in gastric cancer and precancerous. *World J Gastroenterol* 2002;8:586-590
- Nakayama J, Tahara H, Tahara E, Saito M, Ita K, Nakamura H, Nakanishi T, Tahara E, Ide T, Ishikawa F. Telomerase activation by hTRT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 1998;18:65
- Kuwano H, Baba K, Ikebe M, Adachi Y, Toh Y, Sugunachi K. Histopathology of esophageal carcinoma and squamous epithelial dysplasia. *Hepatogastroenterology* 1993;40:222-225

• 研究快报 •

# 血清中血管内皮生长因子与胃癌侵袭和转移的关系

张宏图,胡 祥

张宏图,北京市普仁医院普通外科 北京市 100062  
 胡祥,大连医科大学第一附属医院普通外科 辽宁省大连市 116011  
 项目负责人:张宏图,100062,北京市崇外大街100号,北京市普仁医院.  
 zhanghongtu@hotmail.com  
 电话:010-67117711 转3101 传真:010-67121678  
 收稿日期:2002-04-05 接受日期:2002-08-10

## 摘要

目的:检测胃癌患者术前血清中血管内皮生长因子(VEGF)浓度,探讨其与胃癌侵袭和转移的关系。

方法:应用酶联免疫技术(ELISA法)检测51例胃癌患者和10名健康人血清中VEGF浓度;应用免疫组织化学技术检测胃癌组织中VEGF蛋白表达。

结果:胃癌患者血清VEGF浓度高于健康对照( $P < 0.05$ ),与胃癌浸润深度( $P < 0.05$ ),淋巴结转移( $P < 0.01$ ),远处转移( $P < 0.01$ ),肿瘤分期( $P < 0.05$ )及肿瘤组织学分型( $P < 0.05$ ),生长方式( $P < 0.05$ )密切相关,与性别无关( $P > 0.05$ )。肿瘤组织VEGF蛋白表达阳性的患者血清VEGF浓度明显高于VEGF蛋白表达阴性的患者( $P < 0.05$ )。

结论:血清VEGF浓度与胃癌侵袭和转移密切相关,胃癌患者血清VEGF浓度升高是其对应肿瘤组织VEGF蛋白高表达的结果。

张宏图,胡祥. 血清中血管内皮生长因子与胃癌侵袭和转移的关系. 世界华人消化杂志 2003;11(3):344-345  
<http://www.wjnet.com/1009-3079/11/344.htm>

## 0 引言

实体肿瘤生长及转移需要血管生成。实体肿瘤形成后进入无血管的浸润前期,此时肿瘤细胞依靠弥漫供给营养,当肿瘤结节生长到 $1\text{-}2\text{ mm}^3$ 以后,肿瘤必须有新生血管生成供给营养,才能继续增生和转移<sup>[1]</sup>。肿瘤细胞可分泌多种血管生成因子诱导血管生成,其中以血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的作用最为突出<sup>[2]</sup>。体外研究表明VEGF可促进内皮细胞增生和诱导血管生成。VEGF可在多种实体瘤组织中大量表达,如乳腺癌,胃癌及结肠癌等,肿瘤组织中VEGF的大量表达与肿瘤侵袭和转移密切相关,我们应用ELISA法检测胃癌患者血清中VEGF浓度和免疫组织化学技术检测胃癌患者肿瘤组织中VEGF蛋白表达,探讨血清VEGF浓度与胃癌侵袭和转移的关系。

## 1 材料和方法

1.1 材料 选取大连医科大学第一附属医院普通外科2000-01/2000-06收治的51个病理证实的胃癌病例,男37例,女14例,年龄28-81岁(平均62.9岁)。按日本胃癌研究会《胃癌处理规约》进行组织病理学分型,详细资料见表1。血清从术前未接受化疗及放疗的胃癌患者术前空腹外周静脉血分离,另选取10名健康人(无血管新生疾病,如肿瘤,类风湿性关节炎,银屑病等)血清作对照,-80℃放置备用。

1.2 方法 应用人VEGF ELISA检测试剂盒(quantikine, R&D公司)检测血清VEGF浓度。严格按照试剂盒操作说明书进行,应用BIO-RAD3550-UV型酶标仪在波长450 nm纠正波长570 nm条件下读取光密度值,根据标准曲线得出VEGF浓度。采用常规SP法进行免疫组织化学染色。鼠抗人VEGF单克隆抗体(福建迈新公司,即用型工作液),以正常IgG为阴性对照,以已知VEGF蛋白表达阳性的乳腺癌组织为阳性对照。结果判定:按5%以上细胞质或细胞膜呈棕黄色者为VEGF蛋白表达阳性<sup>[3]</sup>。

统计学处理 所测结果以均数±标准差表示,进行方差分析和t检验,应用统计软件SPSS10.0处理。

## 2 结果

2.1 血清VEGF浓度 胃癌患者术前血清VEGF浓度高于健康对照( $P < 0.05$ ),与胃癌侵袭深度、淋巴结转移、远处转移,肿瘤分期及肿瘤组织学分型密切相关,侵及浆膜、有淋巴结转移和远处转移、进展期胃癌以及低分化型癌血清VEGF浓度显著高于未侵及浆膜( $P < 0.05$ )、无淋巴结转移( $P < 0.01$ )和远处转移( $P < 0.01$ )、早期胃癌( $P < 0.05$ )以及分化型癌( $P < 0.05$ )。Borrmann + 型胃癌血清VEGF浓度高于Borrmann + 型胃癌( $P < 0.05$ ),但Borrmann 、 型胃癌之间及Borrmann 、 型胃癌之间血清VEGF浓度无差异( $P > 0.05$ )。血清VEGF浓度无性别差异( $P > 0.05$ )。详细结果见表1。

2.2 VEGF蛋白表达 51例胃癌中34例VEGF蛋白表达阳性(66.7%),其表达具有明显的异质性,强阳性染色的癌细胞多位于肿瘤浸润的前缘。肿瘤组织中VEGF蛋白表达阳性的胃癌患者血清VEGF浓度( $665.1 \pm 418.7\text{ pg/mL}$ )明显高于VEGF表达阴性的患者( $324.1 \pm 287.7\text{ pg/mL}$ )( $P < 0.05$ )。

表1 血清VEGF浓度与胃癌临床病理特征的关系

临床病理特征	n	VEGF浓度(pg/mL)	P值
浸润深度 <sup>a</sup>			
T <sub>1</sub>	5	157.8 ± 79.2	
T <sub>2</sub>	4	207.1 ± 146.7	
T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub>	42	631.1 ± 408.0	<0.05
淋巴转移			
有	36	681.1 ± 408.7	
无	15	240.3 ± 193.4	<0.01
远处转移			
有	13	996.3 ± 436.5	
无	38	399.3 ± 269.7	<0.01
Borrmann分型 <sup>b</sup>			
+	26	461.8 ± 403.4	
+	20	766.5 ± 357.5	<0.05
组织学分型 <sup>c</sup>			
分化型癌	16	344.7 ± 251.5	
低分化型癌	35	646.0 ± 436.7	<0.05
人群			
对照	10	91.8 ± 61.9	
胃癌	51	551.5 ± 410.6	<0.05
分期			
	6	144.6 ± 77.8 <sup>d</sup>	
	12	261.8 ± 173.2	
	14	476.3 ± 224.4	
	19	918.3 ± 393.0	<0.05
性别			
男	37	529.4 ± 450.1	>0.05
女	14	609.9 ± 286.8	
VEGF蛋白表达			
阳性	34	665.1 ± 418.7	
阴性	17	324.1 ± 287.7	<0.05

a:T<sub>1</sub>浸润黏膜(M)或黏膜下层(Sm),T<sub>2</sub>浸润固有肌层(Pm)或浆膜下层(SS),T<sub>3</sub>穿透浆膜层(Se),T<sub>4</sub>穿透浆膜层并侵袭邻近脏器(Sei); b: 46例进展期胃癌的分型; c:分化型癌:乳头状腺癌,管状腺癌;低分化型癌:低分化腺癌,印戒细胞癌,黏液腺癌; d: , 期胃癌血清 VEGF 浓度无统计学差异( $P > 0.05$ )

### 3 讨论

血管生成在实体肿瘤的生长和转移中是必需的. VEGF 又称血管通透因子(vascular permeability factor, VPF), 是一个重要的血管形成因子, 胚胎发育中 VEGF 广泛表达, 血管生成在正常生理状态下被关闭, 成年组织 VEGF 呈低水平表达, 成年人 VEGF 水平升高仅见于肿瘤、伤口愈合、类风湿性关节炎等病理现象及女性月经期.许多实体肿瘤细胞均可分泌 VEGF, VEGF 特异地作用于血管内皮细胞, 诱导肿瘤血管生成, 供给肿瘤营养, 同时增加微血管的通透性, 使肿瘤细胞增加了进入循环, 产生转移的机会. 最近研究表明, 在乳腺癌、胃肠道癌及卵巢癌等多种肿瘤尤其是转移性肿瘤患者血清中 VEGF 的浓度显著升高<sup>[4,5]</sup>, 并与肿瘤分期密切相关<sup>[6]</sup>. 我们的研究发现, 随着胃癌浸润深度的增加血清 VEGF 浓度明显升高, 同时, 有淋巴结转移的患者血清 VEGF 浓度明显高于无淋巴结转移的患者, 有远处转移的患者血清 VEGF 浓度明显高于无远处转移的患者. 本研究中胃癌患者血清 VEGF 浓度(551.5 ± 410.6 pg/mL)明显高于健康对照(91.8 ± 61.9 pg/mL),

早期胃癌血清 VEGF 浓度相对于健康人即有升高, 但无统计学意义( $P > 0.05$ ), 进展期胃癌尤其是有转移的胃癌患者血清 VEGF 浓度明显高于早期胃癌或无转移的胃癌患者. 上述结果表明健康人血清 VEGF 浓度较低, 肿瘤发生后, 原位肿瘤细胞不断增生, 随着血管生成开关的开放, 血清 VEGF 浓度开始升高, 于原位刺激血管生成, 肿瘤开始组织建立自己的血管网, 因为新生的血管内皮和基底膜有缺陷, 肿瘤细胞易穿过基底膜屏障进入血液循环, 以便于向远端扩散和转移, 在此过程中 VEGF 被大量分泌并释放到血液中, 并随着浸润深度的增加以及肿瘤的转移释放到血液中的 VEGF 也进一步增加<sup>[7]</sup>. 我们认为, 术前血清 VEGF 浓度可作为评价胃癌进展程度的指标.

在研究中我们还发现, 胃癌患者血清 VEGF 浓度与胃癌组织学分型关系密切, 低分化型癌血清 VEGF 浓度高于分化型癌, 反映了肿瘤恶性程度越高分泌 VEGF 越多, 促血管生成能力越强. Borrmann I、II 型胃癌血清 VEGF 浓度明显高于 Borrmann III、IV 型, 但 Borrmann I 和 II 型之间以及 Borrmann III 和 IV 型之间血清 VEGF 浓度无明显差异, 在生长方式上 Borrmann I、II 型胃癌呈局限性生长, 而 Borrmann III、IV 型胃癌呈浸润性生长, 表明根据不同的生长方式, 血清 VEGF 浓度有差异, 胃癌侵袭能力越强, 血清 VEGF 浓度越高.

本研究未发现胃癌患者性别之间血清 VEGF 浓度存在差异.

我们在研究中发现, 肿瘤组织中 VEGF 蛋白表达阳性的胃癌患者术前血清 VEGF 浓度明显高于 VEGF 蛋白表达阴性的患者, 提示肿瘤组织中 VEGF 蛋白的高表达是导致外周血 VEGF 浓度升高的原因. 胃癌细胞产生大量的 VEGF 于原位促进肿瘤血管生成并进入血液循环, 支持肿瘤侵袭和转移. 因此, 术前血清 VEGF 浓度可反映胃癌肿瘤血管生成情况, 从而可能成为预测胃癌血管生成及肿瘤侵袭和转移的一个指标.

### 4 参考文献

- Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989; 339:58-61
- Yoshihi H, Gomez DE, Shibusawa M, Thorgeirsson UP. Expression of VEGF, its receptor and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res* 1996;56:2013-2016
- Miyake M, Taki T, Hitomis S, Hakomori S. Correlation of expression of H/Lex/leb antigen with survival in patients with carcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1992;327:14-18
- Kraft A, Weindel K, Ochs A, Marth C, Zmija J, Schumacher P, Unger C, Marme D, Gastl G. Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and non-malignant disease. *Cancer* 1999; 85:178-187
- Salven P, Manpaa H, Orpana A, Alitalo K, Joensuu H. Serum vascular endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3:647-651
- Eroglu A, Demirci S, Ayyildiz A, Kocaoglu H, Akbulut H, Akgul H, Elhan HA. Serum concentration of vascular endothelial growth factor and nitrite as an estimate of in vivo nitric oxide in patients with gastric cancer. *Brit J Cancer* 1999;80:1630-1633
- Kitamura M, Toi M, Arai K, Iwasaki Y, Suzuki H, Matsuo K. Concentrations of vascular endothelial growth factor in the sera of gastric cancer patients. *Oncol Rep* 1998;5:1419-1424

• 研究快报 •

# 肝硬化门静脉高压症大鼠脾脏血管内皮细胞生长因子的研究

邓琰,马庆久,鲁建国,任朝霞,邓明福

邓琰,马庆久,鲁建国,中国人民解放军第四军医大学唐都医院普外科  
陕西省西安市 710038  
任朝霞,邓明福,中国人民解放军第451医院病理科 陕西省西安市 710054  
项目负责人:马庆久,710038,陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学唐都医院普外科。ydeng\_731@163.com  
电话:029-3377732 传真:029-3377732  
收稿日期:2002-10-25 接受日期:2002-11-16

## 摘要

目的:探讨血管内皮细胞生长因子(VEGF)在肝硬化门静脉高压症中的作用。

方法:对18例肝硬化门静脉高压症大鼠(分早期、中期、晚期三期)和6例正常大鼠脾脏切除标本,使用原位杂交法检测 VEGF 的 mRNA 的表达情况。

结果:门静脉高压组大鼠 VEGF 的 mRNA 高表达,其表达率分别为早期 50.0 %, 中期 66.7 %, 晚期 100 %. 对照组阳性表达率为 16.7 %.

结论:(1) VEGF 是最有力的血管生成因子。(2) VEGF 随肝硬化门脉高压严重程度而阳性表达率有所增加。

邓琰,马庆久,鲁建国,任朝霞,邓明福. 肝硬化门静脉高压症大鼠脾脏血管内皮细胞生长因子的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(3):346-347  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/346.htm>

## 0 引言

门静脉高压症(portal hypertension, PHT)与肝硬变密切相关, 其并发症多由于肝硬变引起的门静脉系统及体循环血流动力学变化所致。在PHT患者, 除有血流动力学紊乱外, 还有门静脉系统血管的病变, 称为门静脉高压性血管病变(portal hypertension vascular lesion), 并在PHT的发展中起重要作用。而VEGF是引起门静脉高压性血管病变的重要细胞因子之一。本文通过动物实验, 测定大鼠脾脏 VEGF 的 mRNA 表达水平, 初步探讨 VEGF 在 PHT 中的作用。

## 1 材料和方法

1.1 材料 动物模型:二级 Wistar 大鼠, 质量在  $200 \pm 30$  g 之间(第四军医大学实验动物中心 SPF 动物), 随机分为实验组(18 只)和对照组(6 只)。

1.2 方法 实验组用 600 mL/L 四氯化碳橄榄油溶液按 0.3 mL/100 g 质量皮下注射, 1 次 /4 d, 饮用 50 mL/L 乙醇, 参照韩德五 et al [1] 将肝硬变大鼠模型分期, 人为地将肝硬变大鼠病程分为三期:早期(第 25 天)脂变坏

死期; 中期(第 45 天)纤维增生期; 晚期(第 65 天)假小叶形成期。对照组用橄榄油溶液 0.3 mL/100 g 质量皮下注射, 1 次 /4 d, 饮用自来水。二组大鼠均在二级动物实验室饲养, 自由进食。大鼠断头处死。迅速取出脾脏放入 -173 ℃ 液氮冷冻保存。血管内皮细胞生长因子(VEGF)的 mRNA 测定:采用原位杂交法。选用武汉博士德生物工程有限公司生产的 VEGF 原位杂交检测试剂盒; APES 胶片; DEPC; POLY-L-LYSINE; DAB 显色试剂盒。采用地高辛标记的随机引物法, 原位杂交的具体方法参照蔡文琴 et al [2] 方法进行。免疫显色半定量判定标准:按显色的深度和阳性颗粒的粗细、数量分为三级, 显色略高于背景、阳性颗粒细而少为弱阳性; 显色为深褐色或棕褐色、颗粒粗大而多为强阳性; 界于二者之间者为中度阳性。阳性颗粒在每个高倍镜视野中占 30 % 以上为阳性切片; 每个标本连续取 5 张切片染色, 其中有一个阳性切片既为阳性结果。

统计学处理 运用 SAS 统计软件作统计分析。比较阳性切片和阴性切片在每组中的统计学差异, 采用 Fisher's 精确检验行统计学处理。

## 2 结果

门静脉高压组大鼠 VEGF 的 mRNA 高表达, 其表达率分别为, 早期 50 %(3/6), 中期 66.7 %(4/6), 晚期 100 %(6/6)。对照组仅有 1 例轻度阳性, 阳性率为 16.7 %(表 1)。由 Fisher's 精确检验可计算出  $P < 0.05$ (表 2), 说明 VEGF 在门静脉高压组同对照组之间, 以及门静脉高压不同时期组间均有显著性差异。VEGF 的 mRNA 表达随肝硬化门脉高压严重程度而有所增高。

表 1 各组大鼠切片阳性结果比较

n	分组	正常	早期	中期	晚期	合计
		5	3	2	0	10
阴性	1	3	4	6	14	
阳性	6	6	6	6	24	
合计						

表 2 由 Fisher's 精确检验计算出的  $P$  值 ( $n = 24$ )

Fisher's Exact Test	
Table Probability (P)	9.178E-04
Pr<=P	0.0350

### 3 讨论

血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor)是1989年Ferrara et al<sup>[3]</sup>在牛垂体星状细胞体外培养分离出的一种糖蛋白，其在体内外都表现出特异性地促进血管内皮细胞生长并诱导血管生成的作用，故被称为血管内皮细胞生长因子(VEGF)。在众多的血管生成因子中，VEGF是最有力的血管生成因子，他通过和血管内皮细胞的特异性受体结合，具有强大的促内皮增生、促血管生成作用。门静脉系统血管病变已经成为PHT目前研究的热点之一<sup>[4]</sup>。而脾内血管病变也是门静脉高压性血管病变的一部分。本实验表明，随着肝硬化程度的加重，VEGF的表达有增高趋势，而VEGF具有较强的促血管内皮细胞增生及增加血管通透性的作用<sup>[5]</sup>，使脾脏内血管增生，脾内储血量加大导致脾髓压力升高，从而加重门静脉高压状态和脾功能亢进。这说明，在肝硬化渐变中，VEGF起着重要的作用。肝内外分流时，胃肠胰源性所释放的舒血管活性物质，使三级小动脉阻力下降，血管扩张，动-静脉短路形成，血氧饱和度下降。由于缺血、缺氧、内毒素及肝功能下降等导致代谢紊乱，包括脾脏在内的

内脏处于高血流动力状态。而缺氧条件下可导致VEGF的表达及释放，并为血管生成的因素之一<sup>[6]</sup>。因此随着肝硬化程度的进一步加重，VEGF的表达更趋升高，对肝硬化严重程度起正反馈性调节作用。

总之，VEGF的高表达不但是门静脉高压作用的结果，同时也是门静脉高压的促进因素。由于VEGF在体内所表现出的特异性促血管生成作用，使其在临床应用方面表现出广泛的应用前景。然而，对VEGF的详细表达调节机制尚有待于进一步研究。利用其血管生成作用机制，通过抑制VEGF的血管生成作用治疗肝硬化门静脉高压症，正在作为一种新的治疗方法被应用于临床。

### 4 参考文献

- 1 韩德五,马学慧,赵元. 肝硬化动物模型研究. 山西医药杂志 1979;4:1
- 2 蔡文琴,王伯云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 第1版. 成都:四川科学技术出版社, 1994:401-427
- 3 Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-858
- 4 Yang Z, Liu RZ, Yang RG, Qiu F. Portal hypertensive vascular lesions. *J Tongji Med Univer* 1996;16:1-3
- 5 Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999;9:211-220
- 6 Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843-845

## 世界胃肠病学杂志英文版获得第二届国家期刊奖百种重点期刊

**本报讯** 为了进一步繁荣期刊出版事业，2002年9月，经中共中央宣传部同意，新闻出版总署决定举办第二届国家期刊奖评选活动。经过反复审核，全国共推荐出参评科技期刊522种。这些参评期刊经过评选办公室的参评资格审查、出版规范审查、广告内容审查后，由专家组和评选工作委员会进行评选。2002年12月初产生评选入围期刊，并将初评结果在《光明日报》、《科技日报》、《中国新闻出版报》和《中国图书商报》公示，接受全社会的监督，最终评出国家期刊奖科技类30名，国家期刊奖提名奖50名，国家期刊奖百种重点期刊99名。世界胃肠病学杂志英文版（World Journal of Gastroenterology）获得第二届国家期刊奖百种重点期刊，并荣获获奖证书、奖杯和获奖徽标。

国家期刊奖是期刊业中最权威的、也是最具影响的奖项。我们衷心感谢全体编委及作者、读者对世界胃肠病学杂志英文版的支持，希望在今后能继续得到大家的关心爱护和大力支持，争取更大的成绩。

# 当归多糖及大蒜素对小鼠四氯化碳肝损伤作用的比较

郑敏,徐爱芹,鲍翠玉,吴基良,李立中

郑敏,吴基良,李立中, 咸宁医学院药理学教研室 湖北省咸宁市 437100  
 徐爱芹,咸宁医学院设备处 湖北省咸宁市 437100  
 鲍翠玉,咸宁医学院内科学教研室 湖北省咸宁市 437100  
 湖北省卫生厅课题, No.WZ01512  
 项目负责人:郑敏,437100,湖北省咸宁市温泉桂花路3号,咸宁医学院临床药系药理教研室. zhengmin330@sohu.com  
 电话:0715-8273513  
 收稿日期:2002-10-07 接受日期:2002-10-22

## 摘要

目的:观察并比较当归多糖(angelica sinensis polysaccharide, ASP)及大蒜素(allitridi, Alt)对小鼠四氯化碳(CCL<sub>4</sub>)肝损伤的作用.

方法:采用500 mL/L 四氯化碳灌胃(0.1 mL/10 g)建立实验性肝损伤模型, 分别测定生理盐水对照组(control)、CCL<sub>4</sub>模型组、当归多糖治疗组(CCL<sub>4</sub>+ASP)、大蒜素治疗组(CCL<sub>4</sub>+Alt)小鼠血清谷丙转氨酶(AST)、谷胱甘肽s-转移酶(GST)活性及肝组织中丙二醛(MDA)含量; 并观察各组小鼠体重改变.

结果:与对照组相似, 当归多糖治疗组小鼠体重明显增加且显著高于CCL<sub>4</sub>模型组及Alt治疗组( $P < 0.01$ ); 当归多糖及大蒜素均能逆转四氯化碳肝损伤小鼠血清AST及肝组织内MDA的升高(均 $P < 0.01$ ), 而恢复到正常水平, 并明显降低肝损伤小鼠血清GST活性( $P < 0.01$ ); 与大蒜素相比, 当归多糖降低小鼠血清AST及GST活性更为显著( $P < 0.01$ ).

结论:当归多糖及大蒜素对小鼠四氯化碳肝损伤均有良好的保护作用, 当归多糖疗效优于大蒜素.

郑敏,徐爱芹,鲍翠玉,吴基良,李立中. 当归多糖及大蒜素对小鼠四氯化碳肝损伤作用的比较. 世界华人消化杂志 2003;11(3):348-349  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/348.htm>

## 0 引言

目前, 从传统的中药或食物中寻找有效部位或有效成分治疗病毒性肝炎已成为研究热点. 当归为我国传统中药, 具有多种功效, 对其有效成分的研究主要集中于阿魏酸和当归多糖(angelica sinensis polysaccharide, ASP); 已有实验证明当归煎剂及阿魏酸对多种肝损伤、肝硬化和肝癌有保护作用<sup>[1-9]</sup>, 其机制与抗脂质过氧化及膜稳定功能有关; 至于当归多糖(ASP)用于保护肝脏的研究, 尚未见报道. 已经证明大蒜具有消炎、杀菌、解毒、抗氧化、降血脂等多种药理作用, 二烯丙基三硫(allitridi, Alt, 俗称大蒜素)则为大蒜中主要的生物

活性成分之一, 对乙醇所致肝损伤有保护作用<sup>[10,11]</sup>. 我们利用四氯化碳复制小鼠肝炎模型, 观察并比较了ASP和Alt对肝损伤小鼠血清AST、GST活性及肝组织中MDA含量的影响, 为其作为护肝药物的应用提供科学依据.

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康 昆明小鼠, 体质量18-22 g, 由湖北省医科院提供. 大蒜素胶囊, 湖北五三制药厂生产(批号950610), 当归多糖, 武汉大学基础医学院药理系制备, 1-氯-2, 4-二硝基苯(CDNB)及还原型谷胱甘肽(GSH)均为Sigma产品, AST测定试剂盒, 购于上海荣盛生物技术有限公司(批号:9906017), 其余试剂均为市售分析纯产品. 日本岛津UV-3000双波长双光束分光光度计UV-752C紫外可见光分光光度计(上海第三分析仪器厂).

1.2 方法 健康昆明小鼠禁食24 h称重后随机分成生理盐水对照组(control)、CCL<sub>4</sub>模型组、大蒜素治疗组(CCL<sub>4</sub>+Alt)和当归多糖治疗组(CCL<sub>4</sub>+ASP). 对照组以生理盐水0.1 mL/10 g灌胃, 其他三组以500 mL/L CCL<sub>4</sub>花生油按0.1 mL/10 g灌胃复制肝损伤模型. 制模后CCL<sub>4</sub>+Alt组小鼠按20 mg/kg给予1 g/L Alt混悬液0.2 mL/10 g ig, qd × 7; CCL<sub>4</sub>+ASP组小鼠按500 mg/kg给予25 g/L ASP溶液0.2 mL/10 g ig, qd × 7; 对照组及四氯化碳组同时给予等容积生理盐水灌胃. 末次给药前各组小鼠称重, 给药后6 h处死小鼠, 放血收集血清, 并立即剖腹取同一叶肝组织以冰生理盐水洗净, 于-30℃冰箱冻存备测. 以CDNB为底物, 用岛津UV-3000双波长双光束分光光度计测定血清GST活性<sup>[12]</sup>. 按AST测定试剂盒说明书测定血清AST. 取小鼠肝组织以冰生理盐水制成10%组织匀浆, 用硫代巴比妥酸法测定MDA含量.

统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较用F检验, 组间两两比较用q检验.

## 2 结果

2.1 Alt及ASP治疗对肝损伤小鼠体质量的影响 造模1 wk后生理盐水对照组小鼠体质量明显增加; CCL<sub>4</sub>模型组、Alt治疗组体重无明显变化, 但均显著低于对照组( $P < 0.01$ ); ASP治疗组体重与对照组相似且明显高于CCL<sub>4</sub>模型组及Alt治疗组(表1).

表1 Alt及ASP治疗前后小鼠体重的变化( $\bar{x} \pm s$ , n=10)

Group	体质量(g)		体质量变化(%)
	治疗前	治疗后	
control	20.2 ± 0.8	23.2 ± 1.0	+14.85
CCL <sub>4</sub>	20.3 ± 0.7	19.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	-2.46
CCL <sub>4</sub> +Alt	20.1 ± 0.8	20.6 ± 1.2 <sup>a</sup>	+2.49
CCL <sub>4</sub> +ASP	20.2 ± 0.6	23.0 ± 1.1 <sup>bc</sup>	+13.86

<sup>a</sup>P <0.01, vs control 组 ; <sup>b</sup>P <0.01, vs CCL<sub>4</sub> 组 ; <sup>c</sup>P <0.01, vs CCL<sub>4</sub>+Alt 组

2.2 Alt及ASP对小鼠血清AST、GST的影响 四氯化碳模型组小鼠血清AST、GST活性较对照组显著增加(P <0.01), Alt 20 mg/kg有阻抑四氯化碳所致血清AST和GST活性升高的作用(均P <0.01),使GST活性降至损伤组的58.8%, AST活性恢复到正常对照组水平; ASP 500 mg/kg亦可明显阻抑四氯化碳所致血清AST和GST活性升高(均P <0.01),使GST活性降至损伤组的28%, AST活性降至正常对照以下(P <0.01);与Alt组相比, ASP降低血清AST及GST活性更为显著(P <0.01)(表2)

表2 Alt及ASP对CCL<sub>4</sub>肝损伤小鼠血清GST、AST影响( $\bar{x} \pm s$ , n=10)

Group	AST(卡门氏单位)	GST(nmol/min·mL)
control	138 ± 11	20 ± 4
CCL <sub>4</sub>	166 ± 12 <sup>b</sup>	245 ± 21 <sup>b</sup>
CCL <sub>4</sub> +Alt	135 ± 9 <sup>d</sup>	144 ± 18 <sup>d</sup>
CCL <sub>4</sub> +ASP	100 ± 8 <sup>bcd</sup>	69 ± 12 <sup>df</sup>

<sup>b</sup>P <0.01, vs control 组 ; <sup>c</sup>P <0.01, vs CCL<sub>4</sub> 组 ; <sup>d</sup>P <0.01, vs CCL<sub>4</sub>+Alt 组

2.3 Alt及ASP对CCL<sub>4</sub>肝损伤小鼠肝组织MDA含量的影响 CCL<sub>4</sub>肝损伤组小鼠肝组织MDA含量较对照组升高53%(P <0.01); Alt及ASP均能明显降低CCL<sub>4</sub>引起的肝组织MDA的升高(均P <0.01),分别使其降低约30.3%、37.6%,而达到正常对照水平(表3)

表3 Alt及ASP对CCL<sub>4</sub>肝损伤小鼠肝匀浆MDA的影响( $\bar{x} \pm s$ , n=10)

Group	MDA(nmol/ggw)
control	15.4 ± 0.9
CCL <sub>4</sub>	23.4 ± 1.5 <sup>a</sup>
CCL <sub>4</sub> +Alt	16.3 ± 1.1 <sup>c</sup>
CCL <sub>4</sub> +ASP	14.6 ± 1.2 <sup>ac</sup>

ggw:每g肝组织湿重

<sup>a</sup>P <0.01, vs control 组 ; <sup>b</sup>P <0.01, vs CCL<sub>4</sub> 组

### 3 讨论

四氯化碳肝损伤为目前国际常用的肝炎模型之一,其中毒机制主要是四氯化碳进入机体后产生自由基引起膜脂质过氧化,使膜结构和功能完整性破坏,从而

引起细胞中毒死亡。

AST主要存在于细胞核和线粒体内,当肝细胞明显损害时释放入血,其水平升高表明肝细胞明显变性坏死;GST(谷胱甘肽S-转移酶)在生物转化酶系中属相酶,参与结合反应,肝损害时细胞膜完整性破坏,GST可大量释放入血,致血清GST增高;汪晖等研究表明,血清GST活性变化对于多种肝损伤具有诊断性意义,与肝组织病理改变、血清ALT活性变化之间具有良好的平行关系,比ALT更灵敏、更特异并具有较高的准确性,目前已有部分医院将血清GST作为肝功能诊断指标之一;因此,我们将血清GST变化作为反映肝损伤程度及药物护肝作用的指标之一。

本实验结果表明,当归多糖及大蒜素均能对抗CCL<sub>4</sub>所致肝损害,降低血清AST,大蒜素使之恢复正常,当归多糖甚而使之下降到正常水平以下;上升的血清GST也逐渐下降,且当归多糖逆转血清AST、降低血清GST水平较大蒜素更为显著;表明二者均有良好的肝细胞膜保护作用,且当归多糖的作用强于大蒜素。造模后,当归多糖治疗组小鼠饮食、四肢活动及其他一般状况恢复均较CCL<sub>4</sub>模型组及Alt治疗组为快,治疗1 wk时体质量与生理盐水对照组相似,且明显高于CCL<sub>4</sub>模型组及Alt治疗组,亦表明当归多糖可明显改善肝损伤小鼠一般状况且优于大蒜素。另外,我们还发现大蒜素及当归多糖均能明显阻止CCL<sub>4</sub>引起的过氧化产物MDA含量的升高,并使之恢复正常。故此提示:大蒜素及当归多糖可能通过抑制脂质过氧化过程,维持细胞膜的完整性,使肝细胞内AST、GST溢出减少,血清AST、GST恢复正常,从而发挥护肝作用;对当归多糖进一步开发和利用,其将不失之为一种良好的护肝新药。

### 4 参考文献

- 姚欣,姚希贤,修贺明,高君萍,张玉琢.活血化瘀中药益肝浓缩煎剂对大鼠肝纤维化的作用.世界华人消化杂志 2002; 10:544-548
- 唐有为,姚希贤,修贺明.益肝煎剂对肝星状细胞增殖的影响.世界华人消化杂志 2001;9:347-348
- 汪晖,彭仁琇.阿魏酸钠减轻对乙酰氨基酚致小鼠肝损.中国药理学报 1994;15:81-83
- 吴东方,彭仁琇,汪晖.阿魏酸钠部分减轻氯化泼尼松引起的小鼠肝脏毒性.药学学报 1995;30:801-805
- 李颖,彭仁琇.阿魏酸钠和当归醇沉物对免疫性肝损伤的干预作用.中草药 2000;31:274-276
- 贺德,曹绣虎.联合应用超氧化物歧化酶、阿魏酸钠抗肝缺血再灌注损伤.中国普通外科杂志 1999;8:135-137
- 贺德,曾志良,曹建华,彭爱军,向红霞.阿魏酸钠抗大鼠肝纤维化.世界华人消化杂志 2002;10:240-241
- 朱秀琴,王国申,张学军,赵倩.中药阿魏酸钠对人EBL-7404肝癌细胞生存性及凋亡的影响.世界华人消化杂志 1999;7:715-716
- 汪晖,彭仁琇,王若琨,孔锐.阿魏酸钠对乙醇所致小鼠肝脏抗氧化功能改变的拮抗作用.药学学报 1997;32:511-514
- 黄杰安,丁虹.大蒜素对乙醇性肝损伤的保护作用.世界华人消化杂志 1999;7:427-428
- 汪晖,彭仁琇,孔锐,曾汗高.大蒜素对乙醇引起肝损伤的拮抗作用.卫生研究 1998;27:415-417
- Habig WH, Pabst MJ, Jaka Koby WB. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974;249:7130

• 研究快报 •

# 丙型肝炎病毒核心区蛋白和细胞凋亡对 HepG<sub>2</sub> 细胞周期的影响

全俊,胡国龄,范学工,谭德明

全俊,胡国龄,范学工,谭德明,中南大学湘雅医院传染科 湖南省长沙市 410008  
 项目负责人:全俊,410008,湖南省长沙市,中南大学湘雅医院传染科.  
 quan73jun@hotmail.com  
 电话:0731-4327221  
 收稿日期:2002-10-07 接受日期:2002-10-21

## 摘要

目的:研究丙型肝炎病毒核心区(HCV-C)蛋白和细胞凋亡对肝癌细胞 HepG<sub>2</sub> 细胞周期的影响。

方法:首先运用基因重组技术构建包含HCV-C基因的真核表达质粒pcDNA3.1,然后利用脂质体介导将重组真核表达质粒转染肝癌细胞 HepG<sub>2</sub>,经 G418 筛选获得稳定转染 HepG<sub>2</sub> 细胞(HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 细胞),经 RT-PCR 和间接免疫荧光法证实其中有 HCV-C 蛋白表达。然后进行如下实验:(1)MTT 法检测 HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 细胞、空白质粒转染 HepG<sub>2</sub> 细胞和未转染 HepG<sub>2</sub> 细胞生长增生率;(2)流式细胞术(FACS)检测三组细胞凋亡率和细胞周期,以及 HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 细胞经 Fas 抗体诱导凋亡后的细胞周期变化。

结果:(1)HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 细胞增生率显著高于空白质粒转染 HepG<sub>2</sub> 和未转染 HepG<sub>2</sub> 细胞增生率;(2)细胞未经 Fas 抗体诱导凋亡时,HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 细胞 S 期所占百分率高于未转染 HepG<sub>2</sub> 细胞 S 期所占百分率,HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 细胞凋亡率低于无 HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 细胞凋亡率;HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 细胞经 Fas 抗体诱导凋亡时,细胞 S 期所占百分率低于未经诱导凋亡细胞 S 期所占百分率。

结论:(1)HCV-C 蛋白具有抑制 HepG<sub>2</sub> 细胞凋亡的作用;(2)HCV-C 蛋白促进 HepG<sub>2</sub> 细胞从 G<sub>0/1</sub> 期进入 S 期,从而可能促进细胞生长增生,抑制细胞凋亡;Fas 抗体诱导细胞凋亡时细胞被阻滞于 G<sub>0/1</sub> 期。

全俊,胡国龄,范学工,谭德明. 丙型肝炎病毒核心区蛋白和细胞凋亡对 HepG<sub>2</sub> 细胞周期的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(3):350-352

<http://www.wjnet.com/1009-3079/11/350.htm>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)感染是引起输血后肝炎的主要病原体,且 HCV 感染后大部分会导致感染慢性化,可引起慢性丙型肝炎、肝炎后肝硬化及肝细胞癌(HCC)等严重后果。目前对丙型肝炎的发病机制尚不清楚,免疫损

伤可能是其主要致病机制,但 HCV 对肝细胞的直接作用也起着一定作用,其中包括 HCV 对肝细胞增生和细胞周期的影响<sup>[1-3]</sup>。Kalker et al<sup>[4,5]</sup>发现转染了 HCV 全基因的细胞增生受到抑制;Werling et al<sup>[6]</sup>报道慢性丙型肝炎患者肝细胞增生率低于非 HCV 所致慢性肝炎的肝细胞增生率,说明 HCV 具有抑制肝细胞增生的能力。丙型肝炎病毒核心区(HCV-C)蛋白对细胞增生和细胞周期的影响还不清楚。部分认为 HCV-C 蛋白抑制细胞凋亡促进细胞增生<sup>[7-9]</sup>,部分认为 HCV-C 蛋白抑制细胞增生<sup>[10]</sup>。细胞周期分为 G<sub>0/1</sub> 期、S 期和 G<sub>2/M</sub> 期,细胞周期在不同时相的多个调控点上受到调控,其中以 G<sub>1/S</sub> 和 G<sub>2/M</sub> 期转换调控点最为重要<sup>[11,12]</sup>。细胞周期阻断与细胞凋亡关系不明确,细胞周期阻断并不是越完全越促使细胞凋亡<sup>[13]</sup>。本实验旨在研究 HCV-C 和细胞凋亡对细胞周期的影响。

## 1 材料和方法

1.1 材料 DNA 纯化试剂盒(QIAGEN),培养基 DMEM, 脂质体 Lipofectamine2000、抗生素 G418(GIBCO), RT-PCR 逆转录试剂盒(Promega), FITC 标记山羊抗人 IgG(武汉博士德),兔抗人 Fas 多克隆抗体(Santa Cruz)。含有 HCV-C, E1, E2 区的质粒 puc118 由本所谭德明教授构建并赠送;质粒 pcDNA3.1(+),大肠杆菌 JM109 及肝癌细胞系 HepG<sub>2</sub> 由我科保存;流式细胞仪(FACS420)。

### 1.2 方法

1.2.1 PCR 引物 根据 HCV1a 序列(AF009606)设计能扩增全长 HCV-C 的引物(分别在两端引入酶切位点 Hind 及 EcoR,并在下游设计终止密码),上游引物:ACAAGCTTCCATGAGCACGAATCCTAAAC,下游引物 AGAATTCTAGGCTGAAGCGGGCACAGTC,预计扩增片段长度为 594 bp。

1.2.2 构建包括目的基因 HCV-C 的重组真核表达质粒<sup>[14,15]</sup>首先以包括 HCV-C、E1 和 E2 区的重组质粒 Puc118 为模板进行 PCR 扩增目的片段 HCV-C,将纯化的 PCR 产物与 T 载体(3 000 bp)经 T<sub>4</sub> DNA 连接酶 4 连接过夜,经氨苄青霉素筛选阳性克隆,并经 Hind 、EcoR 双酶切和 PCR 鉴定证实。然后利用基因重组技术构建包括目的片段 HCV-C 的重组真核表达质粒 pcDNA3.1(约 5 400 bp),经抗生素筛选,PCR 扩增、HindIII 和 EcoRI 双酶切以及重组质粒 DNA 序列测定证实重组真

核表达质粒中包含目的片段 HCV-C，说明含有目的基因 HCV-C 的重组真核表达质粒构建成功。

1.2.3 重组真核表达质粒转染肝癌细胞 HepG<sub>2</sub> 提取的重组真核表达质粒及空质粒 pcDNA3.1 经脂质体介导转染肝癌细胞 HepG<sub>2</sub>，经 G418 筛选获得稳定转染重组真核表达质粒的 HepG<sub>2</sub> 细胞(分别称为 HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 和空质粒转染 HepG<sub>2</sub>)。

1.2.4 RT-PCR 和间接免疫荧光法检测 HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 中 HCV-C 表达 按 Trizol RNA 提取试剂盒说明提取细胞 RNA，行 RT-PCR 检测 HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 细胞中有无 HCV-C mRNA 表达。将细胞置于放有盖玻片的 6 孔细胞培养板中培养 48 h 后，细胞经冷丙酮固定 30 min，滴加山羊血清室温孵育 20 min 封闭；以丙型肝炎抗体阳性患者血清(1:8)作为一抗孵育 2 h， FITC 标记的山羊抗人 IgG(1:32)为二抗 37℃ 孵育 1 h，然后经 PBS 漂洗 3 次 × 5 min；于荧光显微镜下观察 HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 细胞中有无 HCV-C 表达。

1.2.5 MTT 法检测 HCV-C 蛋白对 HepG<sub>2</sub> 细胞增生率的影响<sup>[15]</sup> 分别接种 2 × 10<sup>4</sup> 个 HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub>、空质粒转染 HepG<sub>2</sub> 和未转染 HepG<sub>2</sub> 细胞于 96 孔细胞培养板中培养 48 h 后，使用 MTT(四甲基偶氮唑蓝)法检测细胞生长率。

1.2.6 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡情况 分别传代 2 × 10<sup>5</sup> 个 HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub>、空质粒转染 HepG<sub>2</sub> 和未转染 HepG<sub>2</sub> 细胞至 6 孔细胞培养板中培养 72 h，细胞经胰酶消化后用冷 70 mL/L 乙醇固定细胞于 4℃ 保存。细胞经流式细胞术检测细胞凋亡及细胞周期情况。Fas 抗体诱导 HepG<sub>2</sub> 细胞凋亡：HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 首先培养 48 h 后加入 Fas 抗体(200 ng/ml)后再培养 24 h<sup>[16-20]</sup>。

统计学处理 利用 SPSS10.0 软件进行统计分析：数据用  $\bar{x} \pm s$  表示，多组之间进行比较采用方差分析，当  $P < 0.05$  时，采用 LSD 法分别进行两两比较；两组之间进行比较采用成组设计 t 检验，并以  $P < 0.05$  确定差异是否具有显著性。

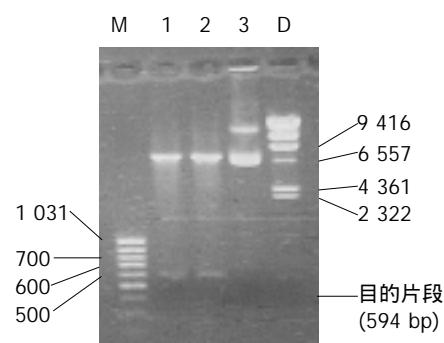
## 2 结果

2.1 重组真核表达质粒经 PCR 扩增可见 600 bp 左右的目的片段条带，HindIII 和 EcoRI 双酶切(图 1)，DNA 序列测定说明包括 HCV-C 序列的重组真核表达质粒构建成功，与 HCV1a 基因进行同源性比较符合率为 98.6%，无移码突变。

2.2 经 RT-PCR 和间接免疫荧光法检测证实 HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 细胞中有 HCV-C mRNA 和蛋白质表达，而未转染 HepG<sub>2</sub> 细胞和空质粒转染 HepG<sub>2</sub> 细胞中无 HCV-C 表达。

2.3 图 2 结果显示 HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 细胞组生长增生率( $0.32 \pm 0.04$ )高于空质粒转染 HepG<sub>2</sub> 组( $0.26 \pm 0.06$ )和未转染细胞组( $0.26 \pm 0.05$ )( $P < 0.05$ )，说明 HCV-C 蛋白促进 HepG<sub>2</sub> 细胞生长增生。

2.4 表 1 结果说明细胞未经 Fas 抗体诱导凋亡时，HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 细胞凋亡率低于未转染 HepG<sub>2</sub> 细胞凋亡率，同时 HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 细胞 S 期所占百分率高于未转染细胞 HepG<sub>2</sub> 细胞 S 期所占百分率( $P < 0.05$ )；二组细胞之间 G<sub>0/1</sub> 期所占百分率比较没有统计学差异( $P > 0.05$ )，但 HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 细胞仍低于未转染 HepG<sub>2</sub> 细胞；二组细胞之间 G<sub>2/M</sub> 期所占百分率没有显著性差别( $P > 0.05$ )。以上结果说明 HCV-C 蛋白促进 HepG<sub>2</sub> 细胞从 G<sub>0/1</sub> 期向 S 期转化，而对 G<sub>2/M</sub> 期没有影响。表 2 结果显示 HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 细胞经 Fas 抗体(200 ng/ml)作用后凋亡率显著增加( $P < 0.001$ )，并且细胞凋亡增加时 S 期所占百分率少于未经 Fas 抗体诱导凋亡对照组 S 期所占百分率( $P < 0.05$ )；G<sub>0/1</sub> 期所占百分率与未经 Fas 抗体诱导凋亡对照组比较虽统计学上没有差异( $P > 0.05$ )，但经 Fas 抗体诱导凋亡组仍高于未经 Fas 抗体诱导凋亡组；二组细胞之间 G<sub>2/M</sub> 期所占百分率没有显著性差异( $P > 0.05$ )。说明 Fas 抗体诱导细胞凋亡时也是作用于 G<sub>1/S</sub> 调控点，使 HCV-C 转染 HepG<sub>2</sub> 细胞阻滞于 G<sub>0/1</sub> 期，而对 G<sub>2/M</sub> 期没有影响。



泳道 M、D : DNA marker  
泳道 1、2 : 酶切后重组真核表达质粒  
泳道 3 : 未酶切重组真核表达质粒  
图 1 重组真核表达质粒双酶切鉴定。

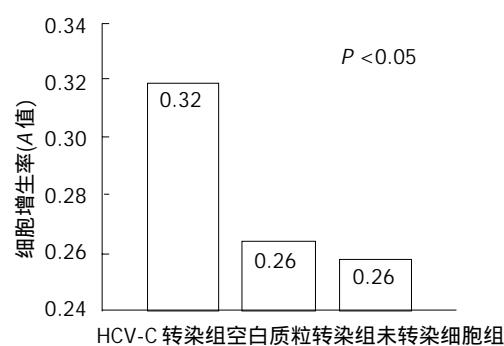


图 2 HCV-C 蛋白对细胞增生。

表 1 HCV-C 蛋白对 HepG<sub>2</sub> 细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s$ , %)

细胞组别	n	G <sub>0/1</sub> 期	S期	G <sub>2/M</sub> 期	细胞凋亡率
未转染细胞组	6	71.50±6.08	15.17±3.87	13.33±2.63	8.63±0.72
HCV-C 转染组	6	66.55±2.09 <sup>b</sup>	19.43±1.85 <sup>a</sup>	14.02±1.41 <sup>b</sup>	5.17±0.76 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05 vs 未转染细胞组；<sup>b</sup>P > 0.05 vs 未转染细胞组。

表2 细胞凋亡对HCV-C转染HepG<sub>2</sub>细胞周期的影响(±S, %)

细胞组别	n	G <sub>0/1</sub> 期	S期	G <sub>2/M</sub> 期	凋亡率
未诱导凋亡对照组	6	66.55±2.09 <sup>b</sup>	19.43±1.85 <sup>a</sup>	14.02±1.41 <sup>b</sup>	5.17±0.76 <sup>a</sup>
Fas抗体诱导凋亡组	4	70.43±3.61	15.13±2.20	14.45±1.69	14.43±1.13

<sup>a</sup>P<0.05 vs Fas抗体诱导凋亡组; <sup>b</sup>P>0.05 vs 未转染细胞组。

### 3 讨论

目前公认HCV-NS5和NS3蛋白具有促进细胞增生、抑制细胞凋亡的功能<sup>[21-24]</sup>;而HCV-C蛋白对细胞增生的影响还没有定论。细胞增生、死亡是受细胞周期调控的,细胞周期分为G<sub>0/1</sub>期、S期和G<sub>2/M</sub>期,其中最关键的两期为S期和M期。不同生物细胞增生周期时间不同,主要是由G<sub>1</sub>期持续时间所决定的,而且G<sub>1</sub>启动是细胞周期启动的关键,因此G<sub>1</sub>/S期的调控尤为重要。本实验结果表明HCV-C蛋白主要作用于G<sub>1</sub>/S调控点,促进HepG<sub>2</sub>细胞由G<sub>1</sub>期进入S期,由此可能启动并加速细胞周期进程,促进细胞增生和抑制细胞凋亡。但HCV-C蛋白作用于G<sub>1</sub>/S调控点的机制有待进一步研究。Cho et al<sup>[8]</sup>发现HCV-C蛋白通过上调细胞中cyclin E促进细胞增生;Kwun et al<sup>[22]</sup>发现HCV-C蛋白通过抑制P21促进细胞增生。当HCV-C转染HepG<sub>2</sub>细胞经Fas抗体诱导凋亡时S期百分率减少,细胞被阻滞于G<sub>1</sub>期。增生细胞对某些凋亡诱因的敏感性常依赖于细胞周期,本实验结果表明不管是HCV-C蛋白抑制细胞凋亡,还是由Fas抗体诱导细胞凋亡增加时都不是作用于G<sub>2/M</sub>期。细胞周期阻断与细胞凋亡关系不明确,并不是细胞周期阻断越完全越促使细胞凋亡;细胞周期阻断并不直接诱导细胞凋亡,他可能是细胞凋亡的重要前提<sup>[25]</sup>。细胞凋亡和增生分化是独立的两种方式,但细胞凋亡和增生分化可同时存在;细胞凋亡可发生在细胞周期不同时相。细胞凋亡与细胞增生并非一定成负相关,许多研究证明肿瘤组织含有激活的癌基因,但细胞却出现大量死亡;在慢性丙型肝炎患者肝细胞凋亡率和增生率可能同时升高,但存在增生/凋亡失衡<sup>[26]</sup>。目前已知具有致凋亡作用的C-myc和腺病毒蛋白E1A都是细胞增生的诱导物。

### 4 参考文献

- Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatopogy* 1997;26:62S-65S
- 陶小红,任红,沈鼎明,张小实,张大志,叶珈,古柏燕.乙型肝炎病毒X蛋白对细胞周期的影响.中华医学杂志 1999;79:613-615
- 刘为纹.肝细胞性肝癌病因学研究.世界华人消化杂志 1999;7:93-95
- Kalker G, Khalap N, Akhter S, Garry RF, Fermin CD, Dash S.

Hepatitis C viral proteins affect cell viability and membrane permeability. *Exp Mol Pathol* 2001;71:194-208

- Kalker G, Khalap N, Garry RF, Fermin CD, Dash S. Hepatitis C virus protein expression induces apoptosis in HepG2 cells. *Virology* 2001;282:26-37
- Werling K, Szentirmay Z, Szepesi A, Schaff Z, Szalay F, Szabo Z, Telegdy L, David K, Stotz G, Tulassay Z. Hepatocyte proliferation and cell cycle phase fractions in chronic viral hepatitis C by image analysis method. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:489-493
- Ray RB, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein promotes immortalization of primary human hepatocytes. *Virology* 2000;271:197-204
- Cho JW, Baek WK, Suh SI, Yang SH, Chang J, Sung YC. Hepatitis C virus core protein promotes cell proliferation through the upregulation of cyclin E expression levels. *Liver* 2001;21:137-142
- 刘重阳,刘为纹,陈东风,杨建民,房殿春.丙型肝炎病毒核心蛋白对细胞凋亡的影响.世界华人消化杂志 2001;9:1125-1128
- Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 2000;106:1239-1249
- 郭德玉,陈意生.细胞周期调控与细胞癌变.国外医学·生理病理科与临床 1997;17:1-4
- 卢斌,戴益民.肝癌发生中细胞周期调控的异常.世界华人消化杂志 2001;9:205-208
- 周明华,陈思颖,李美芳,吴玺印.细胞周期与细胞凋亡.生理科学进展 1996;27:319-322
- 刘重阳,刘为纹,杨建民,鲁荣,罗元辉. HCV核心基因cDNA真核表达载体的构建及其表达.世界华人消化杂志 2000;8:1049-1050
- 全俊,胡国龄,范学工,刘双虎,谭德明.丙型肝炎病毒核心区蛋白在HepG2细胞中的表达.中国现代医学杂志 2002;12:34-35
- 邹世洁,崔巍,张宇鹏,樊雅莉,李玉梅,王肃.大黄酸对胃黏膜上皮细胞生长增生和凋亡的影响.世界华人消化杂志 2001;9:447-448
- Taya N, Torimoto Y, Shindo M, Hirai K, Hasebe C, Kohgo Y. Fas-mediated apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatitis C. *Br J Haematol* 2000;110:89-97
- Zhang XD, Nguyen T, Thomas WD, Sanders JE, Hersey P. Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types. *FEBS Lett* 2000;482:193-199
- 邵润轩,王江滨,王宵伟.凋亡相关因子Fas/FasL在慢性肝炎原发性肝癌表达的规律.世界华人消化杂志 2000;8:937-939
- 梁云,陆斌,崔贞福,李晓冬,郭亚军,刘彦君.肝细胞癌中Fas/FasL表达的意义.世界华人消化杂志 2001;9:1364-1368
- 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
- Kwun HJ, Jung EY, Ahn JY, Lee MN, Jang KL. p53-dependent transcriptional repression of p21(waf1) by hepatitis C virus NS3. *J Gen Virol* 2001;82:2235-2241
- Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T. Hepatitis C virus nonstructural Protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol* 1995;69:3893-3896
- 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
- 彭玮丹,张杰,曹云新,惠宏襄,金明,王成济.紫杉醇诱导食管癌细胞的细胞周期阻断与细胞凋亡.中国药理学通报 1998;14:402-405
- Farinati F, Cardin R, Fiorentino M, D'errico A, Grigioni W, Cecchetto A, Naccarato R. Imbalance between cytoproliferation and apoptosis in hepatitis C virus related chronic liver disease. *J Viral Hepat* 2001; 8: 34-40

# 细菌性肝脓肿的 CT 诊断

邹利光,廖翠薇,陈 垚,戚跃勇,程相晨

邹利光,廖翠薇,陈 垚,戚跃勇,程相晨,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:邹利光,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. zoulg@mail.tmmu.com.cn  
电话:023-68755000-74678 传真:023-68755306  
收稿日期:2002-10-17 接受日期:2002-11-16

## 摘要

目的:研究细菌性肝脓肿的 CT 平扫和增强扫描表现,并同阿米巴性肝脓肿相鉴别。

方法:回顾分析了 52 例手术、穿刺抽吸或临床证实的细菌性肝脓肿病例的 CT 资料,52 例均行 CT 平扫,35 例行增强扫描;另收集 34 例阿米巴性肝脓肿的 CT 资料,对比分析细菌性肝脓肿的 CT 特征,并与阿米巴性肝脓肿相鉴别。

结果:细菌性肝脓肿因病变阶段不同而有不同的 CT 表现,典型 CT 表现为低密度囊样结构,脓肿壁较厚,增强扫描脓肿壁强化较明显而脓腔不强化。不典型者 CT 平扫表现为低密度肿块,增强扫描可见不均匀强化,下列征象有助于鉴别诊断:(1)肿块缩小征,(2)周围充血征,(3)“簇状征”,(4)“花瓣征”,(5)延时强化征。

结论:细菌性肝脓肿 CT 表现变异较大,增强扫描有一定特征性,本文归纳出不典型细菌性肝脓肿的 5 个征象,有助于同阿米巴性肝脓肿和肝脏其他占位病变的鉴别诊断。

邹利光,廖翠薇,陈 垚,戚跃勇,程相晨. 细菌性肝脓肿的 CT 诊断. 世界华人消化杂志 2003;11(3):353-355  
<http://www.wjnet.com/1009-3079/11/353.htm>

## 0 引言

肝脓肿是临幊上较常见的肝脏占位性病变,主要包括细菌性和阿米巴性肝脓肿两大类,细菌性肝脓肿较为多见,临床症状重,死亡率较高,CT 是发现和诊断肝脓肿的主要检查方法<sup>[1-5]</sup>。细菌性肝脓肿 CT 表现变异较大,典型者诊断容易,但部分病例表现不典型,同肝内其他占位病变鉴别有一定困难,常常误诊为肝癌等<sup>[4-6]</sup>。本文回顾分析了 52 例手术、穿刺抽吸或临床证实的细菌性肝脓肿病例 CT 资料,总结其 CT 表现特征,并收集 34 例阿米巴性肝脓肿的 CT 资料作对照,探讨了细菌性肝脓肿的 CT 鉴别诊断。

## 1 材料和方法

1.1 材料 细菌性肝脓肿患者 52 例,男 35 例,女 17 例,年龄 13-68 岁,平均 43 岁。主要临床表现为发

热(45 例)、畏寒(32 例)、右上腹及肝区疼痛(46 例)、黄疸(8 例)、肝大(16 例)及肝区叩痛(31 例)。52 例中经皮肝穿刺抽出脓液 21 例,手术证实 7 例,其余 24 例为临床表现及影像学检查支持细菌性肝脓肿诊断,且经抗感染治疗后复查 B 超和 / 或 CT 病灶明显好转或消失,临床症状也明显改善者。另收集手术、穿刺抽吸或临床证实的阿米巴性肝脓肿的 CT 资料 34 例,对比分析不同类型肝脓肿的 CT 表现。

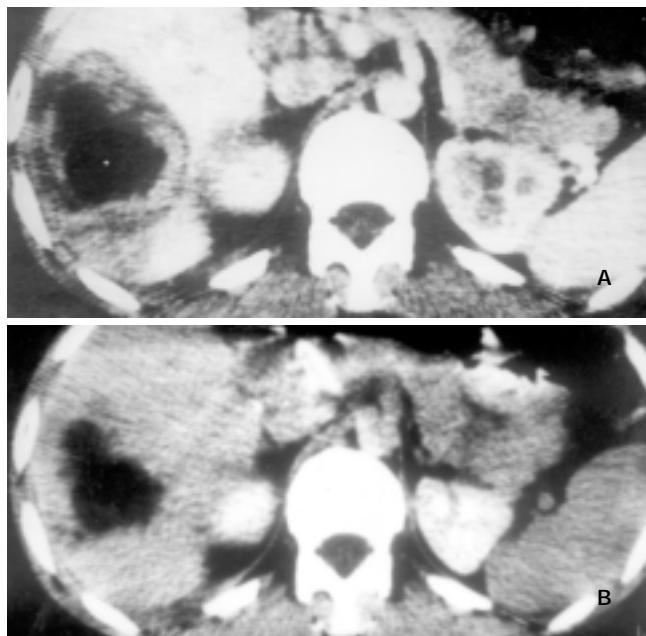
1.2 方法 CT 扫描机型为 Somaton DR3 型(西门子公司)、Sytec 3000 型(GE 公司)、以及 7000 TS 型螺旋 CT 机(岛津公司),扫描层厚及层距均为 10 mm,扫描范围自肝右叶顶部至肝下角。全部病例均作了 CT 平扫,52 例细菌性肝脓肿中 35 例行增强扫描,34 例阿米巴性肝脓肿中 21 例行增强扫描。增强所用造影剂为 Ultravist 300 或 Omnipaque 300,造影剂量用为 80-100 mL,手推或高压注射器团注推入。增强扫描病例中 21 例增强后早期(30 s)及晚期(60-90 s)动态 CT 扫描,15 例增强后延时扫描 3-7 min。CT 平扫分析了病变的数目、部位、大小、形态、密度、边缘、内部结构;增强扫描分析了病灶增强有无、增强程度、增强形式、增强出现及持续时间、增强后病灶大小数目及内部结构的变化以及周围肝组织的增强表现等。

## 2 结果

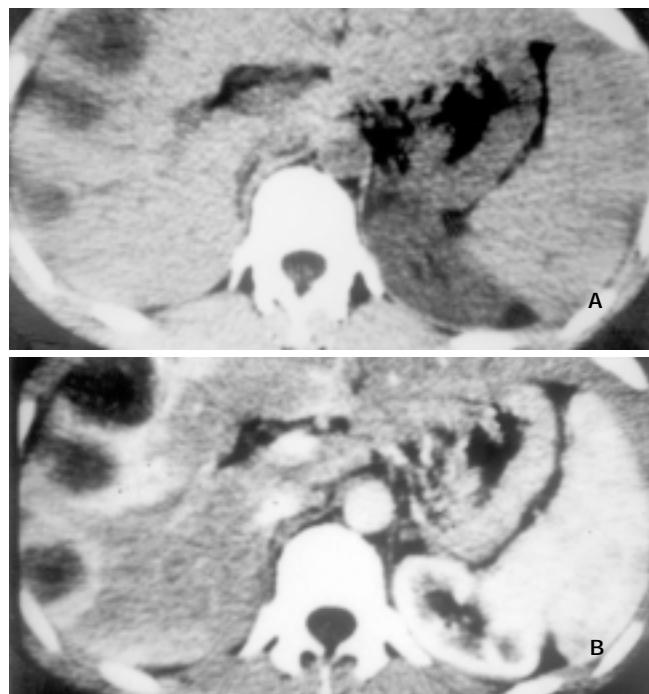
2.1 CT 诊断结果 细菌性肝脓肿 52 例中,44 例诊断正确,误诊 8 例,其中 7 例误诊为原发性肝癌,1 例误诊为肝血管瘤。阿米巴性肝脓肿 34 例中,33 例诊断正确,1 例误诊为肝囊肿。

2.2 细菌性肝脓肿的 CT 表现 (1) 细菌性肝脓肿的典型 CT 表现:具有典型 CT 表现的细菌性肝脓肿 29 例,占所有病例的 55.8%,脓肿呈单发者 13 例,多发者 16 例。CT 平扫呈圆形或类圆形囊样低密度区,其中心部分 CT 值高于水而低于正常肝组织,内部密度较均匀,CT 片上测量了脓腔内部密度有 19 例,CT 值为 8-27 Hu,平均 18.4 Hu;17 例病灶边缘较模糊,9 例病灶边缘部分清晰部分模糊,3 例病灶边缘较清晰;13 例脓肿周围出现低密度的环形带,即“环征”或“靶征”,脓肿壁呈双环结构,表明脓肿壁(内环)周围有水肿带(外环)存在,内环密度高于外环而低于肝组织,即“双靶征”,由此显示脓肿壁较厚,约 3-6 mm。增强扫描早期脓肿壁呈中等程度的环状强化,强化程度高于正常肝组织,脓肿壁周围低密度环和脓肿内部液化

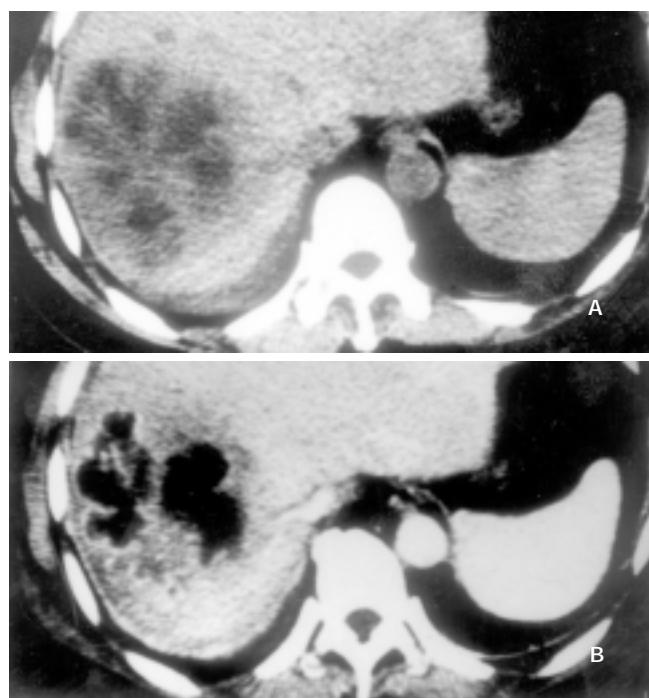
坏死区无强化，“双靶征”及脓腔结构更显清楚(图1A)。延时3-7 min扫描脓肿周围低密度水肿环强化为等密度，脓肿壁显示不清，脓腔内液化坏死区更显清晰(图1B)。4例脓肿内可见气体，气体量多少不等，3例为少量气体呈多个小气泡，1例气体较多形成气液面。(2)细菌性肝脓肿的不典型CT表现 不典型的细菌性肝脓肿23例，占所有病例的44.2%。CT平扫表现为肝内低密度肿块，其密度低于肝组织而明显高于液体，11例有CT值记载的病灶CT值为18-41 Hu，多数病例病灶密度不均匀，低密度区内散在斑片状更低密度区，病灶边界不清，邻近肝表面者可局部外凸。23例中增强扫描20例，其中12例行增强后动态及延时CT扫描。增强后病灶有轻-中度强化，病灶边界较平扫清晰，病灶内部密度更显不均匀。具有不典型CT表现的细菌性肝脓肿增强表现变化较大，本文归纳下列征象：(1)肿块缩小征4例，增强后肿块有轻-中度的强化，强化不均匀，肿块与正常肝组织密度接近、分界不清，肿块较增强前有缩小，其中2例多发性肝脓肿增强后病灶个数减少，部分小的病灶不能显示。(2)周围充血征3例(图2A、B)，增强后动态扫描的早期(30 s)，相当于动脉期，表现为脓肿周围肝组织明显强化，强化范围2例局限于病灶周围肝组织，1例为脓肿所在肝段强化，该强化消退快，60-90 s扫描(相当于门静脉期)周围肝组织强化已不明显。(3)“簇状征”7例，由于病灶内部结构不均匀，病灶内出现多个较小的环状强化且相互靠近堆积呈簇，或呈蜂窝状强化。(4)“花瓣征”4例(图3A、B)，病灶不均匀强化，病灶内分隔出现较明显的强化，几个相邻分隔组成花瓣状表现，中间夹杂增强不明显的低密度区。(5)延时强化征5例，脓肿强化持续时间较长，延时3-7 min扫描仍有强化，病灶较平扫有明显缩小，低密度液化坏死区显示清楚。



A 增强早期,脓肿壁较厚,周围见低密度环  
B 增强后延时5 min扫描,脓肿周围低密度带强化为等密度,脓腔显示清晰  
图1 肝右叶脓肿.



A CT平扫,肝右叶近包膜下3个类圆形低密度影  
B 增强早期(30 s),脓肿周围肝组织明显强化  
图2 肝右叶多发性脓肿.



A CT平扫,肝右叶低密度肿块,内部密度不均呈花瓣状  
B 增强后“花瓣征”更明显  
图3 肝右叶脓肿.

### 2.3 阿米巴性肝脓肿的CT表现

34例阿米巴性肝脓肿单发者25例，多发者9例，病灶位于肝右叶29例，左右两叶者5例。CT征象一般较典型，平扫表现为典型的囊样低密度区，边界较清楚，囊腔密度较均匀，仔细观察部分病例脓肿周边部分密度稍低于中央部分。脓肿壁较薄，34例中22例脓肿壁外围可见薄层低密度环，低密度环部分完整，部分断续，脓肿壁及其外围低密度环构成“双靶征”，由此可测量脓肿壁及外围低密度环

厚度，约1-3 mm，部分病例由于周围水肿轻微致脓肿壁难以分辨。增强扫描脓肿壁有轻-中度强化，脓腔无强化，低密度区更显清晰。细菌性肝脓肿所见不典型CT征象如周围充血征、簇状征、花瓣征等与阿米巴性肝脓肿均未见显示。

### 3 讨论

肝脓肿是临幊上较常见的肝脏占位性疾病，主要包括细菌性和阿米巴性肝脓肿两大类，有时也见于肝结核和霉菌感染。细菌性肝脓肿较为多见，临床症状重，死亡率高。肝脓肿的形成大致可分为化脓性炎症期、脓肿形成初期和脓肿形成期，化脓性炎症期病理改变为肝组织的局部炎症、充血、水肿，脓肿形成初期肝组织开始坏死，部分液化，脓肿形成期脓腔坏死液化彻底，脓肿壁形成，脓肿壁由纤维肉芽组织或炎症充血带形成，脓肿周围肝组织往往伴有充血水肿<sup>[1,5-7]</sup>。

细菌性肝脓肿典型的CT表现为肝内囊样低密度肿块，病灶边缘多数较模糊，脓肿周围往往出现低密度环形带(环征或靶征)，增强扫描脓肿壁呈不同程度的环状强化<sup>[3-8]</sup>。典型肝脓肿反映了脓肿形成期，脓腔液化坏死彻底，脓肿壁可为单环、双环或三环，单环代表了脓肿壁，其周围水肿不明显；双环的内环代表脓肿壁，外环代表周围水肿带；三环表明脓肿壁由两层构成，外层(中环)为纤维肉芽组织，强化最明显，内层(内环)由炎性组织构成，强化不及外层纤维肉芽组织。

细菌性肝脓肿不典型的CT表现变异较大，CT平扫表现为肝内低密度肿块，密度多不均匀，边界不清，CT平扫表现无特征性，难以与肝癌等肝内其他占位病变鉴别。CT增强扫描可显示病灶内部结构和血供特征，本文归纳出5个征象，有助于不典型肝脓肿的诊断。“肿块缩小征”表现为增强后病灶较平扫缩小，甚或不能显示，反映了化脓性炎症期，或脓肿不完全液化残存肝组织的炎性反应。“周围充血征”表现为脓肿周围肝组织于增强早期的一过性明显强化，反映了脓肿周围肝组织的炎性充血反应。Mathieu et al<sup>[8]</sup>报道38例肝脓肿中12例注入造影剂后15 s和30 s病灶周围肝组织一过性强化；Gabata et al<sup>[9]</sup>报道CT动态增强检查8例24个肝脓肿，16个脓肿显示增强早期脓肿周围肝组织一过性强化，认为是由于门管区炎症导致肝内门静脉狭窄，门静脉血流减少，肝动脉血流代偿性增加所致。“簇状征”和“花瓣征”有相似的病理基础，见于细菌性肝脓肿形成初期，“簇状征”为多个细小脓肿(<2 cm)聚集成团或融合<sup>[10]</sup>，“花瓣征”为多房脓肿，脓腔之间的房隔未坏死液化，残存的房隔有炎性反应。“延时强化征”表现为二个方面，一是脓肿强化持续时间较长，病灶较平扫缩小，反映了化脓性炎症期，或化脓性炎症破坏后的增生反应；二是脓肿壁周围低密度水肿环延时强化为等密度，脓肿壁周围低密度带反映了炎性水肿，肝组织仍存活而强化为等密度。“延时强化征”

的可能机制为肝脓肿炎性肉芽组织，造影剂缓慢向外渗透而廓清较慢所致。

具有典型CT征象的细菌性肝脓肿和阿米巴性肝脓肿均表现为圆形或类圆形囊样低密度区，可表现为“靶征”或“双靶征”，增强扫描早期脓肿壁呈中等度的环状强化，脓肿壁周围低密度环和脓肿内部液化坏死区无强化<sup>[11-14]</sup>。二种类型肝脓肿CT表现也有所不同，细菌性肝脓肿多为多发，脓肿壁及其周围的低密度水肿环较厚(3-6 mm)，脓腔密度相对较高而不均匀，周围边界较模糊。CT表现不典型的细菌性肝脓肿平扫表现为肝内低密度肿块，增强扫描CT征象变异较大<sup>[15-17]</sup>。我们归纳增强扫描五种征象：肿块缩小征、周围充血征、簇状征、花瓣征和延时强化征，有助于细菌性肝脓肿的诊断及其同阿米巴性肝脓肿的鉴别诊断。阿米巴性肝脓肿由于溶组织酶的作用，肝组织坏死液化迅速而完全，无细菌性肝脓肿的不典型CT征象。此外结合临床有助于进一步鉴别诊断，绝大多数细菌性肝脓肿病例具有发热、畏寒、肝区疼痛以及血白细胞计数升高等全身感染中毒症状，而半数阿米巴性肝脓肿患者有肠阿米巴病史<sup>[1,12]</sup>。细菌性肝脓肿和阿米巴性肝脓肿的鉴别诊断只是相对的，据报道有的肝脓肿病原体同时为细菌和阿米巴，细菌的存在可以助长溶组织阿米巴的致病作用。

### 4 参考文献

- 周康荣.腹部CT.第1版.上海:上海医科大学出版社, 1998:55-56
- 周建平.细菌性肝脓肿的诊治.世界华人消化杂志 2001;9:669-670
- 邹利光,李妍瑜,易习之.67例肝脓肿的CT图像分析.第三军医大学学报 1998;20:423-425
- 罗运权,王义,卢军华,陈汉,吴孟超.酷似肝脓肿的肝脏原发性恶性肿瘤2例.世界华人消化杂志 1999;7:776
- Petri A, Hohn J, Hodi Z, Wolfard A, Balogh A. Pyogenic liver abscess -20 years' experience. Comparison of results of treatment in two periods. *Langenbecks Arch Surg* 2002;387:27-31
- Fowler VGJ, Eloubeidi M. Image of the month pyogenic liver abscess. *Gastroenterology* 1998;115:524
- Ralls PW. Focal inflammatory disease of the liver. *Radiol Clin North Am* 1998;36:377-389
- Mathieu D, Vasile N, Faginie PL, Segui S, Grably D, Larde D. Dynamic CT features of hepatic abscesses. *Radiology* 1985;154: 749-752
- Gabata T, Kadoya M, Matsui O, Kobayashi T, Kawamori Y, Sanada J, Terayama N, Kobayashi S. Dynamic CT of hepatic abscesses: significance of transient segmental enhancement. *AJR* 2001;176:675-679
- Jeffrey RB Jr, Tolentino CS, Chang FC, Federle MP. CT of small pyogenic hepatic abscesses:the cluster sign. *AJR* 1988;151:487-489
- McDonald KL, Davani M. The rim sign in hepatic abscess: case report and review of the literature. *J Nucl Med* 1997;38:1282-1283
- Nattakom S, Serrato P, Bright T, Anaya A, Stubbers S, Vergheese A. Amoebic liver abscesses masquerading as pyemic abscesses. *Clin Infect Dis* 2001;33:E145-147
- Ralls PW. Inflammatory disease of the liver. *Clin Liver Dis* 2002; 6:203-225
- Dick A, Adam G, Tacke J, Prescher A, Southon TE, Gunther RW. Computed tomography of experimental liver abscesses using a new liposomal contrast agent. *Invest Radiol* 1996; 31:194-203
- Lublin M, Bartlett DL, Danforth DN, Kauffman H, Gallin JI, Malech HL, Shawker T, Choyke P, Kleiner DE, Schwartzentruber DJ, Chang R, DeCarlo ES, Holland SM. Hepatic abscess in patients with chronic granulomatous disease. *Ann Surg* 2002;235:383-391
- Lee TY, Wan YL, Tsai CC. Gas-containing liver abscess: radiological findings and clinical significance. *Abdom Imaging* 1994;19:47-52
- Philips RL. Computed tomography and ultrasound in the diagnosis and treatment of liver abscesses. *Australas Radiol* 1994;38:165-169

• 临床经验 •

# B超引导下加热注射碘油+无水乙醇+5-Fu治疗原发性肝癌16例

刘爱民,雷德安,范德庆,周兴祥,任在跃,郭武,黄和银,周琦,徐来喜

刘爱民,雷德安,范德庆,周兴祥,任在跃,郭武,黄和银,周琦,徐来喜,重庆市涪陵中心医院消化科 重庆市 408000  
项目负责人:刘爱民,408000,重庆市涪陵区高笋塘路2号,重庆市涪陵中心医院消化科 aiminliu53@hotmail.com  
电话:023-72220721 传真:023-72224460  
收稿日期:2002-03-14 接受日期:2002-06-14

## 摘要

目的:对于不能手术切除的中晚期巨块型肝癌患者,TACE + PEI治疗常是首选的治疗方案.但受医院条件、患者经济所限,开展TACE手术有一定的难度.受PEI治疗小肝癌的启发,我们采用经皮穿刺瘤体内加热注射碘油+无水乙醇+5-Fu治疗原发性肝癌,探讨其疗效.

方法:对16例经临床及病理证实为原发性肝细胞癌的患者行彩超引导下使用日本经皮酒精注射疗法针经皮穿刺瘤体内加热注射碘油+无水乙醇+5-Fu,并进行生存期及生存质量的随访.

结果:16例患者的1、2 a生存率分别为75%、50%,生存质量高.

结论:对于不能手术切除的原发性肝癌,采用经皮穿刺瘤体内加热注射碘油+无水乙醇+5-Fu的方法进行治疗,其疗效肯定,操作简单,安全方便,费用低,患者易接受,值得临床推广应用.

刘爱民,雷德安,范德庆,周兴祥,任在跃,郭武,黄和银,周琦,徐来喜. B超引导下加热注射碘油+无水乙醇+5-Fu治疗原发性肝癌16例. 世界华人消化杂志 2003;11(3):356-357

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/356.htm>

## 0 引言

对于不能手术切除的原发性肝癌,临幊上一般采用肝动脉栓塞化疔术(TACE)+经皮穿刺瘤内无水乙醇注射(PEI)联合治疗,疗效较好.但我院地处经济欠发达地区,多数患者经济状况较差,不能承受TACE的高额费用,因此TACE实施不理想.我们于1999-01起采用彩超引导下经皮穿刺瘤体内加热注射碘油+无水乙醇+5-Fu的方法治疗原发性肝癌,取得了一定的效果,现报告如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 16例患者,男15例,女1例,年龄30-65

岁,平均38.0岁,病程1-3 mo,平均1.5 mo. 临幊表现不典型,有10例患者系因其他疾病检查无意中发现为肝癌,另6例患者主要表现为纳差、消瘦、右上腹疼痛,无黄疸.体检:肝脾肿大13例,腹水3例,双下肢凹陷性水肿8例.影像学检查:患者均作彩色多普勒超声、CT检查,提示肿块位于右肝14例,左肝2例,直径在8.0-12.0 cm之间,平均12 cm,无子灶.瘤体均有明显、完整的包膜. AFP检查有8例增高,均>400 ug/L,最高者达3 000 ug/L. 合并肝炎后肝硬化者有6例,酒精性肝硬化3例. 肝功能分级:Child A级12例,B级4例,无C级. 所有病例均在彩色多普勒超声引导下经皮穿刺病理活检证实为肝细胞癌,其中高分化10例,中分化4例,低分化2例. 1.2方法 有腹水者常规消除腹水.采用意大利产AU4型彩色多普勒超声仪,穿刺探头用甲醛熏蒸消毒.穿刺工具:日本产八光牌超声波诱导下经皮酒精注射疗法针(hakko sonoguide percutaneous ethanol injection therapy needle),该针在针头平面每120°有一侧孔,共3个;注射混合液:380 ml/L碘油5ml+997ml/L无水乙醇10 mL+5-Fu10 mL,注射前加热至50°左右. B超引导下,穿刺针刺入瘤体底部注射混合液,然后边退边注射,使混合液沿3个方向充分沉积在瘤体内,采用30 mL注射器注射(对于不能耐受酒精者,我们在术中常规采用9 g/LNS250ml+凯西莱0.6 g静脉滴注,术后口服凯西莱片剂0.2 g tid,并预防性静滴止血药物),2次混合液注射/wk. 6次为一个疗程,每个患者至少接受2个疗程的治疗,最多者接受了4个疗程.治疗后复查B超和/或CT、AFP.

## 2 结果

16例患者中,8例术前增高的AFP值显著降低,其中6例降至正常范围.12例肿块较术前缩小,有10例缩小面积>50%,4例肿块面积变化不大.术后肝功能:Child A级16例,无B、C级. 随访2 a,其1 a、2 a生存率分别为75%、50%,生存质量高,部分患者可进行日常体力活动.

## 3 讨论

对于不能手术切除的中晚期巨块型肝癌患者,TACE + PEI治疗常是首选的治疗方案<sup>[1]</sup>.但由于医院条件、

患者经济所限，开展TACE手术有一定的难度。而PEI是近年来发展的又一疗法，作为治疗小肝癌的一种非手术疗法，1983年由日本千叶大学医学部第一内科杉浦信之 et al 报告用于 3 cm 的小肝癌。目前在日本被广泛应用，并认为是治疗各种原因不能手术切除小肝癌的有效疗法之一，其疗效可与手术相似。国内于1986年将PEI应用于临床，因其对缩小，控制或延缓肝癌生长具有明显的效果，具有操作简便，患者痛苦小，并发症少，费用低廉的特点，且一般不会影响患者对其他治疗方法的再选择，故其在临床的应用日益受到广泛的重视<sup>[2]</sup>。PEI疗法的主要作用机制，是利用无水乙醇对肿瘤组织的迅速脱水固定作用，使肿瘤内血管收缩，血管壁变性及内皮细胞破坏，局部血栓形成，致组织缺血、坏死；同时可使肿瘤细胞核和细胞质破坏，细胞轮廓消失，并引起中性白细胞、淋巴细胞浸润和成纤维细胞增生，继而发生纤维化。通过改变这些癌组织细胞的作用，达到最大程度灭活癌细胞的治疗目的。但是，越来越多的实验证实肝癌的血供是双重的，特别是肿瘤生长活跃的周边部分，门静脉供血的比重可能更大<sup>[3]</sup>。因此，从理论上讲，肝癌的介入治疗，应同时对肝动脉、门静脉进行栓塞，以彻底阻断肿瘤血供<sup>[4]</sup>。但是门静脉栓塞实施较困难，而肝动脉栓塞在一般医院，由于各种条件限制，开展此项手术也有一定的限制，并且肝动脉、门静脉同时阻断，可能导致

正常肝组织广泛坏死。基于TACE + PEI的原理，我们将碘油+无水乙醇+5-Fu加热后局部注射，治疗效果亦佳。因加热后，一方面能使混合液充分混匀易于注射，另一方面，加热后注射，其致热原理使组织温度升高，理论上讲，当温度升高到42-45℃时，部分酶失活，癌细胞对局部损伤敏感性增高，对化疗有增敏作用，当温度达46℃持续60 min时癌细胞发生不可逆损伤，增加至50-52℃则能明显缩短癌细胞损伤时间<sup>[5]</sup>。我们选择只加热至50℃，是为避免局部皮肤损伤。关于混合液注射量的问题，视患者具体情况而定，总之原则上尽量使混合液充分充填瘤体就可以了，本组病例中有一例患者单次注射量最大达到60 mL。疗程上，我们一般以6次混合液注射为一疗程。然后根据患者的情况及瘤体的变化决定是否继续进行治疗。

#### 4 参考文献

- 1 汤钊猷. 肝癌治疗的进展、问题与展望. 中华肝脏病杂志 1998;6: 129-130
- 2 江正辉,黄志强. 肝癌. 第1版. 重庆:重庆出版社, 1996:344-347
- 3 唐承富,李晓群,肖剑秋,胡静芳. 肝动脉栓塞联合经皮穿刺注射无水乙醇治疗巨块型肝癌. 中华肿瘤杂志 1999;21:72
- 4 房殿春,雷德安. 消化系肿瘤研究进展. 第1版. 成都:四川科学技术出版社, 2000:613-617
- 5 Goldberg SN,Gazelle SG,Mueller PR.Thermal ablation therapy for focal malignancy: a unified approach to underlying principles, techniques and diagnostic imaging guidance. AJR 2000;174:323-331

## 世界华人消化杂志和WJG获得商标注册

**本刊讯** 世界华人消化杂志和World Journal of Gastroenterology 经中华人民共和国国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类)，获得商标注册。

世界华人消化杂志<sup>®</sup>注册有效期限自公元2002-11-14至2012-11-13止.商标注册证第2001071号。

World Journal of Gastroenterology<sup>®</sup>注册有效期限自2002-11-14至2012-11-13止.商标注册证第2001158号。

# 肝硬化患者血中一氧化氮及降钙素基因相关肽改变的初步研究

王颖,周卓,王学清

王颖,周卓,王学清,中国医科大学第二临床学院消化内科  
辽宁省沈阳市 110004  
项目负责人:王颖,110004,辽宁省沈阳市三好街36号,中国医科大学第二临床学院消化内科, wangyingyx@163.com  
电话:024-83956986  
收稿日期:2002-10-18 接受日期:2002-11-18

## 摘要

目的:探讨肝硬化患者血清一氧化氮(NO)和血浆降钙素基因相关肽(CGRP)水平的变化及其相互关系。

方法:采用比色法还原法和放免法分别检测40例肝硬化和15例正常人血清NO和血浆CGRP水平。

结果:肝硬化组血清 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 数值明显高于正常组( $P < 0.05$ )，肝硬化组血浆CGRP数值明显高于正常组( $P < 0.01$ )。肝硬化组血清 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 和血浆CGRP呈显著正相关( $r = 0.453$ ,  $P < 0.01$ )。

结论:肝硬化时, 血中一氧化氮(NO)和降钙素基因相关肽(CGRP)水平均升高, 提示二者可能是肝硬化门脉高压血液循环力学异常的重要因素。

王颖,周卓,王学清. 肝硬化患者血中一氧化氮及降钙素基因相关肽改变的初步研究. 世界华人消化杂志 2003;11(3):358-359

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/358.htm>

## 0 引言

内源性一氧化氮(NO)是新型的细胞内信使和神经递质, 亦是强烈的血管舒张因子, 他是左旋精氨酸(L-Arg)通过NO合酶(NOS)的催化而成, 通过第二信使(cGMP)发挥舒张血管作用。NO半衰期甚短, 仅数秒钟, 迅速代谢转变为 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 失活,  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 浓度反映NO水平。降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是广泛分布于神经系统和心血管组织的调节肽, 是迄今所知体内最强的扩血管物质。肝硬化门脉高压患者存在高动力血液循环, 目前认为这与血管活性物质异常有关, 即体内扩血管物质增多及血管对内源性缩血管物质敏感性下降<sup>[1]</sup>。NO和CGRP作为其中重要的扩血管物质越来越受到重视, 我们试图对此做一些初步研究。

## 1 材料和方法

1.1 材料 40例肝硬化患者, 男25例, 女15例, 年

龄为32-72岁, 平均45岁。对照组为健康志愿者15名, 男10名, 女5名, 年龄27-40岁, 平均35岁。二组均无原发性心、脑、肺、肾疾病及高血压病。

1.2 方法 受检者禁食12 h, 早晨6-8时, 于平卧位自肘静脉采血4 mL, 2 mL装入含有10% EDTANa<sub>2</sub>和抑肽酶的塑料试管中, 2 mL装入无抗凝剂试管中, 混匀, 离心后, 分别分离血浆和血清, -30℃以下保存待测, 血浆用于CGRP, 血清用于NO、CGRP和NO分析试剂盒由北京东亚免疫技术研究所提供, 操作方法参照说明书完成。CGRP放免测定采用北京核仪器厂生产的<sup>125</sup>I-FT163自动放免测量仪。血清NO水平用 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 水平来代表, 测定采用比色法还原法, 设备为上海分析仪器厂生产的751G型紫外分光光度仪。

统计学处理 所有数据资料均数以 $\bar{x} \pm s$ 表示。二样本均数比较采用t检验。采用直线相关分析探讨两指标之间有无关系。

## 2 结果

2.1 血浆CGRP检测结果 肝硬化组血浆CGRP的浓度为 $81.75 \pm 41.02 \text{ pg/mL}$ , 对照组为 $41.30 \pm 27.89 \text{ pg/mL}$ , 肝硬化组显著高于对照组( $P < 0.01$ )。

2.2 血清 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 检测结果 肝硬化组血清 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 浓度为 $29.92 \pm 14.03 \mu\text{mol/L}$ , 对照组为 $16.16 \pm 12.53 \mu\text{mol/L}$ , 肝硬化组显著高于对照组( $P < 0.05$ )。

2.3  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 和CGRP的关系 肝硬化患者血清 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 和血浆CGRP呈显著正相关( $r = 0.453$ ,  $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

肝硬化门脉高压患者几乎都伴有高心输出量, 高动脉血流灌注, 外周和内脏血管扩张, 周围血管阻力下降等血液循环改变。这种异常主要源于周围动脉血管扩张, 而后者有赖于体内扩血管物质增多及血管对内源性缩血管物质敏感性下降。这些血管活性物质可能介导或参与了肝硬化门脉高压血液循环异常<sup>[1]</sup>。作为重要的扩血管活性物质NO和CGRP, 其在当中所起的作用, 国内报道不多, 我们试图做一些初步研究。

肝硬化门脉高压患者一般都有内毒素血症, 这通常与肠道菌群失调、肠道淤血水肿、门体分流、肝脏Kupffer细胞活性减弱及全身免疫力下降等有关。内毒素和细胞因子激活诱导剂-一氧化氮合成酶(iNOS)催化

L-精氨酸生成大量NO，使肝硬化患者血中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 水平升高。肝硬化患者血中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 水平升高，且与内毒素水平呈正相关<sup>[1-4]</sup>。作为扩血管物质，NO释放增多引起全身血管扩张，导致低血压，周围血管阻力下降，心率增快，有效血容量不足等高排低阻的高动力学改变。同时其还引起外周血管对血管收缩因子的低反应性<sup>[1,5,6]</sup>。

CGRP是一种舒血管活性肽，对外周血管有强烈的扩张作用。因此，在肝硬化中，CGRP的升高可能造成循环高动力状况，使内脏血流量增多，门静脉压力上升<sup>[7-9]</sup>。CGRP的升高还可以引起外周血管扩张和血容量分布异常，最终引起钠水潴留，产生腹水<sup>[10,11]</sup>。

本文实验结果：肝硬化患者血清 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 水平明显高于对照组( $P < 0.05$ )，血浆CGRP水平明显高于对照组( $P < 0.01$ )。这与国内外的实验研究结果相符<sup>[2,7,8,11-14]</sup>，表明在肝硬化门脉高压过程中，可能由于NO和CGRP水平的升高，导致外周血管阻力下降，血管扩张，内脏血流增多，门脉压力升高，从而形成高动力血液循环状态。

NO和CGRP二者有无关系，目前所知甚少，文章少见。有材料显示<sup>[15]</sup>内毒素休克大鼠血浆CGRP含量显著增高，作用机制中部分是通过一氧化氮引起细胞内cGMP升高而介导的。作为细胞内信使和神经递质，NO是否介导了肝硬化时血浆CGRP的升高、扩张周围血管尚不清楚。本文结果显示二者呈正相关，提示二者关系密切。

总之，NO和CGRP是肝硬化门脉高压血液动力学异常中的二个重要血管活性物质，其是始动因素还是最

终结果，二者关系如何，还有待于进一步探讨和研究。

#### 4 参考文献

- 1 黄颖秋.血管活性物质与肝硬化血液动力学改变.国外医学内科分册 1997;24:55-58
- 2 张丕利,梁扩寰,尹朝礼,唐望先,王天才,田德安,杜荔菁.肝硬化患者血中一氧化氮水平及其产生机制研究.中华内科杂志 1997;36:25-27
- 3 王宜萍.内源性一氧化氮与肝硬化的研究进展.国外医学.生理、病理科学与临床分册 2000;20:114-116
- 4 张海婴,吴志勇,陈治平.一氧化氮合酶与门脉高压高动力循环.中华实验外科杂志 1999;16:284-285
- 5 Martin PY,Gines P,Schrier RW. Nitric oxide as a mediator hemodynamic abnormalities sodium and water retention in cirrhosis. *N Engl J Med* 1998;339:533-541
- 6 张喆颖,任锡玲.内皮素一氧化氮与肝硬变.新消化病学杂志 1996;4:40-41
- 7 Bendtsen F,schifter S, Henriksen JH. Increased circulating calcitonin gene-related peptide(CGRP) in cirrhosis. *J Hepatol* 1991;12:118-123
- 8 Hori N,Okanoue T,Sawa Y,Kashima K. Role of calcitonin gene-related peptide in the vascular system on the development of the hyperdynamic circulation in conscious cirrhotic rats. *J Hepatol* 1997;26:1111-1119
- 9 Moller-Kaufmann C,Sumanovski LT,Sieber CC. Neurally-mediated vasodilatation in normal and portal hypertensive rats:role of nitric oxide and calcitonin gene-related peptide. *J Hepatol* 1998;28:1031-1036
- 10 Moller S,Bendtsen F,Schifter S,Henriksen JH. Relation of calcitonin gene-related peptide to systemic vasodilatation and central hypovolemia in cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:928-933
- 11 占强,郭继忠,康健英,邵力正.肝硬化患者血浆降钙素基因相关肽及内皮素-1水平的变化.中华内科杂志 1999;38:91-93
- 12 黄勇辉,周力,张晓蕾,芦源,陈晓琴.肝硬化患者血浆一氧化氮及内皮素改变的初步研究.中华内科杂志 1996;35:479
- 13 张晓岚,姜慧卿,赵瑞刚.肝硬化患者血浆降钙素基因相关肽水平的检测及其临床意义.新医学 2001;32:203-204
- 14 顾国姝,杨栓平,邱夏地,陶立忠,李华.肝硬化患者血中降钙素基因相关肽水平观察.山西医科大学学报 1999;30:4-5
- 15 王宪,吴中欣,唐跃明,韩启得.一氧化氮和前列腺素在内毒素引起降钙素基因相关肽释放中的作用.生理学报 1996;48:217-221

# 内镜微波及药物治疗疣状胃炎 121 例

李 艳,金永兰,朱晓玲

李艳,金永兰,朱晓玲,辽宁省人民医院消化内科 辽宁省沈阳市 110016  
 项目负责人:朱晓玲,110016,辽宁省沈阳市沈河区文艺路33-10,辽宁省人民医院消化内科。  
 电话:024-24147900-8249  
 收稿日期:2002-10-08 接受日期:2002-10-18

## 摘要

目的:于内镜下微波治疗联合口服药物治疗疣状胃炎,观察疗效并初步探讨治疗机制。

方法:内镜下寻找病灶,根据病灶选择合适电极头。以微波功率40-50W,间歇治疗9-60s,将胃黏膜疣状隆起凝固。术后给予饮食管理和服用H2受体拮抗剂,幽门螺杆菌(Hp)阳性者口服药物枸橼酸铋钾,替硝唑,克拉霉素。1mo后复查胃镜。

结果:121例疣状胃炎中,治愈115例,好转6例。有效率达100%,治愈率达95%。Hp转阴者97例(92.4%)。

结论:内镜微波设备简单,价格低廉,操作方便且安全,疗效也较满意,联合药物治疗,效果更加巩固,值得医务界重视和推广。

李艳,金永兰,朱晓玲. 内镜微波及药物治疗疣状胃炎121例. 世界华人消化杂志 2003;11(3):360-361

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/360.htm>

## 0 引言

已证明内镜微波治疗一些消化道疾病是一种安全有效的方法,本文将近年应用内镜微波及药物治疗完全型疣状胃炎121例的疗效报告,并初步探讨微波治疗的机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 我院1998-01-01/2002-05-31 121例完全型疣状胃炎。诊断标准:胃镜检查见胃黏膜疣状隆起高度1-3mm,直径2-8mm,中央呈脐样凹陷,凹陷处有糜烂,充血明显。病变局限在胃窦部100例,病变同时波及胃体部21例,均为多发。在疣状隆起处黏膜活检并查1min尿素酶试验幽门螺杆菌(Hp)阳性者105例(86.8%)。55例伴有十二指肠球部溃疡。临上有不同程度上消化道症状。在121例完全型疣状胃炎中,男52例,女69例,年龄22-81,平均年龄47.8±2.3岁。

1.2 方法 采用GIEQ-20、EG-2901、微波多功能治疗仪SW-3。按常规放置内镜后寻找病灶,发现病变即摄

片或录像,然后取2-4块活检作病理检查。根据病灶类型选择合适电极头,从内镜钳道孔插入至病变部。隆起较高者用针状电极刺入,以微波功率40-50W,间歇治疗15-60s。对隆起较低者用球状电极紧贴病变表面,以微波功率30-50W,间歇治疗9-60s,将胃黏膜疣状隆起凝固。为防止治疗不彻底和再发,强调将疣状胃炎病变周边之正常胃黏膜3mm也予以凝固。术后处置包括6h后进半流食,1d后进软食,及口服高舒达。Hp阳性者口服枸橼酸铋钾,替硝唑,克拉霉素,共7d。1mo后复查胃镜。

## 2 结果

121例疣状胃炎中110例微波凝固治疗1次,11例微波凝固治疗2次。治愈115例,临床症状消失,复查胃镜见疣状隆起平伏,胃黏膜炎症明显改善。好转6例,疣状隆起基本平伏,胃黏膜炎症改善,只有轻度上腹部不适。有效率达100%,治愈率达95%。105例Hp阳性者有97例转阴(92.4%)。术中、术后均未见并发症。不良反应有16例上腹部胀痛、11例上腹不适和5例嗳气。

## 3 讨论

疣状胃炎是一种特殊类型的胃炎,可单独发生或并发于其他胃病,在形态上与淋巴细胞性胃炎相类似,在病理上却是二进制种不同的实体<sup>[1]</sup>。按其形态特征和病程演变分为二型:(1)完全型疣状胃炎,病变隆起较高,中央脐凹较小而深,常持续存在,不易消失。(2)不完全型疣状胃炎,形态与上述相反,病变隆起较低,中央脐凹较大、较浅,病变可在数日或数月内消失。本病病因及发病机制不明,对完全性疣状胃炎迄今尚无有效药物治疗。有人认为,疣状胃炎为一种高危癌前病变,炎症的持续及上皮组织增生,最终有可能发展成癌<sup>[2]</sup>。我们121例治疗成功的机制:(1)微波作为一种电磁波,具有波长短,频率高的特性。微波频率介于高频电与激光之间,高频电凝及激光光凝是外部加热,微波是一种以生物体组织本身作为热源的内部加热,能使递质或物体的阴阳离子的极性分子发生振动而产生热能,内镜微波治疗就是将微波热能引入体内以其很小范围的高温将增生性病变凝固除去。(2)微波烧灼破坏了局部Hp生存环境,更有利于药物清除Hp<sup>[3]</sup>。(3)有可能微波凝固作用诱导自身免疫反应起抗复发作用,尚有待探讨。(4)微波凝固疗法是通过组织自体诱

电加热而达到凝固之目的。当微波温度达42-44℃时足以使组织细胞水分蒸发而脱落，蛋白凝固变性，细胞萎缩脱落甚至炭化。微波辐射加热的穿透力虽较强(1.7 cm)，但他可选择性对病变加热，对正常组织损伤轻微或不损伤。这一过程较慢，比高频电、激光治疗危险性明显减少，操作简便易行。(5)在微波热效应作用下，胃黏膜小动脉和毛细血管扩张，血液循环增加，以改善胃黏膜血液循环，保障血液灌流，增加了胃十二指肠黏膜氧和营养的供应，加快组织修复，有利于炎症消退<sup>[4,5]</sup>。内镜微波设备简单，价格低廉，操作方便且安全，疗效也较满意，为内镜治疗增添新篇章，再联合应用三联抗Hp药物，清除Hp感染，消除了引起炎症和病灶的重要因素，使治疗效果更加巩固<sup>[6]</sup>。我们认为总

之，微波加 Hp 药物治疗完全型疣状胃炎疗效满意，值得医务界重视和推广。

#### 4 参考文献

- 1 Dixon MF,Wyatt JI,Burke DA,Rathbone BJ.Lymphocytic gastritis-relationship to campylobacter pylori infection.*J Pathol* 1988; 154:125-132
- 2 张炳新,王天连,李元平. 内镜微波治疗疣状胃炎和难治性胃溃疡64例. 临床荟萃 1997;12:1031
- 3 王昌泉,王明松. 微波配合药物治疗 12 例疣状胃炎. 交通医学 2000; 14:280
- 4 蔡华. 内镜微波治疗术. 第 1 版. 安徽:安徽科学技术出版社 , 1992: 24-48
- 5 许幼如,于吟梅,韦庭炫,王秀玲,张黎红,潘晓云,陆汉明. 内镜微波治疗完全性疣状胃炎和难治性胃溃疡. 中华消化内镜杂志 1997;14:184
- 6 何鲁生,陈宗永,卢蕊芬,汪清. 联合内镜微波和幽门螺杆菌治疗完全型疣状胃炎. 中国内镜杂志 2000;6:61

## 世界华人消化杂志获得 2001 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。通过对全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首次评出了中国百种杰出学术期刊。世界华人消化杂志荣获 2001 年度百种中国杰出学术期刊称号

# 非静脉曲张上消化道出血的射频治疗31例

方维丽,王邦茂,杨玉龙,吕宗舜,刘文天,张庆瑜

方维丽,王邦茂,杨玉龙,吕宗舜,刘文天,张庆瑜,天津医科大学总医院消化科 天津市 300052  
项目负责人:王邦茂,300052,天津市和平区鞍山道504号,天津医科大学总医院 gi-tmu@china.com  
电话:022-27816110  
收稿日期:2002-10-08 接受日期:2002-10-21

## 摘要

目的:射频技术辅助治疗上消化道出血,临床报道少见,本研究目的在于探讨射频治疗非静脉曲张上消化道出血的疗效。

方法:对31例因消化道肿瘤、消化性溃疡、血管畸形及经内镜黏膜下肿物切除引起的急性上消化道出血患者,经内镜应用国产射频治疗仪对出血处黏膜表面给予射频治疗,治疗后内镜下观察5 min,7 d后复查胃镜,无再出血为有效,24 h内再出血为无效。

结果:31例上消化道出血患者治疗后止血有效率为93.55%(29/31),2例24 h内发生再出血,无1例出现严重并发症。

结论:射频治疗非静脉曲张上消化道出血的方法具有止血迅速、安全性高的特点。射频技术目前已广泛应用于消化道息肉、上消化道肿瘤、肝癌等的治疗,而作为非静脉曲张的上消化道出血的辅助治疗手段,却少有报道。本院自1999-10/2001-07,采用射频治疗仪治疗各种类型上消化道出血患者31例,取得了满意的治疗效果,现报告如下:

方维丽,王邦茂,杨玉龙,吕宗舜,刘文天,张庆瑜. 非静脉曲张上消化道出血的射频治疗31例. 世界华人消化杂志 2003;11(3):362-363

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/362.htm>

## 1 材料和方法

1.1 材料 上消化道出血患者31例,年龄24-75岁。出血原因:十二指肠球溃疡11例,胃溃疡5例,Dieulafoy病3例,食管息肉2例,食管癌3例,胃癌2例,贲门癌1例,食管平滑肌瘤行黏膜下切除术中出血3例,胃异位胰腺切除术中出血1例。临床表现:呕血8例,呕血伴柏油便15例,单纯柏油便4例,术中出血4例。出血量:治疗前出血量>1000 mL者12例,400-1000 mL者11例,<400 mL者8例。内镜检查及治疗距发病时间在24 h之内者21例,24-48 h者6例,超过48 h者4例。出血方式按Forrest分级:a 6例,b 18例,a 3例,b 4例。

1.2 方法 内镜为Fujinon200电子胃镜,射频治疗仪为四川绵阳立德电子技术有限公司LDRF-50A型射频治疗仪。在内镜检查前均口服利多卡因胶浆10 mL(含祛泡

剂)。患者胃内积血较多者,采用生理盐水反复冲洗或0.08 g/L去甲肾上腺素冰盐水局部喷洒,充分暴露出血部位。将射频电极头直接置于出血部位黏膜表面,启动脚踏开关,功率30-35 W,每次放电时间2-6 s,至出血部位黏膜表面发白或呈棕黄色,观察5 min确认病变局部无渗血,拔出内镜。治疗后禁食水24 h,继续补液、抑酸治疗,密切观察有无活动性出血。治疗后随访7 d,7 d内无再出血为有效,发生再出血为无效。

## 2 结果

31例患者治疗后无再出血29例,2例24 h内再出血,止血有效率93.55%(29/31)。发生再出血2例中1例为胃异位胰腺行黏膜下切除术,术中切口持续滴血,应用射频治疗后仍有渗血,采用10 g/L乙氧硬化醇局部硬化治疗后出血停止。另1例为食管下段息肉样黏膜隆起出血,出血方式为Ia,射频止血后观察5 min无再出血,但治疗后22 h再次发生呕血,经急诊胃镜行高频电切除息肉后随访7 d未再出血。所有患者在接受射频治疗时无明显不适感,没有出现因射频治疗引起胃肠穿孔及大出血。

## 3 讨论

目前对于非静脉曲张的上消化道出血,在内镜下可应用微波、电凝、激光等对出血病变进行治疗,达到内镜下止血的目的,国内外报道止血率均较高,但在治疗时又各有其优缺点。应用电凝止血时,电极头容易使组织炭化,并与炭化组织发生粘连,撕拉后可发生再出血,还易产生电火花,在治疗时要经常向腔内注水以避免粘连<sup>[1]</sup>。在激光治疗时,组织也易于炭化,同时产生大量烟雾及刺激性气味,治疗时需不断吸除烟雾;另外,激光是以光导纤维作为导出递质,易折断、漏光而烧伤周围黏膜<sup>[2]</sup>。微波近年来也大量应用于消化道疾病的治疗,但微波在不同递质界面会发生折射、反射,对治疗界面的损伤表浅、不均匀,对操作者和患者有不良辐射<sup>[3]</sup>。

与上述方法相比,射频是一种高频电流,频率范围200-750 kHz,以正弦波释放热量,可使细胞内外水分蒸发、干燥、固缩,使蛋白质变性,造成组织凝固性坏死而迅速达到治疗目的。射频的生物效应为单纯的热效应,电极头处温度最高,射频造成的组织损伤程度与输出功率和时间成正相关<sup>[4]</sup>。在治疗出血时具有以

下优点：(1)止血迅速，电极头不易使组织炭化，不发生粘着，处置快捷。(2)安全性高，蛋白质变性后电极头处热量迅速衰减，可避免穿孔。(3)术中不产生电火花、烟雾、刺激性气味，对肌肉和神经无刺激和兴奋作用，在放电时患者无明显不适。(4)导线在工作时不发热，不会损伤内镜。

治疗体会：(1)在急性出血时，由于出血灶周围积血较多，充分暴露出血部位是治疗成功的关键。我们采用胃镜检查前口服含有祛泡剂的利多卡因胶浆，可减少胃内黏液泡沫的干扰，有利于发现微小而反复出血的病灶；积血多时反复应用冰盐水或0.08 g/L肾上腺素冰盐水冲洗，暴露出出血病灶。(2)选择合适的功率与放电时间。我们体会到在功率为30-35 W时，将电极头置于病灶黏膜表面，单点放电时间1-2 s就可出现肉眼可见的黏膜发白。从文献报道的治疗深度与输出功率和放电时间关系的曲线中可以看出：功率为20-40 W、时间5-10 s时

治疗深度可达到1-2.5 mm<sup>[3]</sup>。(3)对于较大病变，采用电极头平推手法，范围应覆盖整个出血病灶。对于出血方式为Ia、Ib者，见到黏膜发白后再延长放电时间2 s左右至表面出现棕黄色炭化组织，炭化后的组织不易脱落，有利于立即止血并减少治疗后再出血。(4)射频止血治疗后应辅助应用抑酸、补液治疗，有利于病灶愈合。(5)对于凹陷病灶出血，由于电极头不易接触到出血处黏膜，治疗时可辅助应用硬化剂注射，以提高止血疗效。

#### 4 参考文献

- 1 黄象谦.胃肠道疾病治疗学.第1版.天津：天津科学技术出版社，1996:77-82
- 2 刘毅然.溃疡病出血内镜治疗体会.中华消化内镜杂志 2001;18:48-49
- 3 廖宁逊,李增列.应用射频技术治疗消化道疾病.引进国外技术与设备 1999;5:42-44
- 4 徐辉,蒋明德,楚人俊.消化道射频电应用的实验研究.成都军区总医院院刊 1997;16:16-18

## WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台

World Journal of Gastroenterology<sup>®</sup> (ISSN 1007-9327 CN 14-1219/R) 2003年由双月刊改为月刊，加快刊出周期，展示我国在国际上的食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、H<sub>P</sub>等方面基础和临床研究成果。

WJG 1998年被美国科学引文索引(SCI-E)收录。SCI-E收录文献的作者、题目、源期刊、摘要、关键词等以外，还收录论文的参考文献，从而把一篇论文和其他论文之间有意义的联系勾画出来，也就是把发表论文的两位作者和两位作者群体之间的学术联系显示出来等特点。作为一种比较客观和定量的评价方式之一，已愈来愈受到科学界的重视。当WJG出版20天后，国际上的胃肠病学和肝病学专家即可在ISI Web of SCIENCE(<http://www.isinet.com/isi/journals/index.html>)上看到论文的摘要、参考文献、被引用的次数、关键词、单位名称、通讯地址等信息。

WJG 1998年被美国《医学索引》(Index Medicus / MEDLINE)收录。WJG电子版摘要及全文在印刷版出版前15天，国际上的胃肠病学和肝病学专家即可在PubMed(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>)上阅读到论文的摘要及全文，包括彩色、黑白、线条图照片。世界胃肠病学杂志社将WJG和世界华人消化杂志出版的过刊和现刊全部放在[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)上供国际和国内消化病学者免费使用。WJG是惟一全面反映我国消化学专家研究成果的平台之一，让世界更多的学者在PubMed或[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)上免费看到来自我国胃肠病学和肝病学专家撰写的具有中国特色的创新原始论文。

总之，WJG提供了一个与世界胃肠病学和肝病学专家进行有效的学术交流平台，促进消化病学研究成果的快速发展。

• 临床经验 •

# 酸化电解水消毒法对内镜及附件消毒效果的评价

钟 捷,孙 波,许 斌,季育华,江石湖

钟捷,孙波,许斌,江石湖,上海第二医科大学附属瑞金医院消化科  
上海市 200025  
季育华,上海第二医科大学附属瑞金医院临床检验科 上海市 200025  
项目负责人:钟捷,200025,上海市瑞金二路197号,上海第二医科大学附属瑞金医院消化科 sunborjxh@yahoo.com.cn  
电话:021-64370045-665152  
收稿日期:2002-04-29 接受日期:2002-07-11

## 摘要

目的:观察评价酸化水自动内镜消毒法对高浓度致病菌污染的内镜和附件的消毒效果。

方法:将高浓度选择性致病菌污染内镜镜头部、工作钳道和附件,定量测定消毒前后测试部位和附件的病菌数量,病菌种类包括:耐甲氧西林的金葡菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、肠球菌、大肠埃希菌、伤寒沙门菌、奇异变异杆菌、结核分枝杆菌和幽门螺杆菌、白色念珠菌、肠道柯萨奇病毒和乙型肝炎病毒表面抗原。

结果:经7 min 酸化水自动消毒仪消毒后镜头、钳道区未见致病菌生长;经2 min 流动水清洗和7 min 自动消毒仪消毒后附件污染处未见致病菌生长。

结论:酸化水自动消毒仪消毒法是一种高效、安全和简便的内镜和附件消毒方法。

钟捷,孙波,许斌,季育华,江石湖. 酸化电解水消毒法对内镜及附件消毒效果的评价. 世界华人消化杂志 2003;11(3):364-366  
<http://www.wjnet.com/1009-3079/11/364.htm>

## 0 引言

消化内镜因在操作过程中与患者的组织、体液等密切接触而遭到污染,高效、安全的消毒是确保操作质量,防止病原菌播散和控制医源性交叉感染的关键途径。目前国内的内镜消毒方法以化学浸泡法为主,虽然简单实用,但也存在浸泡时间不足,消毒剂对工作人员健康有一定影响和排放污染等问题<sup>[1]</sup>。本文就酸化电解水消毒法对内镜和附件的消毒效果作有关研究。

## 1 材料和方法

1.1 酸化电解水的消毒原理 将5 g 氯化钠加入10 L 普通自来水中,制成0.05% 氯化钠溶液,流经含氟树脂系的阳离子交换膜的电解槽时通过铂钛合金电极生成酸性电解水,在阳极处的电解水pH值在2.5 ± 0.20以下,氧化还原电位达(1120 ± 70) mV以上,生成的杀菌物质包括Cl<sub>2</sub>, HOCl 和 HCl 等,其中游离剩余氯

浓度为(5 ± 2)ppm。目前已知适合细菌、病毒和真菌的生存pH值在4-9,氧化还原电位在-400-+900之间,在此范围以外,病原菌很难生存与繁殖。酸性电解水的特定pH值和氧化还原电位破坏了病原菌的正常生存环境、改变了菌胞膜的电位差,使其通透性增加代谢酶活力破坏而死亡。电解产生的游离剩余氯和次氯化钠增强了酸化水的杀菌作用<sup>[2]</sup>。

1.2 测试病菌种类的选择 据消化内镜可能的污染菌种,本课题选择的细菌包括:耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、肠球菌、大肠埃希菌、伤寒沙门菌、奇异变异杆菌、结核分枝杆菌和幽门螺杆菌;霉菌为:白色念珠菌;病毒科为:肠道柯萨奇病毒和乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)。

1.3 染用菌液的制备 选用从临床标本中分离并经法国生物酶里埃公司生产ATB半自动细菌鉴定仪鉴定的各种选择菌种,经血琼脂平板增菌培养后,所用菌的浓度在标准比浊管的对照下将其调整到0.5麦氏浓度(约10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> CFU/ml)。将罗氏培养管整斜面上含蜡质成分的结核分枝杆菌菌落洗脱入10.0 ml无菌生理盐水中备用;柯萨奇病毒B组II(Cox B II)型原液以1:100稀释后接种致细胞病变达>8%时收取,病毒效价滴定为10<sup>-7</sup>TCID<sub>50</sub>备用;乙肝表面抗原污染液为临床检验中HBsAg检测为强阳性的混合血清(约10.0 ml)。

1.4 内镜及附件的污染处理 本实验选择内镜钳道镜头部为观察部位,内镜为日本富士能公司制造的电子胃镜、全结肠镜和十二指肠镜。镜头部污染操作:将内镜前端约15 cm 直接浸泡于各种菌液中30 s,然后用20 ml无菌生理盐水浸洗30 s,以次作为基础污染值;镜头用无菌纱布擦净后再次以原菌液污染30 s后直接放置于自动消毒仪中消毒。消毒结束后用20 ml无菌生理盐水液浸洗,作为消毒后效果检测液。钳道污染处理是将菌液直接由钳道孔中注入,并用10 ml无菌盐水冲洗,收留冲洗液作为基础污染值,再次污染后直接消毒。消毒完毕后再次收留冲洗液作为效果观察液。附件污染过程同镜头部操作,选用的附件种类包括:普通活检钳、息肉圈套摘除器和回收网篮、胰胆系造影导管和乳头肌切开刀。

1.5 检测样本的处理 各种检测样本收取后,用肉汤营养液作10倍比稀释(10<sup>-1</sup>-10<sup>-7</sup>),每块平皿加100 ml以营养琼脂或沙堡氏琼脂等作倾注处理,每一稀释度倾注3块,37℃孵育48 h后观察,计数细菌浓度(CFU/ml)。乙型肝炎病毒表面抗原的检测是应用上海科华公司的乙肝

表面抗原试剂合(LOT 2 000)检测. 柯萨奇病毒B的检测则用HeLa细胞, 以50%组织细胞病变剂量(TCID<sub>50</sub>)为病毒浓度, 评价了抗病毒效应. 幽门螺杆菌消毒效果的评判通过取液接种培养并观察其有无生长.

## 2 结果

2.1 酸化电解水自动消毒仪杀菌效果观察 消毒前后各观察样本收取后经浓度矫正、孵育、培养、计数后具体结果详见表1.

表1 消毒前后不同菌种菌落计数表

菌种名称	培养基	消毒前			消毒后		
		镜头	钳道	附件	镜头	钳道	附件
耐甲氧金葡萄	营养琼脂 <sup>a</sup>	2.5×10 <sup>5</sup>	2.0×10 <sup>6</sup>	4.5×10 <sup>6</sup>	0	0	0
肺炎克雷伯菌	营养琼脂	3.0×10 <sup>5</sup>	1.0×10 <sup>7</sup>	3.2×10 <sup>6</sup>	0	0	0
大肠埃希菌	营养琼脂	1.5×10 <sup>5</sup>	1.2×10 <sup>7</sup>	5.1×10 <sup>6</sup>	0	0	0
铜绿假单胞菌	营养琼脂	4.0×10 <sup>5</sup>	1.5×10 <sup>7</sup>	2.8×10 <sup>6</sup>	0	0	0
肠球菌	营养琼脂	2.0×10 <sup>5</sup>	1.4×10 <sup>7</sup>	6.7×10 <sup>6</sup>	0	0	0
伤寒杀门菌	营养琼脂	2.0×10 <sup>5</sup>	1.0×10 <sup>7</sup>	5.5×10 <sup>6</sup>	0	0	0
奇异变形杆菌	营养琼脂	4.0×10 <sup>5</sup>	7.7×10 <sup>7</sup>	3.4×10 <sup>6</sup>	0	0	0
结核分枝杆菌	罗琴管	生长 <sup>b</sup>	生长	生长	未生长 <sup>c</sup>	未生长	未生长
幽门螺杆菌		3.7×10 <sup>6</sup>	3.0×10 <sup>7</sup>	5.5×10 <sup>6</sup>	0	0	0
白色念珠菌	沙堡氏琼脂	4.6×10 <sup>5</sup>	6.0×10 <sup>5</sup>	1.7×10 <sup>5</sup>	0	0	0

a 添加2%酵母浸膏; b 接种后5d放大镜下隐约可见, 10d已达满视野; c 持续培养4wk、8wk后均未见生长.

表2 酸化水自动消毒仪对乙肝病毒、柯萨奇病毒的杀灭效果表

病毒种类	检测方法	消毒前			消毒后		
		镜头	钳道	附件	镜头	钳道	附件
HBsAg	混合血清 (0.803) <sup>a</sup>	0.628	0.701	0.657	0.024	0.020	0.018
Cox B II	10 <sup>-6</sup> TCID <sub>50</sub> /ml <sup>b</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	未测到	未测到	未测到

a 波长450 nm时的吸光度, 质控对照设定0.105以上为阳性; b TCID<sub>50</sub>为50%组织细胞病变计量单位.

2.2 酸化电解水消毒法杀病毒效果观察 酸化水自动消毒仪对肝炎病毒、柯萨奇病毒的杀灭效果详见表2.

## 3 讨论

消化内镜的操作过程与特征决定了其高度污染和具有潜在交叉感染的特点. 因内镜和附件消毒不严格而导致病原菌播散、影响操作质量和效果等问题理应引起内镜医师高度重视<sup>[3]</sup>. 国内目前使用最广泛的化学浸泡消毒法理论上具有良好的消毒灭菌效果, 但在实际实施过程中, 常因单位时间操作例数过多, 消毒过程不规范等影响最终消毒质量. 消毒过程中工作人员劳动强度大和化学试剂对人体、内镜及环境有不良影响也是一个不可忽视的因素. 酸化水自动消毒法的引入是内镜消毒史上的一个进步, 它具有消毒时间相对较短、消毒时间得以保证和消毒范围广(包括机身、钳道、注水/气孔和附件等). 无需特殊化学消毒剂和无环境污染以及特殊排水系统等诸多优点. 日本曾对酸化电解水的安全性进行了严格的动物实验, 发现酸性电解水在接触动物口腔黏膜、皮肤后立即释放电子变为中性, 对动

物和人的眼、黏膜、皮肤等无不良刺激作用. 动物实验无致畸作用. 内镜在酸性电解水中浸泡1 000次以上, 无变形、老化和技术参数指标异常等改变, 因此对人体和内镜都是非常安全的<sup>[4]</sup>.

关于酸化水的消毒灭菌效果, 曾有多项较全面的基础体外研究, 研究发现酸化水对常规剂量细菌( $10^3$ - $10^4$  CFU/ml)的杀菌时间在25-30 s左右, 其中包括大肠杆菌、绿脓杆菌、金葡菌和幽门螺杆菌等致病菌<sup>[5]</sup>. 在本研究中, 选用了超剂量的上、下消化道常见致病菌( $10^6$ - $10^8$  CFU/ml), 在未作流动水清洗的情况下, 直接进行酸化水消毒, 评价其效果. 结果发现, 在推荐的消毒时间(7 min)内, 酸化水消毒能有效地杀灭远超过常规污染剂量的各种致病菌以及常见的乙肝病毒和柯萨奇病毒. 另外对结核杆菌亦有很好的杀灭作用, 消毒能力能满足实际应用要求.

在任何消毒操作过程中, 消毒前的全面、足时、彻底的流动水清洗是影响消毒效果的一个极重要的环节. 研究发现, 消毒前2 min左右的流动水清洗可去除污染物表面近70-80%的污染菌量, 使消毒时的菌量

已明显减少，提高了消毒效果<sup>[6,7]</sup>。本文在附件消毒的预试验中发现，如附件(热探头、圈套器和活检钳)消毒前未作清洗、直接放入消毒池，7 min 后在部分活检钳的浸洗液中仍可有致病菌生长，但作充分清洗后再消毒，则未见致病菌生长现象。因此如同其他正规消毒过程一样，在使用酸化水自动消毒仪的消毒过程中，消毒前的流动水充分、彻底冲、洗、吸、刷等步骤是一个再怎样强调都不过分的关键步骤<sup>[7]</sup>。

另外，酸化水自动消毒的消毒时间短、操作简便、省力、消毒范围大、无排放污染是其不同于其他消毒方法的优点，一次可完成镜身插入部、活检钳道、注气/水孔和多种附件的同时消毒<sup>[8]</sup>。虽然单次投入购机费用不菲，但每日使用的价格则相对低廉。不需使用特殊消毒剂可使工作人员免除同化学物品接触。第一代 Clean Top-WM-1 的实用性仍有尚需改进之处，其中包括：酸化水的发生时间相对较长(45 min)、内镜手柄及旋钮部无法消毒、部分种类的内镜在消毒时须脱离主机。但从文献报道和初步临床使用效果看，酸化水自动消毒仪消毒法应属一种高效、快速、安全和方便的消毒方法，但酸化电解水对内镜器械的影响尚需长期观察和进一步研究。

#### 4 参考文献

- 1 Rutala WA, Weber DJ. Disinfection of endoscopes: review of new chemical sterilants used for high level disinfection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999;20:69-76
- 2 Nelson DB, Bosco JJ, Curtis WD, Faigel DO, Kelsey PB, Ieung JW, Mills MR, Smith P, Tarnasky PR, VanDam J, Wassef UY. Technology status evaluation: sheathed endoscopes: November 1998, From the ASGE, American society for Gastrointestinal Endoscopy. *Gastrointest Endosc* 1999;49:862-864
- 3 Raynard JC, Daisy O, Anthony JD Jr. GI endoscopic reprocessing practices in the United States. *Gastrointest Endosc* 1996;43: 540-545
- 4 Tsuji S, Kawano S, Oshita M, Ohmae A, Shinomura Y, Miyazaki Y, Hiraoka S, Natsuzawa Y, Kamada T, Hori M, Maeda T. Endoscopic disinfection using acidic electrolytic water. *Endoscopy* 1999;31:528-535
- 5 Cronmiller JR, Nelson DK, Salman G, Jackson DK, Dean RS, Hsu JJ, Kim CH. Antimicrobial efficacy of endoscopic disinfection procedures: a controlled, multifactorial investigation. *Gastrintest Endosc* 1999;50:152-158
- 6 Axon A, Kruse A, Urgell R, Struelens M, Petersen C, Spencer K, Rey JF, Reid A, Doherty B, Doherty B, Stief M, Cramer J. Europe society of gastrointestinal endoscopy guidelines for the reprocessing of accessories in digestive endoscopy. *Endoscopy* 1996; 28:534-535
- 7 Wilkinson M, Simmons N, Bramble M, Leicester R, D'Silva J, Boys R, Gray R. Report of the working party of the endoscopy committee of the British Society of Gastroenterology on the reuse of endoscopic accessories. *Gut* 1998;42:304-306
- 8 Kozarek RA. Coming clean on reuse of endoscopic equipment. *Gut* 1998;42:155-156

## 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003 - 2004 年 国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助

本刊讯 世界胃肠病学杂志英文版(*World Journal of Gastroenterology*<sup>®</sup>)申报的 2002 年度国家自然科学基金重点学术期刊专项基金项目,经专家评审,国家自然科学基金委员会委务会议审定,予以批准资助(项目批准号: 30224801). 资助期限2年,2003 - 2004年,资助强度每年8万元。

2002 年度重点学术期刊专项基金资助 30 本学术期刊,分别为天体物理学报(英)、计算数学(英)、理论物理通讯(英)、中国物理快报(英)、力学学报(英)、分析化学、高等学校化学学报、化学学报、化学通报、中国化学工程学报(英)、**世界胃肠病学杂志(英)**、作物学报、中国农业科学、中国中西医结合杂志、中国药理学报(英)、生物化学与生物物理学报、细胞研究(英)、植物学报(英)、大气科学进展(英)、地球物理学报、地质学报(英)、金属学报、稀土学报(英)、材料科学技术(英)、稀有金属材料与工程、电力系统自动化、计算机科学技术学报(英)、管理科学学报、中国科学(中、英)、科学通报(中、英)。

• 临床经验 •

# 糖尿病性胃肠病变患者血浆P物质和胃动素的水平及意义

吴波,郑长青,林连捷,周卓

吴波,中国医科大学第二临床学院内分泌科 辽宁省沈阳市 110004  
 郑长青,林连捷,周卓,中国医科大学第二临床学院消化内科  
 辽宁省沈阳市 110004  
 项目负责人:吴波,110004,辽宁省沈阳市,中国医科大学第二临床学院内分泌科.  
 电话:024-83956986  
 收稿日期:2002-10-07 接受日期:2002-10-29

## 摘要

目的:探讨P物质和胃动素在糖尿病性胃肠病变中的作用机制.

方法:应用放免法对对照组(32例)、单纯糖尿病组(43例)及糖尿病胃肠病变组(38例)血浆中的P物质和胃动素进行测定.

结果:三组病例血浆中的P物质分别为( $53.86 \pm 8.2$ )ng/mL, ( $22.35 \pm 5.4$ )ng/mL, ( $9.96 \pm 6.8$ )ng/mL, 三组之间差异显著( $P < 0.01$ ), 与糖尿病病程呈负相关; 胃动素分别为(217.2  $\pm 23.3$ ) pg/mL, (408.8  $\pm 31.6$ ) pg/mL, (612.5  $\pm 36.2$ ) pg/mL 三组之间差异显著( $P < 0.01$ ), 与糖尿病病程呈正相关.

结论:P物质的降低、胃动素的升高在糖尿病性胃肠病变的发生、发展中起着重要的作用.

吴波,郑长青,林连捷,周卓. 糖尿病性胃肠病变患者血浆P物质和胃动素的水平及意义. 世界华人消化杂志 2003;11(3):367-368  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/367.htm>

## 0 引言

糖尿病胃肠病变是糖尿病神经病变的主要表现之一, 近年来研究显示其发病率高达50%左右, 不仅影响患者的生活质量, 并且妨碍药物吸收, 扰乱治疗, 目前, 此类研究越来越受到重视<sup>[1-3]</sup>, 我们通过测定43例糖尿病患者和38例糖尿病胃肠病变患者血浆中的P物质和胃动素, 进一步探讨其在糖尿病胃肠病变发生、发展中的作用.

## 1 材料和方法

1.1 材料 实验组: 2型糖尿病患者81例, 符合WHO诊断标准, 根据有无胃肠病变分为:(1)单纯糖尿病组43例, 男19例, 女24例, 平均年龄( $56 \pm 11$ )岁, 病程1-13 a. (2)糖尿病胃肠病变组38例, 男20例, 女18例, 平均年龄( $58 \pm 13$ )岁, 病程2-18 a. 胃肠症状主要为腹胀24例, 便秘19例, 上腹部不适28例, 间断恶心、呕吐5例, 反酸、嗳气7例, 二种以上症

状共同出现者26例, 确诊糖尿病5 a内出现上述症状的12例, 5 a以上的26例. 所有患者经临床生化、B超及胃镜检查已除外胃肠等消化道疾病.

对照组:选择32名本院工作人员及健康志愿者, 其中男15名, 女17名, 平均年龄( $48 \pm 19$ )岁, 均无消化道疾病、系统性疾病及胃肠道症状, 且无腹部手术史.

### 1.2 方法

1.1.1 血浆P物质的测定 清晨空腹静息状态下抽肘静脉血3 mL, 注入预冷的含0.5 mol/L EDTA-Na<sub>2</sub> 30 μL及抑肽酶1500 kIU的试管中, 混匀, 离心, 取血浆贮于-20. 每1 mL血浆加2 mL冷丙酮, 混匀, 4 离心, 2 000转×20 min. 取上清加4 mL冷石油醚, 混匀后再次离心. 吸取上相, 下相用凉风将残余丙酮吹掉后, 所余液体用冷冻抽干机抽干, -20 保存待测. 由海军放免技术中心提供试剂盒, 采用放免法测定. 操作环境<10.

1.1.2 血浆胃动素的测定 清晨空腹静息状态下抽肘静脉血2 mL, 注入预冷的含30 μL 100 g/L EDTA-Na<sub>2</sub> 和30 μL 抑肽酶塑料管中混匀, 4 离心15 min, 3 500 r/min, 分离血浆置于-20 下保存待测. 由解放军总医院科技开发中心放免所提供试剂盒, 采用放免法测定. 操作环境<10.

统计学处理 所有资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用配对t检验和直线相关分析.

## 2 结果

血浆P物质和胃动素的水平见表1. 糖尿病组血浆P物质的波动与年龄、性别及血糖水平无相关性, 与糖尿病病程呈负相关, 直线相关分析结果:  $r = -0.69$ ,  $P < 0.01$ . 糖尿病组血浆胃动素的波动与年龄、性别及血糖水平无相关性, 与糖尿病病程呈正相关. 直线相关分析结果:  $r = 0.57$ ,  $P < 0.01$ .

表1 实验组与对照组血浆P物质和胃动素的水平( $\bar{x} \pm s$ )

组	n	P物质(ng/mL)	胃动素(pg/mL)
正常对照组	32	$53.86 \pm 8.2$	$217.2 \pm 23.3$
单纯糖尿病组	43	$22.35 \pm 5.4^b$	$408.8 \pm 31.6^b$
糖尿病胃肠病变组	38	$9.96 \pm 6.8^d$	$612.5 \pm 36.2^d$

<sup>b</sup>P < 0.01 vs 对照组比较; <sup>d</sup>P < 0.01 vs 单纯糖尿病组比较.

## 3 讨论

糖尿病胃肠病变是糖尿病患者常见的并发症之一, 其

主要原因是由于糖尿病未得到良好控制及高血糖所导致的动力障碍，表现为平滑肌的收缩力减低，胃蠕动减弱，胃窦无张力和排空延迟，而幽门收缩时间延长<sup>[4]</sup>。患者可有不同程度的胃肠表现，以早饱、餐后中上腹饱胀、恶心、发作性呕吐等为主要临床表现<sup>[5]</sup>，常因饮食不当而诱发或加重，可有较长时间的自然缓解。目前其发病机制尚不十分清楚。可能的因素有<sup>[2]</sup>：(1)自主神经病变<sup>[6-8]</sup>。糖尿病患者内脏自主神经轴突出现节段性脱髓鞘病变，神经节超微结构有特异性的树突肿胀，肾上腺素能神经和胆碱能神经也存在结构上的变化。(2)平滑肌变性。糖尿病微血管病变导致的局部缺血、神经营养障碍，可使平滑肌变性。(3)高血糖可使胃肠激素分泌失常<sup>[4]</sup>。

据报道<sup>[9-11]</sup>，脑肠肽在调控胃肠道的免疫机制中有重要作用，P物质(substance P，SP)作为重要的脑肠肽之一，在中枢神经系统和胃肠道中均有广泛的分布，他不仅存在于内分泌和旁分泌细胞，发挥激素和局部递质作用，也存在于内源性和外源性神经元，起到神经递质的作用<sup>[12]</sup>，另据现代免疫学研究证实，免疫系统的细胞能释放SP并含有高亲和力的SP结合位点。SP不仅能诱导分泌细胞因子，而且对细胞因子的产生在某些情况下也有抑制作用<sup>[13]</sup>。正常人体内的SP，作为免疫调节递质，作用于外周T细胞上的胃肠道受体，对细胞免疫功能发挥调节作用，并通过SP间接影响多种细胞因子的变化，从而达到对胃肠道免疫的调节，实现对胃肠道疾病及功能的调整作用。本实验结果显示，在糖尿病患者的血浆中，SP的含量低于正常对照组，有胃肠病变的患者低于单纯糖尿病患者( $P < 0.01$ )，说明在糖尿病胃肠病变的患者体内由于缺乏SP，而抑制了胃肠道的免疫调节，使糖尿病患者出现了一系列胃肠道症状。另外，SP的缺乏还与糖尿病的病程呈负相关，原因可能是由于长期高血糖状态抑制了APUD系统的EC1肠嗜铬细胞分泌SP，但目前尚无肯定的结论。

胃动素是胃肠分泌细胞分泌的多肽类激素，由22个氨基酸组成，分子量2700，主要由小肠上部的M0细胞释放，此外，还存在于神经组织及垂体、大脑皮层等部位，因此胃动素也是一种脑肠肽。他通过引发胃和小肠近端消化间期移行性运动复合波(IMMC)第一相，诱发胃和小肠强烈收缩并向远端传播，促进胃排空，是激发消化间期相肌电活动的主要激素，在消化间期，血浆胃动素呈周期性波动，高峰与消化间期肌电活动出现密切相关<sup>[14,15]</sup>。目前，胃动素在糖尿病胃肠病变中的作用机制尚不清楚。有报道<sup>[16]</sup>糖尿病植物神经病变所致的弛缓性胃扩张可刺激胃动素持续升高，给这些患者服用促进胃肠收缩的药物西沙必利，可出现IMMC第二相，使得胃动素水平下降。本研究显示，糖尿病胃

肠病变的患者血浆胃动素水平明显高于正常人，且与糖尿病的病程呈正相关，提示血浆胃动素的升高预示着糖尿病患者胃肠动力学的改变。考虑可能与以下因素有关：(1)糖尿病植物神经病变，使得胃动素通过胆碱能神经引发胃肠运动受阻。(2)糖尿病患者的胃动素活性下降，降低了对胃肠平滑肌的直接作用。(3)糖尿病患者的血糖升高，可能减少胃肠激素分泌的抑制，而使胃动素升高。(4)由于糖尿病的病程长而导致的血管病变，胃肠道可能发生淤血、水肿，迷走神经张力升高，从而刺激胃动素的分泌。

关于脑肠肽SP和胃动素在糖尿病胃肠病变中的作用，本实验已有了初步的结论，能否通过胃肠道激素替代或干预治疗糖尿病胃肠病变以及SP和胃动素，特别是SP在其发病中的根本机制，还有待于进一步研究。

#### 4 参考文献

- 刘剑峰,韩翠华,梁延杰,胡家露,张忠兵. 糖尿病性胃肠病患者血浆胃动素的水平及临床意义. 北京医学 2000;22:55
- 刘云,缪珩. 糖尿病患者26例胃肠激素测定及其临床意义. 南京医科大学学报 2000;20:495-496
- 黄颖秋,王昕,李骢,刘丽. 糖尿病患者血清一氧化氮水平与食管内pH值及食管动力变化的临床意义. 世界华人消化杂志 2000;8:374-376
- McCallum RW,Lin ZY,Chen JDZ, Schirmer BD. Gastric myoelectrical abnormalities in patients with diabetic gastroparesis. *Dig Dis Sci* 1998;43 (Suppl 1):A1592
- Tosetti C, Stanghellini V, Horowitz M, Salvioli B, Corinaldesi R. Predictors of gastroparesis in outpatients with upper gastrointestinal symptoms. *Gastroenterology* 1999;116:A336
- Spangeus A, El-Salhy M, Suhr O, Eriksson J, Lithner F. Prevalence of gastrointestinal symptoms in young and middle-aged diabetic patients. *Scand J Gastroenterology* 1999;34:1196-1202
- Talley NJ, Young L, Bytzer P, Hammer J, Leemon M, Jones M, Horowitz M. Impact of chronic gastrointestinal symptoms in diabetes mellitus on health-related quality of life. *Am J Gastroenterol* 2001;35:71-76
- 黄颖秋. 胃轻瘫综合征的发病机制. 世界华人消化杂志 2001;9:1162-1164
- 高巍,黄裕新,陈洪,孙大勇,王庆莉. 脑肠肽在针刺调节免疫反应中的作用. 中国免疫学杂志 2001;9:473-477
- 王玲,周吕. 脑肠肽对胃肠平滑肌细胞动力调节的信号转导机制. 基础医学与临床 1999;19:26-29
- 李艳梅,黄裕新. 脑肠肽及细胞因子在针刺调控胃肠免疫机制中的作用. 世界华人消化杂志 2001;9:329-332
- Tao K, Chen B, Li ZY, Hu DH, Wang BT. Correlation of Sub P positive nerves and vascular permeability in jejunum of rats in early stage deep partial-thickness skin burns[J]. *Dis Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Mil Med Univ)* 1999;20:412-415
- Assche GV, Barbara G, Deng YK, Lovato P, Gauldie J, Collins SM. Neurotransmitters modulate cytokine-stimulated interleukin 6 secretion in rat intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* 1999;116:346-353
- 潘秀珍,蔡立勉. 胃肠激素研究的现状. 世界华人消化杂志 1999;7:464-466
- 王雁,袁申元,张建忠,胡鸿英,肖作亮,付汉菁,万小平,朱良湘. 糖尿病患者消化间期移行性复合运动规律的研究. 中华消化内科杂志 1998;37:518-521
- 张彤彦,王雁,袁申元,丁燕,陈波,万小平. 西沙必利对糖尿病胃轻瘫患者运动功能及血浆胃动素的影响. 首都医科大学学报 2001;22:236-238

• 临床经验 •

# 胆总管结石伴胆道感染者胆汁细菌培养结果分析

陈晓文,智发朝,周丹,万田謨,朱建新

陈晓文,智发朝,周丹,万田謨,朱建新,中国人民解放军第一军医大学南方医院消化内科研究所 广东省广州市 510515  
 项目负责人:智发朝,510515,广东省广州市,中国人民解放军第一军医大学南方医院消化内科研究所. zhifc@yahoo.com  
 电话:020-85141535  
 收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-16

## 摘要

目的:非手术条件下了解胆总管结石伴胆道感染患者胆汁中主要致病菌情况,探讨通过导管引流取胆汁进行细菌培养结果的可靠性.

方法:对58例胆总管结石伴胆道感染患者,用导管抽吸胆汁进行细菌培养.

结果:培养出74株细菌,革兰氏阴性杆菌53株(71.62%),大肠埃希菌25株(33.78%),肺炎克雷伯菌14株(18.92%);革兰氏阳性球菌20株(27.03%),其中肠球菌16株(21.62%);真菌属1株(1.35%).

结论:胆道感染主要病原菌是大肠埃希氏菌、肠球菌和肺炎克雷伯菌;导管取胆汁进行细菌培养方法可行.

陈晓文,智发朝,周丹,万田謨,朱建新. 胆总管结石伴胆道感染者胆汁细菌培养结果分析. 世界华人消化杂志 2003;11(3):369-370

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/369.htm>

## 0 引言

胆道感染是临床常见病,了解引起胆道感染的主要病原菌和及时解除胆道梗阻对治疗非常重要.既往检测胆汁中感染细菌,常需手术中取胆汁,但随着内镜技术的迅速发展,绝大多数单纯胆总管结石已不需手术治疗,采用非手术方式获取胆汁行细菌培养正成为临床治疗的重要内容.我们在非手术条件下,在逆行胰胆管造影(ERCP)前,通过导管抽吸胆汁进行细菌培养,了解胆总管结石伴胆道感染患者胆汁中的主要致病菌情况,并探讨通过导管引流取胆汁进行细菌培养结果的可靠性.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2002-03/09月我院住院患者58例,男20例,女38例;年龄33-79岁,平均48.8岁.患者入院时均出现腹痛、畏寒、发热、黄疸,经ERCP检查确诊为胆总管结石.

1.2 方法 在行ERCP过程中,当插管(严格消毒的导管)进入胆道,注射造影剂前,抽吸胆汁3ml,进行常规

培养,用Model 60全自动微生物鉴定仪进行鉴定.

## 2 结果

2.1 胆汁中细菌检测情况 58例胆汁标本中有57例检出细菌(表1),检出率为98.28%,共获得74株细菌,其中17例检出2种细菌.检出的细菌中革兰氏阴性杆菌53株,占71.62%;革兰氏阳性球菌20株,占27.03%;霉菌1株,占1.35%.

2.2 治疗效果 全组病例均于ERCP后行乳头括约肌切开取石术,选用第三代头孢和喹诺酮类抗生素各一种,除1例合并胆囊结石伴感染需外科手术外,均痊愈出院.

表1 74株胆汁细菌的构成比

细菌种类	菌株数	构成比(%)
革兰氏阴性杆菌	53	71.62
埃希氏杆菌	25	33.78
克雷伯菌属	14	18.92
肠杆菌属	10	13.51
变形杆菌属	2	2.70
假单胞菌属	2	2.70
革兰氏阳性球菌	20	27.03
肠球菌属	16	21.62
葡萄球菌属	3	4.05
链球菌属	1	1.35
真菌属	1	1.35
酵母菌	1	1.35
合计	74	100

## 3 讨论

正常情况下胆汁内无细菌生长,据国内外文献报道,在感染的胆汁中可培养出一种或多种致病菌株,这些致病菌几乎都来自肠道,为条件致病菌,经Vater壶腹(或胆肠吻合口)逆行进入胆道,细菌亦可通过血行或淋巴通道进入胆道.

近年来,临幊上对胆道细菌感染非常重视,但由于各地区应用抗生素的习惯不同,胆道感染的致病菌也常出现个体和地区的差异<sup>[1,2]</sup>.从国内手术中所取的胆汁的细菌检测来看,胆道感染的致病菌以革兰氏阴性菌为主,且主要为大肠埃希菌(23.1-41.98%)、肺炎克雷伯菌(1.48-33%)和肠杆菌属(8.16-12.3%);而革兰氏阳性菌相对较少,主要为肠球菌(3.0-25%)<sup>[2-6]</sup>.

由于内镜技术的迅速发展,绝大多数单纯胆总管

结石已不需手术治疗，内镜下乳头括约肌切开取石术，凭借其创伤小、安全、恢复快、经济等优点，已经成为最佳选择。但大多数胆石症就诊患者，都伴有不同程度的胆道感染，因此术前、术后应用抗生素显得非常重要的。抗生素的选用，常凭借经验而定，各地区或医院常因本地区的致病菌种类不同而有所差异。这些经验往往是建立在当地的流行病学基础上的，因此胆汁细菌的可靠检测至关重要。

对内镜下治疗的患者，经导管抽吸胆汁进行检测是可行的，但结果的可靠性受到质疑，普遍认为导管插入过程中可受到污染而影响检测结果。本文在58例患者培养出74株菌株，革兰氏阴性杆菌53株(71.62%)，其中大肠埃希菌25株(33.78%)，肺炎克雷伯菌14株(18.92%)；革兰阳性球菌20株(27.03%)，其中肠球菌16株(21.62%)；真菌属1株(1.35%)；1例患者培养阴性，可能为专性厌氧菌。与国内同行的培养结果相一致。这表明只要操作前对所用器械严格消毒，操作中注意无菌操作，培养结果还是可信的。当然，导管插入过程

中完全不受十二指肠壁影响较为困难，可靠的培养结果可能与下列两个因素有关：(1)十二指肠和空肠相对无菌，细菌主要为革兰氏阳性需氧菌，包括链球菌、葡萄球菌和乳酸杆菌，而培养结果中这三种细菌阳性率均较低，说明污染可能性小；(2)因胆道感染几乎均为肠道逆行感染，污染导管的细菌与致病菌一致，使我们检出结果与国内同行的检出结果无明显差异。但目前因样本量较小，内镜下通过导管抽吸胆汁进行细菌培养的结果是否为患者致病菌，尚需大样本进一步检验。

#### 4 参考文献

- 1 周平红,姚礼庆,徐美东. 胆道感染病原菌调查与耐药性分析. 中国临床医学 2001;8:4648-4650
- 2 方善德,夏志平. 临床外科感染. 第1版. 沈阳:沈阳出版社, 2000:106-117
- 3 高家良. 306例胆汁需氧菌培养结果分析. 现代实用医学 2001;13:173
- 4 王海东,郑进方,邢贻雷. 胆石症患者胆汁需氧菌培养结果分析. 中国误诊学杂志 2001;1:1609-1611
- 5 周平红,姚礼庆,张轶群,秦新裕. 化脓性胆管炎胆汁致病菌与药物敏感的临床研究. 中国现代医学杂志 2001;11:40-41
- 6 许春森,黄长玉,黄建富,陈大良,黄心宏,殷凤峙. 近年急性重症胆管炎胆汁病原学及药敏分析. 肝胆外科杂志 2001;9:108-110

## 第五届上海国际肝癌肝炎会议征文启事

为了加强国际及沪港学术交流，进一步提高肝癌和肝炎防治研究水平，由上海国际肝癌肝炎会议组织委员会(复旦大学、上海第二医科大学、第二军医大学、中国科学院上海分院、上海市卫生局)和程思远国际肝炎研究基金会(香港)联合主办，定于2004-02-14~17日在香港召开“2004年港沪国际肝癌肝炎会议-第五届上海国际肝癌肝炎会议、第三届程思远肝炎研究基金会国际学术会议”，会议规模定为1~200人，大会主席为中国工程院院士、复旦大学汤钊猷教授和香港大学医学院林兆鑫教授、大会邀请程思远、吴阶平两位副委员长为名誉主席，并由国内吴孟超等与美、英、法、德、日等国和香港地区的著名教授担任共同主席。会议邀请国内外著名学者80人作专题报告。欢迎国内外从事肝炎和肝癌基础与临床研究的专家、学者参加大会。投稿(请撰写中英文摘要)及联系事项寄：200023,上海市医学院路136号，复旦大学肝癌研究所国际会议秘书处收。电话：(021)64041990-2436，传真：(021)64037181；电子信箱：qiusj68@zshospital.net。有关会议的详情及注册，请查询[www.hepa2004.org](http://www.hepa2004.org)网址。

(2003-03-04)

# 异丙酚静脉麻醉在小儿肠镜检查术中的应用

祝志太,王宇川,刘国剑

祝志太,刘国剑,江西省鹰潭市人民医院内镜室 江西省鹰潭市 335000  
王宇川,江西省鹰潭市人民医院麻醉科 江西省鹰潭市 335000  
项目负责人 祝志太,335000,江西省鹰潭市胜利西路31号,鹰潭市人民医院  
内镜室.  
收稿日期 2002-10-07 收受日期 2002-10-29

## 摘要

**目的:**为了减轻小儿在肠镜检查时的恐惧及痛苦,静脉全身麻醉甚为必要.氯胺酮麻醉清醒时间长,不良反应多,不能完全满足肠镜检查时间短,门诊患者多这一特点的需要,而异丙酚麻醉能满足这一需要.

**方法:**39例接受静脉麻醉的患儿分成二组,术前准备及用药相同,异丙酚组16例,静脉注射异丙酚2 mg/kg,氯胺酮组23例,静脉注射氯胺酮1 mg/kg,术中监测患儿的心率、血压、血氧饱和度,术后记录患儿清醒时间、不适反应.

**结果:**异丙酚组患儿清醒时间为 $5.6\pm3.3$  min,氯胺酮组清醒时间为 $36.3\pm9.5$  min,二组差异显著  $P < 0.01$ ,且异丙酚组术中术后不良反应轻而少.

**讨论:**异丙酚静脉麻醉起效快,维持时间短,清醒快,不良反应少,比氯胺酮麻醉更安全有效,能完全满足小儿肠镜检查需要.

祝志太,王宇川,刘国剑.异丙酚静脉麻醉在小儿肠镜检查术中的应用.世界华人消化杂志 2003;11(3):371-372  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/371.htm>

## 0 引言

小儿大肠镜检查已普遍开展,但因检查过程中有一定痛苦,且小儿由于恐惧而不配合,增加插入的困难和危险,这时短暂、安全的全身麻醉甚为必要.2001-8/2002-6,我们采用异丙酚静脉麻醉,完成16例小儿大肠镜检查,取得满意效果.与此前在氯胺酮全麻下行肠镜检查、有完整记录的23例相比较,发现异丙酚麻醉有明显优越性.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 有便血、潜血或脓血便、腹痛、腹泻等下消化道症状,其它检查未能明确诊断,且因不能忍受疼痛或因恐惧不能配合,而接受在全麻下行大肠镜检查的39例患者.异丙酚麻醉组16例,男11例,女5例,年龄3.5-15岁,体质量 $29.7\pm5.6$  kg;氯胺酮麻醉组23例,男15例,女8例,年龄4-15岁,体质量 $27.3\pm6.9$  kg.

**1.2 方法** 所有病例均做好肠镜检查前的肠道清洁准备,禁食,备足抢救药品及器材;术前30 min肌注阿托品0.01 mg/kg,入室后建立静脉通道.异丙酚组,体位摆正后静脉注射异丙酚2 mg/kg,患儿进入浅睡眠时停止推注,开始肠镜检查,若检查未结束患儿清醒或手脚不自主活动,酌情加量.氯胺酮组,体位摆正后静脉注射氯胺酮1 mg/kg,于30-60 s内推注完,无睫毛反射即行肠镜检查,若检查中患儿手足活动,酌情加量.检查过程中对患儿的心率、血压、血氧饱和度进行监测,根据患儿情况控制用药量及进行相关处理,检查结束记录患儿清醒时间及自诉的不适反应.

## 2 结果

二组病例均顺利完成检查.检查过程中,患儿腹壁软,无紧张强直,肠镜插入顺利,平均操作时间缩短,未出现穿孔等严重并发症.异丙酚组,检查开始后,发现所有患儿心率、血压较检查前有所下降,但最低值均在正常范围内,未行任何处理;血氧饱和度也有所下降,给予面罩吸氧后,恢复正常.检查结束后,心率、血压、血氧饱和度恢复检查前水平.在检查中有3例因注射速度过快引起呼吸暂停,经面罩加压给氧后恢复正常.检查结束后,患儿完全清醒时间为 $5.6\pm3.3$  min,清醒后无1例能记清检查过程和任何不适,有2例诉有轻微头昏,无恶心、呕吐,醒后无1例再次昏睡.

氯胺酮组,所有患儿心率、血压较检查前增加,但在正常变化范围内,3例在检查中出现喉痉挛,4例舌下坠,出现呼吸暂停及口腔分泌物增加,血氧饱和度明显下降,经加压给氧后恢复,清醒时间为 $36.3\pm9.5$  min,清醒后有9例诉有头昏,有3例诉有做恶梦,2例叫醒后又入睡,1例出现恶心、呕吐.二组比较见表1.

表1 二组患儿清醒时间、术中术后不良反应

	平均清醒时间(min)	术中不良反应	术后不良反应
异丙酚组	$5.6\pm3.3$	3	2
氯胺酮组	$36.3\pm9.5$	7	15

$P < 0.01$ .

## 3 讨论

异丙酚是一种新型静脉麻醉药,有作用起效快,维持时间短,体内无蓄积,毒性小,恢复迅速等特点.异丙酚对心血管及呼吸系统有一定抑制作用,所以

在注射后，患儿出现一过性心率、血压、血氧饱和度下降的情况。心率、血压及血氧饱和度下降的最低值仍在正常值范围，影响是短暂有限的，无需特殊处理可自行恢复<sup>[1]</sup>。另外，心率减慢和血压下降与肠镜检查过程中，肠管受牵拉，刺激迷走神经，迷走神经反射亢进有关<sup>[2]</sup>。停止检查，又会逐渐恢复正常。而对呼吸的抑制作用，与剂量及注射速度呈正相关<sup>[1]</sup>。与氯胺酮比较，术中术后不良反应均少且轻，特别是术后清醒时间短的优势，完全满足了肠镜检查时间短且大多为门诊患者这一特点的需要，免除了大量术后监护及护理，能明显减轻患者的痛苦及恐惧，但仍必须在麻醉医师的监护下进行。

小儿大肠镜检查实行静脉麻醉，能明显减轻患儿恐惧及痛苦，增加肠镜插入成功率，降低插入危险性。由于肠镜检查过程中，患儿无知觉，所以手法必需轻柔，动作准确，减少滑镜长度，少注气，多吸气，能发现病灶，明确诊断即可，不必每例都要求插至回盲部，以减少操作时间，避免不必要的并发症。

#### 4 参考文献

- 1 余守章,刘继云,许立新,彭福宪. 静脉注射不同剂量异丙酚对血流动力学及通气功能的影响. 中华麻醉学杂志 1995;15:31-33
- 2 岑戎,徐富星,项华,欧平安,杨旅军,陈桂芳,王宇清. 静脉麻醉辅助大肠镜检查的效果. 中华消化内镜杂志 1999;6:149-150

#### • 病例报告 •

## 夫妻同患大肠癌1例

姚红兵,吴爱国

姚红兵,吴爱国,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  
项目负责人:吴爱国,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. luckstar0503@163.com  
电话:020-61643211 传真:020-61643213  
收稿日期:2002-11-19 接受日期:2002-12-05

#### 摘要

目的:初步探讨环境饮食因素在大肠癌的发病机制中的可能作用。

方法:通过对一对大肠癌夫妇患者的临床资料，包括临床症状体征、电子肠镜检查诊断、手术治疗方法、病理诊断、术后化疗以及随访等资料的收集比较。结合国内外文献来分析本组病例可能的致病因素。

结果:环境饮食因素可能在大肠癌的发病过程中起着一定的促进作用。饮食中适当减少肉类摄入量，增加蔬菜和水果等富含植物纤维等食物，对预防大肠癌，减少发病机会有积极的流行病学意义。

结论:共同的饮食习惯与生活环境，可能和其同发大肠癌有一定的平行关系，其具体机制有待进一步研究。

姚红兵,吴爱国. 夫妻同患大肠癌1例. 世界华人消化杂志 2003;11(3):372  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/372.htm>

#### 1 病例报告

**病例1**男，62岁，广东东莞人，发现大便性状改变5mo，便血1wk于2001-11入院。查体：腹软，无压痛，未扪及包块。肛门指检：距肛门约5cm处可扪及菜花状肿块，约3×3cm大小，紧贴肠管，指套染血。电子肠镜确诊为直肠癌。遂行“经腹会阴联合直肠癌根治术”，术后病理：直肠中分化腺癌，未见淋巴转移。经补液、抗炎、营养支持等治疗，恢复尚可。出院后定期以CF方案进行化疗，目前生存状态良好，暂未见复发及转移。

**病例2**女，59岁，广东东莞人，因左侧腹部隐

痛不适3mo，加重伴便秘5d于2002-03入院。体查：轻度贫血貌，心肺无异常，左侧腹部可扪及一约8×6×5cm大小包块，质中，无压痛，活动度尚可，腹股沟未及淋巴结。电子肠镜示：降结肠癌。行“左半结肠切除术”。术后病理：结肠中分化腺癌，未见淋巴转移。给予经补液、抗炎、营养支持等治疗，并按CF方案进行化疗，患者目前状态良好。

#### 2 讨论

大肠癌的发病原因至今尚未完全阐明，大量文献均表明，大肠癌的发病高低与种族无关，重要的是环境因素。环境因素中主要是饮食因素，尤其是脂肪和动物蛋白。这与其对肠段微植物丛的影响有关，并且最终影响肠腔内容物的化学组成。在饮食中另一个重要因素是饮食中纤维素的含量。饮食纤维降低结直肠癌危险的直接机制可能是：不溶性食物纤维吸收水分，增加粪便体积，稀释粪便中致癌物质浓度，并且缩短排便时间，这就有效的降低了致癌物质与结肠黏膜相互作用的可能性。在大肠内，致癌物质与非消化的谷物纤维直接结合，也同样降低致癌物与大肠的相互作用。本病例系一对夫妇，为较富裕家庭，结婚后共同生活约40a，平时饮食中植物纤维含量相对较少，肉类较多，共同的饮食习惯与生活环境，可能和其同发大肠癌有一定的平行关系。这些因素可能在其发病过程中起着促进作用，也与以往有关文献研究结果基本一致。因此，提倡饮食中适当减少肉类摄入量，增加蔬菜和水果等富含植物纤维等食物，对预防大肠癌，减少发病机会有积极的流行病学意义。但在本病例，该夫妇二人几乎同时发病，饮食因素在肿瘤发生和发展过程中是否起着主导作用，目前还缺乏有力的证据，有待进一步研究证实。发病中还有哪些致病因素参与其中，从基因和分子水平来阐明其发病原因和作用机制，也是今后需要进一步研究探讨的课题。

在注射后，患儿出现一过性心率、血压、血氧饱和度下降的情况。心率、血压及血氧饱和度下降的最低值仍在正常值范围，影响是短暂有限的，无需特殊处理可自行恢复<sup>[1]</sup>。另外，心率减慢和血压下降与肠镜检查过程中，肠管受牵拉，刺激迷走神经，迷走神经反射亢进有关<sup>[2]</sup>。停止检查，又会逐渐恢复正常。而对呼吸的抑制作用，与剂量及注射速度呈正相关<sup>[1]</sup>。与氯胺酮比较，术中术后不良反应均少且轻，特别是术后清醒时间短的优势，完全满足了肠镜检查时间短且大多为门诊患者这一特点的需要，免除了大量术后监护及护理，能明显减轻患者的痛苦及恐惧，但仍必须在麻醉医师的监护下进行。

小儿大肠镜检查实行静脉麻醉，能明显减轻患儿恐惧及痛苦，增加肠镜插入成功率，降低插入危险性。由于肠镜检查过程中，患儿无知觉，所以手法必需轻柔，动作准确，减少滑镜长度，少注气，多吸气，能发现病灶，明确诊断即可，不必每例都要求插至回盲部，以减少操作时间，避免不必要的并发症。

#### 4 参考文献

- 1 余守章,刘继云,许立新,彭福宪. 静脉注射不同剂量异丙酚对血流动力学及通气功能的影响. 中华麻醉学杂志 1995;15:31-33
- 2 岑戎,徐富星,项华,欧平安,杨旅军,陈桂芳,王宇清. 静脉麻醉辅助大肠镜检查的效果. 中华消化内镜杂志 1999;6:149-150

#### • 病例报告 •

## 夫妻同患大肠癌 1 例

姚红兵,吴爱国

姚红兵,吴爱国,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  
项目负责人:吴爱国,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. luckstar0503@163.com  
电话:020-61643211 传真:020-61643213  
收稿日期:2002-11-19 接受日期:2002-12-05

#### 摘要

目的:初步探讨环境饮食因素在大肠癌的发病机制中的可能作用。

方法:通过对一对大肠癌夫妇患者的临床资料，包括临床症状体征、电子肠镜检查诊断、手术治疗方法、病理诊断、术后化疗以及随访等资料的收集比较。结合国内外文献来分析本组病例可能的致病因素。

结果:环境饮食因素可能在大肠癌的发病过程中起着一定的促进作用。饮食中适当减少肉类摄入量，增加蔬菜和水果等富含植物纤维等食物，对预防大肠癌，减少发病机会有积极的流行病学意义。

结论:共同的饮食习惯与生活环境，可能和其同发大肠癌有一定的平行关系，其具体机制有待进一步研究。

姚红兵,吴爱国. 夫妻同患大肠癌 1 例. 世界华人消化杂志 2003;11(3):372  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/372.htm>

#### 1 病例报告

**病例 1 男，62岁，广东东莞人，发现大便性状改变5mo，便血1wk于2001-11入院。查体:腹软，无压痛，未扪及包块。肛门指检：距肛门约5cm处可扪及菜花状肿块，约3×3cm大小，紧贴肠管，指套染血。电子肠镜确诊为直肠癌。遂行“经腹会阴联合直肠癌根治术”，术后病理：直肠中分化腺癌，未见淋巴转移。经补液、抗炎、营养支持等治疗，恢复尚可。出院后定期以CF方案进行化疗，目前生存状态良好，暂未见复发及转移。**

**病例 2 女，59岁，广东东莞人，因左侧腹部隐**

痛不适3mo，加重伴便秘5d于2002-03入院。体查：轻度贫血貌，心肺无异常，左侧腹部可扪及一约8×6×5cm大小包块，质中，无压痛，活动度尚可，腹股沟未及淋巴结。电子肠镜示：降结肠癌。行“左半结肠切除术”。术后病理：结肠中分化腺癌，未见淋巴转移。给予经补液、抗炎、营养支持等治疗，并按CF方案进行化疗，患者目前状态良好。

#### 2 讨论

大肠癌的发病原因至今尚未完全阐明，大量文献均表明，大肠癌的发病高低与种族无关，重要的是环境因素。环境因素中主要是饮食因素，尤其是脂肪和动物蛋白。这与其对肠段微植物丛的影响有关，并且最终影响肠腔内容物的化学组成。在饮食中另一个重要因素是饮食中纤维素的含量。饮食纤维降低结直肠癌危险的直接机制可能是：不溶性食物纤维吸收水分，增加粪便体积，稀释粪便中致癌物质浓度，并且缩短排便时间，这就有效的降低了致癌物质与结肠黏膜相互作用的可能性。在大肠内，致癌物质与非消化的谷物纤维直接结合，也同样降低致癌物与大肠的相互作用。本病例系一对夫妇，为较富裕家庭，结婚后共同生活约40a，平时饮食中植物纤维含量相对较少，肉类较多，共同的饮食习惯与生活环境，可能和其同发大肠癌有一定的平行关系。这些因素可能在其发病过程中起着促进作用，也与以往有关文献研究结果基本一致。因此，提倡饮食中适当减少肉类摄入量，增加蔬菜和水果等富含植物纤维等食物，对预防大肠癌，减少发病机会有积极的流行病学意义。但在本病例，该夫妇二人几乎同时发病，饮食因素在肿瘤发生和发展过程中是否起着主导作用，目前还缺乏有力的证据，有待进一步研究证实。发病中还有哪些致病因素参与其中，从基因和分子水平来阐明其发病原因和作用机制，也是今后需要进一步研究探讨的课题。