

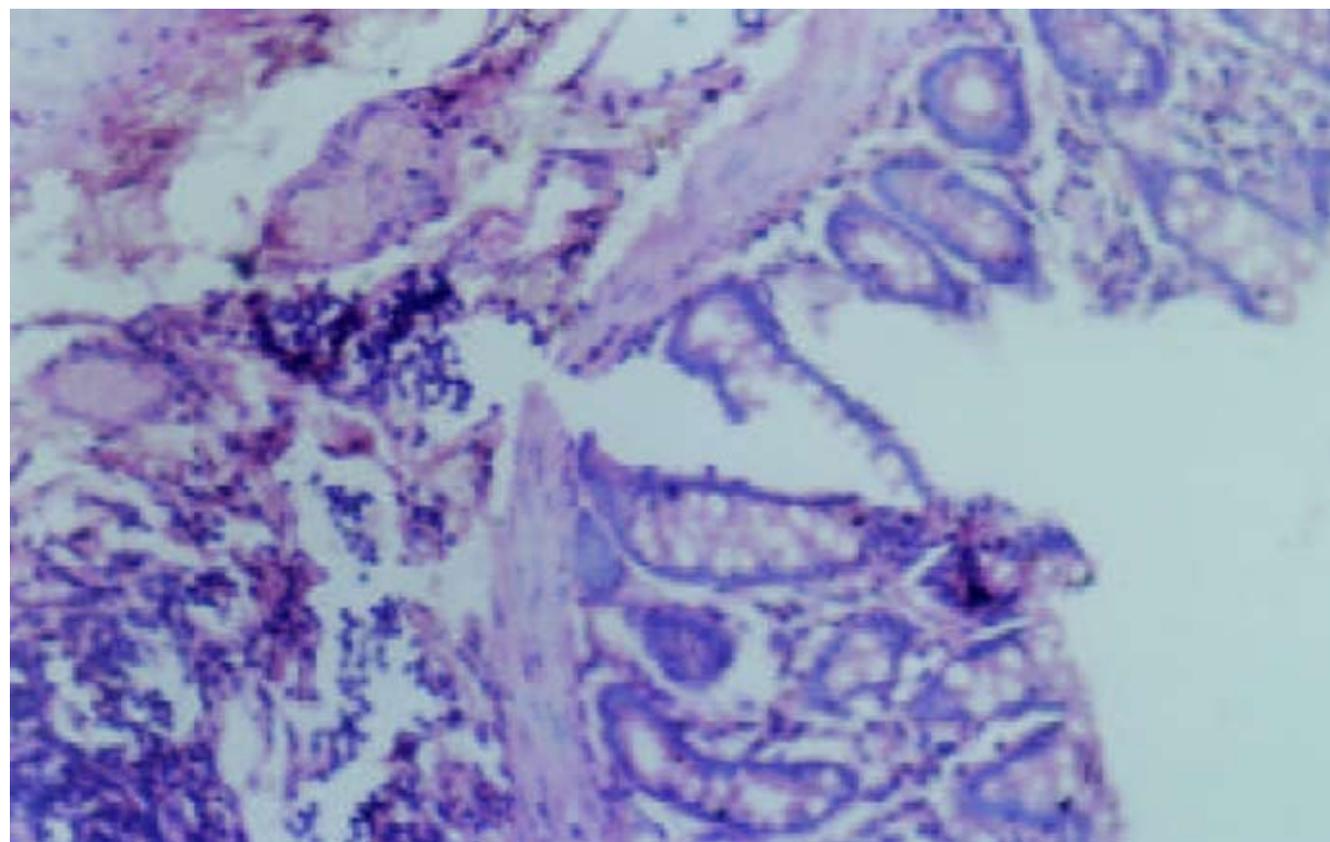
ISSN 1009-3079  
CN 14-1260/R

# 世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2004年2月15日 第12卷 第2期 (Volume 12 Number 2)



**2/2004**

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,  
2003年百种中国杰出学术期刊,  
《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学  
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊。  
世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,  
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,  
俄罗斯《文摘杂志》收录。

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2004年2月15日 第12卷 第2期 (总第119期)

述 评	253 肝炎病毒蛋白对肝细胞基因组转录调节及信号转导机制的影响 成军
胃 癌	258 胃癌线粒体DNA拷贝量的变化 韩琤波, 李凡, 杨雪飞, 毛晓韵, 吴东璇, 辛彦 262 胃癌前病变p21 <sup>ras</sup> , c-erbB-2, p53表达与中医证候的关系 胡玲, 劳绍贤 266 胃癌淋巴结转移预测的多因素分析 黄宝俊, 徐惠绵, 赵雨杰, 王天骄, 田大彤, 陈峻青
肝 癌	271 人鼠嵌合Fab抗体通用表达载体的构建和抗人肝癌相关抗原HAb18G嵌合Fab抗体的表达 邢金良, 杨向民, 张思河, 姚西英, 梁瑞安, 陈志南 276 肝癌细胞H <sub>22</sub> 与树突状细胞杂交瘤苗的实验研究 张娟, 张锦堃, 卓少宏 280 肝细胞癌hOGG1 mRNA及其蛋白的表达 周秀敏, 林菊生, 章金艳, 张莉, 周鹤俊 283 小鼠AFP-CTLA4融合蛋白真核表达载体的构建及鉴定 田耕, 易继林
病毒性肝炎	286 丙型肝炎病毒核心蛋白结合视黄醇脱氢酶11蛋白 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟 291 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A结合蛋白37小鼠同源基因的克隆化及结构分析 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟 298 新生儿HBe Ag在HBV宫内感染中的作用 邵中军, 门可, 徐剑秋, 徐德忠, 闫永平, 张景霞 302 应用抑制性消减杂交技术筛选TAHCCP2的反式调节基因 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 王春花 306 基因表达谱芯片筛选NS5ATP3转染细胞差异表达基因 刘妍, 杨倩, 成军, 王建军, 纪冬, 党晓燕, 王春花 311 基因表达谱芯片技术筛选NS5A-TP4蛋白反式调节基因 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 洪源, 张树林 315 HCV包膜糖蛋白E2基因的克隆、蛋白表达及纯化 杜德伟, 贾战生, 秦鸿雁, 刘秋平, 周永兴, 韩 骅 319 应用表达谱芯片技术对NS5ATP7反式调节基因的研究 张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 梁耀东, 李强, 刘敏 323 应用表达谱芯片技术筛选NS5ATP9反式调节基因的研究 李强, 梁耀东, 成军, 王琳, 王建军, 张健, 刘妍, 程明亮 327 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒反式调节靶基因的抑制性消减杂交和基因芯片分析结果的比较 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 王琳 332 多对型特异性引物巢式PCR检测湖南省乙肝病毒基因型 温志立, 谭德明
基础研究	336 人肝素酶基因正反义腺病毒表达载体的构建及鉴定 蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 杨孟华, 王东旭 339 正常与硬化肝组织基因表达差异的初步分析 刘连新, 陈志宏, 武林枫, 李宏伟, 刘芝华, 姜洪池, 王秀琴, 吴旻 344 癌基因对大鼠肝卵圆细胞分化和转化的影响 廖冰, 薛玲, 何萍, 赵国强, 车丽洪 347 中药抗纤软肝颗粒抑制PDGF诱导的肝星状细胞MEK-1和c-fos表达 杨玲, 朱清静, 笪邦红, 张赤志

	<p>351 实验性肝硬化大鼠小肠血红素氧合酶的表达 田德安,周晓黎</p> <p>355 胃黏膜保护剂预防幽门螺杆菌培养上清液所致小鼠胃黏膜损伤 崔梅花,胡伏莲,董欣红</p> <p>359 结肠充气CT对检测大肠肿瘤的敏感性和特异性 王毅,龚水根,张伟国,陈金华,张连阳,陈金萍</p> <p>363 胃溃疡大鼠胃泌素、生长抑素和GD细胞的变化 孙凤莲,宋于刚,覃汉荣</p> <p>367 当归多糖对大鼠乙酸性结肠炎的保护作用 刘少平,董卫国,余保平,罗和生,于皆平,吴东方</p> <p>371 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响 周燕红,于皆平,何小飞,余细球</p>
<b>临床研究</b>	<p>376 恶性腹水基质金属蛋白酶活性分析 孙晓敏,董卫国,余保平,罗和生,于皆平</p> <p>379 慢性浅表性胃炎脾胃湿热证与水通道蛋白4蛋白表达的关系 周正,劳绍贤,黄志新,张向菊,黄烈平,匡忠生</p> <p>382 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞的变化 王静,梁列新,张志雄,李国华,钱伟,侯晓华</p> <p>385 MRI评估肝硬化再生结节和退变结节 徐海波,孔祥泉,熊茵,冯敬生</p>
<b>焦点论坛</b>	<p>390 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟,张桂英,陈凤英,晏仲舒</p> <p>391 乙型肝炎病毒DNA聚合酶末端蛋白研究进展 陈国凤,成军,张玲霞,李莉</p> <p>393 乙型肝炎病毒DNA多聚酶P结构域研究进展 陈国凤,成军,王琳,张玲霞,李莉</p> <p>397 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对转录因子ATF-1的调节 王春花,成军,郎振为,王建军,刘妍,杨倩,党晓燕</p> <p>401 乙型和丙型肝炎病毒与胱冬肽酶3的关系 纪冬,成军,王建军,刘妍,杨倩,党晓燕,王春花</p> <p>403 乙型和丙型肝炎病毒对转录因子Nur77的调节 成军</p> <p>406 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对层粘连蛋白表达的调节 王建军,成军,刘妍,杨倩,纪冬,王春花</p> <p>408 转录因子C/EBP<math>\beta</math>的生物学功能 成军</p> <p>412 活性氧簇与肝炎病毒的关系 梁耀东,成军,吴君,程明亮</p> <p>414 趋化因子与病毒性肝炎的关系 陆茵英,成军,张玲霞</p> <p>417 病毒性肝炎发病机制中环氧合酶的作用 刘敏,成军,张树林</p>
<b>文献综述</b>	<p>420 乙型肝炎病毒DNA整合的机制及后果 成军</p> <p>428 基质金属蛋白酶及其抑制物与实验性肝纤维化 郑伟达,王小众</p> <p>432 建议将亚临床型肝性脑病更名为轻微型肝性脑病 贾林</p> <p>434 右叶部分肝移植临床解剖进展 刘静,高毅,钟世镇</p> <p>439 肝素酶:抗肿瘤转移的新靶点 陈陵,杨仕明,房殿春,王东旭</p> <p>443 肠道上皮特异性基因CDX2 宋艳,李凌</p> <p>446 细胞凋亡与肝移植免疫耐受 刘静,汪爽,高毅,孙尔维</p> <p>450 自身免疫性肝炎诊断与治疗 欧强,谭德明</p> <p>454 VEGF在肝癌中作用 邓靖宇,何生</p>
<b>研究快报</b>	<p>459 胰腺癌组织中COX-2和Bcl-2蛋白的表达及其意义 刘希双,李玉军,田宇彬,张翠萍,孙显路,魏良洲,薛会光,刘思良</p> <p>461 3种富集胃癌患者外周血中胃癌细胞方法的比较 陈健,郭俊明,金之瑾,肖丙秀</p> <p>464 肠缺血再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输功能的影响 黎君友,孙丹,吕艺,晋桦,胡森,盛志勇</p> <p>467 MUC5AC蛋白在大肠肿瘤中的表达及意义 卜晓东,李俐,黄培林,樊克武,赵建华</p> <p>469 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟,张桂英,陈凤英,晏仲舒</p> <p>471 肛管直肠原发性恶性黑色素瘤临床病理特点 赵尔增,张建中,岳茂兴</p> <p>473 细胞周期蛋白D1 RT-PCR ELISA的建立及其初步应用 陈兵,张雪,府伟灵,常杭花,刘为纹,徐采朴,史景泉</p> <p>476 胃肠激素与不同类型反流所致食管炎的相关性 王雯,李兆申,许国铭,张志坚,林克荣</p> <p>477 尼美舒利对结肠癌细胞ICAM-1 mRNA表达的影响 刘伟,张超</p>

## 临床经验

- 480 腹腔镜次/全结肠切除术治疗结肠慢传输性便秘4例 张连阳, 刘宝华, 陈金萍, 文亚洲  
481 内镜下氩离子凝固术治疗胃息肉 毛振彪, 黄介飞, 陆静娴, 俞智华, 倪润洲  
483 肝硬化门脉系统食管侧支血流动力学与血浆内皮素的关系 肖际东, 李瑞珍, 周平, 朱文晖  
485 大黄与促肝细胞生长素联合治疗重型肝炎 黄以群, 林珍辉, 纪树梅, 王喻, 王崇国  
487 5 km长跑对新兵胆囊排空及胃肠激素的影响 李小丽, 郝悦, 杨凤江, 邹勤, 李智力, 李晓春  
488 药物性肝病41例 苏淑慧, 王春平, 李迎新, 冯永毅  
490 数字化成像结肠双对比造影检查345例 何发清, 官泳松, 王小林, 郭兵文, 孙龙  
492 胃十二指肠隐匿性穿孔的诊断与治疗4例 詹世林, 吴良平, 蒲森水  
494 胃癌及癌前病变中胃黏膜上皮细胞增生及凋亡相关基因蛋白表达 孟华, 刘丽娜, 吕申  
497 胃十二指肠疾病与幽门螺杆菌感染的相关性分析 周惠萌, 范欣敏  
499 原发性胆汁性肝硬化37例临床分析 董正芳, 程留芳  
501 射频消融联合局部热化疗治疗特殊部位肝脏恶性肿瘤 田伏洲, 陈涛, 蔡忠红, 陈琪  
503 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒

## 封面故事

- 371 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响  
周燕红, 于皆平, 何小飞, 余细球 世界华人消化杂志 2004; 12(2): 371-375  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v12/i2/371.htm>

## 国际会议

- 13th United European Gastroenterology Week, UEGW  
October 15-20, 2005
- American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting  
October 28-November 2, 2005
- ISGCON 2005  
November 11-15, 2005  
[isgcon2005@yahoo.co.in](mailto:isgcon2005@yahoo.co.in)  
[www.isgcon2005.com](http://www.isgcon2005.com)
- Advanced Capsule Endoscopy Users Course  
November 18-19, 2005  
[www.asge.org/education](http://www.asge.org/education)
- II Latvian Gastroenterology Congress  
November 29, 2005  
[gec@stradini.lv](mailto:gec@stradini.lv)  
[www.gastroenterologs.lv](http://www.gastroenterologs.lv)
- 2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases  
December 1-3, 2005  
[c.chase@imedex.com](mailto:c.chase@imedex.com)  
[www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm](http://www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm)
- 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus  
February 22-25, 2006  
[isde@sapmea.asn.au](mailto:isde@sapmea.asn.au)  
[www.isde.net](http://www.isde.net)

# 世界华人消化杂志

## Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名  
陈可冀 题写版权刊名  
(半月刊)

创刊 1993-01-15  
改刊 1998-01-25  
出版 2004-02-15  
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生  
编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁  
英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会  
030001, 山西省太原市双塔西街77号  
出版 世界胃肠病学杂志社  
100023, 北京市2345信箱  
E-mail: [wjgd@wjgnet.com](mailto:wjgd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>  
电话: 010-85381901  
传真: 010-85381893  
印刷 北京科信印刷厂  
发行 国内: 北京报刊发行局  
国外: 中国国际图书贸易总公司  
(100044, 北京市399信箱)  
订购 全国各地邮电局  
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部  
(100023, 北京市2345信箱)  
电话: 010-85381901  
传真: 010-85381893

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.

### 特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

2005年版版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079  
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262  
国外代号 M 4481

国内定价 每期24.00元 全年576.00元

广告经营许可证  
1401004000050

# 肝炎病毒蛋白对肝细胞基因组转录调节及信号转导机制的影响

成军

成军, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
成军, 男, 1963-08-17 生, 山东省淄博市人, 汉族. 1986 年毕业于第一军医大学军医系, 获医学学士学位, 1989 年毕业于军医进修学院, 获传染病学硕士学位, 1994 年毕业于北京医科大学, 获传染病学博士学位, 1994-11-17/1997-12-01 在美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病学完成博士后研究, 主任医师. 回国后从事传染病特别是病毒性肝炎的临床工作和基础研究, 主要学术研究方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制. 国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

## 摘要

乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)是引起慢性病毒性肝炎的主要肝炎病毒类型, 而且也是肝细胞癌(HCC)的重要病因. HBV 和 HCV 感染肝细胞之后, 表达出肝炎病毒蛋白, HBV 和 HCV 蛋白通过与转录因子蛋白结合, 或通过对于肝细胞内信号转导通路的影响, 使肝细胞基因组的转录表达产生异常的调节, 从而影响 HCC 的发生.

成军. 肝炎病毒蛋白对肝细胞基因组转录调节及信号转导机制的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(2):253-257  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/253.asp>

## 0 引言

HBV 和 HCV 是引起慢性病毒性肝炎的主要肝炎病毒类型, 而且也是肝细胞癌(HCC)的重要病因<sup>[1-2]</sup>. 虽然临床研究资料和流行病学研究资料都显示 HBV、HCV 感染参与 HCC 的形成有关, 但是, 多年来对于这 2 种肝炎病毒参与 HCC 发生、发展的机制一直不十分清楚<sup>[3-4]</sup>. 近年来人类基因组计划(HGP)和功能基因组学(functional genomics)研究为阐明肝炎病毒与 HCC 之间的关系, 提供了大量的信息和技术平台, 使得关于肝炎病毒与 HCC 发生之间的关系和机制研究, 进入了一个崭新的阶段<sup>[5-6]</sup>. 研究表明, HBV 和 HCV 蛋白对于肝细胞基因组转录调节机制的影响占有十分重要的地位. HBV 和 HCV 感染肝细胞之后, 表达出肝炎病毒蛋白, 这种正常的肝细胞中不存在的蛋白类型, 通过直接或间接的途径, 与转录因子蛋白结合, 或通过对于肝细胞内信号转导通路的影响, 对于肝细胞基因组的转录表达产生异常的调节, 抑癌基因(tumor suppression gene)的

表达水平下降或失活, 以及原癌基因(proto-oncogene)和癌基因(oncogene)的激活、过表达, 都对 HCC 的发生发展产生影响<sup>[7-10]</sup>.

## 1 乙型肝炎病毒截短型表面抗原中蛋白对肝细胞基因组转录调节的影响

HBV 表面抗原大蛋白(LHBs)以及 C-末端截短型的表面抗原中蛋白(MHBst)组成了 HBV 前-S2 反式激活蛋白家族. 这一蛋白家族成员的反式激活作用主要取决于前-S2 结构域在细胞质中的定向<sup>[11-12]</sup>. Hildt et al<sup>[13]</sup>研究发现 MHBst 是蛋白激酶 C(PKC)催化的 Ser28 位点磷酸化修饰依赖性的. 这一磷酸化位点的存在是这一反式激活作用蛋白家族所必须具备的结构条件. MHBst 可以触发 PKC 依赖性的 c-Raf-1/Erk2 信号转导途径的激活, 这也是 MHBst 激活转录因子 AP-1、NF- $\kappa$ B 的先决条件. 为了研究 MHBst 体内反式激活作用的病理生理学意义, 建立了表达 MHBst 的转基因小鼠模型, 在这一模型的肝脏中观察到了前-S2 依赖性的 c-Raf-1/Erk2 持续激活, 造成肝脏细胞的增生能力提高. 在 15 月龄的小鼠中肝脏肿瘤的发生率显著升高. 这些研究资料表明前-S2 反式激活剂 LHBs、MHBst 具有促进肿瘤形成的作用, 主要机制是通过激活肝细胞增生相关的蛋白酶类.

大规模的流行病学调查研究结果表明, HBV 携带者较非携带者发生 HCC 的危险度提高了 10 倍. 几乎所有的 HBV 相关的 HCC 肿瘤细胞基因组中都有 HBV DNA 的整合. 整合在肝细胞基因组中的 HBV DNA 可能编码 2 种不同反式激活病毒蛋白 HBxAg 和前-S2 反式激活蛋白. 根据肿瘤发生的 2 步学说, 前-S2 反式激活蛋白的作用具有促癌作用蛋白的性质, 主要是通过 PKC/c-Raf-1/MAP2 激酶信号转导系统<sup>[14-16]</sup>.

C-末端截短 167 个氨基酸残基 MHBst(MHBst167)对于 HBV 基因组的复制和表达也具有重要的调节作用. 在 Chang 或 HepG2 细胞的瞬时转染实验研究中发现, MHBst167 可以促进 HBV 增强子 I 指导的氯霉素乙酰化酶(CAT)的表达, 但是对于 HBV 其他的调节基因序列如 X 启动子序列、表面抗原基因启动子 I、II, 以及增强子 II 和核心基因启动子等没有显著影响. 目前还没有 MHBst167 与 DNA 之间直接相互作用的证据, Caselmann et al<sup>[17]</sup>推测 MHBst167 的这种调节作用主要是通过对于肝细胞信号转导影响. 另外的研究还发现转录因子蛋白 Sp1、

AP1、NF- $\kappa$ B 可以介导 MHBst167 的反式激活作用. 但是其他的转录因子如 CREB、NF1、C/EBP 等与 MHBst167 的反式激活作用无关. 这些研究结果表明 MHBst167 是一种具有多种生物学活性的反式调节蛋白.

2 乙型肝炎病毒X蛋白对肝细胞基因组转录调节的影响  
HBxAg 是一种具有多种生物学活性的反式激活作用蛋白<sup>[18-20]</sup>. 为了阐明 HBxAg 在 HCC 发生发展中的作用, Wu et al<sup>[21]</sup>利用表达 HBxAg 的腺病毒载体感染的新鲜的肝癌细胞进行基因表达系列分析(serial analysis of gene expression, SAGE), 获得了 19 501 个表达序列标签, 代表了 1 443 个独立的基因, 是 HBxAg 反式激活作用的较为完整的表达谱研究. SAGE 的结果也经过杂交分析证实, 其中 57 个基因的表达水平上调, 46 个基因的表达水平下调, 表达水平的变化都在 5 倍以上. 上调的基因类型包括 3 种: 核糖体蛋白、具有锌指结构的转录因子蛋白, 以及与蛋白降解途径有关的蛋白类型. 因此认为 HBxAg 是一种具有多种生物学活性的调节蛋白, 包括蛋白的合成、基因表达的调节和蛋白的降解等.

Tarn et al<sup>[22]</sup>对 HBxAg 在肝细胞癌发生发展中的作用进行了研究. 选择的细胞系为来源于 AML12 的分化细胞系 3pX-1 以及去分化细胞系 4pX-1, 在转染 HBxAg 之后分别发生恶性转化、不发生恶性转化. HBxAg 表达载体转染之后只有 4pX-1 细胞中的 Stat3 信号被激活, 说明 Stat3 信号的激活与 HBxAg 的恶性转化作用无关. 最大程度的 Stat3 的激活过程需要其 Ser727 位点的磷酸化修饰, 主要是有丝分裂原刺激信号介导的过程. 以显负性突变体或者有丝分裂原信号系统的抑制剂也可以抑制 Stat3 信号转导系统的激活. 如应用 p38/MAPK 的特异性抑制剂 SB203580 即可以抑制 HBxAg 依赖性的 Stat3 信号转导系统的激活. HBxAg 只对 4pX-1 细胞中的 p38/MAPK 和 Stat3 具有激活作用, 而且 p38/MAPK 的激活过程是 Ca<sup>2+</sup>、c-Src 依赖性的. HBxAg 依赖性的 p38/MAPK 激活对于 Cdc25C 有磷酸化修饰和灭活作用, 磷酸化修饰的位点是 Ser216, 因此激活的时机是 G2/M 检验点, 导致 4pX-1 细胞生长阻滞. 在低分化的肝细胞 4pX-1 中表达 HBxAg 可以激活在肝再生过程中活跃的信号转导系统. 这一研究结果表明, HBxAg 在肝细胞中的表达, 影响不同的信号转导途径, 主要取决于肝细胞本身的分化状态<sup>[23-26]</sup>.

Carretero et al<sup>[27]</sup>报道 HBxAg 可以激活转录因子蛋白激活 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cells, NF-AT)这种免疫系统中重要的转录因子蛋白. 这一激活过程是钙/钙神经素(calcineurin)依赖性过程, 与这一转录因子蛋白的去磷酸化修饰以及细胞核内的转位过程有关. HBxAg 与钙协同刺激 NF-AT 依赖性的转录过程, 说明 HBxAg 激活 NF-AT 还可能另有途径. 另外还发现 HBxAg 可激活 NF-AT1 转录因子蛋白的 N-末端转录激活结构域(N-terminal transcription activation domain,

TAD), 具体机制是通过蛋白-蛋白之间的相互作用. 将 HBxAg 定位在细胞核中表达, 并不影响其激活 NF-AT1 的功能. 但是, HBxAg 分子中蛋白结合结构域的缺失突变则严重影响 HBxAg 对 NF-AT1 的反式激活作用<sup>[28-30]</sup>.

Lee et al<sup>[31]</sup>构建了 HBxAg 的表达载体, 转染 Chang X-34 细胞系, 以 Northern、Western blot 方法检测白介素-18(IL-18)的表达. 应用流式细胞学技术对于细胞膜上的 FasL 表达水平进行检测. 发现 HBxAg 表达可以诱导 IL-18 的表达水平, FasL 表达水平也相应升高. 如果以抗-IL-18 的抗体阻断 IL-18 的活性, 则可以阻断 HBxAg 表达载体转染的肝细胞的 FasL 的表达, 说明 HBxAg 对于 FasL 的表达上调是通过 IL-18 实现的. 在 HBxAg 转基因小鼠的肝细胞中也检测到了 IL-18 的表达<sup>[32-34]</sup>.

3 丙型肝炎病毒核心蛋白对肝细胞中转录因子蛋白活性的影响

HCV 核心蛋白的序列相对保守, 在其分子结构中具有核定位信号(NLS), 在功能上不仅参与 HCV 病毒颗粒的形成, 而且具有多种生物学功能, 在 HCV 感染的肝细胞的细胞周期、细胞凋亡、信号转导等过程中, 都有十分重要的调节作用. Shrivastava et al 研究了 HCV 核心蛋白的表达对细胞核转录因子的异常调节作用. 先前的研究发现肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )可以激活肝细胞中的转录因子 NF- $\kappa$ B, 但是转染 HCV 核心蛋白的表达载体后, HCV 核心蛋白的表达, 可以抑制 TNF $\alpha$  对转录因子 NF- $\kappa$ B 的诱导能力. 转录因子 NF- $\kappa$ B 的诱导因素很多, 除了 TNF $\alpha$  之外, 过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和美洲商陆(PMA)等都能诱导 NF- $\kappa$ B 的活性, 但是 HCV 核心蛋白的表达对由这些因素诱导的 NF- $\kappa$ B 的活性升高均具有显著的抑制作用<sup>[35-40]</sup>. 转录因子 NF- $\kappa$ B 向细胞核内的转位, 发生在 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化修饰和蛋白降解之后, 因此, 对 HCV 核心蛋白的表达对 TNF $\alpha$  诱导的 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白降解的影响也进行了研究. 正常情况下, TNF $\alpha$  诱导的 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白降解一般在 10-15 min, 在 30 min 时重新出现. 在表达 HCV 核心蛋白的细胞中几乎见不到 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白降解现象. 因此, HCV 核心蛋白可显著抑制 TNF $\alpha$  诱导的 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白降解, 可以解释 HCV 核心蛋白对于 TNF $\alpha$  对转录因子 NF- $\kappa$ B 的诱导能力进行抑制的机制. I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白降解过程, 需要有其蛋白分子中丝氨酸残基位点的磷酸化修饰, 因此, 推测 HCV 核心蛋白对于 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白降解的抑制和 TNF $\alpha$  对转录因子 NF- $\kappa$ B 的诱导能力的抑制, 可能是通过对于这一步蛋白磷酸化修饰来实现的<sup>[41-45]</sup>.

肝细胞核中的另外一个转录因子蛋白就是 AP-1, Shrivastava et al 研究结果表明, HCV 核心蛋白对 AP-1 具有激活作用. 已知 TNF $\alpha$  对 AP-1 转录因子也具有激活作用, 因此研究了 HCV 蛋白表达对不同剂量的 TNF $\alpha$  对于 AP-1 转录因子活性的诱导作用的影响. 在时效研

究中发现, 受到  $\text{TNF}\alpha$  的刺激之后, MCF-1 细胞中的 AP-1 转录因子活性 30 min 开始出现, 并在 2 h 内达到高峰. 凝胶阻滞实验(EMSA)研究结果也证实了这一研究结果的 AP-1 转录因子的特异性. HCV 核心蛋白表达时, MCF-1 细胞中 AP-1 转录因子活性即已达到高峰, 受到  $\text{TNF}\alpha$  的刺激之后不再升高. 为了排除 HCV 核心蛋白表达对 AP-1 转录因子激活的细胞特异性, 对于 HeLa、NIH3T3 细胞系的研究结果也说明了同样的趋势<sup>[46-48]</sup>.

JNK 信号通路在肝细胞中也具有十分重要的地位和作用.  $\text{TNF}\alpha$  对于 JNK 信号通路也具有显著的激活作用, 研究 HCV 核心蛋白表达影响  $\text{TNF}\alpha$  对 JNK 信号通路的激活作用时发现, MCF-1 细胞受到  $\text{TNF}\alpha$  的刺激之后 10-15 min, JNK 转录因子活性开始升高, 但是表达 HCV 核心蛋白的细胞本身就具有较高的 c-Jun 激酶活性, 再受到  $\text{TNF}\alpha$  的刺激之后, c-Jun 激酶活性没有进一步的升高. 说明 HCV 核心蛋白表达激活了 c-Jun 激酶活性, 类似 HCV 核心蛋白诱导 AP-1 转录因子活性一样<sup>[49-50]</sup>.

丝裂原激活蛋白激酶激酶(MAPKK)在激酶信号转导链中位于 JNK 激活的上游. 如果 MAPKK 缺陷, 其下游的 JNK 和 AP-1 转录因子活性就缺失. 已知  $\text{TNF}\alpha$  可诱导 MAPKK 蛋白激酶活性. 因此, Shrivastava et al 也研究了 HCV 核心蛋白的表达对 MAPKK 蛋白激酶活性的影响. 细胞受到  $\text{TNF}\alpha$  的刺激后 30-60 min, MAPKK 激酶活性开始出现. 表达 HCV 核心蛋白的细胞系, 已经具备了较高的基础水平的 MAPKK 蛋白激酶活性, 再用  $\text{TNF}\alpha$  进行诱导之后, MAPKK 激酶活性没有进一步的升高. 说明 HCV 核心蛋白的表达对于 MAPKK 激酶活性具有显著的激活作用<sup>[51-54]</sup>.

上述 HCV 核心蛋白对于转录因子的活性调节具有十分重要的意义, 因为 NF- $\kappa$ B、AP-1、JNK 和 MAPKK 在肝细胞中具有十分广泛而且重要的调节作用. 因此, HCV 核心蛋白的表达对于上述 4 种转录因子蛋白或蛋白激酶活性具有调节作用, 说明 HCV 核心蛋白的表达可以通过对于这些调节因子的作用, 对于 HCV 感染的肝细胞产生十分广泛的作用<sup>[55-56]</sup>.

HCV 核心蛋白对肝细胞中 2', 5' - 寡腺苷酸合成酶(2', 5' - AS)基因转录水平具有激活作用. 病原体侵入人体之后, 通过其自身的一些成分, 抑制宿主细胞中的防御机制和抗病原体的机制, 有利于感染的形成和病原体的持续存在, 这是人与病原体长期共存形成的一种机制, 几乎是一个普遍的规律. 虽然 2', 5' - AS 是干扰素  $\alpha$ ( $\text{IFN}\alpha$ )诱导的主要的抗病毒蛋白类型, 但是发现 HCV 核心蛋白对于 2', 5' - AS 的基因转录活性具有显著的诱导作用. 在报告基因表达载体的构建和肝细胞转染实验研究中, Naganuma et al 发现 HCV 核心蛋白的表达对干扰素刺激的应答元件(ISRE)信号转导途径具有显著的影响. 不同基因型的 HCV 核心蛋白对于 2', 5' - AS 基因启动子的转录活性均具有显著的激

活作用, 但是 HCV 的 E1、E2、NS5A 等结构和非结构蛋白对于肝细胞中的 2', 5' - AS 基因启动子转录活性没有显著影响. 在 PH5CH8 细胞系受到 500 U/ML 的  $\text{IFN}\alpha$  的刺激之后, 2', 5' - AS 基因启动子转录活性提高约 6 倍, 当  $\text{IFN}\alpha$  的剂量达到 1000 U/ML 时, PH5CH8 细胞不再生长, 而且出现形态学改变.  $\text{IFN}\alpha$  的刺激 2', 5' - AS 基因启动子转录活性的作用在 6-12 h 出现. 在其他类型的肝癌细胞系如 HepG2、PLC/PRF/5 中也得到了相似的结果. HCV 核心蛋白编码基因的反义 RNA 表达载体的共转染实验研究表明, 反义 RNA 可以抑制 HCV 核心蛋白基因诱导的 2', 5' - AS 基因启动子转录活性<sup>[57-60]</sup>.

#### 4 丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 对肝细胞基因组转录调节的影响

HCV 持续感染的形成有赖于 HCV 对于机体的免疫防御系统的抑制作用. Foy et al<sup>[61]</sup>的研究发现 HCV NS3/4A 丝氨酸蛋白酶对于干扰素调节因子-3(interferon regulatory factor-3, IRF-3)的磷酸化和功能的影响. NS3/4A 蛋白酶结构位点的突变或者应用其蛋白酶活性的抑制剂即可以逆转其对于 IRF-3 的抑制作用. 另外, IRF-3 的显负性突变体或者具有持续表达活性的 IRF-3 突变体, 分别具有增强或抑制 HCV RNA 复制的作用. 因此, NS3/4A 蛋白酶代表了一种重要的抗 HCV NS3 蛋白酶的重要的治疗靶点. 重新恢复 IRF-3 的表达活性可能是控制 HCV 感染的重要途径之一.

He et al<sup>[62]</sup>研究了羧基末端截短型 NS3 蛋白突变体在肝细胞肿瘤形成过程中的作用. 以这种截短型 NS3 蛋白的表达载体转染 QSG7701 细胞系, 以 G418 进行筛选之后, 以免疫细胞化学技术和聚合酶链反应(PCR)技术证实 NS3 基因的表达. 对于转染之后的细胞的增生能力、非接触式生长能力以及在裸小鼠体内形成肿瘤的能力进行研究. 发现在转染的细胞质中有高水平的 HCV NS3 蛋白的表达, 发现转染细胞的生长能力显著提高, 不仅可以称非接触式生长, 而且在接种裸小鼠之后的第 15 d 可以形成肿瘤. 肿瘤组织中的 c-myc 蛋白表达水平也显著增多. 认为羧基末端截短型的 HCV NS3 具有显著的恶性转化作用, 而且这种转化作用可能与 c-myc 的表达水平升高有关<sup>[63-65]</sup>.

HCV NS3 蛋白在细胞增生和细胞凋亡的调节中也具有十分重要的作用. 但是, 长期以来这种调节作用的具体机制不十分清楚. Kwun et al<sup>[66]</sup>发现 NS3 蛋白特异性抑制肿瘤抑制基因 p21 基因启动子的转录表达活性, 而且是剂量依赖性的特点. NS3 蛋白的这一特点不是细胞类型特异性的, 而且与核心蛋白之间也没有协同作用. NS3 蛋白的这种抑制作用是 p53 依赖性的, 因为当 p21 基因启动子序列中的 p53 结合位点缺失突变之后, NS3 蛋白对于 p21 启动子转录活性的抑制作用完全消失. 另外, p21 启动子序列中的 p53 结合位点足以介导

NS3 对于 p21 启动子转录活性的抑制作用. 表明 NS3 抑制 p21 启动子转录活性主要是通过对 p53 活性的调节实现的. NS3 蛋白对于 p21 启动子转录活性的抑制作用的结构位点位于蛋白酶活性位点, 但是 NS3 蛋白的酶学活性并不是其抑制 p21 启动子转录活性所必需的. NS3 蛋白对于 p53 基因的转录水平和蛋白的稳定性没有影响, 表明 NS3 蛋白通过与 p53 蛋白之间的相互作用机制来抑制 p21 的启动子转录活性. 表达 NS3 的细胞的生长速度是母本细胞的 2 倍, 说明 NS3 蛋白对于 p21 启动子转录活性的抑制结果造成了细胞增生速度的加快<sup>[67-68]</sup>.

## 5 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 对肝细胞基因组转录调节的影响

HCV NS5A 蛋白的生物学功能目前还不十分清楚, 但是近几年来发现 HCV NS5A 蛋白与 HCV 感染后的 IFN $\alpha$  抗性机制有关. 甚至在 NS5A 的编码基因区还鉴定出一段所谓的 IFN $\alpha$  敏感决定区(ISDR), 近年来分子生物学机制的研究表明, NS5A 蛋白与 IFN $\alpha$  抗性有关的分子生物学机制, 可能是 NS5A 对于双链 RNA 激活蛋白激酶 (PKR) 的活性调节有关. 利用酵母双杂交技术发现 NS5A 蛋白与 PKR 蛋白结合, NS5A 蛋白与 PKR 结合的位点恰好位于 PKR 的二聚体形成的位点, 即 244-296 aa 序列结构. 因此, NS5A 蛋白对于 PKR 蛋白激酶活性的干扰机制, 至少部分是通过干扰 PKR 二聚体的形成来实现的. 也是通过酵母双杂交技术证实, 与 PKR 结合的 NS5A 结构, 与 ISDR 区相重叠. 但是也注意到, NS5A 的 ISDR 区是 NS5A 蛋白与 PKR 结合的先决条件, 但不是全部条件. 临床上注意到 HCV 对于 IFN $\alpha$  疗效的差别, 而且部分患者归结于 NS5A 蛋白序列的差别. 研究结果表明, 来源于 IFN $\alpha$  不同敏感性的患者的 HCV NS5A 的 ISDR 序列不同, 这种序列的差别, 也影响到相应的 NS5A 蛋白与 PKR 蛋白之间的结合能力. 如果能够与 PKR 蛋白结合的 NS5A 蛋白的 ISDR 区发生突变, 那么就会严重影响 NS5A-PKR 蛋白之间的结合能力. 不只是与 PKR 蛋白之间的结合能力受到影响, NS5A 蛋白的 ISDR 区的序列改变, 可以导致 NS5A 蛋白的生物学功能的丧失. 野生型的 NS5A 蛋白与 PKR 结合以后, PKR 功能受到影响, 表现在 eIF-2 $\alpha$  磷酸化水平的降低, 从而导致蛋白合成水平升高, 细胞生长能力增加. 在 ISDR 区进行多个位点的基因突变之后, 严重影响其与 PKR 蛋白之间的结合, 并导致功能的丧失. 在酵母细胞中如此, 在哺乳动物细胞中的研究结果也是如此<sup>[69-72]</sup>.

HCV NS5A 蛋白对于肝细胞中的信号转导的影响, 还包括改变细胞内钙离子的浓度、诱导氧化应激、激活转录因子 Stat3 和 NF- $\kappa$ B 等. Gong et al 利用 EMSA 技术, 研究了 NS5A 蛋白对于细胞转录调节的影响. 研究的对象包括 NF- $\kappa$ B、AP-1、Stat-3 和 Oct-1 等. 结果表明 NS5A 蛋白的表达可以激活 NF- $\kappa$ B、Stat-3. NS5A 蛋白对于 Stat-3 的激活作用具有不寻常的意义, 因为一般

情况下是白介素 -6(IL-6)、表皮生长因子(EGF)等生长因子能激活 Stat-3 的转录. 对于表达 NS5A 蛋白的细胞中的 Stat-3 蛋白的酪氨酸磷酸化状态进行研究, 发现 NS5A 蛋白可以激活 Stat-3. 但是 NS5A 的缺失突变体却不具备这样的功能. Gong et al 用 NF- $\kappa$ B 识别的保守序列的串联启动子的报告基因表达载体的构建和细胞转染技术, 研究了 NS5A 蛋白对于 NF- $\kappa$ B 依赖性的转录调节机制<sup>[72-74]</sup>.

## 6 参考文献

- 1 夏小兵, 成军, 王刚, 杨继珍, 刘妍, 董菁, 王琳, 李克. 人肝再生增强因子在毕赤酵母中的表达. 世界华人消化杂志 2001;9:743-746
- 2 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及接种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325
- 3 成军, 李莉. 清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制. 世界华人消化杂志 2002;10:73-76
- 4 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒 NS2 基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132
- 5 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:426-429
- 6 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBcAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:422-425
- 7 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调 c-myc 基因表达的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:141-144
- 8 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- 9 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 10 洪源, 成军. 肝炎病毒 DNA 疫苗的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:221-223
- 11 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:213-215
- 12 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:217-219
- 13 Hildt E, Munz B, Saher G, Reifenberg K, Hofschneider PH. The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *EMBO J* 2002;21:525-535
- 14 Hildt E, Hofschneider PH. The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:315-329
- 15 钟彦伟, 成军, 王刚, 洪源, 陈菊梅. 肝炎病毒基因工程抗体的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:219-221
- 16 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. 世界华人消化杂志 2002;10:161-164
- 17 Caselmann WH, Renner M, Schluter V, Hofschneider PH, Koshy R, Meyer M. The hepatitis B virus MHBst167 protein is a pleiotropic transactivator mediating its effect via ubiquitous cellular transcription factors. *J Gen Virol* 1997;78(Pt 6):1487-1495
- 18 陆荫英, 李克, 刘妍, 王琳, 成军, 张玲霞. 乙型及丙型肝炎病毒受体的研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:211-213
- 19 成军, 董菁, 刘妍, 李莉, 斯崇文, 王勤环, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒准种研究的临床意义. 世界华人消化杂志 2002;10:209-211
- 20 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 21 Wu CG, Forgues M, Siddique S, Farnsworth J, Valerie K, Wang XW. SAGE transcript profiles of normal primary human hepatocytes expressing oncogenic hepatitis B virus X protein. *FASEB J* 2002;16:1665-1667
- 22 Tarn C, Zou L, Hullinger RL, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in dedifferentiated hepatocytes. *J Virol* 2002;76:9763-9772
- 23 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136

- 24 洪源, 成军, 董菁, 李克, 王琳, 王刚, 刘妍. 乙型肝炎病毒 HBsAg 重组疫苗与表面抗原 DNA 疫苗诱导 H-2<sup>b</sup> 小鼠免疫应答的实验研究. 世界华人消化杂志 2002;10:137-140
- 25 王刚, 刘妍, 牟劲松, 洪源, 邵得志, 张耀新, 李莉, 成军. 大鼠肝再生相关基因 LRRP1 的克隆化. 世界华人消化杂志 2002;10:165-168
- 26 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙肝病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:765-769
- 27 Carretero M, Gomez-Gonzalo M, Lara-Pezzi E, Benedicto I, Aramburu J, Martinez-Martinez S, Redondo J, Lopez-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein binds to and activates the NH(2)-terminal trans-activation domain of nuclear factor of activated T cells-1. *Virology* 2002;299:288-300
- 28 成军. 慢性丙型肝炎病毒性肝炎肝脏脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 29 钟彦伟, 成军, 蔡炯, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 抗独特型人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. 世界华人消化杂志 2002;10:897-901
- 30 李莉, 成军, 李梵, 王建军, 张健, 吴勤, 韩萍, 陈国凤, 纪冬, 李克. 慢性丙型肝炎病毒性肝炎脂肪变的临床与病理学特点. 世界华人消化杂志 2002;10:1009-1013
- 31 Lee MO, Choi YH, Shin EC, Kang HJ, Kim YM, Jeong SY, Seong JK, Yu DY, Cho H, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of interleukin 18 (IL-18): a potential mechanism for liver injury caused by hepatitis B virus (HBV) infection. *J Hepatol* 2002;37:380-386
- 32 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体的构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:15-18
- 33 张健, 成军, 李莉, 刘爱兵, 吴勤, 李克, 董菁, 王琳, 陆荫英. 丙型肝炎病毒感染患者血清载脂蛋白 AI 和 AII 水平的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1014-1017
- 34 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白 AI 结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 35 成军, 任进余, 李莉, 陆志檬, 李克, 洪源, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. 世界华人消化杂志 2002;10:1022-1026
- 36 陆荫英, 成军, 李克, 刘妍, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒进入肝细胞机制的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1028-1029
- 37 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健. 丙型肝炎病毒蛋白与脂蛋白之间的相互作用. 世界华人消化杂志 2002;10:1030-1032
- 38 洪源, 成军, 李莉. 丙型肝炎病毒转基因小鼠模型的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1032-1034
- 39 董菁, 成军. 脂肪肝形成的分子机制的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1035-1037
- 40 吴勤, 成军, 李莉. 酒精性脂肪肝的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1037-1038
- 41 韩萍, 成军, 李莉. 非酒精性脂肪肝的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1038-1040
- 42 陈国凤, 成军, 李莉. 脂肪肝的诊断研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1040-1042
- 43 李莉, 成军, 陈国凤. 脂肪肝的治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1042-1044
- 44 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L, Chen JM. Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein-a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:300-303
- 45 成军. 新基因结构与功能研究的策略. 世界华人消化杂志 2003;11:373-377
- 46 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因和蛋白的生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2003;11:378-384
- 47 钟彦伟, 成军, 张忠东, 孙敏, 李强, 李克, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 噬菌体表面展示技术筛选 HCBP6 人源单链可变区抗体. 世界华人消化杂志 2003;11:389-393
- 48 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选 Hcbp6 结合的肝细胞蛋白编码基因. 世界华人消化杂志 2003;11:385-388
- 49 牟劲松, 刘妍, 王刚, 成军, 段惠娟, 李克, 陆荫英, 王琳, 王惠芬. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活的相关基因. 世界华人消化杂志 2003;11:399-403
- 50 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. 世界华人消化杂志 2003;11:394-398
- 51 陈天艳, 成军, 张树林. 酵母双杂交系统的原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:451-455
- 52 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林. 抑制性消减杂交技术原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:456-458
- 53 张忠东, 成军, 张树林. 噬菌体展示技术的原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:459-461
- 54 马守东, 洪源, 成军. 酵母单杂交技术的原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:450-451
- 55 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 生物信息学技术与新基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:474-477
- 56 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. 世界华人消化杂志 2003;11:461-463
- 57 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:472-474
- 58 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 肿瘤抑制因子 p21/waf1 与肝炎病毒复制与表达的调节研究. 世界华人消化杂志 2003;11:469-471
- 59 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 60 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 丙型肝炎病毒与 MAPK 信号转导系统. 世界华人消化杂志 2003;11:466-469
- 61 Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R Jr, Ikeda M, Lemon SM, Gale M Jr. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 2003;300:1145-1148
- 62 He QQ, Cheng RX, Sun Y, Feng DY, Chen ZC, Zheng H. Hepatocyte transformation and tumor development induced by hepatitis C virus NS3 c-terminal deleted protein. *World J Gastroenterol* 2003;9:474-478
- 63 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 丙型肝炎病毒与 JAK-STAT 信号转导系统. 世界华人消化杂志 2003;11:464-466
- 64 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 10 的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11:935-938
- 65 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白反式调节基因. 世界华人消化杂志 2003;11:920-924
- 66 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
- 67 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 反式调节靶基因. 世界华人消化杂志 2003;11:930-934
- 68 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因 10 的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11:925-929
- 69 成军. 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制. 世界华人消化杂志 2003;11:888-896
- 70 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:943-946
- 71 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式调节基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:939-942
- 72 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调 NIP3 基因表达研究. 世界华人消化杂志 2003;11:951-954
- 73 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调细胞周期调节蛋白 Wee1 基因表达研究. 世界华人消化杂志 2003;11:947-950
- 74 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 杨艳杰, 张树林. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调层粘连蛋白 B1 链基因启动子表达活性的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:955-958

# 胃癌线粒体 DNA 拷贝量的变化

韩琤波, 李 凡, 杨雪飞, 毛晓韵, 吴东瑛, 辛 彦

韩琤波, 杨雪飞, 毛晓韵, 吴东瑛, 辛彦, 中国医科大学附属一院肿瘤研究所第四研究室 辽宁省沈阳市 110001  
李凡, 中国医科大学附属一院干诊科 辽宁省沈阳市 110001  
韩琤波, 男, 1976-12-23 生, 辽宁省普兰店市人, 汉族, 2000 年中国医科大学学士, 2002 年中国医科大学肿瘤学博士生. 主要从事胃癌的基础研究.  
国家自然科学基金资助项目, No.30371607  
项目负责人: 辛彦, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号, 中国医科大学附属一院肿瘤研究所第四研究室. yxin@hotmail.com  
电话: 024-23256666 6351 传真: 0086-24-23252377  
收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-09-24

## Alterations of mtDNA copy number in gastric carcinoma

Cheng-Bo Han, Fan Li, Xue-Fei Yang, Xiao-Yun Mao, Dong-Ying Wu, Yan Xin

Cheng-Bo Han, Xue-Fei Yang, Xiao-Yun Mao, Dong-Ying Wu, Yan Xin, Fourth Laboratory of the Cancer Institute, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Fan Li, Department of Geriatrics, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30371609  
Correspondence to: Yan Xin, The Fourth Laboratory of Tumor Institute, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yxin@hotmail.com  
Received: 2003-08-07 Accepted: 2003-09-24

## Abstract

**AIM:** To explore the relationship between mitochondrial DNA (mtDNA) and gastric cancer by comparing the difference of mtDNA copy number in gastric cancers and paracancerous tissues.

**METHODS:** Hypervariable region (HV)<sub>1</sub> and HV<sub>2</sub> of mitochondrial D-loop region from 20 cases of gastric cancer and 20 paracancerous tissues were amplified by PCR; meantime  $\beta$ -actin was served as a quantitative standard marker, followed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and silver staining, in which the difference of mtDNA copy number was compared between gastric cancers and paracancerous tissues.

**RESULTS:** There existed significantly quantitative difference in HV<sub>1</sub>, HV<sub>2</sub> (standardized with  $\beta$ -actin) between gastric cancers and paracancerous tissues ( $P < 0.01$ ). mtDNA copy number was associated with important enzymes in nucleus such as AKP, cAMP-PDE and cGMP-PDE ( $P < 0.05$ ), although not with tumor histological type and invasive depth ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The occurrence of gastric cancer is closely associated with decreased mtDNA copy number, which may be a new tumor marker.

Han CB, Li F, Yang XF, Mao XY, Wu DY, Xin Y. Alterations of mtDNA copy number in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):258-261

## 摘要

**目的:** 通过比较线粒体基因组(mitochondrial DNA, mtDNA)拷贝数在胃癌和癌旁胃黏膜组织间的差异, 阐述 mtDNA 与胃癌发生的关系。

**方法:** PCR 分别扩增胃癌组织和癌旁胃黏膜组织各 20 例共 40 个样本的线粒体 D-loop 两个高变区 HV<sub>1</sub> (hypervariable region) 和 HV<sub>2</sub>; 并以核基因组的  $\beta$ -actin 作为定量标准物. 聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 银染比较 mtDNA 拷贝数在癌和正常组织间的差异。

**结果:** HV<sub>1</sub> 和 HV<sub>2</sub> 拷贝量(用  $\beta$ -actin 标准化)在胃癌组织和癌旁组织间有显著差异( $P < 0.01$ ); 其拷贝量与组织类型, 癌组织浸润深度未发现统计学联系( $P > 0.05$ ); 而与核内一些重要的酶: 碱性磷酸酶(AKP)、环腺苷酸磷酸二酯酶(cAMP-PDE)和环鸟苷酸磷酸二酯酶(cGMP-PDE)表达有一定关系( $P < 0.05$ )。

**结论:** 胃癌的发生与胃上皮细胞内 mtDNA 量的减少有着密切的关系. 有望成为一种新的肿瘤分子标志物。

韩琤波, 李凡, 杨雪飞, 毛晓韵, 吴东瑛, 辛彦. 胃癌线粒体 DNA 拷贝量的变化. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):258-261

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/258.asp>

## 0 引言

胃癌是世界上最常见的肿瘤之一<sup>[1-10]</sup>, 过度的亚硝酸盐饮食和幽门螺旋杆菌感染等是胃癌发病的重要危险因素<sup>[11]</sup>. 线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA) 与肿瘤的发生可能有一定的关系<sup>[12]</sup>. mtDNA 是一长为 16 569 bp 双链闭环分子, 编码并参与了氧化磷酸化和 ATP 生成所必需的多肽. 线粒体内氧浓度很高, 易产生自由基(free radicals)及过氧化氢等活性氧簇(reactive oxygen species, ROS), 而线粒体本身又不能合成谷胱甘肽(glutathione) 将其有效去除, 因此 mtDNA 易受活性氧损伤<sup>[13]</sup>, 再之由于 mtDNA 缺乏组蛋白的保护以及线粒体内缺乏有效的 DNA 损伤修复系统, 因而 mtDNA 损伤要远高于核基因组<sup>[14]</sup>.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 胃癌组织和癌旁胃黏膜组织各 20 例共 40 个样本取自于中国医科大学附属第一医院肿瘤科胃癌切除术后冰冻标本. 按照 WHO 组织学分型: 乳头管状腺癌 3 例, 高分化和中分化腺癌共 8 例, 低分化腺癌 3 例,

未分化癌 2 例, 黏液腺癌 2 例, 印戒细胞癌 2 例; 按照 Lauren 分型: 弥漫型胃癌 11 例, 肠型胃癌 9 例. 浸润至深肌层 5 例, 浆膜下 6 例, 透浆膜 8 例, 黏膜下 1 例. 所有胃癌组织标本经过酶组化和免疫组化染色分析.

1.2 方法 胃组织 30 mg 剪碎匀浆 30 s, 用含有 0.1 g/L 蛋白酶 K 和 5 g/L SDS 的 10 mmol/L Tris-HCl/0.1 mol/L EDTA (pH7.4) 1 mL 进行消化; DNA 用体积比为 25 : 24 : 1 的酚 / 氯仿 / 异丙醇抽提 2 次, 氯仿 / 异丙醇(24 : 1) 1 次; 再用 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠(pH7.4)和 2 倍体积乙醇沉淀, 700 ml/L 乙醇洗涤. 沉淀 DNA 重溶于 50  $\mu$ l 10 mmol/L Tris-HCl/0.1 mmol/L EDTA(pH8.0). 紫外分光光度仪定量后平衡 DNA.

1.2.1 PCR 扩增 以 D-loop 上 HV<sub>1</sub> (hypervariable region) 和 HV<sub>2</sub> 的 2 个片段的拷贝数来衡量 mtDNA 拷贝数. 设计的引物在 HV 区两侧保守区域内(12S rRNA 和 tRNA<sup>pro</sup>), 以避免由于引物区变异导致假阴性的结果. 引物设计如下, HV<sub>1</sub>: F15974 5' -ACTCCACCATTAGCACCCAA A- 3', R16564 5' -TGATGTCTTATTTAAGGGGAAC GT-3'; HV<sub>2</sub>: F4 5' -CACAGGTCTATCACCTATTAA CCA-3', R628 5' -GCCCCGTCTAAACATTTTCAGT G625-3'. 同时为减少 DNA 模板量的差异给实验带来的假阴性结果, 扩增核内  $\beta$ -actin 基因(引物 F:5' -AAG GGA CTTCCTGTAAACAATGCA-3', R:5' -CTGGAAC GGTGAAGGTGACA-3')作为内对照(定量标准物), 对 HV<sub>1</sub>、HV<sub>2</sub> 扩增量即 mtDNA 拷贝量进行标准化. 在 50  $\mu$ l 扩增反应体系中包括总 DNA 约 50 ng, 引物各 0.5 mmol/L, 每种 dNTP 各 200  $\mu$ mol/L, 2.5 U Taq 酶(TakaRa ExTaq<sup>TM</sup>). PCR 反应条件: 起始 94  $^{\circ}$ C 5 min; 接着 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 继续延伸 3 min. 模板和引物等的量要严格保持一致(稀释后加入以减少实验的系统误差).

1.2.2 PAGE 银染 将 PCR 产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE): 浓缩胶 3%, 分离胶 8%, 加产物 3  $\mu$ l 和上样缓冲液 2  $\mu$ l 至胶孔内, 8 mA 等流电泳 20 min, 然后调至 15 mA 继续电泳 30 min. 取下凝胶进行银染: 100 ml/L 乙醇内固定 5 min; 11.3 ml/L 硝酸 5 min; 水洗 1 min  $\times$  2; 12 mmol/L 硝酸银染色 5 min  $\times$  2; 水洗 1 min  $\times$  2; 30 g/L 碳酸钠 / 0.5 ml/L 甲醛显影液显影数分钟; 100 ml/L 乙酸后固定 5 min; 30 ml/L 甘油 5 min; 封片保存, Chemilmager 扫描; Image J 软件对 HV<sub>1</sub>、HV<sub>2</sub> 和标准物  $\beta$ -actin 进行定量分析, 计算 HV<sub>1</sub>/ $\beta$ -actin、HV<sub>2</sub>/ $\beta$ -actin 比值.

统计学处理 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 以 SPSS11.0 统计软件包进行 t 检验、ANOVA 及相关系数 r 检验. P < 0.05 有差异, P < 0.01 有显著性差异.

## 2 结果

2.1 胃癌组织 mtDNA 定量 在胃癌组织和癌旁胃黏膜正常组织均能扩增出产量比较一致的核内管家基因  $\beta$ -

actin. 癌旁组织都可以扩增出 HV<sub>1</sub> 和 HV<sub>2</sub>, 而癌组织则呈现明显的弱带甚至无条带(图 1, 2), HV<sub>1</sub> 和 HV<sub>2</sub> 扩增量在癌组织和癌旁组织间存在着显著性差异(P < 0.01, 表 1), 即 mtDNA 在胃癌组织和癌旁组织间的拷贝量是不同的, 癌组织 mtDNA 明显降低. HV<sub>1</sub> 与 HV<sub>2</sub> 呈强相关(r = 0.91, P < 0.01). 说明单独由于 HV<sub>1</sub> 或 HV<sub>2</sub> 引起的假阴性结果可能性非常小. mtDNA 的拷贝量与胃癌 WHO 组织学分型之间没有关系, 也可能是由于样本量太少以及选取的样本类型过于分散有关. 但按 Lauren 分型, 定量结果同样没有统计学联系(P = 0.086).

2.2 mtDNA 定量与核内酶表达的关系 胃癌组织标本经酶组化和免疫组化染色分析显示, 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)表达 11 例; 亮氨酸氨基肽酶(Leu-aminopeptidase, LAP)表达 6 例; 环腺苷酸磷酸二酯酶(cyclic AMP phosphodiesterase, cAMP-PDE)表达 9 例; 环鸟苷酸磷酸二酯酶(cyclic GMP phosphodiesterase, cGMP-PDE)表达 6 例. 结果显示 mtDNA 定量与 AKP、cAMP-PDE 和 cGMP-PDE 有统计学联系(P < 0.05, 表 1), 而与 LAP 无统计学联系(P > 0.05).

表 1 以 mtDNA D-loop 区 HV1 为代表 mtDNA 定量分析结果

组别	n	HV <sub>1</sub> / $\beta$ -actin	P
组织性质			
正常	22	2.51 $\pm$ 0.29	<0.01
癌组织	22	0.99 $\pm$ 0.16	
Lauren's			
弥漫型	9	0.98 $\pm$ 0.19	>0.05
肠型	11	1.02 $\pm$ 0.25	
浸润深度			
深肌层	5	0.98 $\pm$ 0.17	>0.05
浆膜下	6	1.09 $\pm$ 0.13	
透浆膜	8	0.95 $\pm$ 0.11	
AKP			
-	9	0.83 $\pm$ 0.10	<0.05
+~+++	11	0.98 $\pm$ 0.13	
LAP			
-	14	0.90 $\pm$ 0.13	>0.05
+~+++	6	0.91 $\pm$ 0.18	
cAMP-PDE			
-	11	0.78 $\pm$ 0.10	<0.05
+~+++	9	0.97 $\pm$ 0.18	
cGMP-PDE			
-	14	0.80 $\pm$ 0.17	<0.05
+~+++	6	1.09 $\pm$ 0.20	

AKP: 碱性磷酸酶; LAP: 亮氨酸氨基肽酶; cAMP-PDE: 环腺苷酸磷酸二酯酶; cGMP-PDE: 环鸟苷酸磷酸二酯酶; P < 0.05 有统计学意义; P < 0.01 有显著意义.

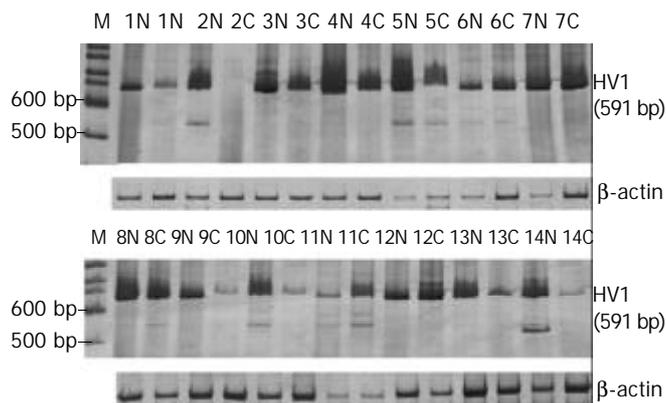


图1 HV<sub>1</sub>区 PCR 扩增 PAGE 银染结果 M: 100 bp Ladder Marker; N: 正常组织; C: 癌组织.

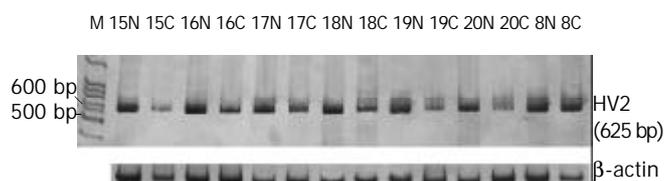


图2 HV<sub>2</sub>区 PCR 扩增 PAGE 银染结果.

### 3 讨论

胃癌的发生与多个癌基因和抑癌基因改变有关<sup>[1-10]</sup>, 但确切的机制仍不十分清楚. 肿瘤的生物特征不仅取决于核内遗传物质, 而且与核外的 mtDNA 也有一定的关系. 线粒体基因组缺乏损伤修复系统, 加之线粒体内氧浓度很高易产生氧自由基, 而其本身又不能合成谷胱甘肽将其有效去除所以特别易遭受内源性损伤因子和外源性致癌物质的攻击<sup>[15-16]</sup>. 线粒体内脂肪/DNA 的比值很高, 使具有嗜脂性的致癌物优先在占细胞总 DNA 量很少的 mtDNA 上聚集<sup>[17]</sup>; mtDNA 缺乏组蛋白的保护, 即是裸露的<sup>[18]</sup>. 因此 mtDNA 是致癌物作用的重要靶点, 其损伤程度和突变率显著高于核 DNA (大约 10 倍于核)<sup>[19]</sup>.

mtDNA 非编码 D-loop 区和高变区(hypervariable region, HV)是 mtDNA 与线粒体内膜相结合的区域, 不仅暴露于脂质过氧化物, 而且其本身的三链结构对氧化损伤也高度敏感, 因此该区更易遭受 ROS 的破坏<sup>[20]</sup>. Chomyn et al<sup>[21]</sup>认为 mtDNA 对细胞凋亡启动并不是必需的, 但却会影响其发生的速率, 原因是 mtDNA 的减少或损伤增多会导致 ROS 产生量增加.

细胞癌变的本质是增生不再受控制并呈现不同程度的去分化. cAMP 和 cGMP 在调节细胞增生与分化这对矛盾中起着重要作用. cPDE 是降解 cAMP 和 cGMP 的关键酶, 其活性变化直接影响 cAMP 和 cGMP 的代谢进而影响细胞的增生与分化<sup>[22-24]</sup>. 本研究组在以往的研究中发现 cAMP-PDE 的表达与胃癌的病理生物学行为有一定的关系. 现研究表明, 特异性 cPDE 抑制剂可以诱导慢性淋巴细胞白血病(CLL)细胞凋亡, 并且与 cAMP 水平成剂量依赖性<sup>[25-26]</sup>. 哈利普兰(rolipram)是 cPDE4 抑制

剂, 弗司扣林(forskolin)是腺苷酸环化酶(adenylate cyclase)激活剂, Moon et al<sup>[27]</sup>认为二者诱导 CLL 细胞凋亡可能是通过激活蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A), 诱导 Bcl-2 家族成员 Bad 去磷酸化, 使之转位至线粒体外膜电压依赖性离子通道(voltage dependent anion channel, VDAC)处, 在 Bax 等的共同作用下使线粒体膜去极化, 通过 VDAC 释放细胞色素 c (cytochrome c, cyt-c), 进而激活 caspase-9 和 caspase-3. 由此可见, cPDE 等所引起的核内一系列分子学改变影响了核外线粒体膜的通透性, 以至于细胞凋亡发生<sup>[28-31]</sup>. 这势必会对线粒体内的遗传物质的稳定性产生一定影响. 各种凋亡刺激因子直接或间接造成 ROS 产生增加, ROS 不仅会直接损伤 mtDNA, 尤其是 D-loop 复制区, 导致其复制效率下降; 而且促进开启的 VDAC 通道进一步打开, 释放凋亡促进因子 cyt-c, AIF 和 Smac/Diablo 等. 此外, 一些类型胃癌从功能分化上不但产生黏液, 而且还不同程度表达小肠吸收细胞标志酶(如 AKP 和 LAP), 有助于水解癌周间质并向周围正常组织浸润性生长, 是胃癌功能分化的重要标志酶. AKP 和(或)LAP 阳性而无黏液分泌的胃癌功能分类属于“吸收功能分化型”, 主要包括高分化的乳头状腺癌和管状腺癌; 而 AKP 和 LAP 阴性有黏液分泌的胃癌功能分类属于“黏液分泌功能分化型”主要包括黏液腺癌和一些未分化型胃癌. 本项研究结果显示 AKP 阳性胃癌, 其 mtDNA 拷贝数高于 AKP 阴性胃癌(P < 0.05), 分析可能是分化程度低的胃癌 mtDNA 的受损程度更大, 所以拷贝数相对较低. mtDNA 定量与 AKP、cAMP-PDE 和 cGMP-PDE 有统计学联系, 进一步证实核内遗传物质或信号分子的改变对核外线粒体基因组有一定的影响, 为进一步研究其在疾病发生方面如何作用提供依据.

胃癌组织与正常胃黏膜 mtDNA 定量存在显著差异, mtDNA 定量有望成为一种新的肿瘤分子标志物, 但仍处于探索阶段, 具体的机制还有待于进一步研究.

致谢: 中国医科大学生物芯片中心赵雨杰教授和教研室其他工作人员为本研究提供的帮助

### 4 参考文献

- 1 Li YL, He XM, Zheng HC, Wu DY, Yang XF, Xin Y, Fu BY. Expression of PTEN encoding product in malignant lesions of gastric mucosa and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:1294-1296
- 2 Yu Y, Zhang YC, Zhang WZ, Shen LS, Hertzog P, Wilson TJ, Xu DK. Ets1 as a marker of malignant potential in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2154-2159
- 3 Han CB, Li F, Zhao YJ, Ma JM, Wu DY, Zhang YK, Xin Y. Variations of mitochondrial D-loop region plus downstream gene 12S rRNA-tRNA<sup>phe</sup> and gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2003;9:1925-1929
- 4 Zhang CP, Tian ZB, Zhao QX, Wu J, Liang YX. Relation between CD44v9, MMP-2 and tumor invasion and metastasis in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:1531-1534
- 5 Feng RE, Chen J, Cui QC, Zhan Y, Wang ZY. Expression of PKC  $\beta$ 1 and PKC  $\beta$ 2 in early gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:1286-1289

- 6 Fu YG, Qu YJ, Wu KC, Zhai HH, Liu ZG, Fan DM. Apoptosis-inducing effect of recombinant Caspase-3 expressed by constructed eukaryotic vector on gastric cancer cell line SGC7901. *World J Gastroenterol* 2003;9:1935-1939
- 7 Zhao XH, Gu SZ, Liu SX, Pan BR. Expression of estrogen receptor and estrogen receptor messenger RNA in gastric carcinoma tissues. *World J Gastroenterol* 2003;9:665-669
- 8 Huang HL, Wu BY, You WD, Shen MS. Prognostic factors and pathology of advanced gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:1297-1301
- 9 Fang DC, Wang RQ, Yang SM, Yang JM, Liu HF, Peng GY, Xiao TL, Luo YH. Mutation and methylation of hMLH1 in gastric carcinomas with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2003;9:655-659
- 10 Li HX, Chang XM, Song ZJ, He SX. Correlation between expression of cyclooxygenase-2 and angiogenesis in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:674-677
- 11 Lan J, Xiong YY, Lin YX, Wang BC, Gong LL, Xu HS, Guo GS. *Helicobacter pylori* infection generated gastric cancer through p53-Rb tumor-suppressor system mutation and telomerase reactivation. *World J Gastroenterol* 2003;9:54-58
- 12 Han CB, Li F, Xin Y. Advances in relationship between mitochondrial DNA and Peptic Tumor. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:624-627
- 13 Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am J Med Genet* 2001;106:62-70
- 14 Li JM, Cai Q, Zhou H, Xiao GX. Effects of hydrogen peroxide on mitochondrial gene expression of intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:1117-1122
- 15 Xin Y, Li XL, Wang YP, Zhang SM, Zheng HC, Wu DY, Zhang YC. Relationship between phenotypes of cell-function differentiation and pathobiological behavior of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2001;7:53-59
- 16 Carew JS, Huang P. Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* 2002;1:9
- 17 Bianchi NO, Bianchi MS, Richard SM. Mitochondrial genome instability in human cancers. *Mutat Res* 2001;488:9-23
- 18 Herrera B, Alvarez AM, Sanchez A, Fernandez M, Roncero C, Benito M, Fabregat I. Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes. *FASEB J* 2001;15:741-751
- 19 Mandavilli BS, Santos JH, Van Houten B. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res* 2002;509:127-151
- 20 Chung YM, Bae YS, Lee SY. Molecular ordering of ROS production, mitochondrial changes, and caspase activation during sodium salicylate-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2003;34:434-442
- 21 Chomyn A, Attardi G. mtDNA Mutations in aging and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:519-529
- 22 Yang L, Wang YP, Wu DY, Zhang SM, Li JY, Zhang YC, Xin Y. Pathological behaviors and molecular mechanisms of signet ring cell carcinoma and mucinous adenocarcinoma of stomach: a comparative study. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:516-524
- 23 Conti M, Richter W, Mehats C, Livera G, Park JY, Jin C. Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J Biol Chem* 2003;278:5493-5496
- 24 Li JM, Zhou H, Cai Q, Xiao GX. Role of mitochondrial dysfunction in hydrogen peroxide-induced apoptosis of intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:562-567
- 25 Ogawa R, Streiff MB, Bugayenko A, Kato GJ. Inhibition of PDE4 phosphodiesterase activity induces growth suppression, apoptosis, glucocorticoid sensitivity, p53, and p21WAF1/CIP1 proteins in human acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 2002;99:3390-3397
- 26 Sarfati M, Mateo V, Baudet S, Rubio M, Fernandez C, Davi F, Binet JL, Delic J, Merle-Beral H. Sildenafil and vardenafil, types 5 and 6 phosphodiesterase inhibitors, induce caspase-dependent apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2003;101:265-269
- 27 Moon EY, Lerner A. PDE4 inhibitors activate a mitochondrial apoptotic pathway in chronic lymphocytic leukemia cells that is regulated by protein phosphatase 2A. *Blood* 2003;101:4122-4130
- 28 Frame MJ, Tate R, Adams DR, Morgan KM, Houslay MD, Vandenamee P, Pyne NJ. Interaction of caspase-3 with the cyclic GMP binding cyclic GMP specific phosphodiesterase (PDE5a1). *Eur J Biochem* 2003;270:962-970
- 29 Thompson WJ, Piazza GA, Li H, Liu L, Fetter J, Zhu B, Sperl G, Ahnen D, Pamukcu R. Exisulind induction of apoptosis involves guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase inhibition, protein kinase G activation, and attenuated beta-catenin. *Cancer Res* 2000;60:3338-3342
- 30 Huston M, Beard F, McCallum NJ, Pyne P, Vandenamee GS, Houslay MD. The cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A5 is cleaved downstream of its SH3 interaction domain by caspase-3. Consequences for altered intracellular distribution. *J Biol Chem* 2000;275:28063-28074
- 31 Gale DD, Landells LJ, Spina D, Miller AJ, Smith K, Nichols T, Rotshteyn Y, Tonelli A, Lacouture P, Burch RM, Page CP, O'Connor BJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile following oral administration of the phosphodiesterase (PDE) 4 inhibitor V11294A in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 2002;54:478-484

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

• 消息 •

## World Journal of Gastroenterology 2005 年将改为周刊

《World Journal of Gastroenterology, WJG》是我国消化病学领域中唯一以全英文发表原创性论文的国际性学术期刊。WJG 创刊于 1995 年, 原名《China National Journal of New Gastroenterology》, 1998 年更名为 WJG, 由世界胃肠病学杂志社出版。WJG 国际标准刊号 ISSN 1007-9327, 国内统一刊号 CN 14-1219/R, 月刊, 大 16 开, 256 页, 邮发代号 82-261, 北京报刊发行局发行。为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 以及日益增多的国际科技交流的需要, 从 2005 年开始, WJG 将由半月刊改为周刊, 大 16 开, 160 页, 每月 7、14、21、28 日出版。

# 胃癌前病变 p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2, p53 表达与中医证候的关系

胡玲, 劳绍贤

胡玲, 劳绍贤, 广州中医药大学脾胃研究所 广东省广州市 510405  
胡玲, 女, 贵州人, 汉族, 医学博士, 广州中医药大学脾胃研究所副所长, 副教授, 硕士生导师, 广东省肝脏病学会理事, 主要从事中医药防治胃癌癌前病变、肝脏疾病及提高溃疡愈合质量的研究。  
广州中医药大学科学研究与发展总体规划重点及广东省中医药管理局资助课题, No. GH0016 300011  
项目负责人: 胡玲, 510405, 广东省广州市机场路 12 号大院, 广州中医药大学脾胃研究所. pqhl@21cn.com  
电话: 020-36585444  
收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-09-24

## Relationship between expression of p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2 and p53 and TCM syndrome in gastric precancerous lesions

Ling Hu, Shao-Xian Lao

Ling Hu, Shao-Xian Lao, Piwei Institute, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China Supported by the Funds of Guangzhou University of TCM and Guangdong Provincial Administration of TCM, No.GH0016, 300011  
Correspondence to: Dr. Ling Hu, Piwei Institute, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, 510405, Guangdong Province, China pqhl@21cn.com  
Received: 2003-08-07 Accepted: 2003-09-24

## Abstract

AIM: To explore the relationship between p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2, p53 protein expression and TCM syndrome in gastric precancerous lesions (GPL).

METHODS: Forty cases with endoscopically and pathologically confirmed GPL were studied, including 24 cases of moderate dysplasia of gastric mucosa, 9 cases of severe dysplasia, 7 cases of incomplete colonic intestinal metaplasia. By the differential diagnosis of TCM, *pi-wei* deficiency of *Qi* and *Yin* associated stagnation of *Qi*, stomach-heat, and blood stasis were 10, 12 and 18 cases respectively. Expression of p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2 and p53 proteins was detected by the LSAB immunohistochemical method.

RESULTS: Overexpression of p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2 and p53 proteins was found in GPL, and gradually increased with the progress of lesions; but among gastric mucosa of the moderate, severe dysplasia and incomplete colonic intestinal metaplasia, there are no differences in the expression of the genes ( $P > 0.05$ ). Among the differential associated symptoms and signs, the expression of p21<sup>ras</sup> and p53 oncogene proteins was the blood stasis > stomach-heat and *Qi* stagnation ( $P < 0.01$ ), and the expression of c-erbB-2 oncogene protein was the blood stasis and stomach-heat > *Qi* stagnation ( $P < 0.05$ ).

CONCLUSION: Overexpression of p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2 and p53

proteins is found in GPL. The expression is related with the differentially associated symptoms and signs.

Hu L, Lao SX. Relationship between expression of p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2 and p53 and TCM syndrome in gastric precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):262-265

## 摘要

目的: 观察胃癌癌前病变 p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2, p53 癌基因蛋白表达与中医证候的关系。

方法: 经内镜及病理证实为胃癌癌前病变的病例共 40 例, 其中中度异型增生 24 例, 重度异型增生 9 例, 不完全性结肠化生 7 例; 中医辨证属脾胃气阴两虚兼气滞者 10 例, 兼胃热者 12 例, 兼血瘀者 18 例。所有胃黏膜活检标本采用抗生蛋白链菌素 - 生物素免疫组织化学标记的方法作 p21<sup>ras</sup>、c-erbB-2、p53 表达的检测。

结果: p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2, p53 在胃癌癌前病变中有过表达, 且其表达随着病变的进展而升高, 但中、重度异型增生及不完全性结肠上皮化生胃黏膜之间的表达差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。在不同的兼证中, p21<sup>ras</sup>, p53 的表达兼血瘀者大于兼胃热、气滞者 ( $P < 0.01$ ), c-erbB-2 的表达兼血瘀、胃热者大于兼气滞者 ( $P < 0.05$ )。

结论: p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2, p53 癌基因蛋白在胃癌癌前病变中有过表达, 其表达与不同中医兼证有关, 可能有一定的证候特异性。

胡玲, 劳绍贤. 胃癌前病变 p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2, p53 表达与中医证候的关系. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):262-265

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/262.asp>

## 0 引言

胃癌癌前病变(gastric precancerous lesions, GPL)指胃黏膜中重度异型增生和 / 或不完全性结肠化生, p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2, p53 等癌基因异常表达与 GPL 的发生密切相关<sup>[1-14]</sup>。中药治疗不仅能使 GPL 患者的临床症状得到缓解, 而且也能在一定程度上下调 GPL 组织中相关癌基因蛋白的过表达<sup>[15-27]</sup>。但不论是各基因蛋白在 GPL 组织中不同病理改变的异常表达, 还是中药对各相关癌基因蛋白的调控作用均存在着一定的差异。中医认为 GPL 是以脾胃气阴两虚为本, 或兼气滞、血瘀、热毒为标虚实夹杂的综合征候群, 癌基因异常表达在 GPL 组

织中存在着一一定的差异是否提示 GPL 组织中相关癌基因蛋白的表达可能具有一定的证候特异性?为此,我们在临床治疗取得一定疗效的基础上,对 GPL 组织中 p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2, p53 癌基因蛋白表达与 GPL 证候的关系进行探讨.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 所有病例均于胃镜下胃窦部活检取材,采用四点法,作 HE 病理染色确认属于胃黏膜中重度异型增生者,若为肠上皮化生胃黏膜尚需进一步采用 HID-ABpH2.5-PAS 法作黏液组织化学染色以确认属于不完全性结肠化生者;然后再结合临床的中医辨证,符合诊断者纳入.心、肝、肾功能明显异常,病理诊断已属癌变者不列入本研究.中医辨证诊断按照《中药新药临床研究指导原则第一辑.1993:88, 108》拟定,具体如下.气阴两虚主症:胃脘痞满;堵闷不舒,食后加重;舌质胖嫩,或有齿印;色淡红;苔薄白或少苔;脉沉细或濡缓.次证:神疲乏力;少气懒言;自汗;口干少饮;形体消瘦.凡具备上述主症 2 项(其中舌象或脉象必备一项),加次症 2 项即可诊断.兼气滞症:胃脘胀满不适;胀痛连胁;暖气频作;反酸或嘈杂;脉弦.兼血瘀症:久痛不已;痛有定处;刺痛;舌质暗或有瘀斑或瘀点.兼胃热症:口干口苦;大便干结;舌苔黄.具备以上兼症中任何两项即为兼有该兼症.随机双盲法收集 GPL 病例共 40 例,包括中度异型增生 24 例,重度 9 例,不完全性结肠化生 7 例;男 32 例,女 8 例;中医辨证兼气滞症 10 例,兼胃热症 12 例,兼血瘀症 18 例.平均年龄 52.±11 岁;病程小于 5 a 者 24 例,5-10 a 者 13 例,大于 10 a 者 3 例.

**1.2 方法** 采用抗生蛋白链菌素-生物素免疫组织化学标记的方法(labeled streptavidin biotin method, LSAB).鼠抗人 p21<sup>ras</sup> 单克隆抗体、兔抗人 c-erbB-2 癌基因蛋白、鼠抗人 p53 蛋白(DO-7)及 LSAB 试剂盒均为丹麦 DAKO 产品;DAB 为福建迈新公司产品.用 PBS 替代一抗作阴性对照,已知的阳性片作阳性对照,阳性示棕黄色均细颗粒,p21<sup>ras</sup> 及 c-erbB-2 位于胞质,p53 位于胞核.

统计学处理 采用 SPSS10.0 统计分析软件包进行  $\chi^2$  检验及  $\chi^2$  分割检验

## 2 结果

**2.1 GPL 中各癌基因蛋白的表达** p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2 表达主要定位于胞质(图 1, 2),部分以腺腔缘明显(图 3);p53 表达主要位于胞核(图 4),但少量也表达在胞质.p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2 及 p53 表达均随着病变的进展而逐渐增加,但中重度异型增生及不完全性结肠化生之间未见显著性差异,  $P > 0.05$ , 见表 1.

**2.2 不同兼症中癌基因的表达** 本组 GPL 病例中不同中医兼症 p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2 及 p53 均有过表达,从脾胃气阴两虚兼气滞→兼胃热→兼血瘀,各癌基因的表达逐渐增加,见表 2.

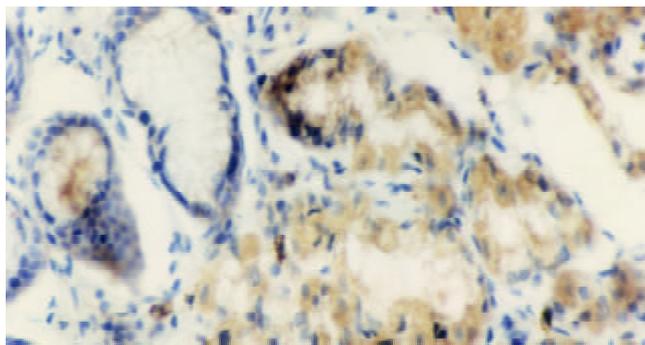


图 1 重度异型增生胃黏膜胞质 p21ras 强阳性 LSAB×400

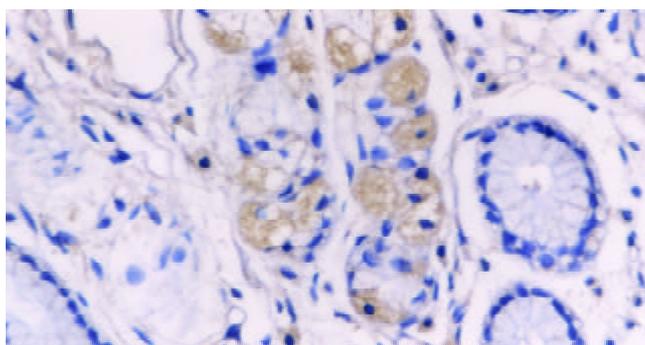


图 2 中度异型增生胃黏膜胞质 c-erbB-2 阳性 LSAB×400

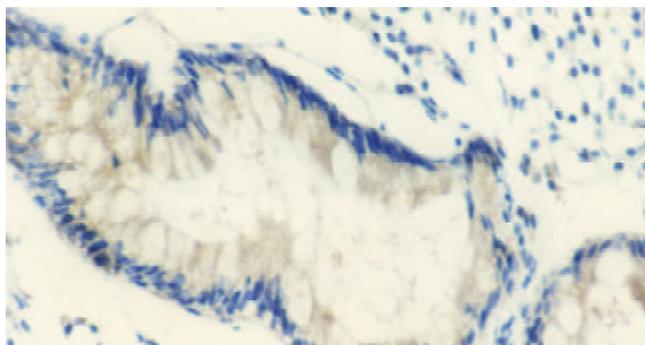


图 3 不完全性结肠化生胃黏膜胞质 c-erbB-2 阳性 LSAB×400

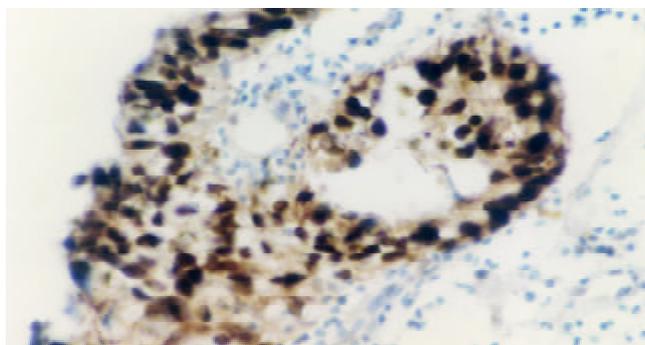


图 4 重度异型增生胃黏膜胞核 p53 强阳性 LSAB×400

表 1 GPL 组织 p21ras, c-erbB-2 及 p53 表达情况(%)

病变	n	p21ras	c-erbB-2	p53
中度异型增生	24	45.8	50.0	37.5
重度异型增生	9	66.7	77.8	44.4
不完全性结肠上皮化生	7	28.6	42.8	14.3

表2 胃癌癌前病变不同兼症 p21ras, c-erbB-2 及 p53 表达情况(%)

中医兼症	n	p21ras	c-erbB-2	p53
气滞	10	20.0	20.0	10.0
胃热	12	33.33	50.0 <sup>a</sup>	16.67
血瘀	18	72.2 <sup>b</sup>	77.78 <sup>a</sup>	61.1 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05,  $\chi^2$ : 4.85 vs 气滞; <sup>b</sup>P < 0.01,  $\chi^2$ : 8.02 vs 气滞、胃热; <sup>c</sup>P < 0.01,  $\chi^2$ : 9.8 vs 气滞、胃热。

### 3 讨论

p21<sup>ras</sup> 是 c-Ha-ras 癌基因的蛋白产物, 为增生和分化受体介导信号传导途径中的重要组成部分. 研究表明 p21<sup>ras</sup> 在翻译和转录水平的过表达并不局限于胃黏膜的恶性病变, 而是在异型增生阶段即出现, 且随着病变的加重而表达逐渐增加, 其在一定水平持续过度表达与肿瘤的启动有关<sup>[28-29]</sup>. c-erbB-2 癌基因定位于染色体 17q<sup>21</sup>, 具有酪氨酸蛋白激酶活性. 研究发现, 胃黏膜异型增生中 c-erbB-2 癌基因蛋白的表达随着病变的进展呈上升趋势, 至重度异型增生达顶峰<sup>[30-31]</sup>. p53 抑癌基因位于染色体 17p<sup>13.1</sup>, 编码 393 个氨基酸残基的胞核磷蛋白, 是维持正常细胞生长和分裂的负调节因子, 可因不同位点的突变或等位基因的缺失而失活. p53 基因的点突变和过表达不仅存在于胃癌各临床分期, 而且可发生于癌变前的不同阶段, 在肠化生, 特别是不完全性结肠化生和异型增生阶段也有较高的检出率<sup>[32-36]</sup>. 上述研究为 p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2, p53 癌基因过表达均可发生在 GPL 阶段提供了强有力的证据. 尽管如此, 现代医学在针对 GPL 的治疗却未见明显的突破, 追踪随访仍为预防的主要措施, 一旦伴有胃黏膜重度异型增生有癌变倾向时则考虑行外科手术治疗.

GPL 属于中医“痞满”、“胃脘痛”之范畴, 临床以胃脘痞满、痛或不痛、纳呆食少、大便不正常为主要表现. 通过国家“八五”攻关对 GPL 进行临床和实验的系统研究以来, 已较一致地认为 GPL 是以脾胃气阴两虚为本, 兼有气滞、或胃热、或血瘀的本虚标实之证; 因虚挟邪, 因实致虚是其主要的病机转化规律<sup>[37]</sup>. 大量的研究也表明, 中药治疗不仅能使 GPL 患者的临床症状缓解, 而且也在一定程度上使 GPL 组织中相关癌基因蛋白的异常表达得到改善<sup>[15-27]</sup>. 但不论是各相关基因蛋白在 GPL 组织中不同病理改变的异常表达, 还是中药对之的调控作用均存在着一定的差异. GPL 中这种基因表达的差异是否与不同兼症有关? 各兼症之间的转化, 又是如何形成的? 基于此, 我们进行了初浅的探讨. 结果表明, 本组研究病例中, p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2 及 p53 有过表达, 并随着病变的进展而表达逐渐增加, 与文献[1-14, 28-37]报道相符. 不同中医兼症中, 上述各癌基因蛋白的表达均以兼血瘀者最高, 兼胃热者次之, 兼气滞者最低, 提示 p21<sup>ras</sup>、c-erbB2 及 p53 的表达与 GPL 的不同兼症呈平行关系. 从中医的角度

看, GPL 的三种兼症中, 以兼气滞者病情最轻, 兼胃热者较重, 兼血瘀者最重, 即所谓的病久入络. 上述研究结果提示, GPL 组织中 p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2 及 p53 表达与中医对 GPL 的认识是相吻合的, GPL 不同中医兼症与胃黏膜组织中上述相关癌基因的表达有一定的相关性; 推测 GPL 兼症间的转化, 其病理基础与 p21<sup>ras</sup>, c-erbB-2 及 p53 表达也可能有一定的联系. 通过对 GPL 中医分型与基因表达相关性的研究, 一方面可为揭示 GPL 证型的客观化开辟了一条新的途径; 同时, 确立 GPL 的中医分型对 GPL 辨证论治的客观化, 为深入研究其病理实质及相关药物的作用机制又提供了必要的前提条件.

### 4 参考文献

- 1 费素娟, 陈玉林, 林志发, 陈淑敏, 刘广珍. 胃癌及癌前病变 ras P21, P53 的表达意义. 世界华人消化杂志 2001;9:465-466
- 2 陈小良, 钟国均, 唐录英, 李建忠, 邹仕恩. 胃癌的发生发展与 P21 表达的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:504
- 3 陆和平, 郑银宝, 肠化生、胃癌组织中幽门螺杆菌感染与 ras 基因表达. 世界华人消化杂志 2001;9:218-219
- 4 Kasper HU, Schneider-Stock R, Mellin W, Roessner A. P21 protein expression and ras-oncogene mutations in gastric carcinoma: correlation with clinical data. *Int J Oncol* 1998;12:69-74
- 5 Sowa M, Nakata B. Genome analyses for precancerous lesions in the gastrointestinal tract. *Gan To Kagaku Ryoho* 2000;27:335-340
- 6 Lu W, Chen L, Gong H. *Helicobacter pylori* infection and expression of PCNA, p53, c-erbB-2 in carcinoma and precancerous lesions of the stomach. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1999;21:125-127
- 7 Morgan C, Jenkins GJ, Ashton T, Griffiths AP, Baxter JN, Parry EM, Parry JM. Detection of p53 mutations in precancerous gastric tissue. *Br J Cancer* 2003;89:1314-1319
- 8 Yang GB, Hu FL, Lu YY. The relation between *Helicobacter pylori* infection and p53 mutation, MG-7 antigen and AgNORs expression in the development of gastric mucosa lesions. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2003;83:1331-1335
- 9 Unger Z, Molnar B, Pronai L, Szaleczky E, Zagoni T, Tulassay Z. Mutant p53 expression and apoptotic activity of *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis in correlation with the presence of intestinal metaplasia. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:389-393
- 10 Tian SF, Xiong YY, Yu SP, Lan J. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and expressions of tumor suppressor genes in gastric carcinoma and related lesions. *Ai Zheng* 2002;21:970-973
- 11 Xu A, Li S, Liu J. Correlation between apoptosis and proliferation in gastric pre-carcinoma. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1999;79:185-186
- 12 蒋艳霞, 赵明彦, 耿明, 曹永成, 王兴友. P16、c-erbB-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 伍银桥, 王孟薇, 吴本俨, 尤经纬, 祝庆孚. 胃癌前病变演变过程中凋亡相关蛋白和 PCNA 的表达意义. 世界华人消化杂志 2003;11:1219-1222
- 14 潘传敬, 刘宽宇. 胃癌增生凋亡与调节基因的表达. 世界华人消化杂志 2003;11:526-530
- 15 李庆明, 余谦, 闵存云. P53 突变与 VEGF 在大鼠胃癌中的表达及中药胃康宁的防治作用. 世界华人消化杂志 2003;11:997-1000
- 16 张旭晨, 高瑞丰, 李炳庆, 马连生, 梅立新, 吴玉珍, 刘凤芹, 廖振林. 胃细胞逆转丸治疗胃癌前期病变的临床与实验研究. 新消化病学杂志 1997;5:216-218
- 17 危北海, 张占海, 杨丽彩, 刘晋生, 赵敏, 赵荣莱, 李乾乾. 胃安素治疗慢性萎缩性胃炎的临床与实验研究. 华人消化杂志 1998;6:114-117

- 18 周学文. 中医药治疗胃癌癌前病变的临床研究现状与展望. 世界华人消化杂志 1999;7:277-279
- 19 胡玲, 劳绍贤, 周福生. 中医药治疗胃癌癌前病变的研究策略. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊 8):3
- 20 陆为民, 单兆伟, 沈洪, 吴静, 朱云华, 朱长乐. 胃舒胶囊治疗慢性萎缩性胃炎癌前病变的临床研究. 世界华人消化杂志 1999;7:822-823
- 21 许建青. 胃细胞逆转丸治疗胃癌癌前病变 927 例的逆转作用. 世界华人消化杂志 1999;7:633
- 22 胡玲, 劳绍贤. 胃癌癌前病变 P21, p53 蛋白表达及胃炎消的调节作用. 华人消化杂志 1998;6:873-874
- 23 胡玲, 劳绍贤. 胃癌癌前病变相关基因表达及胃炎消治疗机制的初步探讨. 中国中西医结合脾胃杂志 1999;7:91-92
- 24 黄志新, 常东, 劳绍贤, 胡玲, 唐纯志, 陈更新, 匡忠生. 胃炎消对胃癌癌前病变的作用机制探讨. 广州中医药大学学报 2003;20:102-105
- 25 李春婷, 王爱云, 单兆伟, 孙志广. 仁术健胃颗粒治疗胃癌前期病变 88 例临床观察. 中医杂志 2002;43:910-911
- 26 胡玲, 劳绍贤, 周福生, 唐纯志. 胃炎消对胃癌癌前病变相关靶基因蛋白表达的调控作用. 浙江中西医结合杂志 2001;11:334-336
- 27 唐纯志, 劳绍贤, 胡玲, 匡忠生. 胃炎消治疗胃癌前病变对细胞凋亡及相关基因表达的影响. 中国中西医结合脾胃杂志 2000;8:263-264
- 28 Hao Y, Zhang J, Lu Y, Yi C, Qian W, Cui J. The role of ras gene mutation in gastric cancer and precancerous lesions. *J Tongji Med Univ* 1998;18:141-144
- 29 惠延平, 黄高升, 王文亮, 王映梅, 朱晓慧, 马福成. 胃癌及其癌前病变中 ras, C-erbB-2, p53 癌基因产物的表达. 第四军医大学学报 2001;22:220-223
- 30 米建强, 杨石强, 沈铭昌. 胃癌及癌前病变组织中 c-erbB-2 癌基因产物的表达. 新消化病学杂志 1997;5:152-153
- 31 李晓清, 郝丽萍, 张小丽, 龚飞跃, 郭惠学, 伍尤泉. 胃黏膜异型增生 C-erbB-2 基因表达及其癌变率的研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2002;11:269-271
- 32 Testino G, Gada D, De Iaco F, Cornaggia M. P53 and Ki-67 expression in epithelial gastric dysplasia and in gastric cancer. *Panminerva Med* 2002;44:369-371
- 33 Feng CW, Wang LD, Jiao LH, Liu B, Zheng S, Xie XJ. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. *BMC Cancer* 2002;2:8
- 34 Ming SC. Cellular and molecular pathology of gastric carcinoma and precursor lesions: A critical review. *Gastric Cancer* 1998;1:31-50
- 35 Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burja I, Thomas E. *Helicobacter pylori* infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci* 2002;47:107-113
- 36 李晓清, 郝丽萍, 张小丽, 龚飞跃, 郭惠学, 伍尤泉. 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
- 37 劳绍贤, 许鑫梅, 周福生, 余绍源, 贾建国, 郑裕璇, 黄志新, 郭遂成, 卞兆祥. 胃炎消治疗胃癌癌前期病变疗效分析. 中药新药与临床药理 1997;8:72-75

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

• 消息 •

## 中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告: 2002 年度世界华人消化杂志 影响因子 1.926, WJG 影响因子 2.579

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

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

(世界胃肠病学杂志社 2003-12-27)

# 胃癌淋巴结转移预测的多因素分析

黄宝俊, 徐惠绵, 赵雨杰, 王天骄, 田大彤, 陈峻青

黄宝俊, 徐惠绵, 陈峻青, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科  
辽宁省沈阳市 110001  
赵雨杰, 王天骄, 中国医科大学生物芯片中心 辽宁省沈阳市 110001  
田大彤, 辽宁省妇婴医院妇产科 辽宁省沈阳市 110005  
黄宝俊, 男, 1972-02-25 生, 辽宁省沈阳市人, 汉族. 2000 年中国医科大学  
肿瘤学硕士, 2002 年博士生, 主要研究胃癌的转移与综合治疗.  
辽宁省自然科学基金项目, No. 20022069  
项目负责人: 徐惠绵, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号, 中国  
医科大学附属第一医院肿瘤外科. cmu xu@hotmail.com  
电话: 024-25909581  
收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-08-25

## Multivariate analysis of predicting lymph node metastasis in gastric cancer

Bao-Jun Huang, Hui-Mian Xu, Yu-Jie Zhao, Tian-Jiao Wang,  
Da-Tong Tian, Jun-Qing Chen

Bao-Jun Huang, Hui-Mian Xu, Jun-Qing Chen, Department of Oncology,  
The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang  
110001, Liaoning Province, China  
Yu-Jie Zhao, Tian-Jiao Wang, Biochip Center, China Medical University,  
Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Da-Tong Tian, Department of Obstetrics and Gynecology, Liaoning Pro-  
vincial Fetomaternal Hospital, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Supported by the Natural Science Foundation of Liaoning Province,  
No. 20022069  
Correspondence to: Dr. Hui-Mian Xu, Department of Oncology, The  
First Affiliated Hospital, China Medical University, 155 Nanjing Beijie,  
Shenyang 110001, Liaoning Province China. cum xu@hotmail.com  
Received: 2003-06-06 Accepted: 2003-08-25

## Abstract

**AIM:** To analyze the factors influencing lymph node metastasis in gastric cancer and to screen the indicators that could predict more exactly the extent of lymph node metastasis before surgery.

**METHODS:** The mRNA expression of heparanase, MMP-7, VEGF-C, S100A4, hRad17, hTERT, CDH1, KAI1 and nm23H1 genes were examined in 62 gastric cancer tissues by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). In combination with clinicopathological features, univariate and multivariate analyses were carried out in order to screen the factors affecting lymph node metastasis of gastric carcinoma.

**RESULTS:** All the genes above were expressed more or less in gastric cancer tissues. With regard to the positive rate, S100A4 and hTERT were the highest (both 96.8%) and CDH1 was the lowest (64.5%). Multivariate analysis with binary logistic regression showed that lymphatic invasion and heparanase mRNA expression were independent factors that judged whether there was lymph node metastasis, and the odds ratios [Exp (B)] were 21.137 (95% CI 2.115-211.211) and 9.768 (95% CI 1.582-60.300) respectively. When predicting the extent of the lymph node metastasis

(the number of lymph node metastasis of no more than 6 was regarded as the fewer and lighter; no less than 7 as the more and heavier), MMP-7, hTERT and CDH1 genes mRNA expression and Lauren type of carcinoma were the independent factors ( $P=0.037, 0.009, 0.021$  and  $0.012$  respectively), Exp (B) was 8.046, 9.159, 0.087 and 10.068 respectively. The area of serosa involvement was also an important factor.

**CONCLUSION:** Heparanase mRNA expression and lymphatic invasion of gastric cancer tissue correlate with lymph node metastasis positively. The degree of lymph node metastasis is more serious in patients with diffusive histological type, area of serosa involvement more than  $20\text{ cm}^2$  and MMP-7, hTERT mRNA overexpression, and CDH1 loss of expression in gastric cancer. Above examinations before surgery are indicated to arrive at an optimum treatment scheme.

Huang BJ, Xu HM, Zhao YJ, Wang TJ, Tian DT, Chen JQ. Multivariate analysis of predicting lymph node metastasis in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):266-270

## 摘要

**目的:** 通过对影响胃癌淋巴结转移因素的分析, 探讨较准确预测胃癌有无淋巴结转移及其程度的标志。

**方法:** 采用 RT-PCR 技术检测 62 例胃癌患者原发癌组织中 Heparanase, MMP-7, VEGF-C, S100A4, hRad17, hTERT, CDH1, KAI1 和 nm23H1 基因的 mRNA 表达, 结合系统的临床病理检查指标, 运用 Binary Logistic regression 进行多因素分析, 寻找影响胃癌淋巴结转移的客观标志。

**结果:** 上述基因在胃癌组织中均有不同程度表达, 其中 S100A4 和 hTERT 阳性率最高 (96.8%), CDH1 表达阳性率最低 (64.5%)。多因素分析表明淋巴管癌栓 ( $P=0.009$ ) 和 Heparanase 表达 ( $P=0.014$ ) 是判断有无淋巴结转移的独立因素, 相对危险度分别为 21.137 和 9.768。在预测胃癌淋巴结转移程度上 (小于或等于 6 个为轻度转移, 大于或等于 7 个为重度转移), Lauren 分型和 MMP-7, hTERT, CDH1 基因表达是独立因素 ( $P=0.012, 0.037, 0.009, 0.021$ ), 其相对危险度分别为 10.068, 8.046, 9.159, 0.087, 浆膜受侵面积亦是重要的影响因素。

**结论:** 胃癌组织中 Heparanase 高表达、淋巴管癌栓阳性者, 有淋巴结转移的可能性较大; 而组织学为弥漫型、浆膜受侵面积大于  $20\text{ cm}^2$ 、原发癌灶中 MMP-7、hTERT 高表达、CDH1 低表达者, 淋巴结转移程度相对较重。术前检测上述基因 mRNA 表达并确定 Lauren 分型, 术中结合

胃浆膜受侵面积, 对制定治疗方案有指导意义.

黄宝俊, 徐惠绵, 赵雨杰, 王天骄, 田大彤, 陈峻青. 胃癌淋巴结转移预测的多因素分析. 世界华人消化杂志 2004;12(2):266-270  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/266.asp

## 0 引言

胃癌是我国人群中发病率和死亡率均占第一位的恶性肿瘤, 转移扩散是影响预后的首要原因<sup>[1-6]</sup>. 近年来对胃癌侵袭、转移分子机制的研究日趋深入<sup>[7-11]</sup>, 以期寻求新的有效治疗措施, 然而外科手术仍为其主要的治疗手段, 合理的淋巴结清除是手术治疗成功的关键之一<sup>[12]</sup>. 但目前尚缺乏客观、有效的判定淋巴结转移及其程度的术前指标. 因此, 从分子水平深入研究胃癌淋巴结转移规律, 寻找预测胃癌淋巴结转移的客观标志, 具有重要临床价值. 文献<sup>[13-15]</sup>报道 Heparanase, MMP-7<sup>[3, 16]</sup>, VEGF-C<sup>[17-19]</sup>, S100A4<sup>[20]</sup>, hRad17<sup>[21-22]</sup>, hTERT<sup>[10-11, 23]</sup>, CDH1<sup>[4-5, 24]</sup>, KAI1<sup>[25]</sup>和 nm23H1<sup>[7, 26]</sup>基因的表达变化分别与不同肿瘤转移关系密切, 尤与淋巴结转移关系密切, 但多为单个或几个基因的研究分析, 尚有一定局限性. 我们运用RT-PCR技术, 同时、并行检测多个相关基因在胃癌组织中的表达, 结合临床病理特征, 进行多因素分析, 寻找影响胃癌淋巴结转移更加客观的指标, 以期术前做出较为准确的预测.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2001-09/2002-09中国医科大学附属第一医院肿瘤外科胃癌患者62例, 其中男41例, 女21例, 年龄28-77(58 ± 1.7)岁, 术前均未经化、放疗. 取新鲜癌组织置液氮中速冻30 min后, -80 °C深低温冰箱冻存, 其余标本行系统病理检查.

1.2 方法 按说明书用Trizol试剂(Invitrogen公司)提取癌组织总RNA, 并用紫外分光光度计定量、测纯度. 取 A<sub>260</sub>/

A<sub>280</sub> ≥ 1.80的标本, 采用AMV酶反转录试剂盒(Promega公司)合成第一链cDNA, 以1 μg总RNA为模板, Oligo(dT)<sub>18</sub>为引物, 42 °C反应1 h. 利用Primer Premier5软件设计Heparanase, MMP-7, VEGF-C, S100A4, hRad17, hTERT, CDH1, KAI1, nm23H1及GAPDH和beta actin基因RT-PCR引物, 分别将上、下游引物设计在不同外显子上, 并将引物T<sub>m</sub>值设在55 °C, 以保证扩增条件的一致性. 具体序列、产物长度及定位见表1. 分别取cDNA溶液4 μL进行PCR扩增, 94 °C变性4 min, 经30个循环(94 °C 35 s、58 °C 45 s、72 °C 60 s), 72 °C延伸7 min. 反应体系为: MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L, dNTP 200 μmol/L, 引物各0.5 μmol/L, Taq DNA聚合酶(华美公司)1.2 MU/20 L. 取各基因扩增产物4 μL进行梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳(30 g/L浓缩胶和80 g/L分离胶), 银染色检测结果, 干燥后扫描图片存图, 详细步骤参见文献<sup>[22]</sup>. 应用Chemi Imager 5500自动电泳凝胶成像分析仪测定各基因扩增条带的灰度值(A), 计算各基因mRNA表达指数(I), I = A<sub>基因</sub> / A<sub>actin B</sub>, 因beta actin在不同组织中表达量相对恒定, 银染后扩增条带为黑色, 而该系统检测灰度值时, 条带越暗(即产量越高)值越低, 故表达指数与各基因mRNA在不同组织中的含量呈负相关关系.

统计学处理 胃癌淋巴结转移单因素分析采用χ<sup>2</sup>检验(fisher's exact test), 多因素分析采用Binary Logistic regression model, 以P < 0.05为差异具有显著性, 以上分析均用SPSS10.0软件完成.

## 2 结果

2.1 胃癌组织不同基因的表达 S100A4和hTERT表达阳性率最高(96.8%), 其次为hRad17(91.9%), KAI1(91.9%), Heparanase (88.7%), MMP-7(86.0%), nm23H1(80.6%)和VEGF-C(70.0%), 而CDH1表达阳性率最低(64.5%). 图1

表1 各基因RT-PCR引物、产物长度及扩增条件

基因	引物		产物长度	产物定位
	正义	反义		
hTERT	5' -ggcgacatggagaacaagc-3'	5' -aggtgagactggctctgatgg-3'	340 bp	9-12exon
VEGF-C	5' -gaggctggcaacataacaga-3'	5' -ccttgagagagggcactgt-3'	321 bp	2-4exon
hRad17	5' -aaaatcaagaggtccaag-3'	5' -cctgagtaagagcgtgt-3'	335 bp	11-14exon
S100A4	5' -cctggatgtgatggtgtc-3'	5' -tcttctcgggctgcttat-3'	278 bp	1-2exon
heparanase	5' -agaaagacggctaagatg-3'	5' -atagggtaaccgcaagta-3'	588 bp	8-11exon
MMP-7	5' -agatgtggagtccagatgt-3'	5' -tagactgtaccatccgtcc-3'	358 bp	1-3exon
KAI1	5' -agcctgtatcaaaagtcccaa-3'	5' -gcagaagccttctctcaca-3'	571 bp	2-7exon
CDH1	5' -ccccataccagaacctcg-3'	5' -accgcttcttcatagtaa-3'	742 bp	12-16exon
nm23H1	5' -cgcttgggtggtctgaaa-3'	5' -tgtgtgtcctcctctgt-3'	377 bp	2-5exon
Actin B	5' -gatgaccagatcatgtttg-3'	5' -tggagtgaaggtatgttcg-3'	491 bp	2-4exon
GAPDH	5' -cgaccactttgtcaagctca-3'	5' -aggggtctacatggcaactg-3'	227 bp	7-9exon

为不同基因在同一患者胃癌组织中表达的RT-PCR电泳图片,其中hTERT, S100A4, Heparanase, MMP-7, KAI1, nm23H1表达相对较强,而VEGF-C、hRad17、CDH1表达相对较弱。

2.2 胃癌淋巴结转移的单因素分析 1997年国际抗癌联盟(UICC)制定了胃癌新的TNM分期系统,将胃癌转移淋巴结分级(pN)标准以转移淋巴结个数的量化指标为依据分成pN<sub>0</sub>(0个), pN<sub>1</sub>(1-6个), pN<sub>2</sub>(7-15个), pN<sub>3</sub>(15个以上),王振宁 et al<sup>[27]</sup>研究发现新TNM分期系统既显示了与预后的一致性,又较好地反映了胃癌的生物学行为,因此我们进一步将pN分级划为轻重两组:小于

或等于6个为轻度转移,大于或等于7个为重度转移。根据各基因的平均表达指数,将表达水平分为高、低两组。将基因表达高低及病理因素分别与淋巴结转移情况进行单因素分析。结果表明原发癌组织低分化、小淋巴结孤立型淋巴结、淋巴管癌栓阳性及Heparanase、hTERT高表达者,淋巴结转移阳性率增加,VEGF-C高表达亦与淋巴结转移呈正相关,但无统计学意义;癌组织低分化、Lauren分型为弥漫型、浆膜受侵面积大于20 cm<sup>2</sup>、小淋巴结孤立型淋巴结者,MMP-7, VEGF-C, hRad17, hTERT高表达和CDH1, KAI1低表达者,淋巴结转移程度相对较重,转移数量多在7个以上(表2)。

表2 胃癌淋巴结转移情况的单因素分析

相关因素	淋巴结转移				淋巴结转移程度			
	阴性	阳性	$\chi^2$	P	轻	重	$\chi^2$	P
浆膜分型	正常+反应	1	2		3	0		
	结节	5	15	1.869	13	7	4.492	0.106
	腱状+多彩弥漫	5	34		18	21		
浆膜受侵	≤ 10	8	29		24	13		
面积(cm <sup>2</sup> )	11-19	2	12	1.06	8	6	7.5	0.024
	≥ 20	1	10		2	9		
大体型	局限	3	12	0.069	11	4	2.733	0.098
	浸润	8	39		23	24		
生长方式	团块+巢状	8	35	0.072	26	17	1.794	0.18
	弥漫	3	16		8	11		
分化程度	高/中	6	12	4.225	15	3	8.315	0.004
	低	5	39		19	25		
Lauren分型	肠型	8	22	3.172	23	7	11.182	0.001
	弥漫型	3	29		11	21		
侵透浆膜	-	8	34	0.152	26	16	2.625	0.105
	+	3	17		8	12		
转移淋巴结	大结节融合	5	18		14	9		
分型	小淋巴结孤立	0	27	14.631	9	18	11.952	0.003
	一般型	6	6		11	1		
淋巴管	-	10	25	6.495	22	13	2.087	0.149
癌栓	+	1	26		12	15		
MMP-7	低	6	24	0.203	22	8	8.028	0.005
	高	5	27		12	20		
Heparanase	低	9	21	5.984	19	11	1.694	0.193
	高	2	30		15	17		
S100A4	低	8	31	0.553	24	15	1.95	0.167
	高	3	20		10	13		
VEGF-C	低	10	31	3.666	27	14	5.93	0.015
	高	1	20		7	14		
hTERT	低	9	25	3.93	27	7	18.356	0.00018
	高	2	26		7	21		
hRad17	低	7	31	0.031	25	13	4.753	0.029
	高	4	20		9	15		
nm23H1	低	7	27	0.418	17	17	0.712	0.399
	高	4	24		17	11		
KAI1	低	6	35	0.801	18	23	5.846	0.016
	高	5	16		16	5		
CDH1	低	8	37	0.0001	20	25	7.16	0.007
	高	3	14		14	3		

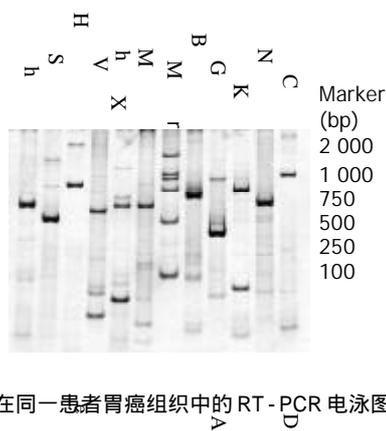


图1 不同基因在同一患者胃癌组织中的RT-PCR电泳图。

### 2.3 胃癌淋巴结转移的多因素分析 考虑存在混杂因素

表3 胃癌有无淋巴结转移及其程度的 Logistic 回归分析

淋巴结转移	相关系数( $\chi$ )	回归系数(b)	标准误(Sx)	统计量 Wald 值	显著性 P	相对危险度 Exp(B)	95.0% CI for EXP(B)	
							Lower	Upper
有	淋巴管癌栓	3.051	1.174	6.794	0.009	21.137	2.115	211.211
	Heparanase	2.279	0.929	6.022	0.014	9.768	1.582	60.300
无	hTERT	1.563	0.946	2.731	0.098	4.775	0.748	30.500
	常数项	-4.511	1.846	5.968	0.015	0.011		
	浆膜受侵面积	1.15	0.592	3.77	0.052	3.157	0.989	10.074
	Lauren 分型	2.309	0.915	6.37	0.012	10.068	1.675	60.504
	MMP-7	2.085	1	4.348	0.037	8.046	1.133	57.123
	VEGF-C	1.537	0.982	2.448	0.118	4.649	0.678	31.872
	hTERT	2.215	0.852	6.756	0.009	9.159	1.724	48.652
	CDH1	-2.444	1.063	5.291	0.021	0.087	0.011	0.697
	常数项	-4.113	2.579	2.545	0.111	0.016		

### 3 讨论

淋巴结转移、复发是影响胃癌预后的主要因素, 而无转移的淋巴结尚具有重要的免疫监视作用. 因此, 术前、术中准确判断淋巴结转移范围和程度, 施行合理的淋巴结清除术, 对提高疗效具有十分重要意义. 目前影响胃癌淋巴结转移因素的报道多停留在病理形态学水平, 或仅涉及一个(或几个)分子指标, 且多应用免疫组化、原位杂交等检测技术, 术前应用受到一定的限制<sup>[1, 3-4, 6, 10, 13, 16, 18, 22, 24, 28-29]</sup>. 为了使胃癌淋巴结清除范围更趋于合理, 我们将病理因素和基因表达相结合, 从临床应用角度出发, 在方法和实验设计上做了改进. 采用 RT-PCR 技术, 操作相对简单, 而且术前胃镜检查时即可获得标本; 所选指标均是文献报道与肿瘤淋巴结转移关系密切的基因, 代表性强; 病理因素与基因表达相结合, 单因素与多因素序贯分析, 结果更加全面、可靠; 引物设计时分别将上、下游引物设计在不同外显子上, 并将引物 Tm 值均设在 55 °C, 可保证扩增的真实性和条件的一致性, 免去多个基因检测需要多次 PCR 的烦琐, 便于临床推广应用.

有无淋巴结转移的单因素分析发现, 原发癌组织低分化、淋巴管癌栓阳性、小结节孤立型转移淋巴结及 Heparanase, hTERT 高表达者, 淋巴结转移阳性率

的影响, 进一步将有统计学意义的单因素结果进行二维 Logistic 回归分析. 结果显示淋巴管癌栓(P =0.009)和 Heparanase 表达(P =0.014)是判断有无淋巴结转移的独立因素, 若淋巴管癌栓阳性或 Heparanase 高表达, 则有淋巴结转移的危险分别增加 21.137 和 9.768 倍. 而淋巴结转移程度的分析结果表明: Lauren 分型, MMP-7, hTERT 和 CDH1 表达是独立预测因素(P =0.012, 0.037, 0.009, 0.021), 若原发癌组织为弥漫型, MMP-7, hTERT, CDH1 高表达者, 其转移淋巴结数大于或等于 7 个的危险分别增加 10.068, 8.046, 9.159 和 0.087 倍. 其中浆膜受侵面积和 VEGF-C 表达虽无统计学意义(P =0.052, 0.118), 但也是较重要的预测因素, 其相对危险度分别为 3.157 和 4.649 (表 3).

增加, 这与文献[13-14, 23, 28]报道一致. 但经多因素分析发现, 只有淋巴管癌栓和 Heparanase 与淋巴结转移呈正相关关系, 淋巴管癌栓阳性者有淋巴结转移的风险增加 21.1 倍, 肝素酶高表达者淋巴结转移阳性的风险增加 9.7 倍. 癌细胞首先要侵入淋巴管形成癌栓, 而后才能引流到区域淋巴结形成转移灶, 因此淋巴管癌栓阳性者有淋巴结转移的可能性显著增加. 肝素酶是一种内切糖苷酶, 能够降解细胞外基质和脉管基底膜的主要成分硫酸肝素和硫酸肝素多糖, 是癌细胞侵袭和转移过程中的首要步骤. 肝素酶在正常组织中的表达严格限于胎盘和淋巴源性器官, 这是否影响其表达与胃癌淋巴结转移特异性相关尚需进一步研究探讨. Takaoka et al<sup>[13]</sup> 研究发现在胃癌组织中肝素酶 mRNA 和蛋白质表达具有一致性, 因此检测肝素酶 mRNA 水平可以反应其蛋白质的高低.

淋巴结转移程度的单因素分析发现, 癌组织低分化、Lauren 分型为弥漫型、浆膜受侵面积大于 20 cm<sup>2</sup>、小结节孤立型淋巴结者, MMP-7, VEGF-C, hRad17, hTERT 高表达和 CDH1, KAI1 低表达者, 淋巴结转移程度相对较重. 而多因素分析发现, 组织学类型、MMP-7, hTERT 和 CDH1 表达是独立影响因素, 相对危险度分

别为 10.068, 8.046, 9.159 和 0.087; 浆膜受侵面积亦是较重要的影响因素( $P = 0.052$ ), 可能与例数较少有关。浆膜受侵面积大于  $20 \text{ cm}^2$  者, 往往病期较晚; 而组织学为弥漫型者, 癌细胞的生物学行为恶性度往往较高, 均体现出高转移潜能, 我们认为浆膜受侵面积和组织学类型是影响胃癌淋巴结转移程度较为确切的大体指标。MMP-7 能够降解 IV 型胶原、蛋白多糖、laminin、elastin 等, 其与胃癌、结直肠癌、食管癌、胰腺癌、肺癌转移关系密切<sup>[3, 16, 30]</sup>。端粒酶活性增高与多种肿瘤的病理因素及淋巴转移相关, 人端粒酶催化亚基(hTERT)在端粒酶表达中起决定性作用, hTERT 基因表达水平与端粒酶活性一致<sup>[10-11, 23]</sup>。E-钙黏附素(CDH1)与连环素结合形成复合体介导同种细胞间黏附反应, 研究发现许多人类肿瘤中 CDH1 表达下调与淋巴结转移和肿瘤侵袭性密切相关<sup>[4, 24]</sup>。我们运用多因素分析筛选发现 MMP-7, hTERT 和 CDH1 是影响胃癌淋巴结转移程度的标志基因, 我们还将进一步研究其相应蛋白质表达与胃癌淋巴结转移程度的相关性, 以期寻求新的有效治疗靶点。

总之, 淋巴管癌栓和肝素酶是预测胃癌有无淋巴结转移的特异性指标; MMP-7, hTERT, CDH1 和 Lauren 分型、浆膜受侵面积是预测胃癌淋巴结转移严重程度的敏感性指标。由此推测肝素酶可能是在胃癌淋巴结转移的始动阶段起重要作用, 而 MMP-7, hTERT 和 CDH1 是在胃癌淋巴结转移的加速阶段起重要作用。术前 RT-PCR 检测胃原发癌组织中上述基因 mRNA 表达并确定 Lauren 分型, 术中结合胃浆膜受侵面积, 对制定治疗方案有一定指导意义。

#### 4 参考文献

- Zhang S, Li L, Lin JY, Lin H. Imbalance between expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:899-904
- 黄海力, 吴本俨, 尤经纬, 申明识. 进展期胃癌病理和预后影响因素的关系. *世界华人消化杂志* 2003;11:1297-1301
- 孙晋民, 郑华川, 杨雪飞, 辛彦, 张荫昌. 基质金属蛋白酶-7 表达与胃癌临床病理生物学行为的关系. *世界华人消化杂志* 2003; 11:1310-1313
- Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, Yang JM. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol* 2002;8:987-993
- 周永宁, 徐采朴, 韩彪, 王金穗, 房殿春, 彭贵勇, 杨建民, 刘海. 胃癌 E-钙粘蛋白表达与临床病理学关系. *世界华人消化杂志* 2002; 10:1121-1124
- 王耕, 杨道华, 孙勤, 代全武, 惠震, 陈立新, 易建华, 朱礼国. 胃癌组织若干癌相关基因的表达与淋巴转移的关系. *世界华人消化杂志* 1999;7:803-804
- 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
- Shao JC, Wu JF, Wang DB, Qin R, Zhang H. Relationship between the expression of human telomerase reverse transcriptase gene and cell cycle regulators in gastric cancer and its significance. *World J Gastroenterol* 2003;9:427-431
- Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:994-998
- 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
- Yao XX, Yin L, Sun ZC. The expression of hTERT mRNA and cellular immunity in gastric cancer and precancerosis. *World J Gastroenterol* 2002;8:586-590
- 陈峻青. 胃癌外科治疗的现状与未来. *中国实用外科杂志* 1999; 19:30-31
- Takaoka M, Naomoto Y, Ohkawa T, Uetsuka H, Shirakawa Y, Uno F, Fujiwara T, Gunduz M, Nagatsuka H, Nakajima M, Tanaka N, Haisa M. Heparanase expression correlates with invasion and poor prognosis in gastric cancers. *Lab Invest* 2003;83:613-622
- Tang W, Nakamura Y, Tsujimoto M, Sato M, Wang X, Kurozumi K, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. Heparanase: a key enzyme in invasion and metastasis of gastric carcinoma. *Mod Pathol* 2002;15:593-598
- Endo K, Maejara U, Baba H, Tokunaga E, Koga T, Ikeda Y, Toh Y, Kohnoe S, Okamura T, Nakajima M, Sugimachi K. Heparanase gene expression and metastatic potential in human gastric cancer. *Anticancer Res* 2001;21:3365-3369
- Liu XP, Kawachi S, Oga A, Tsushimi K, Tsushimi M, Furuya T, Sasaki K. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) expression at the invasive front in gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93:291-295
- Duff SE, Li C, Jeziorska M, Kumar S, Saunders MP, Sherlock D, O' Dwyer ST, Jayson GC. Vascular endothelial growth factors C and D and lymphangiogenesis in gastrointestinal tract malignancy. *Br J Cancer* 2003;89:426-430
- Amioka T, Kitadai Y, Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Yasui W, Chayama K. Vascular endothelial growth factor-C expression predicts lymph node metastasis of human gastric carcinomas invading the submucosa. *Eur J Cancer* 2002;38: 1413-1419
- Mattila MM, Ruohola JK, Karpanen T, Jackson DG, Alitalo K, Harkonen PL. VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors. *Int J Cancer* 2002;98:946-951
- Rosty C, Ueki T, Argani P, Jansen M, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Goggins M. Overexpression of S100A4 in pancreatic ductal adenocarcinomas is associated with poor differentiation and DNA hypomethylation. *Am J Pathol* 2002; 160:45-50
- Sasaki H, Chen LB, Auclair D, Moriyama S, Kaji M, Fukai I, Kiriyaama M, Yamakawa Y, Fujii Y. Overexpression of Hrad17 gene in non-small cell lung cancers correlated with lymph node metastasis. *Lung Cancer* 2001;34:47-52
- 黄宝俊, 赵雨杰, 徐惠绵, 张玉魁, 王绍成, 徐莹莹. hRad17 mRNA 在胃癌中表达的意义. *中华肿瘤杂志* 2003;25:160-162
- Hara H, Yamashita K, Shinada J, Yoshimura H, Kameya T. Clinicopathologic significance of telomerase activity and hTERT mRNA expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001;34:219-226
- 戴冬秋, 陈峻青, 徐惠绵, 王舒宝, 赵凤凯, 王梅先. E-钙黏附素及  $\alpha$ -连接素的表达与胃癌生物学行为及淋巴结转移规律的关系. *中华肿瘤杂志* 2001;23:35-38
- Muneyuki T, Watanabe M, Yamanaka M, Shiraiishi T, Isaji S. KAI1/CD82 expression as a prognostic factor in sporadic colorectal cancer. *Anticancer Res* 2001;21:3581-3587
- Chow NH, Liu HS, Chan SH. The role of nm23-H1 in the progression of transitional cell bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:3595-3599
- 王振宁, 徐惠绵, 王舒宝, 陈峻青. 胃癌新 TNM 分期与其生物学行为及预后的关系. *中华外科杂志* 2000;38:493-495
- 徐惠绵, 陈峻青, 王舒宝. 胃癌的淋巴结转移规律及其意义. *中国肿瘤临床* 2001;28:465-468
- 张声, 李莉, 林华, 林建银. 胃癌淋巴结转移相关因素的多元分析. *中华肿瘤杂志* 2001;23:399-402
- Sasaki H, Yukiue H, Moiriyama S, Kobayashi Y, Nakashima Y, Kaji M, Kiriyaama M, Fukai I, Yamakawa Y, Fujii Y. Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 and Ets-1 gene expression in patients with lung cancer. *J Surg Res* 2001;101: 242-247

# 人鼠嵌合Fab抗体通用表达载体的构建和抗人肝癌相关抗原 HAb18G 嵌合 Fab 抗体的表达

邢金良, 杨向民, 张思河, 姚西英, 梁瑞安, 陈志南

邢金良, 杨向民, 张思河, 姚西英, 梁瑞安, 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  
邢金良, 男, 1972-09-22 生, 黑龙江省龙江县人, 汉族, 医学博士, 讲师, 第四军医大学细胞工程研究中心.  
国家十五“863”计划课题, No.2001AA215101  
国家自然科学基金资助课题, No.30200330  
项目负责人: 陈志南, 710032, 陕西省西安市长乐西路 169 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 传真: 029-3293906  
收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-09-24

## Construction of a universal expression vector for human-mouse chimeric Fab antibody and expression of chimeric Fab antibody against human hepatoma associated antigen HAb18G

Jin-Liang Xing, Xiang-Min Yang, Si-He Zhang, Xi-Ying Yao, Rui-An Liang, Zhi-Nan Chen

Jin-Liang Xing, Xiang-Min Yang, Si-He Zhang, Xi-Ying Yao, Rui-An Liang, Zhi-Nan Chen, Center for Cell Engineering Research, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China  
Supported by the National 863 Project of 10<sup>th</sup> Five-year Plan, No. 2001AA215101, and the National Natural Science Foundation of China, No.3020330  
Correspondence to: Zhi-Nan Chen, Center for Cell Engineering Research, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. chcerc2@fmmu.edu.cn  
Received: 2003-06-06 Accepted: 2003-09-24

## Abstract

**AIM:** To construct a universal expression vector for human-mouse chimeric Fab antibody and to use it for construction and expression of human-mouse chimeric Fab antibody against human hepatoma associated antigen HAb18G.

**METHODS:** Human IgG3 CH1 and C $\kappa$  genes were amplified by PCR with specific primers and cloned into vector pComb3 to construct a human-mouse chimeric Fab antibody universal expression vector pComb3C. Then, the V $\kappa$  and V $_H$  genes of mAb HAb18 were amplified by PCR using specific primers and cloned into the expression vector pComb3-cFab. After gIII was cut away, the secretory expression vector pComb3C/cFab containing chimeric Fab antibody gene of HAb18 was constructed and transfected into competent *E. Coli*. And then, the antibody induction expression by IPTG was conducted. The localization of expression products was detected by sandwich ELISA. Finally, The expression product was purified by affinity chromatography and the antigen-binding specificity and affinity of the expression product were tested by ELISA and immunofluorescence staining.

**RESULTS:** Human IgG3 CH1 and C $\kappa$  genes were correctly

inserted into vector pComb3 by nucleotide sequencing and restriction endonucleases digestion, with the size of 324bp and 333 bp, and chimeric Fab gene of mAb HAb18 was successfully constructed and expressed in *E. Coli*. The molecular mass of expression product was about 45 ku. It was mainly located in the periplasm. The results of ELISA and immunofluorescence staining showed that the expressed chimeric Fab contained human antibody fragment and had specific antigen-binding activity, and its affinity was about 10% of parental antibody HAb18.

**CONCLUSION:** We have successfully constructed a universal expression vector for human-mouse chimeric Fab antibody. Based on this result, a small molecule of chimeric Fab antibody against human hepatoma is prepared, which lays a foundation for its further application into diagnosis and therapy of human hepatocellular carcinoma.

Xing JL, Yang XM, Zhang SH, Yao XY, Liang RA, Chen ZN. Construction of a universal expression vector for human-mouse chimeric Fab antibody and expression of chimeric Fab antibody against human hepatoma associated antigen HAb18G. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):271-275

## 摘要

**目的:** 构建一个在大肠杆菌中表达人鼠嵌合Fab抗体的通用载体, 并用于抗人肝癌相关抗原 HAb18G 人鼠嵌合 Fab 抗体的表达。

**方法:** 利用特异引物 PCR 扩增人 IgG3 的 CH1 和 C $\kappa$  基因, 分别克隆到表达载体 pComb3 中, 从而构建成人 - 鼠嵌合 Fab 抗体的通用表达载体 pComb3C. 然后将扩增的 mAb HAb18 的 V $_L$  和 V $_H$  基因分别组装到通用表达载体中, 酶切去除 g III 片段后, 连接成为 HAb18 嵌合 Fab 抗体的分泌型表达载体 pComb3C/cFab. 转化大肠杆菌后诱导其表达, 通过 ELISA 检测产物的表达和定位. 最后, 利用亲和层析纯化表达产物, 进行 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 检测, 同时采用 ELISA 和免疫荧光法检测表达产物的亲和力和特异性。

**结果:** 测序及酶切鉴定表明, 人 IgG3 的 CH1 和 C $\kappa$  基因正确插入到 pComb3 中, 大小分别为 324 bp 和 333 bp, 同时 mAb HAb18 的嵌合 Fab 基因也分别获得正确组装和表达. 表达产物的分子质量约为 45 ku, 主要位于周质腔中. 另外, ELISA 和免疫荧光检测证实, 表达产物含有人的抗体片段, 并具有与相应抗原特异结合的活性, 亲和力约为亲本抗体的 10%。

**结论:** 成功构建了人鼠嵌合 Fab 抗体的通用表达载体并制备了抗人肝癌小分子嵌合 Fab 抗体, 为其进一步在肝癌诊断

与治疗中的应用奠定了基础。

邢金良, 杨向民, 张思河, 姚西英, 梁瑞安, 陈志南. 人鼠嵌合 Fab 抗体通用表达载体的构建和抗人肝癌相关抗原 HAb18G 嵌合 Fab 抗体的表达. 世界华人消化杂志 2004;12(2):271-275

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/271.asp>

## 0 引言

HAb18mAb 为抗人肝细胞肝癌表面分子 HAb18G/CD147 的特异性单克隆抗体<sup>[1-2]</sup>, 具有较好的特异性和亲和力. 近年来, 我们利用该 mAb 作为载体进行了肝癌的导向治疗研究, 其中 I<sup>131</sup> 标记 HAb18 mAb 的 F(ab')<sub>2</sub> 制备的第二代肝癌放射免疫治疗剂已进入 II 期临床阶段<sup>[3-7]</sup>. 但鼠源性抗体在患者体内可产生不同程度的人抗鼠抗体反应 (HAMA), 从而削弱其治疗的有效性, 并对清除抗体的器官产生毒性损害<sup>[8]</sup>. 另外, 较大的抗体分子的组织穿透能力较差, 在血液和非瘤组织的清除较慢. 从而导致相对较低的 T/NT 比值, 因此应用受限<sup>[9]</sup>. 为了克服这些弊病, 研制新一代低免疫原性高 T/NT 比值的基因工程抗体很有必要. 我们在成功制备 HAb18mAb 鼠源 Fab 抗体的基础上, 对已构建好的 Fab 抗体进行了部分人源化改造, 用 huCH1/huCL 替换鼠源的 mCH1/mCL, 制备成嵌合 Fab 片段, 以期尽可能的减少人体内应用时可能引发的人抗鼠抗体 (HAMA) 反应, 便于实际应用, 为进一步探讨该型抗体在肝癌治疗中的应用奠定了良好的基础.

## 1 材料和方法

1.1 材料 含有人 IgG3CH1 及  $\kappa$  轻链恒定区基因的载体 pComb3/HuFab 由本校生化教研室温博士惠赠. 含有 mAb HAb18(IgG1)Fd 及全长轻链基因的 T 载体 pMD18T-Fd 和 pMD18T-L 由本中心构建并保存. 表达载体 pComb3 及 E.coli 感受态菌株 JM109 和 XL1-blue, 均为本室制备保存. T 载体、PCR 试剂及限制性内切酶和连接酶, 均为大连宝生物公司产品. mAb HAb18、嵌合 IgG 抗体 chHAb18 及 HRP-HAb18 由本室自制. IPTG, FITC 及 HRP 标记的羊抗人 IgG 购于华美公司. Protein G 亲和层析柱为美国安玛西亚的产品. 肝癌细胞株 HHCC 由我中心培养保存. PCR 引物由北京赛百盛公司合成, 具体序列如下: MVHback5' - AAG TGA AGC TTC TCG AGT CTG G-5'; MVHfor5' - GGG GAT ATC TGC AGA GAC AGT GAC -3'; HuCH1back5' - GGG GCT CGA GTT GAT ATC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC -3'; HuCH1for5' - GCA TGT ACT AGT TTT GTC ACA AGA TTT GGG -3'; MVLback5' - CAGATGTGAGCTCAGTA TTGTGATGACCCAGACTCC-3'; MVLfor5' - GGG GTC GAC GTT TTA TTT CCA ACT TTG T-3'; HuCLback5' - GTT CCG AGC TCA AGT CGA CCT GTG GCT GCA CCA TCT GTC -3'; HuCLfor3' - GCG CCG TCT AGA ATT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC TCT TTG TGA CGG GCG AAC TCA GGC CC-3'. 划线处依次为 Xho I、EcoR

V、Xho I、EcoR V、Spe I、Sac I、Sal I、Sac I、Sal I 及 Xba I 的酶切位点.

## 1.2 方法

1.2.1 人鼠嵌合 Fab 抗体通用表达载体的构建 以载体 pComb3/HuFab 为模板, 分别用两对引物扩增人 IgG3CH1 及  $\kappa$  轻链恒定区基因. PCR 扩增产物经凝胶纯化试剂盒纯化并回收后, 分别与载体 pMD18-T 进行连接 (具体步骤参见试剂盒说明书), 构建成克隆载体 pMD18-T/HuCH1 和 pMD18-T/HuC $\kappa$ , 并转化感受态大肠杆菌 JM109 挑选阳性克隆, 酶切鉴定后进行 DNA 序列分析. 以 Sac I+Xba I 分别双酶切表达载体 pComb3 和测序分析的克隆载体 pMD18-T/Hu C $\kappa$ , 经琼脂糖凝胶电泳分离纯化目的片段后, 连接、转化, 筛选 pComb3/Hu C $\kappa$  阳性克隆并进行酶切鉴定. 然后, 用 Xho I+Spe I 双酶切构建的 pComb3/Hu C $\kappa$  和已测序分析的克隆载体 pMD18-T/Hu CH1, 重复连接、转化, 筛选及鉴定的步骤, 构建成嵌合 Fab 展示型通用载体 pComb3C.

1.2.2 HAb18 cFab 基因表达载体的构建 分别以载体 pMD18T-Fd 和 pMD18T-L 为模板, 利用对应的引物扩增 mAb HAb18 重、轻链可变区基因, 同时引入相应的酶切位点. 然后, 用 Sac I+Sal I 分别双酶切表达载体 pComb3C 和经凝胶纯化试剂盒纯化并回收后的 mAb HAb18 重链可变区基因 PCR 扩增产物, 经琼脂糖凝胶电泳分离纯化目的片段后, 连接、转化, 筛选 pComb3C/cL 阳性克隆并进行酶切鉴定. 进而, 用 Xho I+EcoR V 双酶切构建的 pComb3C/cL 和经凝胶纯化试剂盒纯化并回收后的 mAb HAb18 轻链可变区基因 PCR 扩增产物, 重复连接、转化, 筛选及鉴定的步骤, 构建成嵌合 Fab 展示型载体 pComb3C/cFab-gIII. 再以 Spe I+Nhe I 酶切已鉴定正确的重组子 pComb3C/cFab-gIII 中的 gIII 片段后, 直接用 T4 DNA 连接酶将其环化为分泌型的表达载体 pComb3C/cFab, 再次进行转化、筛选和酶切鉴定等步骤, 获得目的克隆.

1.2.3 cFab 的小量诱导表达及鉴定和检测 分别取鉴定正确的 pComb3/cFab 重组菌和 pComb3 空载体转化菌 1:100 分别接种于 10 mL 和 5 mL 新鲜 SB-Amp (100 mg/L) 液体培养基中, 250 r/min 37 °C 振荡培养至 A<sub>600nm</sub> 为 0.6 左右. 取出 pComb3/Fab 重组菌 5 mL 不加 IPTG 诱导剂, 其余菌液分别加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 所有菌液均于 250 r/min 30 °C 培养 16 h. 将菌液 12 000 g 离心 2 min 收集菌体. 反复冻融后离心收集上清, 利用夹心 ELISA 检测 cFab 的表达, 设立嵌合 HAb18IgG 作为阳性对照, PBS 作为空白对照 (Yan ZY, et al. *Jingbian Fenzishengwuxue Shiyuan Zhinan Beijing: Science Press. 1998:415-417*). 分别收集和制备诱导菌的培养基上清、周质腔提取液、胞质蛋白和不溶性沉淀物, 夹心 ELISA 检测 cFab 表达产物的定位.

1.2.4 cFab 表达产物的纯化及鉴定和检测 同步骤 1.2.3 的条件诱导表达 500 mL pComb3/cFab 重组菌, 制备周

质控提取液, 具体操作步骤参见文献[10]. 样品于 PBS 缓冲液中 4 °C 透析过夜后, 利用 protein G 亲和层析柱纯化, 具体纯化方法参见产品说明书. 纯化样品进行 120 g/L SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western Blot 分析. (1) 间接 ELISA: 包被 HAb18G<sup>[11]</sup> (mAb HAb18 的相应抗原) 胞外区的原核融合表达产物 GST-HAb18GE 和粗纯化的 GST, 检测纯化 cFab 表达产物的抗原结合特异性, 以 chHAb18 为阳性对照, PBS 为空白对照. (2) 竞争性 ELISA: 以粗纯化的 GST-HAb18GE 4 °C 包被过夜, 用脱脂奶粉封闭后, 加入 HRP-HAb18 (0.1 mg/L) 与不同稀释度的 cFab 表达产物的等量混合物. 孵育洗涤后, 以 TMB 显色, 检测 A<sub>450nm</sub> 值, 并计算抑制率和相对亲和力. 抑制率(%)=[(对照组 A 值 - 抑制组 A 值)/对照组 A 值] × 100%. (3) 免疫荧光染色 制备高表达 HAb18G 的 HHCC 细胞悬液, 调整细胞密度至 5 × 10<sup>9</sup>/1 × 10<sup>10</sup>/L. 用马血清稀释 HAb18 cFab 后, 将其加入到适量 HHCC 细胞悬液中, 4 °C 作用 30 min, 洗涤 2 次. 然后, 加入兔抗人 IgG-FITC, 4 °C 作用 30 min, 洗涤 2 次, 经固定、制片后, 于荧光显微镜下观察. 分别设立人 IgG 为阴性对照, PBS 为空白对照.

## 2 结果

**2.1 人鼠嵌合 Fab 抗体通用表达载体的构建** 利用 PCR 成功扩增出与预期大小相符的人 IgG3CH1 及 κ 轻链恒定区基因片段(图 1). 序列测定结果证实与已知的人 IgG3CH1 及 κ 轻链恒定区基因序列完全相符, 大小分别为 324 bp 和 333 bp, 且同时正确引入了相应的酶切位点. 重组通用表达载体 pComb3C 酶切鉴定结果显示, 人 IgG3CH1 及 κ 轻链恒定区基因已正确插入载体 pComb3 中相应的酶切位点, 为单拷贝插入(图 1).

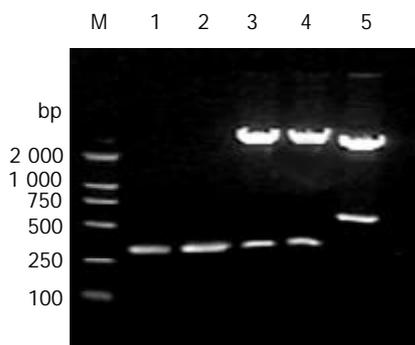


图 1 重组通用表达载体 pComb3C 的限制性酶切分析. M: DNA marker; 1: Human IgG3CH1; 2: Constant region of human κ chain; 3: pComb3C/Xho I + Spe I; 4: pComb3C/Sac I + Xba I; 5: pComb3C/EcoR V + Sal I.

**2.2 HAb18cFab 基因表达载体的构建** 利用 PCR 成功扩增出与 mAb HAb18 重、轻链可变区基因预期大小相符的目的片段(图 2). 酶切载体及相应基因片段后构建成重组表达载体 pComb3C/cFab(图 3). 酶切鉴定结果(图 2)证实, 目的基因片段已正确插入载体 pComb3C 中相应的

酶切位点. 序列分析结果显示, 嵌合 Fd 片段的 V<sub>H</sub> 及嵌合轻链的 V<sub>L</sub> 序列与已克隆的 HAb18 可变区序列完全相符, 并正确引入了相应的酶切位点, 同时鼠源的 V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub> 分别与人 IgG3CH1 及 κ 轻链恒定区通过酶切位点 EcoR V、Sal I 获得正确组装, 且密码子读框正确.

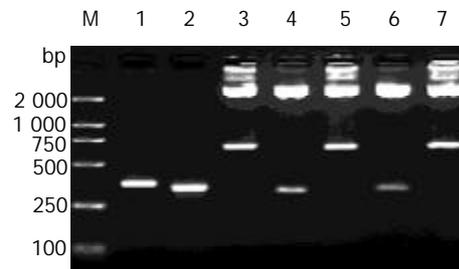


图 2 重组 cFab 表达载体 pComb3C/cFab-gIII 的限制性酶切分析. M: DNA marker; 1: VH; 2: VL; 3: pComb3C/cFab-gIII/Xho I + Spe I; 4: pComb3C/cFab-gIII/EcoR V + Spe I; 5: pComb3C/cFab-gIII/Sac I + Xba I; 6: pComb3C/cFab-gIII/Sal I + Xba I; 7: pComb3C/cFab-gIII/Spe I + Nhe I.

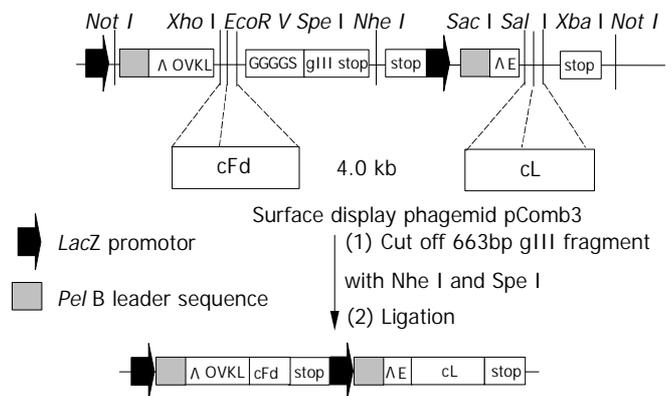


图 3 cFab 基因表达载体的构建.

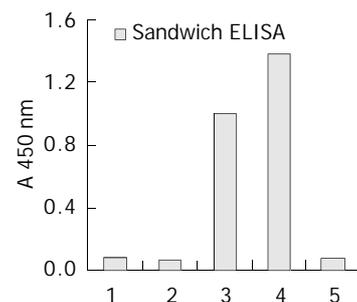


图 4 夹心 ELISA 检测 cFab 的表达. 1: pComb3 after induction; 2: pComb3C/cFab before induction; 3: pComb3C/cFab after induction; 4: chHAb18; 5: PBS.

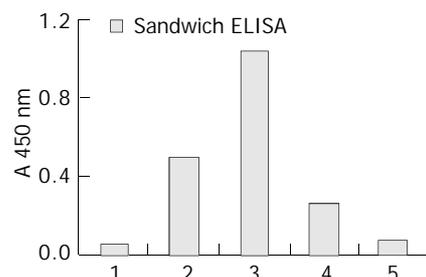


图 5 夹心 ELISA 检测 cFab 抗体表达产物的定位. 1: PBS; 2: Media supernatant; 3: Periplasmic extracts; 4: Cytoplasmic extracts; 5: Precipitation.

2.3 cFab的诱导表达及鉴定 夹心ELISA检测证实:重组载体 pComb3C/cFab 经 IPTG 诱导后成功的获得 cFab 抗体的表达(图 4, 图 5). cFab 表达产物主要存在于周质腔中, 培养基上清和细胞质中也有少量存在, 而沉淀中则未检测到 cFab 的存在.

2.4 cFab 表达产物的纯化和抗原结合活性的检测 利用亲和层析从 500 mL 培养细菌中纯化获得了 50 μg cFab 表达产物. SDS-PAGE 电泳和 Western-Blot 检测表明, 非还原状态下目的蛋白分子质量约为 42 ku, 还原后改变为 25 ku 左右. 所有蛋白条带均与羊抗人 IgG 抗体特异结合(图 6). 间接 ELISA 显示, 纯化的 cFab 可与 HAb18G 胞外区片段特异性结合(图 7). 同时竞争性 ELISA 结果证实, 纯化的 cFab 可以与亲本鼠抗体竞争性结合同一抗原表位, 且竞争性作用随着抗体浓度的增加而增强(图 8). 根据 50% 抑制率时 cFab 抗体与亲本鼠抗体浓度的比值, 可估计出其亲和力约为亲本鼠抗体 HAb18 的 10%. 免疫荧光染色结果也表明, 纯化的 cFab 可与肝癌细胞株 HHCC 特异性结合(图 9A), 阴性对照的细胞未见荧光染色(图 9B).

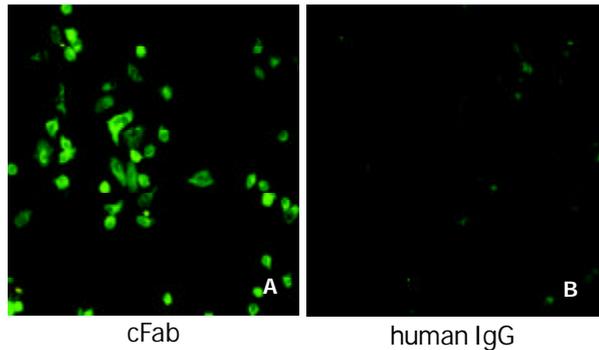


图9 免疫荧光染色观察 cFab 与肝癌细胞株 HHCC 的结合(× 200).

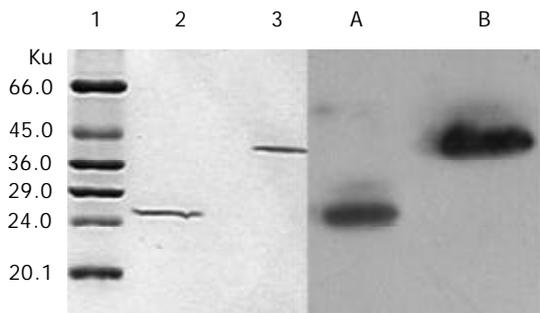


图6 cFab 抗体表达产物的 SDS-PAGE 电泳和 Western-Blot 分析. 1: m<sub>M</sub> marker; 2: Reduced cFab; 3: Unreduced cFab; A: Western blot of reduced cFab; B: Western blot of unreduced cFab.

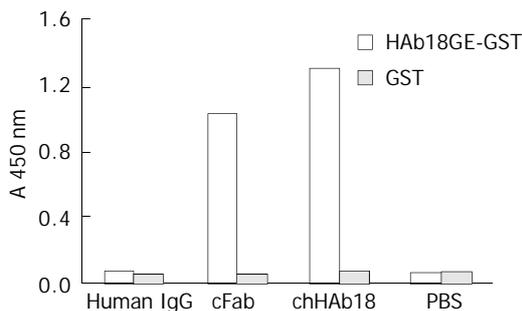


图7 间接 ELISA 检测 cFab 抗体的抗原结合特异性.

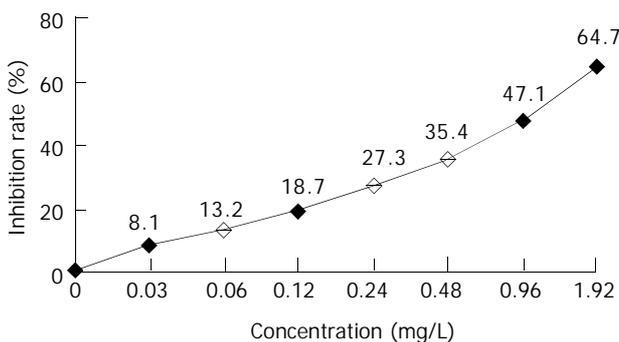


图8 竞争性 ELISA 检测 cFab 与 HAb18 的相对抗原结合活性.

### 3 讨论

单克隆抗体作为一种新型生物制剂在人类疾病的预防、诊断及治疗方面已显示出重要作用<sup>[12-14]</sup>. 然而, 鼠源性单抗属于异种蛋白而具免疫原性, 故在人体内应用时可产生不同程度的人抗鼠抗体(HAMA)反应, 因此其应用受到限制. 制备嵌合抗体、人源化抗体甚至完全人源性抗体可以程度不同的克服上述问题<sup>[15-16]</sup>, 但由于完全人源性抗体和人源化抗体制备相对比较困难<sup>[17]</sup>, 所以目前嵌合抗体是最常用于降低免疫原性的方法之一<sup>[18]</sup>. 嵌合抗体应用于临床治疗是安全有效的<sup>[19]</sup>.

另外, 全抗体分子组织穿透能力较差, 在血液和非瘤组织的清除较慢, 从而导致相对较低的 T/NT 比值. 嵌合 Fab 抗体的 M<sub>r</sub> 为 50 Ku, 只有完整 IgG 的 1/3, 具有较好的穿透性和药代动力学特征, 且能较好地保持结合抗原的活性因而成为当今应用较多的一种基因工程抗体类型<sup>[20-21]</sup>. cFab 由于没有 Fc 段, 从理论上减少了发生非特异性结合, 产生排斥反应的机会. 和完整抗体相比, cFab 没有抗体依赖的细胞毒作用(ADCC)和补体依赖的细胞毒作用(CDC), 因而主要作为载体分子用于疾病的导向诊断和治疗, 也可以进一步加工改造用于制备基因工程嵌合 F(ab)<sub>2</sub> 的抗体形式<sup>[22]</sup>.

由于嵌合 Fab 不需要翻译后修饰, 所以目前应用最多的为原核表达系统<sup>[23]</sup>. 所用 pComb3 该系统中最常见的噬粒表达载体之一, 含有两套启动子、前导肽及多克隆位点, 可同时使 cFd 和轻链基因在大肠杆菌中共表达. 表达产物在引导肽引导下, 可分泌进入大肠杆菌的周质腔, 在周质腔中形成二硫键并折叠成正确的空间构像, 并以有活性的可溶状态存在, 但也可由于未知的“渗漏”机制, 而导致 cFab 进入培养上清. 相对于以包涵体形式表达的蛋白而言, 分泌表达最大的优点是表达的抗体活性较高且便于纯化, 无须进行重新折叠复性等复杂的处理过程, 同时可避免细菌蛋白酶的降解, 降低抗体蛋白对宿主细胞的毒性作用, 但产量一般低于包涵体表达.

为了利于将各种鼠源性抗体方便的改造成嵌合 Fab 的形式, 避免每一次构建时均要进行嵌合 Fd 和嵌合轻链拼接的烦琐, 并尽量减少拼接部位个别氨基酸的改变对嵌合 Fab 抗体结构与功能活性的不确定影响, 我

们首先将人 IgG3CH1 和  $\kappa$  轻链恒定区基因克隆至原核分泌表达载体 pComb3 中, 成功构建了一个人鼠嵌合 Fab 抗体通用表达载体 pComb3C, 从而使鼠源性  $V_H$ 、 $V_L$  与人 IgGCH1、 $\kappa$  轻链恒定区基因拼接部位的氨基酸构成得以固定. 并通过抗人肝癌相关抗原 HAb18G 嵌合 Fab 抗体的表达证实了拼接部位的氨基酸构成对片段抗体的活性无明显影响. 其次, 我们先后将 mAb HAb18 重、轻链可变区基因亚克隆到载体 pComb3C 中相应的内切酶位点, 然后用 Spe I 和 Nhe I 双酶切去除 gIII 基因而得到可溶性 cFab 的表达载体. ELISA 和免疫细胞化学检测均证实, cFab 获得表达, 并具有较好的亲和力和特异性, 但纯化的结果显示表达产物的分泌量较低. 原因可能有两个方面: 一是外源基因本身对产量的影响, 这在我们表达 HAb18 的鼠源性 Fab 抗体时也有体现. 二是可能表达的条件不够优化. 根据 Raffai et al<sup>[24]</sup> 的报道, 在 Fab 的表达中, 选用不同的大肠杆菌菌株在表达量和表达抗体的活性上会有所不同. 因此, 如何提高 HAb18 cFab 的表达量, 仍是进一步需要解决的关键问题. 目前, 我们也正在尝试通过大肠杆菌非分泌性表达的形式来获得大量的高活性 cFab 抗体, 以期为进一步探讨该类抗体在肝癌治疗中的应用奠定良好的基础.

#### 4 参考文献

- 1 陈志南, 边惠洁, 蒋建利. 肝癌单抗研究应用现状与展望. 华人消化杂志 1998;6:461-462
- 2 蹇爱荣, 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;11:255-259
- 3 Lou C, Chen ZN, Bian HJ, Li J, Zhou SB. Pharmacokinetics of radioimmunotherapeutic agent of direct labeling mAb 188Re-HAb18. *World J Gastroenterol* 2002;8:69-73
- 4 Yang LJ, Sui YF, Chen ZN. Preparation and activity of conjugate of monoclonal antibody HAb18 against hepatoma F(ab')<sub>2</sub> fragment 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;4:117-1201
- 7 陈志南, 刘彦仿, 隋延仿. 肝癌单克隆抗体 HAb18 在人体肝癌导向诊断中的意义和应用. 中华肿瘤杂志 1992;14:9-12
- 8 Hasholzner U, Stieber P, Meier W, Lamerz R. Value of HAMA-determination in clinical practice-an overview. *Anticancer Res* 1997;17:3055-3058
- 9 Souriau C, Hudson PJ. Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:305-318
- 10 He FT, Nie YZ, Chen BJ, Qiao TD, Fan DM, Li RF, Kang YS, Zhang Y. Expression and identification of recombinant soluble single-chain variable fragment of monoclonal antibody MC3. *World J Gastroenterol* 2002;8:258-262
- 11 邢金良, 陈志南, 米力, 李郁, 冯强. 高效表达肝癌相关抗原 HAb18G 的 CHO 细胞株的建立. 肿瘤 2001;21:4-7
- 12 Goldenberg DM. Advancing role of radiolabeled antibodies in the therapy of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:281-296
- 13 Trail PA, King HD, Dubowchik GM. Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:328-337
- 14 Milenic DE. Monoclonal antibody-based therapy strategies: providing options for the cancer patient. *Curr Pharm Des* 2002;8:1749-1764
- 15 Chuntharapai A, Lai J, Huang X, Gibbs V, Kim KJ, Presta LG, Stewart TA. Characterization and humanization of a monoclonal antibody that neutralizes human leukocyte interferon: a candidate therapeutic for IDDM and SLE. *Cytokine* 2001;15:250-260
- 16 Hudson PJ, Souriau C. Engineered antibodies. *Nat Med* 2003;9:129-134
- 17 Caldas C, Coelho V, Kalil J, Moro AM, Maranhao AQ, Brigido MM. Humanization of the anti-CD18 antibody 6.7: an unexpected effect of a framework residue in binding to antigen. *Mol Immunol* 2003;39:941-952
- 18 Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 2001;1:118-129
- 19 Linenberger ML, Maloney DG, Bernstein ID. Antibody-directed therapies for hematological malignancies. *Trends Mol Med* 2002;8:69-76
- 20 Hellstrom HR. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Circulation* 2003;107:E39-49
- 21 赖增祖, 熊冬生, 范冬梅, 彭辉, 许元富, 朱祯平, 杨纯正. 嵌合抗 CD20 抗体 Fab 片段在大肠杆菌中表达及活性鉴定. 中国免疫学杂志 2000;16:521-524
- 22 Humphreys DP, Vetterlein OM, Chapman AP, King DJ, Antoniw P, Suijters AJ, Reeks DG, Parton TA, King LM, Smith BJ, Lang V, Stephens PE. F(ab')<sub>2</sub> molecules made from Escherichia coli produced Fab' with hinge sequences conferring increased serum survival in an animal model. *J Immunol Methods* 1998;217:1-10
- 23 Maeda F, Nagatsuka Y, Ihara S, Aotsuka S, Ono Y, Inoko H, Takekoshi M. Bacterial expression of a human recombinant monoclonal antibody fab fragment against hepatitis B surface antigen. *J Med Virol* 1999;58:338-345
- 24 Raffai R, Vukmirica J, Weisgraber KH, Rassart E, Innerarity TL, Milne R. Bacterial expression and purification of the Fab fragment of a monoclonal antibody specific for the low-density lipoprotein receptor-binding site of human apolipoprotein E. *Protein Expr Purif* 1999;16:84-90

# 肝癌细胞 H<sub>22</sub> 与树突状细胞杂交瘤苗的实验研究

张娟, 张锦堃, 卓少宏

张娟, 汕头大学医学院第一附属医院检验中心 广东省汕头市 515041  
张锦堃, 汕头大学医学院肿瘤病理研究室 广东省汕头市 515041  
卓少宏, 汕头市第三人民医院消化科 广东省汕头市 515073  
张娟, 女, 1972-12-18 生, 安徽省蚌埠市人, 汉族. 1996 年蚌埠医学院本科毕业, 2001 年汕头大学医学院硕士研究生毕业, 主管检验师. 主要从事肿瘤疫苗、肿瘤免疫等的基础研究.  
广东省自然科学基金资助项目, No. 980180  
项目负责人: 张锦堃, 515041, 广东省汕头市, 汕头大学医学院肿瘤病理研究室.  
电话: 0754-8900443  
收稿日期: 2003-08-08 接受日期: 2003-09-24

## A vaccine prepared by fusion of H<sub>22</sub> cells with the spleen-driven dendritic cells

Juan Zhang, Jin-Kun Zhang, Shao-Hong Zhuo

Juan Zhang, Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China  
Jin-Kun Zhang, Laboratory of Cancer Pathology, Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China  
Shao-Hong Zhuo, Department of Gastroenterology, Third Municipal Hospital of Shantou, Shantou 515073, Guangdong Province, China  
Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No.980180  
Correspondence to: Jin-Kun Zhang, Laboratory of Cancer Pathology, Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China.  
Received: 2003-08-08 Accepted: 2003-09-24

## Abstract

AIM: To prepare a cancer vaccine (H<sub>22</sub>-DC) based on fusion of hepatocarcinoma cells (H<sub>22</sub>) with dendritic cells (DC) of mice and to analyze the biological characteristics, tumorigenicity and specific CTL activity of H<sub>22</sub>-DC.

METHODS: DCs were fused with H<sub>22</sub> cells and fusion cells were marked with CD11c MicroBeads. The techniques of cell culture, immunocytochemistry and light microscopy were used to test the characteristics of growth morphology of H<sub>22</sub>-DC *in vitro*. As an immunogen, H<sub>22</sub>-DC was inoculated subcutaneously into the right armpit of Balb/C mice, and their tumorigenicity *in vivo* was observed. MTT was used to test the CTL activity of murine spleen *in vitro*.

RESULTS: H<sub>22</sub>-DC was able to divide and proliferate *in vitro*, but its activity of proliferation was significantly decreased as compared with H<sub>22</sub> cells and its growth curve was flatter than that of H<sub>22</sub> cells. The spleen CTL activity against H<sub>22</sub> cells in mice implanted with fresh H<sub>22</sub>-DC was significantly higher than that in control groups ( $P < 0.01$ ).

CONCLUSION: H<sub>22</sub>-DC can significantly stimulate the specific CTL activity of murine spleen. The DC vaccine is likely to become a helpful approach in immunotherapy of hepatocellular carcinoma.

Zhang J, Zhang JK, Zhuo SH. A vaccine prepared by fusion of H<sub>22</sub> cells with the spleen-driven dendritic cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12(2):276-279

## 摘要

目的: 将肝癌 H<sub>22</sub> 细胞与树突状细胞(DC)相融合, 研制杂交瘤苗, 并观察瘤苗的生长特性、致瘤性及免疫活性。

方法: 将 DC 与肝癌 H<sub>22</sub> 细胞融合制备 H<sub>22</sub>-DC 融合细胞, 磁式分选器分选融合细胞; 观察融合细胞的生长特性和体内致瘤性; 从 Balb/C 小鼠皮下接种融合细胞, 实验设肿瘤等三组对照, 每组各 5 只小鼠. MTT 比色法检测小鼠脾 CTL 活性。

结果: 融合细胞在体外能分裂增生, 但明显低于肿瘤细胞, 无体内致瘤性; 活融合细胞免疫的小鼠, 其脾 CTL 杀伤 H<sub>22</sub> 细胞的活性明显高于对照组小鼠 ( $P < 0.01$ ).

结论: 融合细胞能诱导出特异性的 CTL 活性, 可望成为肝癌免疫治疗的新途径。

张娟, 张锦堃, 卓少宏. 肝癌细胞 H<sub>22</sub> 与树突状细胞杂交瘤苗的实验研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):276-279

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/276.asp>

## 0 引言

T 细胞介导的细胞免疫应答在机体抗肿瘤免疫中起着关键作用, T 细胞的致敏、激活和扩增依赖于抗原呈递细胞(antigen presenting cells, APC)提呈相应的抗原多肽并提供共刺激信号<sup>[1]</sup>. 然而, 由于许多肿瘤细胞为弱免疫原性, 呈现 MHC 分子与共刺激分子的表达低下或缺如, 致使肿瘤抗原不能得到有效的提呈, 因而不能诱导机体有效的抗肿瘤免疫应答, 不能有效地激活体内特异性的杀伤机制. 当前国内外引人瞩目的 APC 瘤苗, 正是期望增强肿瘤细胞的免疫原性和提高抗原呈递细胞对肿瘤抗原的提呈能力, 以诱导有效的特异性 T 细胞抗肿瘤免疫. 树突状细胞(dendritic cells, DC)是目前已知体内功能最强的一类专职的抗原呈递细胞<sup>[2-4]</sup>, DC 具有抗原捕获、加工和提呈功能<sup>[5-6]</sup>, 尤其对初次免疫应答激发具有强大的刺激活性<sup>[7-9]</sup>. 因此 DC 在肿瘤免疫治疗方面的作用越来越受到人们的重视<sup>[10-13]</sup>. 本文采用小鼠脾脏来源的 DC 与肝癌细胞融合, 以有效发挥 DC 提呈肿瘤抗原的能力, 增强肿瘤细胞的免疫原性, 刺激宿主产生特异性 CTL 活性。

## 1 材料和方法

1.1 材料 BALB/C 小鼠(H-2<sup>d</sup>):清洁级, 6-8 周龄. ♂, ♀

质量 15-20 g, 购自上海西普尔必凯实验动物有限公司, 随机分成实验组和对照组. 小鼠 mAbCD80, CD86, CD54 为 coulter 公司产品. rmGM-CSF 和 rm IL-4 为 R&D Systems 产品; Mini MACS 磁式分选器及 CD11c MicroBeads 为 Miltenyi Biotec GmbH 产品; Metrizamide 为 amresco 产品, PEG 为 Sigma 公司产品.

1.2 方法 分离 DC 在原有 Steinman 法的基础上加以改良, 根据 DC 的半黏附性及 FcR $\gamma$  的特点, 应用 145 g/L 的 Metrizamide 密度梯度离心再用小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)和白介素-4(rmIL-4)共培养, 诱导小鼠脾 DC 扩增, 制备大量的 DC.

细胞融合和筛选 用 500 g/L 的聚乙二醇(PEG)使 DC 与 H<sub>22</sub> 细胞融合<sup>[14-15]</sup>. 再用 CD11c MicroBeads 标记, Mini MACS 磁式细胞分选器分选出 H<sub>22</sub>-DC. 置于含 rmGM-CSF 和 rm IL-4(500 ng/L)以及 200 g/L FCS 的 RPMI 1640 完全培养基中扩增培养 2-3 wk. 用光镜和相差镜观察 H<sub>22</sub>-DC, H<sub>22</sub> 和 DC 的形态特征.

1.2.1 免疫细胞化学染色 细胞分别与一抗 CD80, CD86 或 CD54 共孵育, 应用 ABC 试剂, DAB 显色, 观察膜蛋白并用 Olympus 显微摄影显微镜照相.

1.2.2 细胞体外增生特性分析 接种 H<sub>22</sub>-DC 于 24 孔培养板, 1.25 × 10<sup>4</sup>/孔, 每隔 24 h 取 3 孔计数细胞, 取其平均值绘制体外生长曲线, 同时以 H<sub>22</sub> 细胞为对照.

1.2.3 致瘤性分析 实验分三组, 每组又分 4 小组(H<sub>22</sub>-DC, H<sub>22</sub>+DC, H<sub>22</sub> 和 PBS 组). 分别给第一组的实验组小鼠右腋皮下接种 0.1 mL 1 × 10<sup>10</sup>-2 × 10<sup>10</sup>/L 的活 H<sub>22</sub>-DC, 对照组分别给予等量的 H<sub>22</sub>+DC, H<sub>22</sub> 和 PBS. 每日观察肿瘤的生长情况及小鼠的存活期. 第二组小鼠于免

疫后 14 d 处死, 分离肿瘤并称重比较.

1.2.4 CTL 活性 第三组小鼠于免疫后第 10 d 处死, 分离脾脏, 制备细胞悬液. 加入基因重组 IL-2 的含 100 g/L FCS 的 RPMI1640 培养液, 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 饱湿条件下孵育 3 d. 抗肿瘤实验分为 4 组, 各组均设 5:1 和 10:1 效(CTL)靶(H<sub>22</sub>)比. A 组: CTL(H<sub>22</sub>-DC 组)+ H<sub>22</sub>; B 组: CTL(H<sub>22</sub>+DC 组)+ H<sub>22</sub>; C 组: CTL(H<sub>22</sub> 组)+ H<sub>22</sub>; D 组: CTL(PBS 组)+ H<sub>22</sub>. 另设 T 组为相应的 CTL 对照组, E 组为 H<sub>22</sub> 对照组, 培养液空白对照组只含 FCS- RPMI1640. 每组均设 3 个复孔, 置于 96 孔培养板中, 37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub> 饱湿条件下孵育 48h, 应用原有的 MTT 法检测细胞毒性. 简而言之, 就是加入新配制已滤菌的 5 g/L 的 MTT 20 ul/孔继续孵育 4 h, 吸弃上清液, 加入 150 ul DMSO 振荡 10 min 使结晶物充分溶解; 选择 570 nm 波长, 在 Bio-Rad 3550-UV 型全自动酶联检测仪上检测.

统计学处理 用方差分析进行统计学处理, P < 0.05 为有统计学意义.

## 2 结果

2.1 DC 的形态特征 DC 为具有许多突起的形态不规则的细胞, 有刺突状和球形伪足状突起. 核卵圆形或不规则形, 不断进行波状运动. 胞质富含球形线粒体. 免疫细胞化学染色显示 DC 为 CD80、CD86、CD54 阳性细胞. 细胞形态不规则, 胞质内充满棕黄色细颗粒(图 1).

2.2 H<sub>22</sub>-DC 和 H<sub>22</sub> 的特性及融合细胞筛选 CD11c MicroBeads 标记后, Mini MACS 分选, 结果 H<sub>22</sub>-DC 为阳性细胞, H<sub>22</sub> 为阴性细胞; 免疫细胞化学染色显示 H<sub>22</sub>-DC 为 CD80、CD86、CD54 阳性细胞(图 2), 而 H<sub>22</sub> 为 CD80、



图 1 免疫细胞化学染色 DC. A: CD80; B: CD86; C: CD54 阳性(棕黄色) 3.3 × 100.

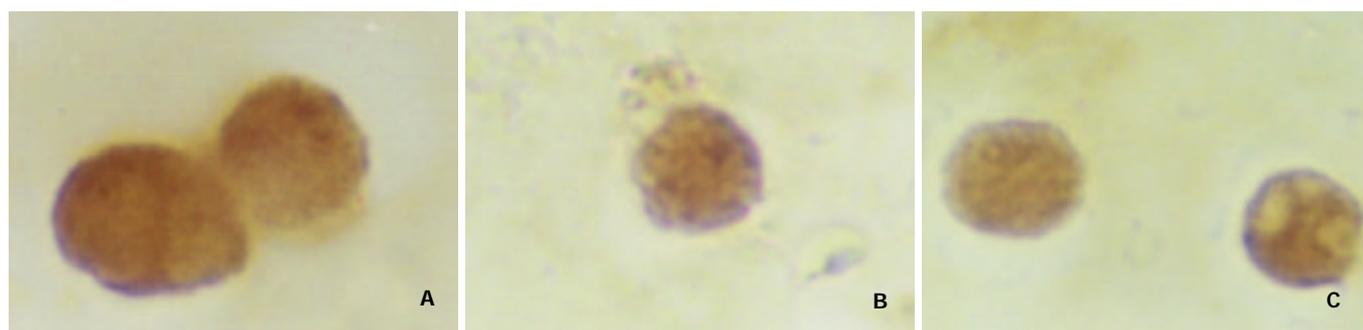


图 2 免疫细胞化学染色 H<sub>22</sub>-DC. A: CD80; B: CD86; C: CD54 阳性(棕黄色) 3.3 × 100.

CD86, CD54 阴性细胞. 细胞因子 rmGM-CSF 和 rmIL-4 能诱导融合细胞分裂增生, 并延长其存活时间. 经 rmCD11c MicroBeads 标记, Mini MACS 分选的融合细胞中混有未融合的 DC, 但在不加细胞因子的培养液中 10-14 d, DC 自然调亡, 而融合细胞则继续生长.

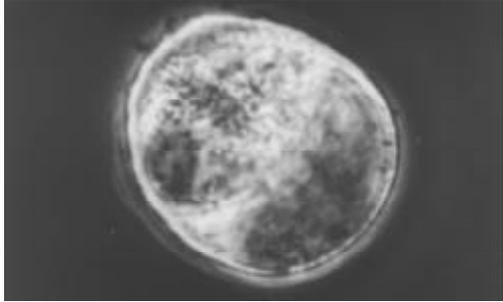


图3 倒置相差显微镜示 H<sub>22</sub>-DC 融合细胞 5 × 40.

2.3 融合细胞鉴定及特性分析 H<sub>22</sub>-DC 兼具两种亲本细胞的特性, 细胞呈悬浮生长, 呈卵圆形、扁平、不规则状, 富含线粒体, 核不规则(图3). 不加 rmGM-

CSF、rmIL-4 的 H<sub>22</sub>-DC 细胞活性低, 加入 rmGM-CSF 和 rmIL-4 后, H<sub>22</sub>-DC 可分裂增生, 但其生长曲线明显低于 H<sub>22</sub> 细胞(图4). H<sub>22</sub>-DC 免疫小鼠后, 超过 60 d 未见肿瘤形成, 而 H<sub>22</sub>+DC 和 H<sub>22</sub> 对照组却 100% 成瘤. 荷瘤 14 d 小鼠, H<sub>22</sub>-DC 组与 H<sub>22</sub> 组瘤重有显著性差异 P < 0.01(图5-6).

2.4 CTL 活性分析 MTT 法检测结果表明, H<sub>22</sub>-DC 组脾 CTL 活性显著高于 H<sub>22</sub>+DC, H<sub>22</sub> 和 PBS 组(P < 0.01)(图6).

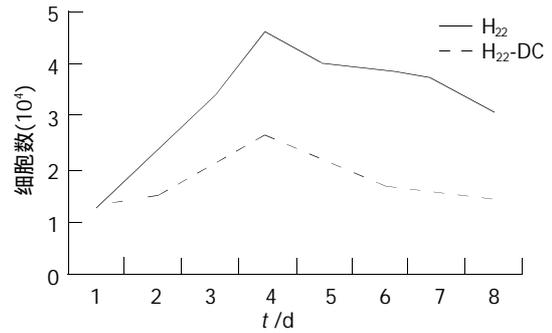


图4 融合细胞 H<sub>22</sub>-DC 生长曲线.

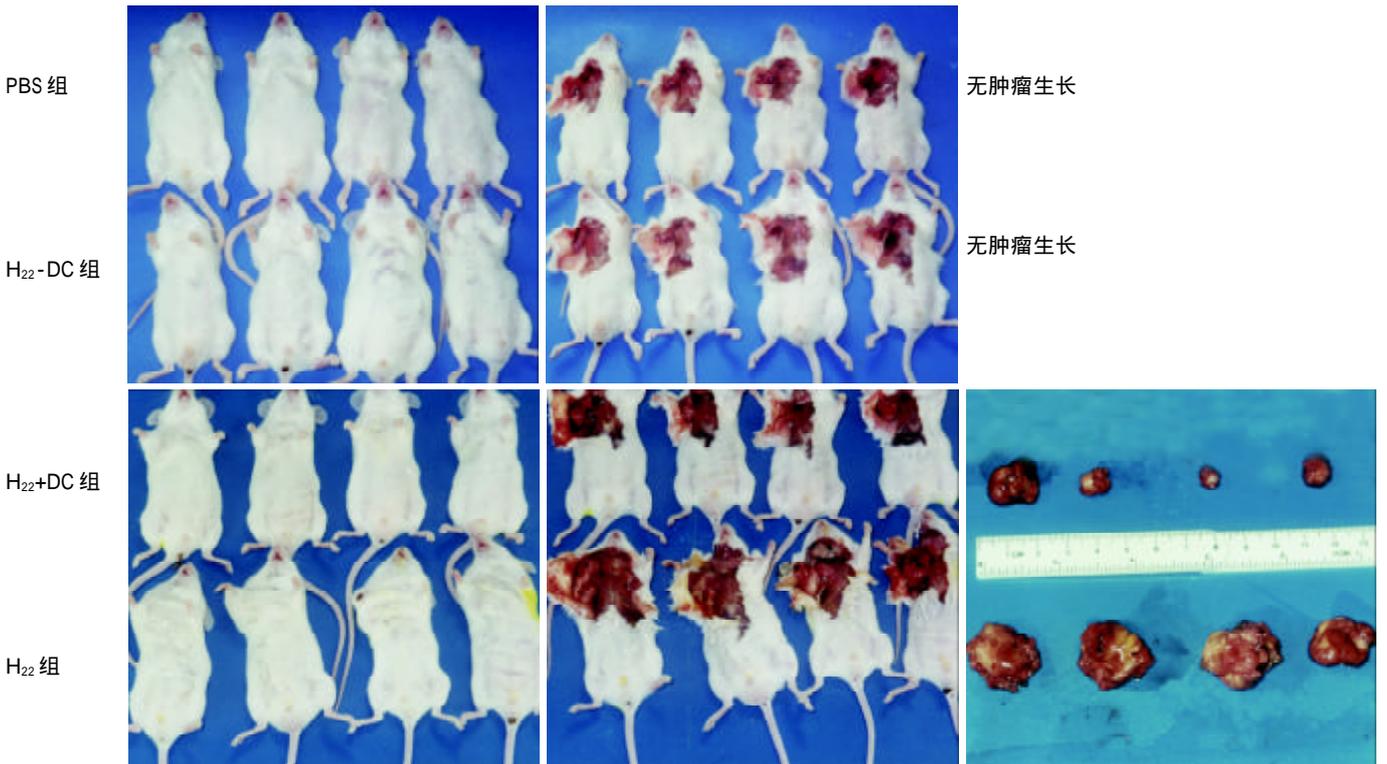


图5 皮下接种 H<sub>22</sub>-DC 14 d 的 Balb/c 小鼠成瘤情况.

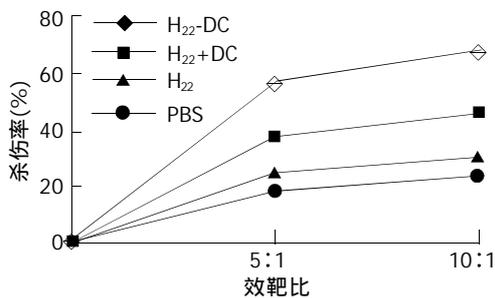


图6 MTT 法检测荷瘤 10 d Balb/c 小鼠的 CTL 活性.

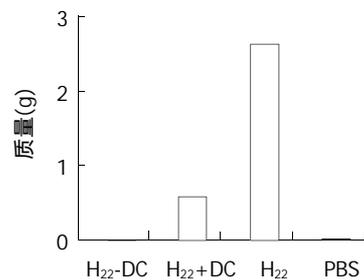


图7 荷瘤 14 d Balb/c 小鼠的瘤重情况.

### 3 讨论

成熟的DC能有效的递呈肿瘤肽表位诱导机体CTL产生特异性的抗肿瘤免疫反应<sup>[15-18]</sup>。活化的B细胞和DC与肿瘤细胞融合可制备DC疫苗。我们在建立DC的分离与扩增培养的基础上,采用PEG化学融合与免疫磁珠法相结合研制融合瘤苗,不仅大大简化了传统细胞融合方法中的繁琐筛选过程,也提高了分选细胞的纯度,是一种既简便又切实可行的方法。CD11c mAb (N418)对小鼠脾脏DC上表达的白细胞整合素 $\alpha\beta_2$ 中的 $\alpha$ 亚单位是特异性的,CD11c<sup>+</sup>细胞磁式分选器(Mini MACS)分离细胞的原理是通过通过偶联在CD11c抗体上的磁珠标记在细胞上,让细胞流过置于磁场中的分离柱而分离细胞。磁标记的CD11c<sup>+</sup>细胞留在MACS分选柱中,而CD11c<sup>-</sup>的细胞流过分选柱。分选柱撤离磁场后,从柱上洗脱的CD11c<sup>+</sup>细胞DC为正选细胞。MACS的分离效果已得到免疫荧光、PCR、FISH及FACS的确认,他的优点是处理的细胞量大,分离纯度高,方法简便,易于操作。

近年直接用DC与肿瘤细胞融合制备瘤苗已成为肿瘤主动免疫治疗的重要方法之一<sup>[19-23]</sup>。他不仅方法容易掌握、切实可行,而且开发了宿主体内免疫系统独特地识别、杀伤肿瘤细胞而又不损伤正常细胞的肿瘤治疗途径<sup>[24-30]</sup>。利用小鼠CD11c MicroBeads 标记,Mini MACS 磁式分选器分选出的H<sub>22</sub>-DC融合细胞,兼具两种亲本细胞的特征,形态不规则。其中混有的DC-DC和DC,在不加细胞因子的情况下,DC-DC于7-10d自然凋亡,DC于10-14d自然凋亡,H<sub>22</sub>-DC则继续存活。融合细胞开始时分裂增生尚快,尔后生长变的缓慢,活力和分裂增生活性下降,体外建株未成功。可能与肿瘤亲本细胞在体外的生长特性及融合细胞随培养时间增加而出现染色体丢失有关。

将H<sub>22</sub>-DC融合细胞注入Balb/C小鼠右腋皮下,超过60d未见肿瘤形成;注入混有等量DC的H<sub>22</sub>细胞的对照组则100%诱发肿瘤,说明H<sub>22</sub>-DC融合细胞已失去体内致瘤性。荷瘤14d的DC+H<sub>22</sub>组小鼠瘤重与H<sub>22</sub>组有显著性差异,说明单纯的混合虽不能阻止肿瘤形成,但在肿瘤形成的早期即可明显抑制小鼠肿瘤生长。提示在肿瘤形成早期,DC在递呈肿瘤抗原和诱导特异性抗肿瘤免疫反应过程中起到了一定的积极作用。本研究分别取接种10d的H<sub>22</sub>-DC, H<sub>22</sub>+DC及H<sub>22</sub>小鼠的脾脏,在体外诱导脾CTL活性,结果表明,接种融合细胞H<sub>22</sub>-DC的小鼠脾CTL活性明显高于接种H<sub>22</sub>细胞小鼠。提示瘤苗主动免疫小鼠能在体内产生特异性的抗肿瘤免疫保护作用,DC和H<sub>22</sub>-DC都能诱导小鼠体内特异性的抗肿瘤免疫反应,刺激效应性T细胞的形成,且H<sub>22</sub>-DC无致瘤性,提示DC与肝癌细胞直接融合有望成为肝癌肿瘤免疫治疗的一条有希望的治疗途径。

### 4 参考文献

1 戴晓霞,金月玲,黄培林. 树突状细胞的最新研究进展. 中华中西

- 医杂志 2001;2:902-904
- 2 Nagata Y, Ono S, Matsuo M, Gnjatic S, Valmori D. Differential presentation of a soluble exogenous tumor antigen, NY-ESO1, by distinct human. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10629-10634
  - 3 De Vries JJ, Eggert AA, Scharenborg NM, Vissers JL, Lesterhuis WJ, Boerman OC. Phenotypical and functional characterization of clinical grade dendritic cells. *J Immunother* 2002;25:429-438
  - 4 Zhang X, Gordon JR, Xiang J. Advances in dendritic cell-based vaccine of cancer. *Cancer Biother Radiop* 2002;17:601-619
  - 5 张锦堃, 陈海滨, 孙劲旅, 周燕琼. 树突状细胞对不同诱导时间LPAAK抗肝癌作用的影响. 世界华人消化杂志 1999;7:673-375
  - 6 陈海滨, 张锦坤, 黄子亮, 孙劲旅, 周燕琼. 细胞因子树突状细胞对抗肝癌作用的影响. 世界华人消化杂志 1999;7:191-193
  - 7 Rains N, Canan RJ, Chen W, Stubbs RS. Development of a dendritic cell (DC)-based vaccine for patients with advanced colorectal. *Hepatogastroenterology* 2001;48:347-351
  - 8 Fay JW. Hematopoietic growth factors, dendritic cell biology, and vaccine therapy of cancer. *Curr Opin Hematol* 2002;9:202-206
  - 9 Hu JY, Wang S, Zhu JG, Zhou GH, Sun QB. Expression of B7 costimulation molecules by colorectal cancer cells reduces tumorigenicity and induces anti-tumor immunity. *World J Gastroenterol* 1999;5:147-151
  - 10 Gitlitz BJ, Belldgrun AS, Figlin RA. Vaccine and gene therapy of renal cell carcinoma. *Semin Urol Oncol* 2001;19:141-147
  - 11 Zisman A. New trends in the diagnosis and treatment of renal cell carcinoma. *Harefuah* 2002;141:713-717
  - 12 Sabel MS, Sondak VK. Tumor vaccines: a role in preventing recurrence in melanoma? *Am J Clin Dermatol* 2002;3:609-616
  - 13 Onaitis M, Kalady MF, Pruitt S, Tyler DS. Dendritic cell gene therapy. *Surg Oncol Ckin N Am* 2002;11:645-660
  - 14 McConnell EJ, Pathangey LB, Madsen CS, Gendler SJ, Mukherjee P. Dendritic cell-tumor cell fusion and staphylococcal enterotoxin B treatment in a pancreatic tumor model. *J Surg Res* 2002;107:196-202
  - 15 Liu YQ, Zhang WD, Chan T, Saxena A, Xiang J. Engineered fusion hybrid vaccine of IL-4 gene-modified myeloma and relative mature dendritic cells enhances antitumor immunity. *Leuk Res* 2002;26:757-763
  - 16 李明松, 袁爱力, 张万岱, 陈学清, 谭晓华, 朴英杰. 树突状细胞诱导的抗肿瘤免疫诱导移植瘤细胞凋亡并抑制其增生. 世界华人消化杂志 2000;8:56-58
  - 17 李明松, 袁爱力, 张万岱, 刘思德, 吕爱民, 周殿元. 树突状细胞体外诱导抗肝癌免疫. 世界华人消化杂志 1999;7:161-163
  - 18 肖兰凤, 罗利琼, 邹奕, 黄树林. CD28/CD80和CD2/CD58活化PBLs作用肝癌细胞的表型分析与TcR V $\beta$ 基因亚家族的优势取用. 世界华人消化杂志 1999;7:1044-1046
  - 19 翟守恒, 刘俊彬, 朱平, 王彦宏. 肝硬变和肝细胞癌组织中CD54、CD80、CD86、HLA-ABC的表达. 世界华人消化杂志 2000;8:292-295
  - 20 李军, 张锦堃, 张娟, 陈海滨, 陈肃标. 树突状细胞融合瘤苗的体内抗肝癌效应. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:34-38
  - 21 陆燕蓉, 林苹, 张洁, 王修杰, 周宏远, 黄孝忠, 宁奇志. 肺癌树突状融合细胞的制备及其生物学特征. 免疫学杂志 2001;17:60-63
  - 22 刘美娜. 自体或同种异体树突状细胞融合人卵巢癌细胞体外诱导抗肿瘤免疫反应. 国外医学·妇产科学分册 2001;28:189-190
  - 23 伊焕发, 唐军民, 唐岩, 孙红亚, 甄豆, 戴燕, 秦说. 人外周血树突状细胞-乳腺癌细胞融合细胞. 解剖学杂志 2003;26:105-108
  - 24 李坚, 李卫党, 藏磊, 许化溪, 陈森. 树突状细胞与肿瘤细胞融合后对肿瘤发生和生长的抑制作用. 实用癌症杂志 2000;15:453-455
  - 25 李坚, 藏磊, 许化溪, 马斌, 邵起祥. 树突状细胞与肿瘤细胞融合后诱导T细胞介导的抗肿瘤效应. 中国肿瘤临床 2001;28:926-929
  - 26 张卫东, 杨泓, 甄宏韬, 陈庄. 基因工程肿瘤细胞融合疫苗诱导Th1应答抗肿瘤. 中华血液学杂志 2002;23:61-64
  - 27 吴军, 杨太成, 王晓怀, 杨传红, 赖晃文, 王捷, 郑文玲. 人癌胚抗原重组疫苗病毒转染树突状细胞体外诱导的抗肿瘤免疫. 中华微生物学和免疫学杂志 2003;23:27-30
  - 28 杨航. 树突状细胞疫苗与泌尿系统肿瘤的生物治疗. 免疫学杂志 2002;18:S164-S167
  - 29 癌症疫苗. 国外医学·预防、诊断、治疗用生物制品分册 2001;24:14-16
  - 30 邹文燕, 钱志红, 徐惠民. 树突状细胞与卵巢癌的免疫治疗. 国外医学·妇产科学分册 2003;30:50-53

# 肝细胞癌 hOGG1 mRNA 及其蛋白的表达

周秀敏, 林菊生, 章金艳, 张莉, 周鹤俊

周秀敏, 林菊生, 章金艳, 张莉, 周鹤俊, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030

周秀敏, 女, 1977-10-24 生, 湖北省孝感人, 汉族, 2000 年郧阳医学院本科毕业, 2000-2002 年华中科技大学同济医学院硕士研究生, 2002 年硕博连读攻读博士学位, 主要从事肝脏疾病的研究。

项目负责人: 林菊生, 200080, 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肝病研究所. linjusheng2001@163.net  
电话: 027-83663595

收稿日期: 2003-04-15 接受日期: 2003-06-04

## Expression of hOGG1 mRNA and protein in hepatocellular carcinoma

Xiu-Min Zhou, Ju-Sheng Lin, Jin-Yan Zhang, Li Zhang, He-Jun Zhou

Xiu-Min Zhou, Ju-Sheng Lin, Jin-Yan Zhang, Li Zhang, He-Jun Zhou, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Ju-Sheng Lin, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China. linjusheng2001@163.net

Received: 2003-04-15 Accepted: 2003-06-04

## Abstract

**AIM:** To study the expression of DNA repair enzyme hOGG1 mRNA and protein in normal liver cell, hepatoma cell lines and hepatocellular carcinoma (HCC) tissues, and to investigate their function in the progress of HCC.

**METHODS:** Expression of hOGG1 in normal liver cell L-02, hepatoma cell lines HepG2, SMMC7721 and HCC tissues (26 cases) as well as surrounding tissues of HCC (21 cases) were detected by semi-quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction. hOGG1 protein was detected in corresponding HT tissues (17 cases HT) and their surrounding liver tissues (15 cases HST) by immunohistochemistry.

**RESULTS:** The expression level of hOGG1 mRNA in normal liver cell line was lower than that in two hepatoma cell lines ( $0.270 \pm 0.014$  vs  $0.662 \pm 0.011$ ,  $0.624 \pm 0.020$ ,  $P < 0.05$ ). The expression of hOGG1 mRNA in HepG2 was similar to that in SMMC7721. The expression of hOGG1 mRNA in HT was lower than that in HST ( $P < 0.05$ ). hOGG1 protein was 87.2% (41 of 47) positive in HT and HST and was mainly distributed in liver cells. The protein level of hOGG1 in HCC tissues was correspondingly lower than in their surrounding tissues ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Overexpression of hOGG1 in hepatoma cell lines and the surrounding liver tissues of HCC may be one of the key events which promote the malignant growth. These results suggest a role for hOGG1 expression in the course of the multistage process of carcinogenesis in hepatocellular carcinoma.

Zhou XM, Lin JS, Zhang JY, Zhang L, Zhou HJ. Expression of hOGG1 mRNA and protein in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):280-282

## 摘要

**目的:** 通过检测 DNA 修复酶 hOGG1 mRNA 及其蛋白在肝细胞癌中表达程度, 探讨 hOGG1 在肝细胞癌发生、发展中的作用。

**方法:** 应用 RT-PCR 研究正常肝细胞株 L-02、肝癌细胞株 SMMC7721, HepG2 和肝癌(26 例)及癌旁组织(21 例)中 hOGG1 mRNA 的表达, 同时用免疫组织化学方法检测了上述肝癌组织(17 例)及癌旁组织(15 例)中 hOGG1 蛋白的表达。

**结果:** 三株细胞均有 hOGG1 mRNA 表达, 但 hOGG1 mRNA 在正常肝细胞株 L-02 中的表达显著低于肝癌细胞株 SMMC7721、HepG2 中的表达(分别为  $0.270 \pm 0.014$ ,  $0.66 \pm 0.011$ ,  $0.624 \pm 0.020$ ,  $P < 0.05$ )。肝癌组织 hOGG1 mRNA 表达较癌周组织明显降低( $P < 0.05$ )。hOGG1 蛋白肝组织表达阳性率为 87.2%, 主要在肝细胞胞质表达, 在肝癌组织中表达比癌周组织明显降低( $P < 0.05$ )。

**结论:** hOGG1 mRNA 及其蛋白在肝癌细胞株及癌周组织中表达量升高, 这可能是肝细胞癌恶性演变过程中的一个早期预警指标。

周秀敏, 林菊生, 章金艳, 张莉, 周鹤俊. 肝细胞癌 hOGG1 mRNA 及其蛋白的表达. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):280-282

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/280.asp>

## 0 引言

多种理化因素, 如紫外线、电离辐射、化学诱变剂等可损伤细胞 DNA。如果 DNA 损伤得不到及时和有效的修复, 细胞将发生基因突变和癌变等严重后果。Oh8Gua 是肿瘤发生过程中 DNA 损伤的主要产物, 是一种高度致突变性损伤。hOGG1 基因产物 hOGG1 蛋白具有 DNA 糖苷酶和 AP 裂解酶活性, 可特异切除修复 Oh8Gua 以及因自发碱基丢失、或因 DNA 糖苷化作用产生的阻断 DNA 复制的脱嘌呤或脱嘧啶(AP)位点。我们以  $\beta$ -microglobulin 基因为内参, 采用 RT-PCR 技术和免疫组织化学 SP 方法检测正常肝细胞株 L-02、肝癌细胞株 SMMC7721, HepG2 和肝癌及癌旁组织中 hOGG1 mRNA 及其蛋白质表达, 来揭示 hOGG1 表达与肝细胞癌恶性演变的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 正常肝细胞株 L-02、肝癌细胞株 SMMC7721, HepG2 均由同济医院肝病研究所传代培养, 均为贴壁生长的真核细胞, 用含 100 mL/L 的胎牛血清(FCS)和 100 kU/L 的青/链霉素的 DMEM(dulbeccos modified engle medium)培养液在 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 条件下培养. 2001-09/2002-01 在武汉同济医院肝胆外科中心手术切除, 并经病理证实为肝癌及癌旁组织各 26、21 例, 经病理证实为肝癌及肝硬化组织. 逆转录试剂及 PCR 扩增试剂均购自 Promega 公司, Trizol 购自 Omega 公司. 兔抗人 hOGG1 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz Biotech 公司, 由国内深圳晶美公司代理. 免疫组织化学 SP 试剂盒购自北京中山公司. 引物和内参  $\beta$ -microglobulin 参照文献[1] (Oncogene 1998;16:3083-3086) 中的引物序列, 扩增片段分别为 250 bp 和 190 bp, 两对引物由上海生物工程研究所合成. hOGG1 上游引物序列: 5' -GCGAC TGCTGCGACAAGAC-3', 下游引物序列: 5' -TCGGGCACTGGCACTCAC-3';  $\beta$ -microglobulin 上游引物序列 5' -TACTCTCTCTTTCTGGCCTG-3', 下游引物序列: 5' -GACAAGTCTGAATGCTCCAC-3'.

**1.2 方法** 吸干六孔板培养液, 加 TrizoL 1 mL 后吹打、混匀、按照 TrizoL 试剂说明书步骤提取总 RNA, 溶于无 RNase 酶水中, 用紫外分光光度仪测定 RNA 浓度和纯度, -75 °C 保存备用. 组织用预冷的 PBS 漂洗干净后, 组织匀浆器研碎, 其他步骤同细胞提取过程相同. 取总 RNA 2  $\mu$ L, 5  $\times$  RT Buffer 5  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L, 50 mU/L 的 RNasin 0.5  $\mu$ L, 0.5 g/L 的 oLigodT 1  $\mu$ L, 200 mU/L 的 M-MLV RT 1  $\mu$ L, 去离子水补至 25  $\mu$ L, 42 °C 反应 60 min, 99 °C 灭活 5 min. 阴性对照为不加模板的反应体系. 取上述 cDNA 4  $\mu$ L, 加入 10  $\times$  Buffer 5  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ L, 10 pmol/L 引物各 2  $\mu$ L, 10 pmol/L  $\beta$ -microglobulin 各 1  $\mu$ L. 混匀后 97 °C, 5 min 热启动, 3 mU/L Taq 酶 1  $\mu$ L, 总体积 50  $\mu$ L, 加矿物油 50  $\mu$ L 覆盖. 扩增条件: 94 °C 变性 50 s, 57 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 20 s, 32 个循环, 72 °C 补偿 7 min, 分别扩增 hOGG1 及  $\beta$ -microglobulin 基因片段. 实验过程设立空白对照, 为不加模板的反应体系. 取 PCR 产物 10  $\mu$ L, PCR 上样缓冲液 5  $\mu$ L, 于 20 g/L 琼脂糖凝胶上电泳(含 0.5 mg/L 溴化乙锭), 80V, 30 min, 然后在紫外灯下观察结果. UVP 凝胶分析系统摄像分析结果. hOGG1 蛋白的表达用 SP 法检测, 石蜡切片常规脱蜡至水, 然后加 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 甲醇孵育 10 min, 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲液微波 90 °C, 10 min 抗原修复, PBS 洗后加正常兔血清, 再滴加一抗(1:100) 4 °C 孵育过夜. 滴加二抗, PBS 洗后用 DAB 显色, 苏木素复染, 中性树脂封片.

**统计学处理** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 率的显著性差异检验选用方差分析(SNK 软件).

## 2 结果

**2.1 正常肝细胞和肝癌细胞中hOGG1mRNA的表达** 正常肝细胞株 L-02 平均 hOGG1/ $\beta$ 2 比值为  $0.270 \pm 0.014$ , SMMC7721 为  $0.662 \pm 0.011$ , HepG2 为  $0.624 \pm 0.020$ . 其中 hOGG1 mRNA 的水平在 L-02 中比在 SMMC7721, HepG2 中相对下降 ( $P < 0.05$ , SNK test), 但两株肝癌细胞 SMMC7721 和 HepG2 中 hOGG1 mRNA 表达无明显差异 ( $P > 0.05$ , SNK test, 图 1).

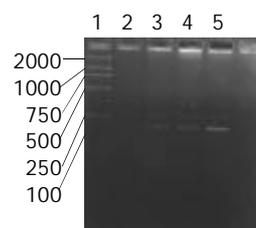


图 1 hOGG1 mRNA 在三株细胞中的表达. 1: marker; 2: 不加 cDNA 的 PCR 反应体系; 3: SMMC7721 肝癌细胞株; 4: HepG2 肝癌细胞株; 5: L-02 正常肝细胞株.

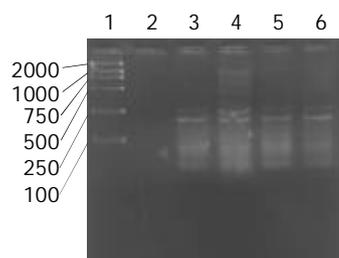


图 2 hOGG1 mRNA 在肝癌及癌旁组织表达. 1: marker; 2: 为不加 cDNA 的 PCR 反应体系; 3: 肝癌组织; 4: 相应癌旁组织; 5: 肝癌组织 2; 6: 相应癌旁组织 2.

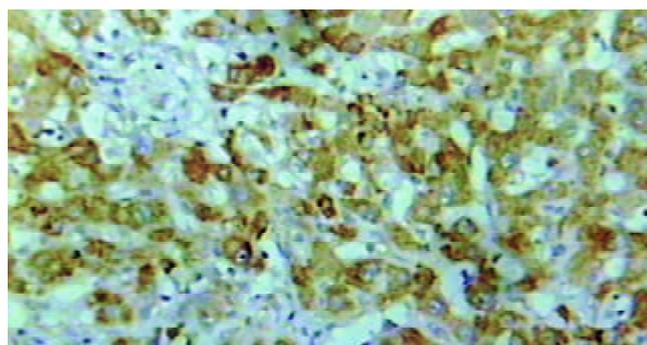


图 3 hOGG1 蛋白在肝癌癌旁组织中表达免疫组化( $\times 200$ ).

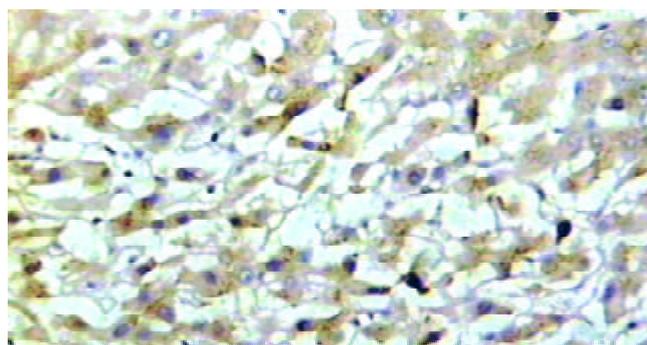


图 4 hOGG1 蛋白在肝癌组织中表达免疫组化( $\times 200$ ).

2.2 肝癌组织及癌旁组织 hOGG1 mRNA 表达 肝癌组织 hOGG1/ $\beta$ 2 比值为  $0.31 \pm 0.08$ , 癌旁组织为  $0.68 \pm 0.15$ , 两组差异有显著性 ( $P < 0.05$ ). hOGG1 蛋白表达阳性率为 87.2% (41/47), 阳性物质呈棕黄色, 在肝癌及癌旁组织中主要分布于肝细胞胞质内见图 3-4. 肝癌组织中 hOGG1 蛋白表达的阳性均值  $0.126 \pm 0.02$ , 癌旁组织中 hOGG1 蛋白表达的阳性均值为  $0.137 \pm 0.08$ , 两组均值有统计学差异 ( $t = 5.358$ ,  $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

在 DNA 氧化损伤中, 8-羟基鸟嘌呤(Oh8Gua)形成频率最高, 致突变能力最强, 是 DNA 氧化损伤的代表性产物, 是肿瘤发生和发展的重要因素<sup>[1-10]</sup>. 因此, Oh8Gua 的修复能力可能与个体癌症易感性密切相关<sup>[11-17]</sup>. hOGG1 基因产物 hOGG1 蛋白具有 DNA 糖苷酶和 AP 裂解酶活性, 可特异切除修复 Oh8Gua 以及自发碱基丢失、或因 DNA 糖苷化作用产生的阻断 DNA 复制的脱嘌呤或脱嘧啶(AP)位点. hOGG1 基因及其表达产物与肿瘤的发生发展关系密切, 在多种肿瘤里发现 hOGG1 基因表达异常, 故很多学者认为: hOGG1 基因及其表达产物可能是肿瘤恶变的一个早期预警指标. Li et al 发现乳腺癌患者的正常乳腺组织较正常人的乳腺组织 Oh8Gua 含量高, 同时也发现其 hOGG1 蛋白含量也较正常人乳腺组织高. Cheng et al 研究了女性肺癌的致癌因素, 发现厨房的油烟是主要的因素之一. 发现肺癌细胞 C L - 3 经油烟处理后, Oh8Gua 含量增高, hOGG1 mRNA 含量也相应升高; 同时他们研究了经常接触油烟的 94 名女厨师和 43 名家庭妇女, 101 名没有接触厨房油烟的正常女性作为对照. 发现前二者肺组织 hOGG1 mRNA 含量较对照组高. 因此他们认为: hOGG1 mRNA 水平可能作为油烟刺激后肺癌发生的一个预警指标. Kondo et al 发现 hOGG1 mRNA 在结肠癌组织中比相应癌旁组织表达增高, Oh8Gua 在结肠癌组织中比相应癌旁组织中含量增高.

本研究结果显示 hOGG1 mRNA 在三株细胞中均有表达. 其中, hOGG1 mRNA 在正常肝细胞株 L-02 中表达量较肝癌细胞株 SMMC7721、HepG2 中相对较少 ( $P < 0.05$ ), 而 2 株肝癌细胞株中的 hOGG1 mRNA 基因表达则无显著异性 ( $P > 0.05$ ). 肝癌细胞株 SMMC7721, HepG2 中 hOGG1 mRNA 基因表达比正常肝细胞株 L-02 中表达量增加, 这可能是肝癌的演进过程中氧化应激加剧, 机体 DNA 修复酶系统反馈性从转录水平进行调节的机制. 同时发现肝癌组织 hOGG1 mRNA 及蛋白表达较癌周肝硬化组织明显降低, 其机制可能为肝癌在恶性演变过程中, 在其肝硬化阶段已发生 DNA 修复酶系统 hOGG1 从转录水平进行代偿性调节, 在肝癌形成阶段 DNA 修复酶系统失代偿所致. 我们从 DNA 氧化损伤及其修复酶系统探讨肝细胞癌的发生机制, 研究氧化应激和 DNA 修复酶在肝细胞癌发生发展中的地位与作用. 试图为肝癌的发生预测和早期诊断寻求新的指标, 为肝癌的预

防和早期治疗开辟一条新的途径.

### 4 参考文献

- Mistry P, Herbert KE. Modulation of hOGG1 DNA repair enzyme in human cultured cells in response to pro-oxidant and antioxidant challenge. *Free Radic Biol Med* 2003;35:397-405
- Collins AR, Harrington V, Drew J, Melvin R. Nutritional modulation of DNA repair in a human intervention study. *Carcinogenesis* 2003;24:511-515
- Karim MR, Wanibuchi H, Wei M, Morimura K, Salim EI, Fukushima S. Enhancing risk of ethanol on MeIQx-induced rat hepatocarcinogenesis is accompanied with increased levels of cellular proliferation and oxidative stress. *Cancer Lett* 2003;192:37-47
- Tsuruya K, Furuichi M, Tominaga Y, Shinozaki M, Tokumoto M, Yoshimitsu T, Fukuda K, Kanai H, Hirakata H, Iida M, Nakabeppu Y. Accumulation of 8-oxoguanine in the cellular DNA and the alteration of the OGG1 expression during ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *DNA Repair (Amst)* 2003;2:211-229
- Potts RJ, Watkin RD, Hart BA. Cadmium exposure down-regulates 8-oxoguanine DNA glycosylase expression in rat lung and alveolar epithelial cells. *Toxicology* 2003;184:189-202
- Hazra TK, Izumi T, Boldogh I, Imhoff B, Kow YW, Jaruga P, Dizdaroğlu M, Mitra S. Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:3523-3528
- Saitoh T, Shinmura K, Yamaguchi S, Tani M, Seki S, Murakami H, Nojima Y, Yokota J. Enhancement of OGG1 protein AP lyase activity by increase of APEX protein. *Mutat Res* 2001;486:31-40
- Kim HN, Morimoto Y, Tsuda T, Ootsuyama Y, Hirohashi M, Hirano T, Tanaka I, Lim Y, Yun IG, Kasai H. Changes in DNA 8-hydroxyguanine levels, 8-hydroxyguanine repair activity, and hOGG1 and hMTH1 mRNA expression in human lung alveolar epithelial cells induced by crocidolite asbestos. *Carcinogenesis* 2001;22:265-269
- Burner SD, Norman DP, Verdine GL. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature* 2000;403:859-866
- Nishioka K, Ohtsubo T, Oda H, Fujiwara T, Kang D, Sugimachi K, Nakabeppu Y. Lular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Mol Biol Cell* 1999;10:1637-1652
- Cheng B, Jungst C, Lin J, Caselmann WH. In process citation. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2002;22:206-211
- Riis B, Risom L, Loft S, Poulsen HE. Increased rOGG1 expression in regenerating rat liver tissue without a corresponding increase in incision activity. *DNA Repair (Amst)* 2002;1:419-424
- Morland I, Rolseth V, Luna L, Rognes T, Bjoras M, Seeberg E. Human DNA glycosylases of the bacterial Fpg/MutM superfamily: an alternative pathway for the repair of 8-oxoguanine and other oxidation products in DNA. *Nucl Acids Res* 2002;30:4926-4936
- Vogel U, Moller P, Dragsted L, Loft S, Pedersen A, Sandstrom B. Inter-individual variation, seasonal variation and close correlation of OGG1 and ERCC1 mRNA levels in full blood from healthy volunteers. *Carcinogenesis* 2002;23:1505-1509
- Kinoshita A, Wanibuchi H, Imaoka S, Ogawa M, Masuda C, Morimura K, Funae Y, Fukushima S. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine and cell-cycle arrest in the rat liver via generation of oxidative stress by phenobarbital: association with expression profiles of p21(WAF1/Cip1), cyclin D1 and Ogg1. *Carcinogenesis* 2002;23:341-349
- He YH, Xu Y, Kobune M, Wu M, Kelley MR, Martin WJ 2nd. Escherichia coli FPG and human OGG1 reduce DNA damage and cytotoxicity by BCNU in human lung cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L50-55
- Araneda S, Mermet N, Verjat T, Angulo JF, Radicella JP. Expression of Kin17 and 8-OxoG DNA glycosylase in cells of rodent and quail central nervous system. *Brain Res Bull* 2001;56:139-146

# 小鼠AFP-CTLA4融合蛋白真核表达载体的构建及鉴定

田耕, 易继林

田耕, 易继林, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科  
湖北省武汉市 430030  
田耕, 男, 1971-03-18 生, 陕西省宝鸡市人, 汉族, 博士, 主治医师. 主要从事肝脏肿瘤的研究.  
项目负责人: 田耕, 430030, 湖北省武汉市汉口解放大道 1095 号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科. geng\_tian707@hotmail.com  
电话: 027-83663402  
收稿日期: 2003-06-30 接受日期: 2003-10-07

## Construction and identification of the eukaryotic expression vector of murine AFP-CTLA4 fusion protein

Geng Tian, Ji-Lin Yi

Geng Tian, Ji-Lin Yi, Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
Correspondence to: Geng Tian, Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China.  
geng\_tian707@hotmail.com  
Received: 2003-06-30 Accepted: 2003-10-07

## Abstract

AIM: To clone the murine  $\alpha$ -fetoprotein gene and to construct the eukaryotic expression vector of AFP-CTLA4 fusion protein.

METHODS: Total RNAs were extracted from Hepa1-6 cells, then the murine  $\alpha$ -fetoprotein gene was amplified by RT-PCR and cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1. The extramembrane domain of mouse CTLA4 gene was amplified from plasmid pmCTLA4-Ig, followed by the addition of a linker using overlap PCR. The PCR product was subcloned into pmAFP and fused in frame with the AFP. The recombinant of vector was transformed into *E. coli*. DH5 $\alpha$ , the positive clones were selected and the plasmid DNA was identified by restriction enzyme analysis and sequencing. After transient transfection of CHO-K1 cells with the recombinant of vector, Western blotting was used to detect the expression of fusion protein.

RESULTS: The 1.8 kb murine  $\alpha$ -fetoprotein gene was successfully cloned from the total RNA of Hepa1-6 cells. The result obtained from the restriction enzyme analysis showed that the extramembrane domain of mouse CTLA4 gene was successfully inserted into pmAFP. Result of sequencing ascertained that the orientation of the ligations and the reading frame were correct, and Western blotting indicated that the recombinant of vector could express murine AFP-CTLA4 fusion protein in CHO-K1 cells.

CONCLUSION: We successfully construct eukaryotic expression vector of AFP-CTLA4 fusion protein, which forms an important basis for the research of immunotherapy of

hepatocellular carcinoma with pmAFP-CTLA4.

Tian G, Yi JL. Construction and identification of the eukaryotic expression vector of murine AFP-CTLA4 fusion protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):283-285

## 摘要

目的: 克隆小鼠甲胎蛋白(mAFP)基因并构建小鼠甲胎蛋白-细胞毒性T淋巴细胞抗原4(mAFP-CTLA4)融合蛋白真核表达载体.

方法: 从Hepa1-6细胞中提取总RNA进行RT-PCR, 扩增出mAFP基因, 亚克隆于pcDNA3.1载体. PCR法从质粒pmCTLA4-Ig中克隆出mCTLA4膜外部分基因并通过重叠PCR法添加接头, 重组连接于pmAFP质粒中mAFP基因后, 转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ , 筛选阳性克隆酶切、测序鉴定. 用质粒瞬时转染CHO细胞, Western blot检测融合蛋白的表达.

结果: 利用RT-PCR从Hepa1-6细胞总RNA中成功克隆出1.8 kb的mAFP基因;重组阳性克隆经酶切鉴定证实连有接头的CTLA4膜外部分基因已正确插入pmAFP质粒中, 测序结果证实各片段连接方向及阅读框正确. 用质粒瞬时转染CHO细胞, Western blot检测到预计大小分子量蛋白的表达.

结论: mAFP-CTLA4融合蛋白真核表达载体的构建成功, 为进一步研究其在肝癌免疫治疗中的作用奠定了基础.

田耕, 易继林. 小鼠AFP-CTLA4融合蛋白真核表达载体的构建及鉴定. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):283-285

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/283.asp>

## 0 引言

甲胎蛋白(AFP)能诱导T细胞产生AFP特异性的CTL. 基于AFP的质粒DNA疫苗免疫及转染AFP基因的树突状细胞免疫均在小鼠体内诱导产生了AFP特异性的抗肝癌免疫应答. 但AFP的免疫原性较弱<sup>[1-4]</sup>. 细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA4)与B7-1(CD80)和B7-2(CD86)有很强的结合力, 而B7分子主要表达于APC表面. CTLA4为同源二聚体, 其单体亦能与B7分子结合. 融合蛋白CTLA4-Ig已作为免疫抑制剂用在移植和自身免疫疾病动物模型上. 为了在小鼠肝癌模型上研究通过CTLA4与B7分子结合的途径将AFP靶向送达APC能否增强AFP的免疫原性. 我们构建了编码小鼠AFP和小鼠CTLA4膜外部分融合蛋白的真核表达载体.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 小鼠肝癌细胞系 Hepa 1-6 由第二军医大学王皓博士惠赠; E.coli. DH5 $\alpha$  菌种由华中科技大学同济医学院蔡俐琼硕士惠赠, 编码 mCTLA4-Ig 融合蛋白的质粒 pmCTLA4-Ig 由华中科技大学同济医学院汪道文教授惠赠, 真核表达载体 pcDNA3.1/myc-His 购自 Invitrogen 公司; RT-PCR 试剂盒(Ver.2.1)、Ex Taq 高保真 Taq 酶、限制性内切酶和 T4DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司; Trizol 试剂和 RPMI1640 为 Gibco 公司产品、胎牛血清为 Hyclone 公司产品; 质粒小量制备试剂盒和琼脂糖凝胶核酸纯化回收试剂盒为 Omega 公司产品. 其余试剂均为国产或进口分析纯试剂.

**1.2 方法** 培养 Hepa 1-6 细胞至对数期, 收集细胞, 细胞数应在  $5-10 \times 10^6$ , 用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA. 为了克隆包括分泌信号在内的 AFP 全长基因, 设计的引物为 P1、P2, P1:5' -CTCAGGAATTCGCCATGAAGTGGATCACA-3', 在 5' 端引入酶切位点 Eco RI; P2:5' -CTCTGCTCTAGATTACTCGAGAACGCCCAAAGCATCACG-3', 在 3' 端引入酶切位点 Xho I 和 Xba I. 引物由上海博亚生物工程公司合成. 利用 RT-PCR 试剂盒反转录出 cDNA 第 1 链, 引物采用 Oligo dT, 条件为: 42 °C 30 min, 99 °C 5 min, 5 °C 5 min. 采用 Ex Taq 高保真 Taq 酶进行随后的 PCR. PCR 条件为: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环, 末次 72 °C 延伸 5 min. 取 PCR 产物 3  $\mu$ L 进行琼脂糖凝胶电泳, 观察 RT-PCR 结果. 为了构建 mAFP-mCTLA4 融合蛋白的表达载体, 我们采用重叠 PCR 的方法在 mCTLA4 膜外部分基因的上游添加了编码 GGGGSGGGGS 多肽接头的片段, 同时在 mCTLA4 膜外部分基因的下游添加了终止编码. 方法如下: 以 pmCTLA4-Ig 为模板, 第 1 轮扩增 mCTLA4 膜外部分基因的上、下游引物分别为: 5' -TATGGCGGGGGCTCGATGGAAGCCATACAGGTG-3' 和 5' -CTCTCTCTAGATCAAGAATCCGGGCATGGT-3', 引物由北京赛百盛公司合成. PCR 条件为: 95 °C 预变性 5 min, 5 °C 40 s, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环, 末次 72 °C 延伸 10 min. 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳回收后作为第 2 轮 PCR 的模板. 第 2 轮 PCR 下游引物不变, 上游引物改为 5' -TTATATTCTCGAGG GAGGCGGGGGCTCGGAGGCGGGGGCTCGATGG-3'. 第 1 轮上游引物的 5' 端与第 2 轮上游引物的 3' 端有 17 个核苷酸重叠. PCR 条件为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 40 s, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环, 末次 72 °C 延伸 10 min.

**1.2.1 重组质粒的构建、酶切和测序** 克隆的小鼠 AFP 基因经 Eco RI 和 Xba I 同时双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳回收、纯化; 质粒 pcDNA3.1/myc-His 同样经 Eco RI 和 Xba I 同时双酶切后, 回收纯化. 目的基因与质粒按 3:1 的比例混合, 加入 T4DNA 连接酶进行连接反应(18 °C, 16 h). 构建的质粒命名为 pmAFP. 按同样方法将加有接头的

mCTLA4 膜外部分基因与 pmAFP 分别经 Xho I 和 Xba I 双酶切后进行连接, 即将连有接头的 mCTLA4 膜外部分基因的 N 端与 pmAFP 中编码 mAFP 基因的 C 端相连, 构建表达 mAFP-CTLA4 融合蛋白的质粒, 命名为 pmAFP-CTLA4(图 1). 将上述连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 涂平板, 氨苄青霉素筛选阳性菌落. 挑取单个菌落培养, 小量质粒制备. pmAFP-CTLA4 用 Eco RI、Xba I 和 Xho I 进行单酶切或不同组合双酶切鉴定. 酶切鉴定正确的质粒, 挑取相应菌落培养后送上海博亚生物工程公司进行双向全长测序.

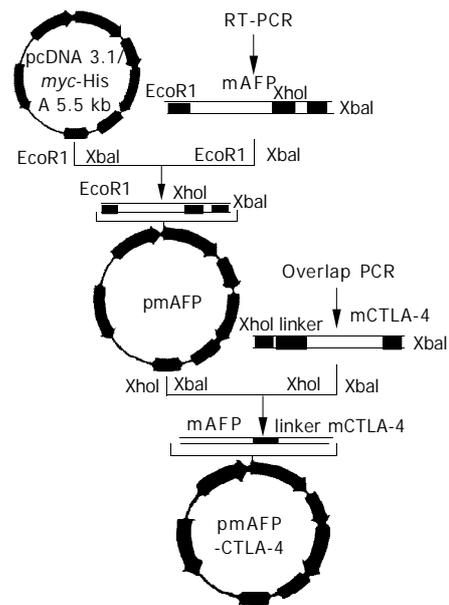


图1 真核表达载体 pmAFP-CTLA4 的构建过程.

**1.2.2 瞬时转染及 Western Blot 检测蛋白表达** 利用脂质体 lipofectamine 2000 (Invitrogen) 瞬时转染 CHO 细胞, 按说明书进行操作. 在 6 孔板中每孔加入  $5 \times 10^5$  个 CHO 细胞, 24 h 后加入分别稀释于 Opti-MEM 培养基(Invitrogen) 质粒 4  $\mu$ g 和 lipofectamine 200 010  $\mu$ L, 48 h 后提取蛋白. 超声破碎粉碎 Hepa 1-6 细胞, 提取蛋白质作为阳性对照. 蛋白质经电泳后, 半干法转印至硝酸纤维素膜上, 一抗分别为羊抗人 AFP 多克隆抗体和生物素标记的兔抗小鼠 CTLA4 多克隆抗体, 然后分别用 HRP 标记的抗羊二抗及 HRP 标记的亲合素孵育, ECL(Pharmacia) 显色.

## 2 结果

提取的总 RNA A260/A280 比值为 1.885, 表明总 RNA 较纯. 以 Oligo dT 反转录的 cDNA 为模板, 用设计引物进行 PCR 扩增, 所得特异性条带与预期长度为 1.8 kb 的目的基因相符(图 2). 以 pmCTLA4-Ig 为模板, 第 1 轮 PCR 扩增 mCTLA4 膜外部分基因得到预期长度的目的基因. 以第 1 轮 PCR 产物为模板行重叠 PCR 得到加有接头的 mCTLA4 膜外部分基因, 共 414 个碱基.

**2.1 重组质粒酶切及测序鉴定** 质粒带有相应的目的基因. 对重组质粒进行测序, 结果与实验设计完全相符,

连接方向及阅读框正确, 说明本实验已成功构建编码小鼠 AFP 和小鼠 CTLA4 膜外部分的融合蛋白的质粒(图 3).

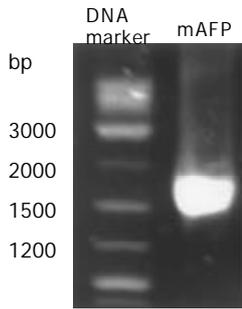


图2 RT-PCR 获得小鼠 AFP 基因.

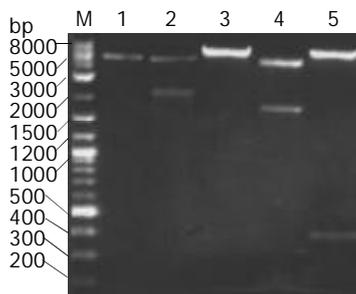


图3 重组质粒 pmAFP-CTLA4 酶切鉴定. M: DNA marker (200 bp-10 kb); 1: pcDNA3.1 (Eco RI); 2: pmAFP-CTLA4 (Eco RI + Xba I); 3: pmAFP-CTLA4 (Eco RI); 4: pmAFP-CTLA4 (Eco RI+Xho I); 5: pmAFP-CTLA4 (Xho I+Xba I).

2.2 Western Blot 检测蛋白表达 分别用 pmAFP 和 pmAFP-CTLA4 瞬时转染 CHO 细胞. Western blot 检测蛋白表达(图 4), 一抗分别为抗 -AFP 抗体(图 4 A)和抗 -CTLA4 抗体(图 4 B). 结果显示上述两种质粒可分别表达分子质量为 70 和 84 ku 的蛋白质.

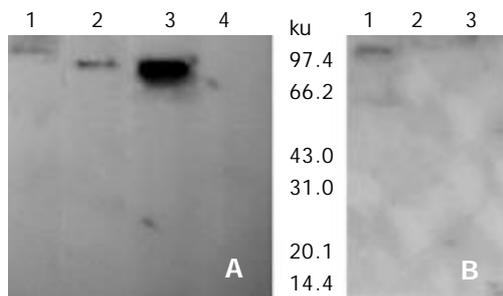


图4 Western Blot 检测蛋白表达. A: 1: CHO/pmAFP-CTLA; 2: CHO/pmAFP; 3: Hepa 1-6; 4: CHO/ pcDNA3.1; B: 1:CHO/pmAFP-CTLA; 2: CHO/pmAFP; 3: CHO/pcDNA3.1.

### 3 讨论

AFP 作为肝癌的标志物已被广泛用于临床<sup>[3-15]</sup>. 近年来的

研究说明 AFP 能够作为肝癌免疫治疗的靶的<sup>[1-4]</sup>, 解决了肝癌免疫治疗的第一个障碍 - 靶的问题. 但是 AFP 免疫原性较弱, 所诱导的抗肝癌免疫力不强<sup>[2-4]</sup>. 已有研究发现, 通过基因工程的方法将 mCTLA4 与自身肿瘤抗原融合, 利用 mCTLA4 和 B7 分子的相互作用将抗原直接靶向到抗原提呈细胞(APC)能显著提高抗体和 T 细胞免疫应答<sup>[16]</sup>, 还能诱导产生明显的抗肿瘤免疫<sup>[16]</sup>. 在本实验中, 我们用 PCR 法克隆出 mCTLA4 膜外部分基因并通过重叠 PCR 法添加接头(添加接头的 mCTLA4 膜外部分共 414 个碱基), 并构建了编码小鼠 AFP 和小鼠 CTLA4 膜外部分的融合蛋白的质粒 pmAFP-CTLA4, 为探讨该质粒在肝癌免疫治疗中的作用奠定了基础.

### 4 参考文献

- Butterfield LH, Meng WS, Koh A, Vollmer CM, Ribas A, Dissette VB, Faull K, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. T cell responses to HLA-A 0201-restricted peptides derived from  $\alpha$ -fetoprotein. *J Immunol* 2001;166:5300-5308
- Hanke P, Serwe M, Dombrowski F, Sauerbruch T, Caselmann WH. DNA vaccination with AFP-encoding plasmid DNA prevents growth of subcutaneous AFP-expressing tumors and does not interfere with liver regeneration in mice. *Cancer Gene Ther* 2002;9:346-355
- Meng WS, Butterfield LH, Ribas A, Dissette VB, Heller JB, Miranda GA, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS.  $\alpha$ -fetoprotein-specific tumor immunity induced by plasmid prime-adenovirus boost genetic vaccination. *Cancer Res* 2001;61:8782-8786
- Grimm CF, Ortman D, Mohr L, Michalak S, Krohne TU, Meckel S, Eisele S, Encke J, Blum HE, Geissler M. Mouse  $\alpha$ -fetoprotein-specific DNA-based immunotherapy of hepatocellular carcinoma leads to tumor regression in mice. *Gastroenterology* 2000;119:1104-1112
- Tang ZY. Clinical research of hepatocellular carcinoma in the 21st century. *China Natl J New Gastroenterol* 1995;1:2-3
- Wang JH, Lin G, Yan ZP, Wang XL, Cheng JM, Li MQ. Stage II surgical resection of hepatocellular carcinoma after TAE: a report of 38 cases. *World J Gastroenterol* 1998;4:133-136
- Wu MC. Clinical research advances in primary liver cancer. *World J Gastroenterol* 1998;4:471-474
- Wu ZQ, Fan J, Qiu SJ, Zhou J, Tang ZY. The value of postoperative hepatic regional chemotherapy in prevention of recurrence after radical resection of primary liver cancer. *World J Gastroenterol* 2000;6:131-133
- 张开泰, 韩本立, 王玉芝. 肝细胞性肝癌 AFP-mRNA 检测外周血癌细胞的价值. *华人消化杂志* 1998;6:689-691
- 周信达. 肝癌复发转移防治的研究进展. *世界华人消化杂志* 1999;7:260-261
- 杨秉辉, 任正刚, 汤钊猷. 原发性肝癌临床分期之推荐意见. *世界华人消化杂志* 2000;8:441-442
- 王在国. 肝癌的综合治疗. *世界华人消化杂志* 2000;8:443-445
- 李锦清. 肝癌术后复发高危病例的预测和防治. *世界华人消化杂志* 2000;8:445
- 田伏洲. 肝癌肿瘤标记物. *世界华人消化杂志* 2000;8:440-441
- 赵海磊, 刘成, 赵爱光. 中药复方胃肠安血清诱导肝癌 SMMC-7721 细胞分化. *世界华人消化杂志* 2003;11:1345-1348
- Huang TH, Wu PY, Lee CN, Huang HI, Hsieh SL, Kung J, Tao MH. Enhanced antitumor immunity by fusion of CTLA4 to a self tumor antigen. *Blood* 2000;96:3663-3670

# 丙型肝炎病毒核心蛋白结合视黄醇脱氢酶 11 蛋白

成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟

成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治重点实验室 北京市 100039

成军, 男, 1963-08-17 生, 山东省淄博市人, 汉族. 1986 年毕业于第一军医大学军医系, 获医学学士学位, 1989 年毕业于军医进修学院, 获传染病学硕士学位, 1994 年毕业于北京医科大学, 获传染病学博士学位, 1994-11-17/1997-12-01 在美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病学完成博士后研究, 主任医师, 主要研究肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制. 国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

## Identification and characterization of retinol dehydrogenase 11 as a hepatitis C virus core protein-binding protein by yeast-two hybrid technique

Jun Cheng, Ke Li, Lin Wang, Yin-Ying Lu, Yan Liu, Yan-Wei Zhong

Jun Cheng, Ke Li, Lin Wang, Yin-Ying Lu, Yan Liu, Yan-Wei Zhong, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Supported by National Natural Science Foundation of China No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA of China.

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

Received: 2003-07-12 Accepted: 2003-08-16

## Abstract

AIM: To screen the hepatocyte protein interacting with HCV core protein.

METHODS: By using HCV core protein as a bait, yeast-two hybrid system 3 was employed for screening and identification of HCV core protein-binding proteins from a hepatocyte cDNA library expressed in yeast cells. The protein-protein interaction was confirmed by back-cross experiment, and the inserts of the expressive vectors were sequenced and analyzed by bioinformatics methods.

RESULTS: Among them we identified retinol dehydrogenase 11(RDH11)/androgen-regulated short-chain dehydrogenase/reductase 1 (ARSDR1) as a HCV core protein-interacting protein. This is the first time, to the best of our knowledge, to know the fact that there are interactions of HCV core protein-retinol dehydrogenase 11.

CONCLUSION: The identification of retinol dehydrogenase 11 as the HCV core protein binding partner paves a new way

for further understanding of the pathogenesis of HCV infection.

Cheng J, Li K, Wang L, Lu YY, Liu Y, Zhong YW. Identification and characterization of retinol dehydrogenase 11 as a hepatitis C virus core protein-binding protein by yeast-two hybrid technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):286-290

## 摘要

目的: 丙型肝炎病毒(HCV)的核心蛋白是HCV基因组编码的一种主要的结构蛋白, 研究表明这种病毒的蛋白具有复杂的生物学调节作用.

方法: 以 HCV 的核心蛋白作为诱饵(bait), 利用酵母双杂交技术, 对于肝细胞表达型酵母细胞 cDNA 文库进行筛选. 对于在缺陷型培养基上生长的真阳性酵母集落, 进行回交实验, 并对于 cDNA 文库表达载体质粒中插入的基因片段进行序列分析和生物信息学分析.

结果: 其中一个克隆命名为 HCBP12, 后来证明为视黄醇脱氢酶 11(retinol dehydrogenase 11, RDH11), 或称为雄性激素调节的短链脱氢酶/还原酶 1(androgen-regulated short-chain dehydrogenase/reductase 1, ARSDR1).

结论: 这是首次发现和证实 HCV 核心蛋白与视黄醇脱氢酶 11 之间存在着相互结合和相互作用, 为充分阐明 HCV 核心蛋白在 HCV 感染发病机制中的作用, 开辟了新的研究方向.

成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合视黄醇脱氢酶 11 蛋白. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):286-290

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/286.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)的基因组编码大约 10 种结构和非结构蛋白, 在 HCV 的生活周期、HCV 感染的致病机制中具有十分重要的作用<sup>[1-5]</sup>. HCV 核心蛋白是 HCV 基因组编码的一种重要的结构蛋白, 除了与 HCV RNA 结合构成 HCV 核心颗粒之外, 还具有广泛的生物学调节作用<sup>[6-10]</sup>. HCV 核心蛋白与 HCV 感染的靶细胞的细胞周期、细胞凋亡、信号转导、HCV 感染的慢性化、以及正常细胞的恶性转化等调节过程有十分密切的联系<sup>[11-15]</sup>. HCV 核心蛋白的表达, 对于 HCV 感染细胞的影响机制是多方面的, 其中之一就是 HCV 核心蛋白与肝细胞中的蛋白之间的结合和相互作用<sup>[16-20]</sup>. 如果结合的蛋白是一种激酶, 就会改变激酶的活性, 如果是一种底物蛋白, 就会改变这种底物蛋白的性质. HCV 核心蛋白对于 HCV 感染的靶细胞的信号转导具有显著的影响<sup>[21-25]</sup>. 因此,

关于 HCV 核心蛋白的结合蛋白的研究就十分重要<sup>[26-30]</sup>. 既往应用不同的技术对于 HCV 核心蛋白的结合蛋白进行筛选, 获得了一系列的重要信息, 我们为了进一步拓宽 HCV 核心蛋白结合蛋白研究的范围和深度, 利用酵母双杂交技术对于肝细胞cDNA表达型酵母细胞文库进行筛选, 首次证实 HCV 核心蛋白可以与视黄醇脱氢酶 11(retinol dehydrogenase 11, RDH11)或称为雄激素调节短链脱氢酶/还原酶 1(androgen-regulated short-chain dehydrogenase/reductase 1, ARSDR1)进行结合, 从而为研究 HCV 核心蛋白的生物学作用研究开辟了新的方向.

## 1 材料和方法

1.1 材料 pGBKT7-BD 克隆载体、pGADT7-AD 克隆载体、pGBKT7-53 对照质粒、pGBKT7-Lam 对照质粒, *Saccharomyces cerevisiae* AH109 酵母株、Y187 酵母株(K1612-1)、预转化入酵母的对照质粒 pGBKT7-p53 (AH109)、编码 DNA-BD/鼠 p53 融合蛋白、pTD1-1 (Y187)、质粒 pACT2 中编码 AD/SV40 大 T 抗原融合蛋白、以及预转化的 cDNA 肝文库(Y187)、质粒 pACT2 表达 AD/cDNA 文库融合蛋白(PT3183-1), 以上产品均购自 Clontech 公司. 酵母 YPDA 培养基、SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基, X- $\alpha$ -半乳糖苷酶(Gal)等购自 Clontech 公司, 半硫酸腺苷、醋酸锂购自 Sigma 公司<sup>[31-32]</sup>.

### 1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒载体的构建及酵母配合实验 HCV 核心蛋白的酵母表达载体 pGBKT7-core 由本室构建, 用醋酸锂法<sup>[4]</sup>转入酵母细胞 AH109 后, 在四缺培养基上培养排除其自身激活作用. 挑取在 SD/-Trp 选择培养基上生长转化子(计数大于  $1 \times 10^9$  细胞/ml)与肝文库混合, 30 °C 轻摇配合过夜, 24 h 后铺板 SD/-Trp/-Leu/-His 25 块、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 25 块. 同时进行阳性对照实验及文库滴定. 生长 6-18 d 后把长出的大于 2 mm 的酵母集落, 在铺有 X- $\alpha$ -半乳糖苷酶的 QDO 上检查  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性, 认为在 QDO 培养基上生长且出现蓝色菌落的配合为阳性集落<sup>[33-35]</sup>.

1.2.2 阳性质粒的克隆和分析 挑取真正的阳性集落按照试剂盒提供的操作指南 Lyticase 法提取酵母质粒. 提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的 SOB 平板培养, 所获得的菌落酶切鉴定后测序. 阳性克隆 DNA 测序后, 提交 GenBank 分析, 所获新的基因存入 GenBank 数据库.

## 2 结果

2.1 表达载体的构建 利用重组表达载体的限制性内切酶作图分析和插入片段的核苷酸序列分析, 证实构建的 pGBKT7-HCV-core 表达载体正确.

2.2 酵母双杂交筛选 利用 HCV 核心蛋白作为诱饵, 对

于人肝细胞的 cDNA 文库进行筛选, 获得了 36 个既能在 4 重缺陷培养基上生长, 又能在  $\alpha$ -半乳糖苷酶底物的存在下变蓝的阳性酵母菌落. 对于阳性菌落的插入 cDNA 片段进行序列分析, 其中第 12 号克隆与已知的功能基因没有显著的同源性, 命名为 HCV 核心蛋白结合蛋白 12(HCBP12), 被 GenBank 收录, 收录号为 AF395068. HCBP12 基因开放读码框架含有 954 nt, 编码产物由 318 aa 组成(图 1).

```

ATG GTT GAG CTC ATG TTC CCG CTG TTG CTC
M V E L M F P L L L
CTC CTT CTG CCC TTC CTT CTG TAT ATG GCT
L L L P F L L Y M A
GCG CCC CAA ATC AGG AAA ATG CTG TCC AGT
A P Q I R K M L S S
GGG GTG TGT ACA TCA ACT GTT CAG CTT CCT
G V C T S T V Q L P
GGG AAA GTA GTT GTG GTC ACA GGA GCT AAT
G K V V V V T G A N
ACA GGT ATC GGG AAG GAG ACA GCC AAA GAG
T G I G K E T A K E
CTG GCT CAG AGA GGA GCT CGA GTA TAT TTA
L A Q R G A R V Y L
GCT TGC CGG GAT GTG GAA AAG GGG GAA TTG
A C R D V E K G E L
GTG GCC AAA GAG ATC CAG ACC ACG ACA GGG
V A K E I Q T T T G
AAC CAG CAG GTG TTG GTG CGG AAA CTG GAC
N Q Q V L V R K L D
CTG TCT GAT ACT AAG TCT ATT CGA GCT TTT
L S D T K S I R A F
GCT AAG GGC TTC TTA GCT GAG GAA AAG CAC
A K G F L A E E K H
CTC CAC GTT TTG ATC AAC AAT GCA GGA GTG
L H V L I N N A G V
ATG ATG TGT CCG TAC TCG AAG ACA GCA GAT
M M C P Y S K T A D
GGC TTT GAG ATG CAC ATA GGA GTC AAC CAC
G F E M H I G V N H
TTG GGT CAC TTC CTC CTA ACC CAT CTG CTG
L G H F L L T H L L
CTA GAG AAA CTA AAG GAA TCA GCC CCA TCA
L E K L K E S A P S
AGG ATA GTA AAT GTG TCT TCC CTC GCA CAT
R I V N V S S L A H
CAC CTG GGA AGG ATC CAC TTC CAT AAC CTG
H L G R I H F H N L
CAG GGC GAG AAA TTC TAC AAT GCA GGC CTG
Q G E K F Y N A G L

```

```

GCC TAC TGT CAC AGC AAG CTA GCC AAC ATC
  A  Y  C  H  S  K  L  A  N  I
CTC TTC ACC CAG GAA CTG GCC CGG AGA CTA
  L  F  T  Q  E  L  A  R  R  L
AAA GGC TCT GGC GTT ACG ACG TAT TCT GTA
  K  G  S  G  V  T  T  Y  S  V
CAC CCT GGC ACA GTC CAA TCT GAA CTG GTT
  H  P  G  T  V  Q  S  E  L  V
CGG CAC TCA TCT TTC ATG AGA TGG ATG TGG
  R  H  S  S  F  M  R  W  M  W
TGG CTT TTC TCC TTT TTC ATC AAG ACT CCT
  W  L  F  S  F  F  I  K  T  P
CAG CAG GGA GCC CAG ACC AGC CTG CAC TGT
  Q  Q  G  A  Q  T  S  L  H  C
GCC TTA ACA GAA GGT CTT GAG ATT CTA AGT
  A  L  T  E  G  L  E  I  L  S
GGG AAT CAT TTC AGT GAC TGT CAT GTG GCA
  G  N  H  F  S  D  C  H  V  A
TGG GTC TCT GCC CAA GCT CGT AAT GAG ACT
  W  V  S  A  Q  A  R  N  E  T
ATA GCA AGG CGG CTG TGG GAC GTC AGT TGT
  I  A  R  R  L  W  D  V  S  C
GAC CTG CTG GGC CTC CCA ATA GAC TAA
  D  L  L  G  L  P  I  D  *

```

图1 人HCBP12基因及其编码产物一级结构序列。

2.3 人HCBP12同源基因序列的搜索 在我们完成HCBP12的基因克隆化数月之后,在GenBank中又收录了视黄醇脱氢酶11或称为雄性激素调节的短链脱氢酶/还原酶1。我们的HCBP12克隆,实际上就是视黄醇脱氢酶11或称为雄性激素调节的短链脱氢酶/还原酶1。

### 3 讨论

未知功能基因的克隆化是研究病毒性肝炎发病机制重要的创新知识的源泉<sup>[36-40]</sup>。以研究蛋白-蛋白相互作用的酵母双杂交技术,首先是用于验证两种已知蛋白之间的结合,随着表达型cDNA文库的构建和应用,酵母双杂交技术还可用来筛选未知功能的新基因,这也是后基因组计划,即蛋白质组计划中的支柱技术类型之一<sup>[41-45]</sup>。随着 $\alpha$ 和 $a$ 型单倍体酵母及其配合技术的引入,取代了文库质粒的转染环节,从而使酵母双杂交技术的筛选效率大大提高。在以丙型肝炎病毒核心蛋白为“饵”的酵母双杂交技术筛选过程中,我们不仅发现了一些已知功能的蛋白类型,例如本文发现的与HCV核心蛋白结合的视黄醇脱氢酶11或称为雄性激素调节的短链脱氢酶/还原酶1之外,我们还发现了与HCV核心蛋白结合的新型蛋白的基因<sup>[46-60]</sup>。我们的结果充分说明了酵母双杂交技术在蛋白质组计划、HCV核心蛋白结合蛋白的筛选中的重要作用和地位。

Moore et al<sup>[61]</sup>克隆了小鼠短链脂肪酸脱氢酶/还原酶(SDR)基因家族的一个新成员,成为小鼠前列腺短链脱氢酶/还原酶1(Psdr1)。来自睾丸的Psdr1的cDNA大小为3.2 kb,编码的Psdr1的蛋白由316 aa组成,与人的同源基因序列的同源性为85%。Northern blot杂交分析结果表明,Psdr1在小鼠的睾丸和肝脏中的表达水平最高,但是表达的分子类型却不同。对于基因启动子序列的分析结果表明,具有保守的雄激素应答元件(androgen response element)和孕酮的应答元件(progesterone response element)。小鼠的Psdr1基因在染色体上的定位是12q31-34,相当于人PSDR1在染色体上的定位(14q23-24.3)。这些研究结果表明,Psdr1属于一种组织特异性视黄醇和类固醇代谢相关的酶类。Wang et al<sup>[62]</sup>对于眼外组织中的重组人11-顺-视黄醇脱氢酶、类固醇激素、视黄醇等对于Rdh5基因转录表达的影响。Rdh5催化9-顺-视黄醇的代谢,与催化11-顺-视黄醇的代谢效率相同,也可以催化雄性激素的代谢。Rdh5 mRNA在眼外组织中具有广泛的表达活性,肝脏、乳腺的表达水平最高。另外的表达位点还包括结肠、胸腺、小肠、肾、膀胱、胰腺、脾、心、子宫、卵巢、睾丸和脊髓等。胎儿肝脏中也有高水平的Rdh5的表达,是胎儿组织中表达水平最高的组织类型。人Rdh5和9-顺-视黄醇脱氢酶实际上是同一个基因。

11-顺-视黄醇脱氢酶催化顺-视黄醇的氧化反应,这是9-顺-视黄酸生物合成的限速步骤。11-顺-视黄醇脱氢酶对于 $3\alpha$ -羟基类固醇也具有催化作用,因此认为11-顺-视黄醇脱氢酶参与类固醇的代谢。Huang et al<sup>[63]</sup>建立了11-顺-视黄醇脱氢酶基因稳定转染的293细胞系,只要给予适当的辅助因子,293细胞中表达的11-顺-视黄醇脱氢酶可以催化一系列性激素的转化。这一途径可以看作是外周组织非经典途径的具有活性的雄性激素的产生途径。为了阐明11-顺-视黄醇脱氢酶(11-cis-retinol dehydrogenase)以及9-顺-视黄酸生物合成的过程和作用,Driessen et al<sup>[64]</sup>建立了11-顺-视黄醇脱氢酶的基因敲除小鼠模型。基因敲除模型可以正常发育,包括视网膜的发育也正常。光受体的数目没有显著的减少。最近发现11-顺-视黄醇脱氢酶的基因突变与眼底病(fundus albipunctatus)的发病有关。Yamamoto et al<sup>[65]</sup>也发现11-顺-视黄醇脱氢酶的基因突变可以引起暗适应时间延长和眼底病。

从基因水平上来看病毒性肝炎的发病机制,可以认为是正常的肝脏获得了肝脏之外的基因的表达,就是肝炎病毒基因的表达。因此,病毒性肝炎也可以看作是一种基因病。这种疾病的发病机制非常复杂,其中之一就是肝炎病毒蛋白与肝细胞蛋白之间的相互结合和相互作用。由于肝脏获得了正常情况下不存在的肝炎病毒蛋白,通过蛋白-蛋白之间的结合和相互作用,改变了肝脏正常的代谢途径。本文的研究结果发现HCV核心蛋白可以与视黄醇脱氢酶11/雄性激素调节的短链脱氢

酶/还原酶 1 结合, 可能会改变其酶学催化作用, 导致肝脏正常代谢途径的紊乱. HCV 感染引起脂类代谢的异常, 与脂肪性肝炎(steatohepatitis)的发生发展密切相关. 另外, HCV 感染也引起胰岛素抗性(insulin resistance, IR), 与 II 型糖尿病的发生发展有关<sup>[66-71]</sup>. 本文又发现 HCV 核心蛋白与视黄醇脱氢酶 11/ 雄性激素调节的短链脱氢酶/还原酶 1 结合, 说明 HCV 感染可能通过其核心蛋白干扰性激素和类固醇激素的代谢途径. 已有的资料表明, HCV 感染可以造成多方面的代谢异常, 这是 HCV 慢性感染发病机制的重要组成部分. 有足够的资料表明, HCV 感染可引起多代谢综合征(multiple metabolic syndrome, MMS). HCV 感染与多代谢综合征相互关系的提出, 对于进一步认识 HCV 感染的发病机制, 从多个方面、多个角度认识 HCV 感染所引起的疾病、探讨不同的治疗措施, 具有重要的意义.

#### 4 参考文献

- 1 成军, 李莉. 清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制. 世界华人消化杂志 2002;10:73-76
- 2 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒 NS2 基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132
- 3 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:426-429
- 4 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBcAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:422-425
- 5 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- 6 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 7 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:213-215
- 8 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:217-219
- 9 钟彦伟, 成军, 王刚, 洪源, 陈菊梅. 肝炎病毒基因工程抗体的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:219-221
- 10 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. 世界华人消化杂志 2002;10:161-164
- 11 陆荫英, 李克, 刘妍, 王琳, 成军, 张玲霞. 乙型及丙型肝炎病毒受体的研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:211-213
- 12 成军, 董菁, 刘妍, 李莉, 斯崇文, 王勤环, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒准种研究的临床意义. 世界华人消化杂志 2002;10:209-211
- 13 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 14 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136
- 15 洪源, 成军, 董菁, 李克, 王琳, 王刚, 刘妍. 乙型肝炎病毒 HBsAg 重组疫苗与表面抗原 DNA 疫苗诱导 H-2<sup>b</sup> 小鼠免疫应答的实验研究. 世界华人消化杂志 2002;10:137-140
- 16 王刚, 刘妍, 牟劲松, 洪源, 邵得志, 张耀新, 李莉, 成军. 大鼠肝再生相关基因 LRRP1 的克隆化. 世界华人消化杂志 2002;10:165-168
- 17 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙肝病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:765-769
- 18 成军. 慢性丙型肝炎病毒性肝炎脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 19 钟彦伟, 成军, 蔡炯, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 抗独特型人源化单链可变区抗体的筛选与鉴定. 世界华人消化杂志 2002;10:897-901
- 20 李莉, 成军, 李梵, 王建军, 张健, 吴勤, 韩萍, 陈国凤, 纪冬, 李克. 慢性丙型肝炎病毒性肝炎脂肪变的临床与病理学特点. 世界华人消化杂志 2002;10:1009-1013
- 21 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:15-18
- 22 张健, 成军, 李莉, 刘爱兵, 吴勤, 董菁, 王琳, 陆荫英. 丙型肝炎病毒感染血清载脂蛋白 AI 和 AII 水平的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1014-1017
- 23 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白 AI 结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 24 成军, 任进余, 李莉, 陆志檬, 李克, 洪源, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. 世界华人消化杂志 2002;10:1022-1026
- 25 陆荫英, 成军, 李克, 刘妍, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒进入肝细胞机制的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1028-1029
- 26 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健. 丙型肝炎病毒蛋白与脂蛋白之间的相互作用. 世界华人消化杂志 2002;10:1030-1032
- 27 洪源, 成军, 李莉. 丙型肝炎病毒转基因小鼠模型的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1032-1034
- 28 董菁, 成军. 脂肪肝形成分子机制的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1035-1037
- 29 吴勤, 成军, 李莉. 酒精性脂肪肝的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1037-1038
- 30 韩萍, 成军, 李莉. 非酒精性脂肪肝的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1038-1040
- 31 陈国凤, 成军, 李莉. 脂肪肝的诊断研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1040-1042
- 32 李莉, 成军, 陈国凤. 脂肪肝的治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1042-1044
- 33 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L, Chen JM. Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein—a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2003; 9:300-303
- 34 成军. 新基因结构与功能研究的策略. 世界华人消化杂志 2003;11:373-377
- 35 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因和蛋白的生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2003;11:378-384
- 36 钟彦伟, 成军, 张忠东, 孙敏, 李强, 李克, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 噬菌体表面展示技术筛选 HCBP6 人源单链可变区抗体. 世界华人消化杂志 2003;11:389-393
- 37 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选 Hcbp6 结合的肝细胞蛋白编码基因. 世界华人消化杂志 2003;11:385-388
- 38 牟劲松, 刘妍, 王刚, 成军, 段惠娟, 李克, 陆荫英, 王琳, 王惠芬. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活的相关基因. 世界华人消化杂志 2003;11:399-403
- 39 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. 世界华人消化杂志 2003;11:394-398
- 40 陈天艳, 成军, 张树林. 酵母双杂交系统的原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:451-455
- 41 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林. 抑制性消减杂交技术原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:456-458
- 42 张忠东, 成军, 张树林. 噬菌体展示技术的原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:459-461
- 43 马守东, 洪源, 成军. 酵母单杂交技术的原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:450-451
- 44 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 生物信息学技术与新基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:474-477
- 45 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. 世界华人消化杂志 2003;11:461-463
- 46 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:472-474
- 47 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 肿瘤抑制因子 p21/waf1 与肝炎病毒复制与表达的调节研究. 世界华人消化杂志 2003;11:469-471
- 48 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源,

- 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. *世界华人消化杂志* 2001; 9:1379-1383
- 49 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 丙型肝炎病毒与 MAPK 信号转导系统. *世界华人消化杂志* 2003;11:466-469
- 50 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 丙型肝炎病毒与 JAK-STAT 信号转导系统. *世界华人消化杂志* 2003;11:464-466
- 51 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 10 的克隆化研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:935-938
- 52 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白反式调节基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:920-924
- 53 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 反式调节靶基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:930-934
- 54 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因 10 的克隆化研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:925-929
- 55 成军. 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制. *世界华人消化杂志* 2003;11:888-896
- 56 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:943-946
- 57 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式调节基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:939-942
- 58 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调 NIP3 基因表达研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:951-954
- 59 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调细胞周期调节蛋白 Wee1 基因表达研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:947-950
- 60 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 杨艳杰, 张树林. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调层粘连蛋白 B1 链基因启动子表达活性的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:955-958
- 61 Moore S, Pritchard C, Lin B, Ferguson C, Nelson PS. Isolation and characterization of the murine prostate short-chain dehydrogenase/reductase 1 (Psdr1) gene, a new member of the short-chain steroid dehydrogenase/reductase family. *Gene* 2002;293:149-160
- 62 Wang J, Chai X, Eriksson U, Napoli JL. Activity of human 11-cis-retinol dehydrogenase (Rdh5) with steroids and retinoids and expression of its mRNA in extra-ocular human tissue. *Biochem J* 1999;338(Pt 1):23-27
- 63 Huang XF, Luu-The V. Characterization of the oxidative 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity of human recombinant 11-cis-retinol dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 2001;1547:351-358
- 64 Driessen CA, Janssen BP, Winkens HJ, Kuhlmann LD, Van Vugt AH, Pinckers AJ, Deutman AF, Janssen JJ. Null mutation in the human 11-cis retinol dehydrogenase gene associated with fundus albipunctatus. *Ophthalmology* 2001;108:1479-1484
- 65 Yamamoto H, Simon A, Eriksson U, Harris E, Berson EL, Dryja TP. Mutations in the gene encoding 11-cis retinol dehydrogenase cause delayed dark adaptation and fundus albipunctatus. *Nat Genet* 1999;22:188-191
- 66 Wu BX, Chen Y, Chen Y, Fan J, Rohrer B, Crouch RK, Ma JX. Cloning and characterization of a novel all-trans retinol short-chain dehydrogenase/reductase from the RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:3365-3372
- 67 Liden M, Romert A, Tryggvason K, Persson B, Eriksson U. Biochemical defects in 11-cis-retinol dehydrogenase mutants associated with fundus albipunctatus. *J Biol Chem* 2001;276:49251-49257
- 68 Huang XF, Luu-The V. Modulation of the androgenic response by recombinant human 11-cis retinol dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;77:129-133
- 69 Chen P, Lee TD, Fong HK. Interaction of 11-cis-retinol dehydrogenase with the chromophore of retinal g protein-coupled receptor opsin. *J Biol Chem* 2001;276:21098-21104
- 70 Cideciyan AV, Haeseleer F, Fariss RN, Aleman TS, Jang GF, Verlinde CL, Marmor MF, Jacobson SG, Palczewski K. Rod and cone visual cycle consequences of a null mutation in the 11-cis-retinol dehydrogenase gene in man. *Vis Neurosci* 2000;17:667-678
- 71 Driessen CA, Winkens HJ, Hoffmann K, Kuhlmann LD, Janssen BP, Van Vugt AH, Van Hooser JP, Wieringa BE, Deutman AF, Palczewski K, Ruether K, Janssen JJ. Disruption of the 11-cis-retinol dehydrogenase gene leads to accumulation of cis-retinols and cis-retinyl esters. *Mol Cell Biol* 2000;20:4275-4287

## World Journal of Gastroenterology 办刊宗旨

《World Journal of Gastroenterology, WJG》的任务是及时报道和刊登国内外、特别是我国消化病学者具有创造性的、有较高学术水平的基础和临床研究论文、研究快报等.对具有中国特色的研究论文,如食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合和基于作者自己研究工作为主的综述性论文,将优先发表,使WJG成为我国消化疾病临床和基础科学研究对外学术交流的窗口和我国优秀医务工作者走向世界的桥梁.

# 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A结合蛋白37小鼠同源基因的克隆化及结构分析

成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟

成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治重点实验室北京市100039

成军, 男, 1963-08-17生, 山东省淄博市人, 汉族. 1986年毕业于第一军医大学军医系, 获医学学士学位, 1989年毕业于军医进修学院, 获传染病学硕士学位, 1994年毕业于北京医科大学, 获传染病学博士学位, 1994-11-17/1997-12-01在美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病学完成博士后研究, 主任医师, 主要研究肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制. 国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

## Identification and sequence analysis of mouse homologous gene coding for hepatitis C virus non-structural protein 5A-binding protein 37

Jun Cheng, Ke Li, Lin Wang, Yin-Ying Lu, Yan Liu, Yan-Wei Zhong

Jun Cheng, Ke Li, Lin Wang, Yin-Ying Lu, Yan Liu, Yan-Wei Zhong, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Supported by National Natural Science Foundation of China No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA of China.

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

Received: 2003-07-12 Accepted: 2003-08-16

### Abstract

**AIM:** To clone murine homologous gene to human NS5ABP37 gene, and to elucidate its biological functions and the possible effects in the pathogenesis of hepatitis C virus (HCV) infection.

**METHODS:** Yeast-two hybrid system was employed to screen the human liver cDNA library by using non-structural protein 5A (NS5A) of hepatitis C virus (HCV) as the bait. According to the homologous role between the species, a murine NS5ABP37 homologous to human NS5ABP37 was deduced by bioinformatics methods. The primary sequence of murine NS5ABP37 was searched for conserved domains by online tools of GeneBank.

**RESULTS:** Human NS5ABP37 was screened and cloned from human liver cDNA library by yeast-two hybrid system 3. The murine NS5ABP37 was deduced by bioinformatics methods. The open reading frame (ORF) of murine NS5ABP37 con-

sisted of 1 488 nt encoding a protein of 495 amino acids. Calculated molecular weight was 54 583.67 dalton and predicted pI was 4.70. From the homologous protein search, murine NS5ABP37 was demonstrated homologous to leukocyte antigen related (LAR) protein precursor. The sequence of murine NS5ABP37 was deposited into GenBank, and the accession number was AY234860.

**CONCLUSION:** Successful identification and cloning of murine NS5ABP37, which is homologous to LAR protein precursor, paves a way for elucidating the biological function of murine NS5ABP37 and pathogenesis of hepatitis C virus infection.

Cheng J, Li K, Wang L, Lu YY, Liu Y, Zhong YW. Identification and sequence analysis of mouse homologous gene coding for hepatitis C virus non-structural protein 5A-binding protein 37. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):291-297

### 摘要

**目的:** 克隆丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白5A(NS5A)结合蛋白37(NS5ABP37)的小鼠同源基因, 为阐明小鼠NS5ABP37基因的生物学功能奠定基础, 探索 HCV NS5A 蛋白与 NS5ABP37蛋白之间的结合在慢性丙型肝炎的发病机制中可能的作用。

**方法:** 利用酵母双杂交系统3, 以 HCV NS5A 蛋白作为诱饵, 筛选肝细胞cDNA文库, 首先获得HCV NS5A结合的人肝细胞蛋白的新的编码基因. 利用生物信息学(bioinformatics)技术确定 NS5ABP37 的小鼠同源基因序列. 利用 GenBank 在线分析软件, 对小鼠NS5ABP37蛋白一级结构特点进行分析。

**结果:** 通过酵母双杂交技术获得了人NS5ABP37的编码基因. 利用生物信息学技术确定了小鼠NS5ABP37的基因序列. 利用分子生物学技术获得了小鼠的NS5ABP37的基因克隆, 小鼠NS5ABP37基因开放读码框架(ORF)为1 488 nt, 编码产物由495 aa组成. 计算分子量为54 583.67道尔顿, 预测等电点(pI)为4.70. 小鼠NS5ABP37与白细胞抗原相关(leukocyte antigen related, LAR)蛋白前体蛋白(LAR protein precursor)同源. 小鼠HCV NS5ABP37基因序列被美国核苷酸数据库 GenBank 收录, 收录号为AY234860.

**结论:** 成功确定、克隆了小鼠的NS5ABP37基因序列, 并证实与白细胞抗原相关蛋白前体蛋白具有一定的同源性. 这一结果, 为进一步阐明小鼠的NS5ABP37基因的功能, 阐

明HCV感染的发病机制奠定了坚实的基础。

成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A结合蛋白37小鼠同源基因的克隆化及结构分析. 世界华人消化杂志 2004;12(2): 291-297

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/291.asp>

## 0 引言

肝炎病毒与肝细胞之间的相互作用是病毒性肝炎发病机制的重要组成部分<sup>[1-5]</sup>. 肝细胞获得肝炎病毒的基因、肝炎病毒蛋白的表达, 通过多种复杂的机制对于感染的肝细胞的基因表达谱产生显著的影响; 肝炎病毒蛋白与肝细胞中蛋白结合形成异二聚体或多聚体, 对于肝细胞蛋白的功能产生显著影响; 肝炎病毒作为一种简单的生物类型, 肝细胞中的蛋白与肝炎病毒DNA/RNA的结合, 对于肝炎病毒基因组的复制和表达不仅是可能的, 而且也是肝炎病毒生活周期所必需的<sup>[6-10]</sup>. 所有这些相互作用, 对于肝炎病毒的生存至关重要, 同时也是病毒性肝炎发病机制的关键所在<sup>[11-15]</sup>. 我们应用酵母双杂交技术对丙型肝炎病毒(HCV)的非结构蛋白5A(NS5A)在肝细胞中的结合蛋白进行了筛选, 获得了一个未知功能基因, 命名为HCV NS5A结合蛋白37(NS5ABP37)<sup>[7]</sup>, 我们利用分子生物学技术与生物信息学技术相结合的策略, 克隆了小鼠的NS5ABP37编码基因, 并对其序列进行分析。

## 1 材料和方法

1.1 材料 pGBKT7-BD克隆载体、pGADT7-AD克隆载体、pGBKT7-53对照质粒、pGBKT7-Lam对照质粒, *Saccharomyces cerevisiae* AH109酵母株、Y187酵母株(K1612-1)、预转化入酵母的对照质粒pGBKT7-53(AH109)、编码DNA-BD/鼠p53融合蛋白、pTD1-1(Y187)、质粒pACT2中编码AD/SV40大T抗原融合蛋白、预转化的肝细胞cDNA文库(Y187)、质粒pACT2表达AD/cDNA文库融合蛋白(PT3183-1). 酵母YPDA培养基、SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade、X- $\alpha$ -半乳糖苷酶(Gal)等购自Clontech公司. 半硫酸腺苷、醋酸锂购自Sigma公司. 抗c-myc单克隆抗体本室自制. 由购自ATCC的1-9E10.2杂交瘤产生, HepG2细胞为本室保存细胞株<sup>[7]</sup>.

### 1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒载体的构建及酵母配合实验 人HCV NS5A结合蛋白37(NS5ABP37)的基因克隆化见文献<sup>[7]</sup>.

1.2.2 小鼠HCV NS5ABP37同源基因的克隆化 根据生物信息学分析结果, 确定NS5ABP37小鼠同源基因序列. 对蛋白质一级结构的特点进行生物信息学分析<sup>[16-23]</sup>.

## 2 结果

### 2.1 小鼠HCV NS5ABP37同源基因的克隆化 NS5ABP37

小鼠同源基因序列分析结果表明, 小鼠NS5ABP37基因开放读码框架(ORF)为1 488 nt, 编码产物由495 aa组成(图1). 计算分子量为54 583.67道尔顿, 等电点(pI)为4.70. 小鼠HCV NS5ABP37基因序列被美国核苷酸数据库GenBank收录, 收录号为AY234860.

对于小鼠HCV NS5ABP37蛋白的同源性蛋白数据库进行搜索, 发现与白细胞抗原相关(leukocyte antigen related, LAR)蛋白前体蛋白(LAR protein precursor), 即蛋白酪氨酸磷酸酶Lar前体(protein-tyrosine phosphatase Lar precursor)或称为蛋白酪氨酸磷酸盐磷酸水解酶(protein-tyrosine-phosphate phosphohydrolase, dLAR)具有高度的同源性. 这种同源性提示了小鼠HCV NS5ABP37蛋白功能的特点.

```

ATG ACG GAA CCC GAG AAT GTC GCC TCA GAG
M T E P E N V A S E
GTG TAC CAT GGG CCT GAG CTG GAG TGC ACG
V Y H G P E L E C T
GTT GGC AAC CTG CTG CCT GGA ACT GTG TAC
V G N L L P G T V Y
CGC TTC AGA GTG CGA GCT CTG AAT GAC GGA
R F R V R A L N D G
GGG TAC GGT CCC TAC TCT GAT GTG TCA GAA
G Y G P Y S D V S E
ATC ACC ACT GCC GCA GGG CCC CCT GGG CAG
I T T A A G P P G Q
TGC AGA GCA CCG CGT GTC TCC TTC ACG CCT
C R A P R V S F T P
GAC GGA TGC GTC CTG GTG GGC TGG GAG AGC
D G C V L V G W E S
CCT GCG AGC CCT GGT GCC GAC ATC TCC GAA
P A S P G A D I S E
TAC AGG TTG GAG TGG GGA GAA GAT GAA CAG
Y R L E W G E D E Q
TCC TTA GAA CTC GTT TAT CAT GGT CCA GAC
S L E L V Y H G P D
ACC TGC TTT GAG ATG CGA GAT CTG TTG CCT
T C F E M R D L L P
GCT GCA CAG TAT TGC TGC AGA CTA CAG GCC
A A Q Y C C R L Q A
TTC AAT CCA GCA GGC GCA GGG CCA TAT AGT
F N P A G A G P Y S
GAG CTT GTC CAC TGC CAG ACA CCA GCC TCT
E L V H C Q T P A S
GCC CCC GAC CCT GTC TCC ACT CTG TGT GTC
A P D P V S T L C V
CTG GAG GAG GAG CCC CCC AGT GCC CAC CCA
L E E E P P S A H P
GAC TCA CCC TCT GTG TGC CTT GTA CTG AAC
D S P S V C L V L N

```

TGG GAA GAG CCG TGC AAT AAT GGG TCT GAA  
 W E E P C N N G S E  
 ATC CTT GCT TAT AAC ATC GAT CTG GGA GAC  
 I L A Y N I D L G D  
 AGC TGC ATT ACT GTG GGC AAC ACT ACC ACA  
 S C I T V G N T T T  
 CAC GTG ATG AAG AAC CTC CTT CCA GAA ACG  
 H V M K N L L P E T  
 ACA TAC CGG ATC AGA ATT CAG GCT ATC AAT  
 T Y R I R I Q A I N  
 GAA ATT GGA GTT GGA CCA TTT AGT CAG TTC  
 E I G V G P F S Q F  
 ATT AAA GCA AAA ACT CGG CCA TTA CCG CCT  
 I K A K T R P L P P  
 TCG CCT CCT AGG CTT GAG TGT GCT GCG TCT  
 S P P R L E C A A S  
 GGT CCT CAG AGC CTG AAG CTC AAG TGG GGA  
 G P Q S L K L K W G  
 GAC AGT AAC TCC AAG ACA CAT GCT GCT GGT  
 D S N S K T H A A G  
 GAC ATG GTG TAC ACA CTA CAG CTG GAA GAC  
 D M V Y T L Q L E D  
 AGG AAC AAG AGG TTT ATC TCA ATC TAC CGA  
 R N K R F I S I Y R  
 GGA CCC AGC CAC ACC TAC AAG GTC CAG AGA  
 G P S H T Y K V Q R  
 CTG ACA GAG TTT ACC TGC TAC TCC TTC AGG  
 L T E F T C Y S F R  
 ATC CAG GCA ATG AGC GAG GCA GGG GAG GGG  
 I Q A M S E A G E G  
 CCT TAC TCA GAA ACC TAC ACC TTC AGC ACA  
 P Y S E T Y T F S T  
 ACC AAA AGC GTG CCT CCC ACC CTC AAA GCA  
 T K S V P P T L K A  
 CCT CGA GTG ACG CAG TTA GAA GGG AAT TCC  
 P R V T Q L E G N S  
 TGT GAA ATC TTC TGG GAG ACG GTA CCA CCG  
 C E I F W E T V P P  
 ATG AGA GGC GAC CCT GTG AGC TAC GTT CTA  
 M R G D P V S Y V L  
 CAG GTG CTG GTT GGA AGA GAC TCT GAG TAC  
 Q V L V G R D S E Y  
 AAG CAG GTG TAC AAG GGA GAA GAA GCC ACA  
 K Q V Y K G E E A T  
 TTC CAA ATC TCA GGC CTC CAG AGC AAC ACA  
 F Q I S G L Q S N T  
 GAT TAC AGG TTC CGC GTG TGT GCC TGC CGC  
 D Y R F R V C A C R

CGC TGT GTG GAC ACG TCT CAG GAG CTC AGT  
 R C V D T S Q E L S  
 GGC GCG TTC AGC CCC TCT GCG GCT TTC ATG  
 G A F S P S A A F M  
 TTA CAA CAG CGT GAG GTT ATG CTT ACA GGG  
 L Q Q R E V M L T G  
 GAC CTG GGA GGC ATG GAA GAG GCC AAG ATG  
 D L G G M E E A K M  
 AAG GGC ATG ATG CCC ACC GAC GAA CAG TTT  
 K G M M P T D E Q F  
 GCT GCA CTC ATC GTG CTT GGC TTC GCG ACC  
 A A L I V L G F A T  
 CTG TCC ATT TTG TTT GCC TTT ATA TTA CAG  
 L S I L F A F I L Q  
 TAC TTC TTA ATG AAG TAA  
 Y F L M K \*

图 1 小鼠 NS5ABP37 基因序列及其编码产物序列.

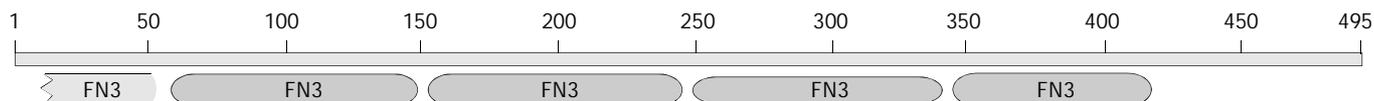
2.2 人、小鼠 HCV NS5ABP37 蛋白一级结构序列的同源性比较 对于人 HCV NS5ABP37(AF543840)和小鼠 NS5ABP37基因序列的蛋白质一级结构序列的同源性进行比较, 人和小鼠的 NS5ABP37 蛋白质一级结构的同源性为 90.91%(450/495)(图 2).

人 MTEPENVASEVYHGPELECTVGNLLPGTVYRFRVR  
 小鼠 -----D-----  
 人 ALNDGGYGPYSDVSEITTAAGPPGQCRAPRVSFTP  
 小鼠 -----CI-C--  
 人 DGCVLVGWESPASPGADISEYRLEWGEDEQSLELV  
 小鼠 -----D-S-----E-----I  
 人 YHGPDTCFEMRDLLPAAQYCCRLQAFNPAGAGPYS  
 小鼠 -----R--I-----  
 人 ELVHCQTPASAPDPVSTLCVLEEEPPSAHPDPSV  
 小鼠 --L-----LD-Y----A  
 人 CLVLNWEEPCNNGSEILAYNIDLGDSCITVGNTTT  
 小鼠 -----T-----TS-----M  
 人 HVMKNLLPETTYRIRIQAINIIGVGPFSQFIKAKT  
 小鼠 -----D-----A-----  
 人 RPLPPSPRLECAASGPQSLKLGWDSNSKTHAAG  
 小鼠 -----L-----A-----E  
 人 DMVYTLQLEDNRNKRIFISYRGPSTHYKVQRLTEFT  
 小鼠 -I-----  
 人 CYSFRIQAMSEAGEGYPYSETYTFSTTKSVPPTLKA  
 小鼠 -----A-----F-----I--  
 人 PRVTQLEGNSCEIFWETVPPMRGDPVSYVLQVLVG  
 小鼠 -----L-----S-K----N-I-----

人 RDSEYKQVYKGE EATFQISGLQSN TDYRFRVCACR  
 小鼠 -E-----T-----  
 人 RCVDTSQELSGAFSPSA AFMLQQREV MLTGD LGGM  
 小鼠 -L-----V-R-E-----MG--  
 人 EEAKMKGMMP TDEQFAALIVLGFATLSILF AFILQ  
 小鼠 DD-K-S-----  
 人 YFLMK  
 小鼠 -----

2.3 小鼠 HCV NS5ABP37 同源基因保守结构位点的生物信息学分析 在小鼠 NS5ABP37 蛋白质一级结构序列中发现了一系列的纤维连接蛋白 3 型结构域(fibronectin type 3 domain, Fn-III), Fn-III 是血浆蛋白纤维连接蛋白(Fn)结构内部的 3 种重复结构序列之一. 大约 2% 的动物蛋白分子结构中含有 Fn-III 重复序列结构, 包括细胞内蛋白、细胞外基质蛋白、跨膜细胞因子受体、酪氨酸磷酸酶受体以及黏附分子等. 在细菌的糖基水解酶分子结构中也含有 Fn-III 样结构域(图 3).

图 2 人和小鼠 HCV NS5A 结合蛋白 37 蛋白一级结构序列的比较.



CD-Length = 93 residues, 100.0% aligned

Score = 56.9 bits (136), Expect = 5e-09

小鼠 NS5ABP37: 58 PGQCRAPRV SFTP DGCVLV GWESPAS PGADISEYR LEW---GEDEQSLELVYHGP DTCFE 114

Fn-III: 1 PSPPTNLRV TDVTST SVTL SWTPEDDGGPITGYVVEYREK GSGDWKEVEVTPGSETSYT 60

小鼠 NS5ABP37: 115 MRDLLPAAQYCCRLQAFNPAGAGPYSELVHCQT 147

Fn-III: 61 LTGLKPGTEYEFVRVAVNGGGESPPSESVTVTT 93

CD-Length = 93 residues, 100.0% aligned

Score = 52.2 bits (124), Expect = 1e-07

小鼠 NS5ABP37: 152 PDPVSTLCVLEEEPPSAHPDSPSVCLVLNWEPCNNGSEILAYNIDLGDSC-----I 203

Fn-III: 1 PSPPTNLRV TDVTST S-----VTL SWTPEDDGGPITGYVVEYREK GSGDWKEVEV 51

小鼠 NS5ABP37: 204 TVGNTTTHVMKNLLPETTYRIRIQAIN EIGVGPFSQFIKAKT 245

Fn-III: 52 TPGSETSYTLTGLKPGTEYEFVRVAVNGGGESPPSESVTVTT 93

CD-Length = 93 residues, 100.0% aligned

Score = 49.5 bits (117), Expect = 8e-07

小鼠 NS5ABP37: 249 PPSPPRLECAASGPQSLKLGWDSNSKTHAAGDMVYTLQLED RNK---RFISIYRGP SHT 305

Fn-III: 1 PSPPTNLRV TDVTST SVTL SW--TPPEDDGGPITGYVVEYREK GSGDWKEVEVTPGSETS 58

小鼠 NS5ABP37: 306 YKVQRLTEFTCYSFRIQAMSEAGEGPYSETYTFST 340

Fn-III: 59 YTLTGLKPGTEYEFVRVAVNGGGESPPSESVTVTT 93

CD-Length = 93 residues, only 47.3% aligned

Score = 48.4 bits (114), Expect = 2e-06

小鼠 NS5ABP37: 10 EVYHGPELECTVGNLLPGTVYRFRVRALNDGGYGPYSDVSEITT 53

Fn-III: 50 EVTPGSETSYTLTGLKPGTEYEFVRVAVNGGGESPPSESVTVTT 93

CD-Length = 93 residues, 81.7% aligned

Score = 45.7 bits (107), Expect = 1e-05

小鼠 NS5ABP37: 345 PPTLKAPRV TQLEGNSCEIFWETVPPMRGDPVSYVLQVLVGRDSEYKQVYK--GEEATFQ 402

Fn-III: 1 PSPPTNLRV TDVTST SVTL SWTPEDDGGPITGYVVEYREK GSGDWKEVEVTPGSETSYT 60

小鼠 NS5ABP37: 403 ISGLQSN TDYRFRVCA 418

Fn-III: 61 LTGLKPGTEYEFVRVRA 76

CD-Length = 83 residues, 84.3% aligned

Score = 50.9 bits (121), Expect = 3e-07

小鼠 NS5ABP37: 177 LVLNWEPCNNGSEILAYNIDLGD-----SCITVGN TTTTHVMKNLLPETTYRIRIQA 228

Fn-III: 14 LTLWSPPPDGNGPITGYEVEYQPKNSGEEWNEITVPGTTTSYTLTGLKPGTEYEV RVQA 73

小鼠 NS5ABP37: 229 INEIGVGPFS 238

Fn-III: 74 VNGGGNGPPS 83

CD-Length = 83 residues, 98.8% aligned  
Score = 44.7 bits (105), Expect = 2e-05

小鼠 NS5ABP37: 62 RAPRVSFTPDGCVLVGWESPASPGADISEYRLEW---GEDEQSLELVYHGPDTCFEMRDL 118  
Fn-III: 2 TNLTVTDVTSTSLTSLWSPPPDGNGPITGYEVEYQPKNSGEEWNEITVPGTTTTSYTLTGL 61

小鼠 NS5ABP37: 119 LPAAQYCCRLQAFNPAGAGPYS 140  
Fn-III: 62 KPGTEYEV RVQAVNGGGNGPPS 83  
CD-Length = 83 residues, only 39.8% aligned  
Score = 41.6 bits (97), Expect = 2e-04

小鼠 NS5ABP37: 14 GPELECTVGNLLPGTVYRFRVRALNDGGYGPYS 46  
Fn-III: 51 GTTTSYTLTGLKPGTEYEV RVQAVNGGGNGPPS 83  
CD-Length = 83 residues, 84.3% aligned  
Score = 41.2 bits (96), Expect = 2e-04

小鼠 NS5ABP37: 351 PRVTQLEGNSCEIFWETVPPMRGDPVSYVLQVLVGRDSEYKQVY--KGEEATFQISGLQS 408  
Fn-III: 4 LTVTDVTSTSLTSLWSPPPDGNGPITGYEVEYQPKNSGEEWNEITVPGTTTTSYTLTGLKP 63

小鼠 NS5ABP37: 409 NTDYRFRVCA 418  
Fn-III: 64 GTEYEV RVQA 73  
CD-Length = 83 residues, 100.0% aligned  
Score = 37.8 bits (87), Expect = 0.003

小鼠 NS5ABP37: 252 PPRLECAASGPQSLKCLKWGDSNSKTHAAGDMVYTLQLEDNRNKRFSIYR---GPSHTYKV 308  
Fn-III: 1 PTNLTVDVTSTSLTSLW--SPPPDGNGPITGYEVEYQPKNSGEEWNEITVPGTTTTSYTL 58

小鼠 NS5ABP37: 309 QRLTEFTCYSFRIQAMSEAGEGPYS 333  
Fn-III: 59 TGLKPGTEYEV RVQAVNGGGNGPPS 83  
CD-Length = 83 residues, 100.0% aligned  
Score = 43.0 bits (100), Expect = 8e-05

小鼠 NS5ABP37: 58 PGQCRAPRVSFTPDGCVLVGWESPASPGAD-ISEYRLEWGEDEQSLELVYHGP--DTCFE 114  
Fn-III: 1 PPPSNLRVTDVTSTSVTSLSWKPPDDIGGYIVGYRVEYREEGSEWKEVNVTPSSTTSYT 60

小鼠 NS5ABP37: 115 MRDLLPAAQYCCRLQAFNPAGAG 137  
Fn-III: 61 LTGLKPGTEYEFVRVAVNGAGEG 83  
CD-Length = 83 residues, 100.0% aligned  
Score = 42.6 bits (99), Expect = 1e-04

小鼠 NS5ABP37: 152 PDPVSTLCVLEEEPPSAHPDSPSVCLVLNWECP-CNNGSEILAYNIDLGDSC-----I 203  
Fn-III: 1 PPPSNLRVTDVTSTSVT-----LSWKPPDDIGGYIVGYRVEYREEGSEWKEVNV 51

小鼠 NS5ABP37: 204 TVGNTTTHVMKNLLPETTYRIRIQAINIIGVG 235  
Fn-III: 52 TPSSTTSYTLTGLKPGTEYEFVRVAVNGAGEG 83  
CD-Length = 83 residues, 100.0% aligned  
Score = 41.4 bits (96), Expect = 2e-04

小鼠 NS5ABP37: 249 PPSPRLECAASGPQSLKCLKWGDSNSKTHAAGDMVYTLQLEDNRNKRFSIYRGPS--HTY 306  
Fn-III: 1 PPPSNLRVTDVTSTSVTSLW-KPPDDIGGYIVGYRVEYREEGSEWKEVNVTPSSTTSY 59

小鼠 NS5ABP37: 307 KVQRLTEFTCYSFRIQAMSEAGEG 330  
Fn-III: 60 TLTGLKPGTEYEFVRVAVNGAGEG 83  
CD-Length = 83 residues, 91.6% aligned  
Score = 40.3 bits (93), Expect = 5e-04

小鼠 NS5ABP37: 345 PPTLKAPRVTQLEGNSCEIFWETVPPMRGDPVSYVLQVLVGRDSEYKQVYK--GEEATFQ 402  
Fn-III: 1 PPPSNLRVTDVTSTSVTSLSWKPPDDIGGYIVGYRVEYREEGSEWKEVNVTPSSTTSYT 60

小鼠 NS5ABP37: 403 ISGLQSN TDYRFRVCA 418  
Fn-III: 61 LTGLKPGTEYEFVRA 76  
CD-Length = 83 residues, only 34.9% aligned  
Score = 39.1 bits (90), Expect = 0.001

小鼠 NS5ABP37: 15 PELECTVGNLLPGTVYRFRVRALNDGGYG 43  
Fn-III: 55 STTSYTLTGLKPGTEYEFVRVAVNGAGEG 83

图3 小鼠 NS5ABP37 保守结构位点的分析.

### 3 讨论

HCV 属于 RNA 病毒, 所以其发病机制与乙型肝炎病毒这种 DNA 病毒是不同的, 没有病毒 DNA 与肝细胞基因组 DNA 整合、对于宿主基因组的异常调节的环节<sup>[24-30]</sup>. HCV 感染的发病机制, 更多的是通过病毒的 RNA、蛋白质成分对于肝细胞的异常调节而实现的. 因此, 研究 HCV 与肝细胞之间的相互调节的分子生物学机制具有十分重要的意义. 在 HCV 基因组编码的一系列的和非结构蛋白中, 非结构蛋白 5A 是一种具有多种生物学功能的蛋白类型. 体外的细胞转染试验结果表明, NS5A 基因转染可以引起细胞系、甚至原代细胞发生恶性转化, NS5A 转基因小鼠也发生肝细胞癌. 所有这些证据都表明 NS5A 蛋白对于肝细胞的信号转导、细胞周期、细胞凋亡等环节具有显著的调节作用<sup>[7, 28]</sup>. HCV 对于肝细胞影响的机制很复杂, 其中之一就是 HCV NS5A 蛋白与肝细胞中的蛋白之间的结合, 改变了肝细胞内正常的信号转导途径<sup>[31-38]</sup>. 我们在探索 NS5A 蛋白结合的肝细胞内的蛋白类型时, 发现了一种未知功能蛋白可以与 HCV NS5A 蛋白结合, 命名为 NS5ABP37. 本项研究, 我们应用生物信息学技术结合分子生物学技术, 克隆、鉴定了小鼠的 NS5ABP37 同源基因. 通过生物信息学技术分析, 发现小鼠和人的 NS5ABP37 基因序列具有高度的同源性. 同时发现 NS5ABP37 蛋白与 LAR 具有高度的同源性, 提示 NS5ABP37 蛋白可能有酪氨酸磷酸酶的催化活性<sup>[39]</sup>. 另外, 在蛋白质一级结构的分子中发现, NS5ABP37 分子结构中存 5 段纤维连接蛋白 III 型结构位点, 说明 NS5ABP37 具有细胞外基质蛋白的结构特点. 这些生物信息学推测的结果, 有待于进一步的实验研究证实.

未知功能基因的克隆化是研究病毒性肝炎发病机制的重要的创新知识的源泉. 关于肝炎病毒结合蛋白的筛选, 目前酵母双杂交技术系统 3 得到了广泛的应用. 经过多年的改进, 其筛选的效率和准确性已经有了可靠的保证. 结合体外的免疫<sup>[40-45]</sup>共沉淀技术的研究, 确立蛋白-蛋白之间的相互作用已经有了可靠的保证. 因为正常的肝细胞中没有这些肝炎病毒的蛋白, 当肝细胞突然获得了这些肝炎病毒蛋白之后, 通过蛋白-蛋白之间的结合, 对于肝细胞的正常的生物学功能就会产生显著的影响. 比如肝炎病毒蛋白结合的是一种蛋白酶类, 如本项研究的结果提示 NS5ABP37 可能具有酪氨酸磷酸酶的活性, 可能就会改变了这种蛋白酶的活性; 如果肝炎病毒蛋白结合的对象是一种蛋白酶结合的底物蛋白, 就会改变这种蛋白作为底物蛋白的性质. 这样, 或许还通过影响肝细胞中蛋白的正常的细胞内转位, 从而改变了肝细胞的正常的信号转导途径, 改变了细胞的生长、凋亡, 引起肝细胞的病变, 甚至是恶性转化. NS5ABP37 蛋白具有 Fn-III 结构位点可能具有十分重要的生物学意义. 生物信息学分析结果表明, NS5ABP37 蛋白与 LAR 蛋白之间具有一定的同源性. 研究表明, LAR 蛋白分子结构中也有 Fn-III 位点结构. 利用噬菌体 DNA

文库和黏粒基因组 DNA 克隆技术, O' Grady et al<sup>[39]</sup>对于人白细胞普通抗原相关分子(leukocyte-common antigen-related molecule, LAR)酪氨酸磷酸酶(tyrosine phosphatase)的结构进行了研究. LAR 基因由 33 个外显子组成, 大小为 85 kb. 外显子 2 编码信号肽序列以及成熟 LAR 蛋白的前 4 个氨基酸残基. 外显子 3-7 编码免疫球蛋白样结构位点, 外显子 8-17 编码 8 个 Fn-III 位点. 外显子 18-22 编码膜相关和跨膜位点, 外显子 23-33 编码 2 个保守的酪氨酸磷酸酶位点. 外显子 1 的功能还没有确定. 逆转录聚合酶链反应扩增结果表明在外显子 13 的第 5 个 FnIII 结构域可能存在不同的剪接体. RNase 保护分析结果表明, 人 LAR mRNA 外显子 13 的剪切是主要的剪切类型<sup>[46-50]</sup>. 在 LAR mRNA 的第 4、5、6、7 个 FnIII 位点区也可能存在着剪切. 这些发现有助于研究 LAR 细胞外围点的功能. 这些结构上的类似, 有助于推测 NS5ABP37 蛋白的可能的生物学功能. 但是, 至于 NS5ABP37 蛋白确切的结构和功能, 以及 NS5ABP37 蛋白在 HCV 感染中所发挥的病理生理学作用, 必须通过进一步的实验加以证实和发掘.

### 4 参考文献

- 1 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001; 9:1379-1383
- 2 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒 NS2 基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132
- 3 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- 4 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. 世界华人消化杂志 2002;10:161-164
- 5 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 牟劲松, 洪源, 刘妍, 段惠娟, 王刚, 李莉, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白与染色体转位蛋白的相互作用. 中华医学杂志 2002;82:673-677
- 6 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白 AI 结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 7 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 刘妍, 王刚, 洪源, 王贺, 芮莉莉. 筛选与克隆丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白结合蛋白基因. 解放军医学杂志 2003;28:50-52
- 8 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源. 酵母双杂交技术筛选克隆丙型肝炎病毒 NS3 蛋白结合蛋白. 解放军医学杂志 2003;28:31-33
- 9 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选 Hcbp6 结合的肝细胞蛋白编码基因. 世界华人消化杂志 2003;11:385-388
- 10 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:426-429
- 11 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBeAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:422-425
- 12 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙肝病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:765-769
- 13 成军. 慢性丙型病毒性肝炎肝脏脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 14 李莉, 成军, 李梵, 王建军, 张健, 吴勤, 韩萍, 陈国凤, 纪冬, 李克. 慢性丙型病毒性肝炎脂肪变的临床与病理学特点. 世界华人消化杂志 2002;10:1009-1013
- 15 张健, 成军, 李莉, 刘爱兵, 吴勤, 李克, 董菁, 王琳, 陆荫英. 丙型肝炎病毒感染血清载脂蛋白 AI 和 AII 水平的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1014-1017

- 16 成军, 李莉. 清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制. *世界华人消化杂志* 2002;10:73-76
- 17 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因结合蛋白的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:223-225
- 18 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:125-128
- 19 成军, 任进余, 李莉, 陆志檬, 李克, 洪源, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. *世界华人消化杂志* 2002;10:1022-1026
- 20 成军. 丙型肝炎病毒致病的分子生物学机制. *解放军医学杂志* 2003;28:23-27
- 21 成军. 新基因结构与功能研究的策略. *世界华人消化杂志* 2003;11:373-377
- 22 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因和蛋白的生物信息学分析. *世界华人消化杂志* 2003;11:378-384
- 23 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 生物信息学技术与新基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:474-477
- 24 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调 *c-myc* 基因表达的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:141-144
- 25 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L, Chen JM. Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein-a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:300-303
- 26 牟劲松, 刘妍, 王刚, 成军, 段惠娟, 李克, 陆荫英, 王琳, 王惠芬. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活的相关基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:399-403
- 27 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. *世界华人消化杂志* 2003;11:394-398
- 28 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 10 的克隆化研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:935-938
- 29 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白反式调节基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:920-924
- 30 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 反式调节靶基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:930-934
- 31 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因 10 的克隆化研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:925-929
- 32 成军. 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制. *世界华人消化杂志* 2003;11:888-889
- 33 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:943-946
- 34 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式调节基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:939-942
- 35 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调 NIP3 基因表达研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:951-954
- 36 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调细胞周期调节蛋白 *Wee1* 基因表达研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:947-950
- 37 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 杨艳杰, 张树林. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调层粘蛋白 B1 链基因启动子表达活性的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:955-958
- 38 杨倩, 刘妍, 成军, 李克, 王建军, 洪源, 张树林. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 上调新生多肽相关复合物  $\alpha$  多肽基因的表达. *世界华人消化杂志* 2003;11:959-962
- 39 O' Grady P, Krueger NX, Streuli M, Saito H. Genomic organization of the human LAR protein tyrosine phosphatase gene and alternative splicing in the extracellular fibronectin type-III domains. *J Biol Chem* 1994;269:25193-25199
- 40 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 董菁, 洪源, 张跃新, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. *解放军医学杂志* 2001;26:880-883
- 41 Kataeva IA, Seidel RD 3rd, Shah A, West LT, Li XL, Ljungdahl LG. The fibronectin type 3-like repeat from the Clostridium thermocellum cellobiohydrolase CbhA promotes hydrolysis of cellulose by modifying its surface. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:4292-4300
- 42 Sakata N, Sasatomi Y, Meng J, Ando S, Uesugi N, Takebayashi S, Nagai R, Horiuchi S. Possible involvement of altered RGD sequence in reduced adhesive and spreading activities of advanced glycation end product-modified fibronectin to vascular smooth muscle cells. *Connect Tissue Res* 2000;41:213-228
- 43 O' Farrell TJ, Pourmotabbed T. Identification of structural elements important for matrix metalloproteinase type V collagenolytic activity as revealed by chimeric enzymes. Role of fibronectin-like domain and active site of gelatinase B. *J Biol Chem* 2000;275:27964-27972
- 44 Paci E, Karplus M. Forced unfolding of fibronectin type 3 modules: an analysis by biased molecular dynamics simulations. *J Mol Biol* 1999;288:441-459
- 45 Hamill SJ, Meekhof AE, Clarke J. The effect of boundary selection on the stability and folding of the third fibronectin type III domain from human tenascin. *Biochemistry* 1998;37:8071-8079
- 46 Ingham KC, Brew SA, Huff S, Litvinovich SV. Cryptic self-association sites in type III modules of fibronectin. *J Biol Chem* 1997;272:1718-1724
- 47 Weber P, Ferber P, Fischer R, Winterhalter KH, Vaughan L. Binding of contactin/F11 to the fibronectin type III domains 5 and 6 of tenascin is inhibited by heparin. *FEBS Lett* 1996;389:304-308
- 48 Jongewaard IN, Tsai PM, Smith JW. The type III connecting segment of fibronectin contains an aspartic acid residue that regulates the rate of binding to integrin alpha 4 beta 1. *Cell Adhes Commun* 1996;3:487-495
- 49 Appel F, Holm J, Conscience JF, von Bohlen und Halbach F, Faissner A, James P, Schachner M. Identification of the border between fibronectin type III homologous repeats 2 and 3 of the neural cell adhesion molecule L1 as a neurite outgrowth promoting and signal transducing domain. *J Neurobiol* 1995;28:297-312
- 50 Busby TF, Argraves WS, Brew SA, Pechik I, Gilliland GL, Ingham KC. Heparin binding by fibronectin module III-13 involves six discontinuous basic residues brought together to form a cationic cradle. *J Biol Chem* 1995;270:18558-18562

# 新生儿 HBe Ag 在 HBV 宫内感染中的作用

邵中军, 门可, 徐剑秋, 徐德忠, 闫永平, 张景霞

邵中军, 门可, 徐德忠, 闫永平, 张景霞, 中国人民解放军第四军医大学流行病学教研室 陕西省西安市 710032  
徐剑秋, 陕西省妇幼保健院 陕西省西安市 710003  
邵中军, 男, 1973-11-29 生, 医学博士, 发表论文 6 篇。  
国家自然科学基金课题, No. 3203023  
项目负责人: 徐德忠, 710032, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学流行病学教研室. xudezh@fmmu.edu.cn  
电话: 0293374871  
收稿日期: 2003-11-05 接受日期: 2003-12-19

## Effect of HBeAg on the hepatitis B virus vertical transmission in neonates

Zhong-Jun Shao, Ke Men, Jian-Qiu Xu, De-Zhong Xu, Yong-Ping Yan, Jing-Xia Zhang

Zhong-Jun Shao, Ke Men, De-Zhong Xu, Yong-Ping Yan, Jing-Xia Zhang, Department of Epidemiology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China  
Jian-Qiu Xu, Shaanxi Maternity and Children Healthy Hospital, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No.3203023  
Correspondence to: De-Zhong Xu, Department of Epidemiology, Forth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. xudezh@fmmu.edu.cn  
Received: 2003-11-05 Accepted: 2003-12-19

### Abstract

AIM: To investigate the effect of HBeAg on the hepatitis B virus vertical transmission in neonates.

METHODS: HBsAg positive pregnant women were enrolled, and ELISA or Abbott was employed to detect the HBeAg and HBsAg in the peripheral blood of neonates and their mothers.

RESULTS: Fifty-seven HBsAg positive pregnant women were reconfirmed as HBsAg positive. Fifteen of them were detected as HBeAg positive. Eleven of 16 neonates born to 15 HBeAg positive mother were detected as HBeAg positive. Three neonates diagnosed as HBsAg positive by ELISA or Abbott reagents were detected as HBeAg positive. Statistic analysis indicated that HBeAg in newborns was an important risk factor.

CONCLUSION: HBeAg in neonates played an important role during HBV vertical transmission.

Shao ZJ, Men K, Xu JQ, Xu DZ, Yan YP, Zhang JX. Effect of HBeAg on the hepatitis B virus vertical transmission in neonates. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):298-301

### 摘要

目的: 探讨新生儿 HBe Ag 在 HBV 宫内感染中的作用。

方法: 收集 HBs Ag 阳性住院待产孕妇, 采用 ELISA 方法和

abott 试剂对产妇和新生儿 HBe Ag、HBs Ag 进行检测。

结果: 57 例孕妇血清经实验室复查, HBs Ag 均阳性, 其中 HBe Ag 阳性孕妇 15 例。15 例 HBe Ag 阳性孕妇所产的 16 例新生儿有 11 例 HBe Ag 阳性(68.75%)。新生儿 HBs Ag 阳性 3 例, 全部产自于 HBe Ag 阳性母亲, 且其外周血 HBe Ag 均阳性。统计分析显示新生儿 HBe Ag 是 HBV 宫内感染的危险因素( $P < 0.05$ )。

结论: 新生儿 HBe Ag 在 HBV 宫内感染过程中起重要作用。

邵中军, 门可, 徐剑秋, 徐德忠, 闫永平, 张景霞. 新生儿 HBe Ag 在 HBV 宫内感染中的作用. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):298-301

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/298.asp>

### 0 引言

HBe Ag 属于 HBV 核壳蛋白的分泌型, 他不参与病毒复制和病毒颗粒的装配<sup>[1-4]</sup>。但由于 HBe Ag 与 HBc Ag 在一级结构上具有相似性, 在 T 细胞水平存在交叉识别, 容易引起免疫耐受<sup>[5-8]</sup>。同时 HBe Ag 是病毒传染性的重要标志, 也是 HBV 宫内传播的重要危险因素<sup>[9-11]</sup>, 与新生儿乙型肝炎宫内感染的预后有重要关系<sup>[12-14]</sup>。有研究显示 HBs Ag、HBe Ag 双阳性孕妇所产婴儿一旦发生感染极易发展成 HBV 慢性携带状态, 其中约有 50% 将最终发展成肝硬化、肝癌<sup>[15-19]</sup>。目前关于 HBe Ag 能否通过胎盘尚存在争议。为此, 我们对 HBV 感染的母亲所产婴儿外周血 HBe Ag 进行检测, 探讨 HBe Ag 能否透过胎盘屏障, 从而为进一步探讨 HBe Ag 与 HBV 宫内传播的关系提供线索。

### 1 材料和方法

1.1 材料 2002-10/2003-10 连续收集的陕西省某医院 HBs Ag 阳性孕妇及其所产新生儿为研究对象, 采集孕妇肘静脉血、新生儿 24 h 内股静脉血。采血后常规注射乙肝免疫球蛋白和乙肝疫苗。1 500 r/min 离心分离血清, -20 °C 保存备用。HBs Ag、HBe Ag 检测试剂盒购于上海科华生物技术公司。Abbott 检测试剂由西京医院检验科提供。

1.2 方法 宫内感染定义: 新生儿出生 24 h 内、未接受主被动联合免疫前的静脉血 HBs Ag 阳性。HBs Ag、HBe Ag 检测均采用酶联免疫黏附试验(ELISA, 上海科华), 结果检测全自动酶联检测仪(Multiskan MK3)上进行。检测步骤: 吸取血清原液 50  $\mu$ L 加入酶联反应板中, 同时

滴加辣根过氧化物酶标记的抗体, 37 °C 孵育反应 30 min 后, 洗液清洗 5 便; 后加入显色剂 A 和 B, 37 °C 孵育 10 min, 加终止液终止反应. 分别于 450 nm 和 630 nm 处进行双波长检测, 读吸光度(A)值, P/N 大于或等于 2.1 为阳性. 数日后采用单盲法和同一厂家 ELISA 试剂进行复测. 如果两次结果一致, 即予采用; 如不一致, 采用 Abbott 检测方法进行复测, 并以 Abbott 检测结果为最终结果. Abbott 检测及结果报告在 Abbott Systems 上自动完成.

统计学处理 采用 SPSS10.0 软件进行统计分析: 计量资料采用 t 检验对检测结果进行分析, 计数资料采用  $\chi^2$  检验或 Fisher's test 精确检验, 以  $P < 0.05$  确定差异是否具有统计意义.

## 2 结果

2.1 一般情况 共收集临床检验 HBs Ag 阳性孕妇 66 例及其所产新生儿 67 例. 经过实验室复测, 剔除 HBs Ag 阴性孕妇 2 例, 孕妇血清或新生儿血清两不足或已不适于 ELISA 检测 7 例, 故实际纳入研究病例数为 57 例母亲和 58 例新生儿, 双胞胎 1 例. 孕妇平均年龄为  $27.8 \pm 3.1$  岁. 新生儿体质量为  $2978 \pm 940$  g, 其中男婴 27 例, 女婴 30 例, 无畸形儿.

2.2 母亲及新生儿血清 HBs Ag、HBe Ag 检测结果 经实验室复查 57 例孕妇血清 HBs Ag 均阳性, 其中 HBe Ag 阳性孕妇 15 例. 15 例 HBe Ag 阳性孕妇所产的 16 例新生儿有 11 例 HBe Ag 阳性(68.75%). 新生儿 HBs Ag 阳性 3 例, 全部产自于 HBe Ag 阳性母亲, 且其外周血 HBe Ag 均阳性. 其中, 部分新生儿 HBe Ag 的吸光度值要高于其母(表 1), 配对差值 t-test 检验无差异( $P = 0.40$ ). 41 例 HBe Ag 阴性孕妇所产的新生儿 HBs Ag、HBe Ag 均阴性.

表 1 11 例 HBs Ag - HBe Ag 阳性新生儿母亲 - 新生儿 ELISA 方法吸光度值比较

编号	母亲 HBs Ag	新生儿 HBs Ag	母亲 HBe Ag	新生儿 HBe Ag
12	2.487	0.097	0.469	1.353
16	2.694	0.010	1.444	1.645
25	2.808	0.156	0.693	1.698
30	2.662	0.043	0.636	0.927
39	2.476	1.202	0.431	1.282
40	2.471	0.041	0.413	0.603
44	2.427	0.034	1.336	0.120
49	2.825	0.026	1.118	1.169
51	2.342	0.200	0.441	2.093
53	2.601	0.065	0.552	0.161
64	2.929	0.021	2.748	0.655

其中 39、40 号为双胞胎, 阳性界值为 0.11.

## 2.2 母亲及新生儿 HBe Ag 阳性对乙肝病毒宫内感染的

危险度分析 本次调查的 57 名孕妇中, HBe Ag 阳性孕妇 15 例(26.31%), 发生宫内感染 3 例. Fisher's test 精确检验显示母亲、新生儿 HBe Ag 都是乙肝病毒宫内感染的危险因素(表 2).

表 2 HBe Ag 阳性对乙肝病毒宫内感染的危险度分析

暴露	新生儿 HBs Ag		合计	P
	阳性	阴性		
母亲 HBe Ag	阳性	3	13	0.02
	阴性	0	42	
新生儿 HBe	阳性	3	8	0.01
	阴性	0	47	

## 3 讨论

本研究对新生儿股静脉血血清 HBe Ag 和母亲血清 HBe Ag 进行检测, 共检出 16 例阳性母亲, 其所产新生儿有 11 例 HBe Ag 阳性. Wang et al<sup>[20]</sup> 在 7 例 HBe Ag 阳性母亲的新生儿静脉血检测到 HBe Ag, 且新生儿 HBe Ag 滴度都低于他们的母亲, 而本次研究部分新生儿血清 HBe Ag 吸光度值高于母亲. 本次研究发现所有发生宫内感染的新生儿其 HBe Ag 均阳性, 且吸光度值均高于母亲. 新生儿 HBe Ag 阳性率明显高于 HBs Ag 阳性率, 提示 HBe Ag 和 HBs Ag 跨越胎盘的机制可能不同, HBe Ag 可能存在主动转运过程. 而已经证实发生宫内感染的 3 例新生儿其外周血 HBe Ag 均阳性, 且新生儿血清 HBe Ag 吸光度值高于母亲.

HBe Ag 作为病毒复制的指标同时又是高传染性的标志<sup>[21-28]</sup>. 实验室证据显示外周血 HBe Ag 阳性与 HBV DNA 高度相关. 有文献对 HBe Ag 和 HBV DNA 水平对新生儿宫内感染的贡献进行分析, OR 值分别为 17.6 (8.1-38.5, 95% CI) 和 41.7 (21.7-80.4, 95% CI), 说明母体 HBV DNA 水平是新生儿持续感染更强的预测指标<sup>[29]</sup>. 但 Chen et al<sup>[30]</sup> 认为新生儿体内的 HBe Ag 干扰了细胞毒性病毒清除机制. 他们用 HBe Ag 决定多肽表位 p120-131 刺激 HBe Ag 转基因雌性小鼠的子代(F1)和正常小鼠, 发现 HBe Ag 转基因小鼠的子代小鼠抗原刺激后增生能力明显低于和正常小鼠, 提示宫内暴露于 HBe Ag 可引起免疫耐受.

细胞毒性病毒清除机制是体内清除 HBV 的重要方式. HBV 感染机体后会在感染的肝细胞表面表达 HBc Ag. 在缺乏免疫耐受的情况下, HBc Ag 特异的 CTL 能够对这些肝细胞进行识别、杀伤, 从而清除病毒. HBc Ag 与 HBe Ag 在一级结构上具有相似性, 在 T 细胞水平存在交叉识别, 宫内暴露 HBe Ag 后, 通过活化诱导的细胞凋亡剔除 HBe Ag、HBc Ag 特异的 Th1 细胞, 从而降低了 HBc Ag 特异性细胞毒性 T 细胞对 HBV 感染细胞的清除能力<sup>[31-33]</sup>. 这就可以从理论上解释为什么 HBe Ag 阳性母亲所产新生儿感染 HBV 慢性化程度高而所产

新生儿爆发型肝炎发病率低<sup>[21-23]</sup>。通过免疫耐受影响细胞毒性机制,能缓解急性肝炎的肝细胞损伤,同时也降低了病毒清除的效率。许多研究已证实,胎儿发育过程中如果宫内暴露于一些免疫源性物质则更容易引起免疫耐受。因此,可以推测, HBe Ag 不仅仅是高传染性的标志,其本身也可能通过影响人类胎儿免疫系统,从而增加感染的风险。

母亲HBe Ag阳性是HBV宫内感染的重要危险因素。Xu et al<sup>[9]</sup>报告的15例宫内HBV感染的新生儿中有13例新生儿的母亲HBe Ag阳性(OR=17.07, 95% CI 1.15-25.67)。本次调查发现的3例新生儿感染个案均来自于HBe Ag阳性母亲,且这些新生儿外周血HBe Ag均阳性,说明新生儿HBe Ag阳性也是HBV宫内感染的重要危险因素。这对于今后深入研究HBe Ag在HBV宫内感染过程中的作用提供必要线索<sup>[34-38]</sup>。

#### 4 参考文献

- 1 苏勤. 乙型肝炎病毒慢性感染和肝癌发生. 世界华人消化杂志 2003;11:791-795
- 2 Ma CL, Fang DX, Chen HB, Li FQ, Jin HY, Li SQ, Tan WG. A mutation specific polymerase chain reaction for detecting hepatitis B virus genome mutations at nt551. *World J Gastroenterol* 2003;9:509-512
- 3 黄晶, 高志良. 乙型肝炎病毒基因型及其临床意义的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1362-1364
- 4 Shen LJ, Zhang HX, Zhang ZJ, Li JY, Chen MQ, Yang WB, Huang R. Detection of HBV, PCNA and GST-pi in hepatocellular carcinoma and chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2003;9:459-462
- 5 Alheim M, Lazdina U, Milich DR, Sallberg M. Flow cytometric determination of cytokine production and proliferation in hepatitis B core antigen specific murine CD4 cells: lack of correlation between number of cytokine producing cells and cytokine levels in supernatant. *J Immunol Methods* 2001;258:157-167
- 6 Hu YP, Hu WJ, Zheng WC, Li JX, Dai DS, Wang XM, Zhang SZ, Yu HY, Sun W, Hao GR. Establishment of transgenic mouse harboring hepatitis B virus (adr subtype) genomes. *World J Gastroenterol* 2001;7:111-114
- 7 Lazdina U, Alheim M, Nystrom J, Hultgren C, Borisova G, Sominskaya I, Pumpens P, Peterson DL, Milich DR, Sallberg M. Priming of cytotoxic T cell responses to exogenous hepatitis B virus core antigen is B cell dependent. *J Gen Virol* 2003; 84:139-146
- 8 Chen M, Sallberg M, Thung SN, Hughes J, Jones J, Milich DR. Modeling the T-helper cell response in acute and chronic hepatitis B virus infection using T-cell receptor transgenic mice. *Antiviral Res* 2001;52:99-111
- 9 Xu DZ, Yan YP, Choi BC, Xu JQ, Men K, Zhang JX, Liu ZH, Wang FS. Risk factors and mechanism of transplacental transmission of hepatitis B virus: a case-control study. *J Med Virol* 2002;67:20-26
- 10 Xu DZ, Yan YP, Zou S, Choi BC, Wang S, Liu P, Bai G, Wang X, Shi M, Wang X. Role of placental tissues in the intrauterine transmission of hepatitis B virus. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185:981-987
- 11 Shao ZJ, Xu DZ, Yan YP, Li JH, Zhang JX, Zhang ZY, Pan BR. Detection of anti-HAV antibody with dot immunogold filtration assay. *World J Gastroenterol* 2003;9:1508-1511
- 12 Ma CH, Sun WS, Tian PK, Gao LF, Liu SX, Wang XY, Zhang LN, Cao YL, Han LH, Liang XH. A novel HBV antisense RNA gene delivery system targeting hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:463-467
- 13 张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林. 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对蛋白酪氨酸激酶信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:1027-1030
- 14 Wu JS, Hwang LY, Goodman KJ, Beasley RP. Hepatitis B vaccination in high-risk infants: 10-year follow-up. *J Infect Dis* 1999;179:1319-1325
- 15 Wang FS. Current status and prospects of studies on human genetic alleles associated with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2003;9:641-644
- 16 郝春秋, 聂青和. 乙型肝炎的实验检查及其临床意义. 世界华人消化杂志 2003;11:776-780
- 17 Hsu CY, Chu CH, Lin SC, Yang FS, Yang TL, Chang KM. Concomitant hepatocellular adenoma and adenomatous hyperplasia in a patient without cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:627-630
- 18 Baptista M, Kramvis A, Jammeh S, Naicker J, Galpin JS, Kew MC. Follow up of infection of chacma baboons with inoculum containing A and non-A genotypes of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:731-735
- 19 Cheng H, Zhang HZ, Shen WA, Liu YF, Ma FC. Expression of RNase H of human hepatitis B virus polymerase in *Escherichia coli*. *World J Gastroenterol* 2003;9:513-515
- 20 Wang JS, Zhu QR. Infection of the fetus with hepatitis B e antigen via the placenta. *Lancet* 2000;355:989
- 21 Li H, Li RC, Liao SS, Gong J, Zeng XI, Li YP. Long-term effectiveness of infancy low-dose hepatitis B vaccine immunization in Zhuang minority area in China. *World J Gastroenterol* 1999;5:122-124
- 22 Thakur V, Kazim SN, Guptan RC, Malhotra V, Sarin SK. Molecular epidemiology and transmission of hepatitis B virus in close family contacts of HBV-related chronic liver disease patients. *J Med Virol* 2003;70:520-528
- 23 Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001;7:537-541
- 24 Yang X, Tang XP, Lei JH, Luo HY, Zhang YH. A novel stop codon mutation in HBsAg gene identified in a hepatitis B virus strain associated with cryptogenic cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1516-1520
- 25 Ding CL, Yao K, Zhang TT, Zhou F, Xu L, Xu JY. Generation of cytotoxic T cell against HBcAg using retrovirally transduced dendritic cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:1512-1515
- 26 Gong WD, Liu J, Ding J, Zhao Y, Li YH, Xue CF. Inhibition of HBV targeted ribonuclease enhanced by introduction of linker. *World J Gastroenterol* 2003;9:1504-1507
- 27 Ding J, Liu J, Xue CF, Gong WD, Li YH, Zhao Y. Anti-HBV effect of TAT-HBV targeted ribonuclease. *World J Gastroenterol* 2003;9:1525-1528
- 28 Li XM, Yang YB, Hou HY, Shi ZJ, Shen HM, Teng BQ, Li AM, Shi MF, Zou L. Interruption of HBV intrauterine transmission: A clinical study. *World J Gastroenterol* 2003;9:1501-1503
- 29 Roussos A, Goritsas C, Pappas T, Spanaki M, Papadaki P, Ferti A. Prevalence of hepatitis B and C markers among refugees in Athens. *World J Gastroenterol* 2003;9:993-995
- 30 Chen M, Sällberg M, Thung SN, Hughes J, Milich DR. Modeling the T-helper cell response in acute and chronic hepatitis B virus infection using T-cell receptor transgenic mice. *Antiviral Research* 2001;52:99-111
- 31 Chen YD, Liu MY, Yu WL, Li JQ, Dai Q, Zhou ZQ, Tisminetzky SG. Mix-infections with different genotypes of HCV and with HCV plus other hepatitis viruses in patients with hepatitis C in China. *World J Gastroenterol* 2003;9:984-992
- 32 Wu CH, Ouyang EC, Walton C, Promrat K, Frouhar F, Wu GY. Hepatitis B virus infection of transplanted human hepatocytes causes a biochemical and histological hepatitis in immunocompetent rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:978-983

- 33 Jeon MJ, Shin JH, Suh SP, Lim YC, Ryang DW. TT virus and hepatitis G virus infections in Korean blood donors and patients with chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2003;9:741-744
- 34 Huang JM, Huang TH, Qiu HY, Fang XW, Zhuang TG, Liu HX, Wang YH, Deng LZ, Qiu JW. Effects of hepatitis B virus infection on human sperm chromosomes. *World J Gastroenterol* 2003;9:736-740
- 35 Jaboli MF, Fabbri C, Liva S, Azzaroli F, Nigro G, Giovanelli S, Ferrara F, Miracolo A, Marchetto S, Montagnani M, Colecchia A, Festi D, Reggiani LB, Roda E, Mazzella G. Long-term alpha interferon and lamivudine combination therapy in non-responder patients with anti-HBe-positive chronic hepatitis B: Results of an open, controlled trial. *World J Gastroenterol* 2003;9:1491-1495
- 36 Garcia JM, Marugan RB, Garcia GM, Lindeman ML, Abete JF, Terron SD. TT virus infection in patients with chronic hepatitis B and response of TTV to lamivudine. *World J Gastroenterol* 2003;9:1261-1264
- 37 Zheng SJ, Zhong S, Zhang JJ, Chen F, Ren H, Deng CL. Distribution and anti-HBV effects of antisense oligodeoxynucleotides conjugated to galactosylated poly-L-lysine. *World J Gastroenterol* 2003;9:1251-1255
- 38 Gao Y, Ma Y, Li M, Cheng T, Li SW, Zhang J, Xia NS. Oral immunization of animals with transgenic cherry tomatillo expressing HBsAg. *World J Gastroenterol* 2003;9:996-1002

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

• 新书介绍 •

## “农肥、污水与食管癌”出版消息

本刊讯 由徐致祥、谭家驹主任医师，司建华、陈凤兰副主任医师等编著，由包括两院院士在内的国内外四十多位有关领域的著名专家评审的《农肥、污水与食管癌》一书已由科学出版社出版。全书共九章 266 页，41 万字。在食管癌病因尚未查清，现有的病因假说不能够解释：食管癌死亡率分布地图，鸡咽食管癌现象；食管癌死亡率与气候，地貌、河流、湖泊、城乡、民族、年龄、性别、产煤区，及与胃癌，肝癌等相关的 20 多个流行病学特征的情况下，徐致祥从环境科学的角度于 1986 年提出了“农家肥料、霉变食品、自然界氮循环产物含有亚硝酸胺，亚硝酸胺前体物引起食管癌、胃癌、肝癌”病因假说。假说共分十个方面 86 个观点，可以解释上述 20 多个流行病学特征。作者从我国的实际情况出发，根据自己多年的观察，全方位多角度、实事求是地对食管癌高发区致病因素做了历史的、系统的考查，着重分析其主要矛盾，主要可疑线索。对 N-亚硝基化合物的两类前体物与食管癌的关系，做了深入的辩证论述，其结论与全世界所有的食管癌中发、高发区分布与气候类型；与全国两千多个县的食管癌死亡率基本符合。假说涉及气象、地质、地貌、土壤、水文、数学、微生物、地下水、农牧业、有机化学、生物化学、食管外科、胃肠外科，病因学及理论流行病学等多个边缘学科。对于理论流行病学的基本概念如人群癌发病率、癌死亡率与动物诱癌率之间的关系做了深入的探讨，并提出了有效污染比率、有效剂量、无效剂量、临界剂量等概念。此外，作者对于科学假说的一般形式，对于流行病学、病因学研究时所采用的假说的方法都提出了独到的见解。对于理论流行病学研究具有一定的意义。18 年来作者坚持对假说进行验证，在化学分析、动物实验、流行病学调查等六个方面取得了证据。并且为高发区居民提供了简单有效、切实可行的预防办法。因此，对食管癌、胃癌、肝癌的病因研究有相当的意义，不仅可供肿瘤病因、流行病学工作者参考，也可供高发区医务工作者和广大群众阅读。每本定价 41 元，另收邮挂号费 4 元，共 45 元。

欲购者请直接汇款到广东佛山市第一人民医院科教科 司建华收

地址：佛山市大福南路，邮编 528000，电话：0757-83833633-3831

# 应用抑制性消减杂交技术筛选TAHCCP2的反式调节基因

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 王春花

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

王建军, 男, 汉族, 1975-06生, 吉林省通化市人, 1999年毕业于第一军医大学, 现为军医进修学院2001级内科学专业硕士研究生, 主要从事肝炎病毒蛋白的反式调节作用研究。

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C39900130, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

## Screening and cloning of the target genes transactivated by TAHCCP2 using suppression subtractive hybridization technique

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

Jian-Jun Wang, Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Dong Ji, Xiao-Yan Dang, Zhi-Qiang Xu, Chun-Hua Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China Supported by National Natural Science Foundation of China, No. C030114020, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn Received: 2003-07-12 Accepted: 2003-08-16

### Abstract

**AIM:** To clone and identify human genes transactivated by TAHCCP2 by constructing a cDNA subtractive library with suppression subtractive hybridization technique.

**METHODS:** Suppression subtractive hybridization (SSH) and bioinformatics techniques were used for screening and cloning of the target genes transactivated by TAHCCP2 protein. The mRNA was isolated from HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 and pcDNA3.1(-) empty vector, respectively, and SSH method was employed to analyze the differentially expressed DNA sequence between the two groups. After restriction enzyme Rsa I digestion, small sizes cDNAs were obtained. Then tester cDNA was divided into two groups and ligated to the specific adaptor 1 and adaptor 2, respectively. After tester cDNA was hybridized with driver cDNA twice and underwent two times of nested PCR and then was subcloned into T/A plasmid vectors to set up the subtractive library. Amplification of the library was carried out with E. coli strain JM109. The cDNA was sequenced and analyzed in GenBank with Blast search after PCR.

**RESULTS:** The subtractive library of genes transactivated by TAHCCP2 was constructed successfully. The amplified library contained 70 positive clones. Colony PCR showed that these clones contained 200-1 000 bp inserts. Sequence analysis was performed in 32 clones, and the full length sequences were obtained with bioinformatics method. Altogether 15 coding sequences were achieved.

**CONCLUSION:** The obtained sequences may be target genes transactivated by TAHCCP2 among which some genes coding proteins involve in cell cycle regulation, metabolism, immunity and cell apoptosis. Advanced experiments need to be done to prove this finding.

Wang JJ, Liu Y, Cheng J, Yang Q, Ji D, Dang XY, Xu ZQ, Wang CH. Screening and cloning of the target genes transactivated by TAHCCP2 using suppression subtractive hybridization technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):302-305

### 摘要

**目的:** 筛选与克隆TAHCCP2的反式激活基因, 了解其可能存在的调节功能线索。

**方法:** 应用抑制性消减杂交(SSH)技术及生物信息学(bioinformatics)技术筛选并克隆TAHCCP2反式激活的新型靶基因。以TAHCCP2表达质粒pcDNA3.1(-)-TAHCCP2转染HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取mRNA并逆转录为cDNA, 经Rsa I酶切后, 将实验组cDNA分成两组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与对照组cDNA进行两次消减杂交及两次抑制性聚合酶链反应(PCR), 将产物与T/A载体连接, 构建cDNA消减文库, 并转染大肠杆菌进行文库扩增, 随机挑选克隆PCR扩增后进行测序及同源性分析。

**结果:** 成功构建人TAHCCP2反式激活基因差异表达的cDNA消减文库。文库扩增后得到70个阳性克隆, 进行菌落PCR分析, 均得到200-1 000 bp插入片段。对插入片段测序, 并通过生物信息学分析获得其全长基因序列, 结果共获得15种编码基因。

**结论:** 筛选到的cDNA全长序列, 包括一些与细胞生长调节、物质代谢、免疫及细胞凋亡密切相关的蛋白编码基因, 推测了TAHCCP2可能存在的调控机制的线索, 尚需进一步的实验证明。

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 王春花. 应用抑制性消减杂交技术筛选TAHCCP2的反式调节基因. *世界华人消化杂志* 2004;12(2): 302-305

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/302.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)基因组含有单一的开放读码框架, 编码 3 010-3 033 个氨基酸残基(aa)的多蛋白前体, 两侧是 5' - 非翻译区及 3' - 非翻译区. 多蛋白前体至少被加工为 10 种结构蛋白和非结构蛋白, 其中核心区(1-573 nt)编码的 21 kD HCV 核衣壳蛋白(191 aa)是一种多功能蛋白质, 能够影响多种细胞信号转导途径, 激活多种病毒及细胞基因启动子, 具有广泛的反式激活作用<sup>[1-6]</sup>, 最近研究还发现其与 HCV 感染后脂肪肝的形成也有一定关系<sup>[7-9]</sup>, 在 HCV 致病过程中可能起着重要的作用. 本室利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH), 对于表达 HCV 核心蛋白载体转染的 HepG2 细胞进行研究, 结合生物信息学技术(bioinformatics)克隆了 HCV 核心蛋白反式激活作用的新靶基因, 命名为 HCV 核心蛋白反式激活基因 2 (TAHCCP2). 继续应用抑制性消减杂交技术筛选与克隆 TAHCCP2 反式激活的基因, 推测其在体内可能存在功能的线索, 为研究 HCV 的致病机制及探索未知基因的功能提供了新的方向.

## 1 材料和方法

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

### 1.2 方法

1.2.1 消减杂交文库的建立及克隆分析 分别将 pcDNA3.1(-)-core 及 pcDNA3.1(-)空载体转染 HepG2 细胞, 48 h 后提取 mRNA, 按 PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒扩增差异表达的 cDNA. 对于所获基因片段序列分析表明, 其中之一为新型基因片段, 与 GenBank 中注册的已知功能基因序列没有同源性, 利用表达序列标签(EST)序列的搜索和比对, 进行电子拼接, 根据基因起始密码子的 Kozak 规则和终止密码子下游保守的多聚腺苷酸信号序列, 确定新型基因序列. 从 HepG2 细胞提取总 RNA, 以逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术扩增获得该新基因的全长序列, 并测序证实, 命名为 HCV 核心蛋白反式激活基因 2(TAHCCP2), 在 GenBank 中注册, 注册号为 AY039043. TAHCCP2 基因的编码序列全长为 429 个核苷酸(nt), 编码产物由 142 个氨基酸残基(aa)组成.

1.2.2 真核表达载体及细胞转染 TAHCCP2 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 由本室构建. 用 FuGENE6 转染试剂将 2 μg pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞.

1.2.3 细胞 mRNA 提取 使用 mRNA Purification 试剂盒,

直接提取转染了核心表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析.

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

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

1.2.6 克隆鉴定分析 扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 JM109 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 °C 培养 18 h. 挑取白色菌落, 增菌, 以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增, 证明含有插入片段后(100-1 000 bp), 测序(上海申友公司). 应用生物信息学将测得序列 GenBank 数据库进行同源性分析.

## 2 结果

2.1 pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 的表达载体构建 TAHCCP2 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 经测序及酶切鉴定均正确.

2.2 mRNA 的定性定量分析 使用高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提. 紫外分光检测显示, 转染了 pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 4.64 μg 和 4.38 μg, A260/A 280=1.87.

1.0% 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带.

2.2 dscDNA 两端连接效率检测 dscDNA 与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的最关键步骤. 将连接有 adaptor 1 和 adaptor 2 的两组 dscDNA 分别用不同的特异性引物(看家基因甘油三磷酸脱氢酶 G3PDH 引物)进行 28 个循环扩增, 产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定. 结果显示两组 dscDNA 扩增产物浓度相当, 说明 dscDNA 已与接头高效率连接.

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

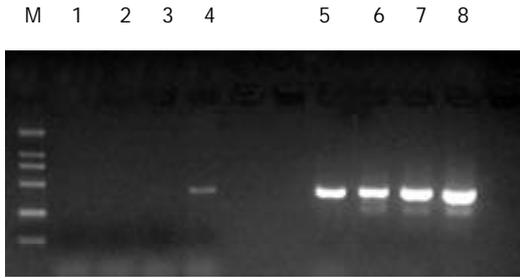


图1 消减效率分析结果. 1-4: 消减组, 引物为G3PDH3', 5', PCR循环次数分别为18、23、28、33; 5-8: 未消减组, 引物为G3PDH3', 5', PCR循环次数分别为18、23、28、33.

2.4 差异表达cDNA片段的扩增及克隆 杂交产物经两轮PCR扩增后, 菌落PCR扩增结果显示为200-1 000 bp大小不等的插入片段, 所获得的70个克隆中几乎均含有插入片段, 这些条带可能代表差异表达的基因片段(图2).

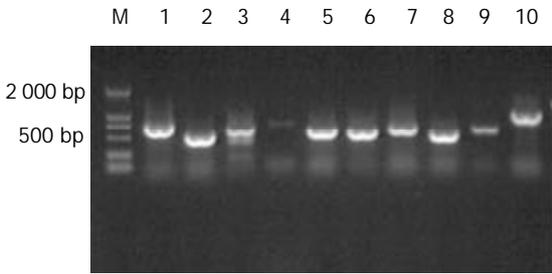


图2 部分克隆菌落PCR鉴定电泳图.

2.5 cDNA测序与同源性分析初步结果 挑选其中32个克隆测序, 与GenBank数据库进行初步比较. 有32个与已知基因的部分序列高度同源(98-100%), 详细结果见表1.

表1 阳性克隆与GenBank同源序列比较结果

同源蛋白名称	同源菌株	同源性
1 核糖体蛋白	5	98-100%
2 线粒体单倍型基因	4	99-100%
3 二氢乙醇脱氢酶	3	99%
4 血栓粘素1	1	98%
5 纤维连接蛋白1	4	99-100%
6 白蛋白	4	99-100%
7 肿瘤排斥抗原1	1	99%
8 结缔组织生长因子3'非翻译区	1	100%
9 前列腺结合蛋白	1	100%
10 硬脂酰辅酶A脱氢酶	1	99%
11 苯丙氨酸羟化酶	1	100%
12 载脂蛋白H	2	100%
13 丝氨酸/苏氨酸激酶19	1	100%
14 真核翻译延长因子1	2	100%
15 包涵素重链多肽	1	99%

3 讨论

HCV核心蛋白是一种多功能蛋白质, 除了作为核壳蛋白具有病毒颗粒组装功能外, 还具有多种调控细胞、

病毒基因表达、细胞生长以及免疫调节等功能. 研究证实核心蛋白也是一种反式激活蛋白, 甚至其作用还要超过X蛋白<sup>[10-11]</sup>. 核心蛋白对细胞信号转导途径, 尤其是核因子-κB (NF-κB)、激活因子1(AP-1)和血浆反应因子(SRE)相关途径具有明显的增强作用<sup>[12]</sup>; 在HepG2细胞中, 核心蛋白激活人c-myc基因、劳氏肉瘤病毒长末端重复序列(RSV-LTR)和SV40早期启动子<sup>[13]</sup>; 核心蛋白还能抑制或增强p53基因启动子功能<sup>[14-15]</sup>, 这些证据表明核心蛋白具有潜在的致癌作用. 近来研究还发现HCV核心蛋白可与细胞内的一些细胞凋亡因子作用, 促进细胞凋亡<sup>[16-20]</sup>. 也有人发现HCV核心蛋白启动CAP-Rf反式激活能力可能是通过复合形式和cDNA编码的DEAD盒家族中推定的RNA解旋酶(CAP-Rf ATP酶)活性调节, 表明HCV已经进化了一种特殊机制, 通过其核壳蛋白涉及RNA代谢<sup>[21]</sup>. Aoki et al<sup>[22]</sup>发现HCV核心蛋白通过和14-3-3蛋白相互作用表现出一种新型的Raf-1激酶激活蛋白特性, 可能对肝细胞的生长起调节作用. HCV核心蛋白的反式激活功能在HCV致病中发挥重要的作用, 研究其作用分子生物学机制有助于理解HCV感染的慢性化和致癌作用机制. 本室利用SSH, 对于表达HCV核心蛋白载体转染的HepG2细胞进行研究, 结合生物信息学技术(bioinformatics)克隆了HCV核心蛋白反式激活作用的新靶基因, 命名为HCV核心蛋白反式激活基因2(TAHCCP2), 并构建其真核表达载体TAHCCP2-cDNA3.1(-). 继续应用SSH技术筛选与克隆TAHCCP2反式激活的基因, 推测其在体内可能存在功能的线索.

SSH方法是近年发展起来的一项新的基因克隆技术, 与传统的方法比较, 具有实验周期短、易操作、可靠性高、假阳性率低等特点, 能有效地分离扩增低丰度特异表达的基因, 可以在较短的时间内获得较理想的实验结果<sup>[23]</sup>. 我们将真核表达载体pcDNA3.1(-)-TAHCCP2, 转染肝母细胞瘤细胞系HepG2, 并以转染空白载体的相同细胞系作为对照, 以2种转染的细胞系中提取的mRNA为起始材料, 应用SSH方法成功地构建了TAHCCP2反式激活相关基因差异表达的cDNA消减文库, 挑选32个克隆测序分析, 结果主要包括(1)细胞内结构与细胞生长相关蛋白, 如线粒体蛋白、核糖体蛋白、包涵素重链多肽为细胞内结构蛋白、血栓粘素1(THBS1)、纤维连接蛋白1(FN1)真核翻译延长因子在细胞生长、分化、黏附中起重要作用. (2)参与细胞内物质代谢的蛋白基因, 如白蛋白在各种物质代谢中起运输作用, 并且是维持血浆胶体渗透压的重要物质. 硬脂酰辅酶A脱氢酶(SCD), 参与体内脂肪的合成过程, 其升高可能会增加体内不饱和脂肪酸的合成. 苯丙氨酸羟化酶(PAH), 催化苯丙氨酸转化成酪氨酸的酶, 他调控苯丙氨酸在体内的分解代谢. 二氢乙醇脱氢酶是肝内多环芳香烃代谢重要的酶, 最近研究发现, 大约40%的HCC患者中表达显著降低. 然而, 在肝肿瘤的边缘区域表达增高, 并且增高的水平与肿瘤的大小和病情的进展相关<sup>[24]</sup>. 还有

人发现其在可检测到的非小细胞肺癌可能是早期而非进展期生化指标<sup>[25]</sup>。在卵巢肿瘤中其表达可诱导对顺铂药物治疗肿瘤的抵抗作用<sup>[26]</sup>。载脂蛋白H在减少甘油三酯, 增加脂蛋白脂肪酶方面有一定作用<sup>[27]</sup>, 对低密度脂蛋白的氧化有类似抗氧化剂的作用, 可以抑制胆固醇从细胞外易位到巨噬细胞内<sup>[28]</sup>。研究还发现其在止血和产生抗磷脂抗体方面有作用<sup>[29]</sup>, 体外可影响巨噬细胞对表面包含磷脂酰丝氨酸颗粒的摄取, 如凋亡的胸腺细胞和单层囊泡一样。介导体内衰老细胞的祛除作用, 所以对细胞凋亡可能有一定作用。(3)与机体免疫功能相关的蛋白基因, 如肿瘤排斥抗原1与体内的抗肿瘤免疫相关。前列腺结合蛋白包括C1、C2、C3三种成分, 形成两种不同的二聚体(C1-C3H和C2-C3), 最近研究表明前列腺类固醇结合蛋白他是一种免疫抑制因子, 可以保护精子免受女性生殖道免疫损伤。丝氨酸/苏氨酸激酶被认为可调节C-fos和p27基因的表达, 并且参与对细胞凋亡的调节, 可以抑制前凋亡蛋白的活性, 抑制T细胞的活性。(4)与肝损伤后纤维化作用密切相关的基因, 如结缔组织生长因子, 在纤维化损伤时表达增加的前纤维化基因分子, 可刺激结缔组织细胞增生, 引起组织纤维化<sup>[1]</sup>, 与肝纤维化相关。他的表达增强可能与丙型肝炎患者肝硬化发病机制有一定关系。

通过对TAHCCP2的上述反式激活基因的分析, 我们发现他与体内物质代谢尤其是脂肪代谢关系较密切, 并且对细胞分化生长与纤维化也有一定关系, 能在病毒感染后肝纤维化方面有一定的作用。另外, 他也可能负性调节体内的某些免疫反应。TAHCCP2是正常人体存在的基因, 在病毒蛋白NS5A的存在下其功能被进一步激活。关于其在体内与各种活性因子的具体调节机制, 仍需进一步实验来验证。

#### 4 参考文献

- 1 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 2 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;16(Suppl):A185
- 3 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- 4 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 5 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆HCV核心蛋白结合蛋白基因1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 6 Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001;59:1271-1276
- 7 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白AI结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 8 成军, 任进余, 李莉, 陆志檬, 李克, 洪源, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. 世界华人消化杂志 2002;10:1022-1026
- 9 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健. 丙型肝炎病毒蛋白与脂蛋白之间的相互作用. 世界华人消化杂志 2002;10:1030-1032
- 10 刘妍, 成军, 陆荫英, 王刚, 牟松, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒X蛋白反式激活基因克隆化研究. 中华肝脏病杂志 2003;11:5-10
- 11 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV核心蛋白与截短型HBV表面抗原中蛋白的协同反式激活功能. 中华肝脏病杂志 2002;10:354-357
- 12 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses:C-virus core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 13 Chang J, Yang SH, Cho YG, Hwang SB, Hahn YS, Sung YC. Hepatitis C virus core from different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J Virol* 1998;72:3060-3065
- 14 Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1997; 272:10983-10986
- 15 Lu W, Lo SY, Chen M, Wu K, Fung YK, Ou JH. Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1999;264:134-141
- 16 Hahn CS, Cho YG, Kang BS, Lester IM, Hahn YS. The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. *Virology* 2000;276:127-137
- 17 Honda A, Hatano M, Kohara M, Arai Y, Hartatik T, Moriyama T, Imawari M, Koike K, Yokosuka O, Shimotohno K, Tokuhisa T. HCV-core protein accelerates recovery from the insensitivity of liver cells to Fas-mediated apoptosis induced by an injection of anti-Fas antibody in mice. *J Hepatol* 2000;33:440-447
- 18 Rubbia-Brandt L, Taylor S, Gindre P, Quadri R, Abid K, Spahr L, Negro F. Lack of in vivo blockade of Fas- and TNFR1-mediated hepatocyte apoptosis by the hepatitis C virus. *J Pathol* 2002;197:617-623
- 19 Farooq M, Kim Y, Im S, Chung E, Hwang S, Sohn M, Kim M, Kim J. Cloning of BNIP3h, a member of proapoptotic BNIP3 family genes. *Exp Mol Med* 2001;33:169-173
- 20 Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:1899-1911
- 21 You LR, Chen CM, Yeh TS, Tsai TY, Mai RT, Lin CH, Lee YH. Hepatitis C virus core protein interacts with cellular putative RNA helicase. *J Virol* 1999;73:2841-2853
- 22 Aoki H, Hayashi J, Moriyama M, Arakawa Y, Hino O. Hepatitis C virus core protein interacts with 14-3-3 protein and activates the kinase Raf-1. *J Virol* 2000;74:1736-1741
- 23 Kuang WW, Thompson DA, Hoch RV, Weigel RJ. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. *Nucleic Acids Res* 1998;26:1116-1123
- 24 Yang MD, Wu CC, Chiou SH, Chiu CF, Lin TY, Chiang IP, Chow KC. Reduction of dihydrodiol dehydrogenase expression in resected hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2003;10:271-276
- 25 Chen CY, Hsu CP, Hsu NY, Shih CS, Lin TY, Chow KC. Expression of dihydrodiol dehydrogenase in the resected stage I non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2002;9:515-519
- 26 Deng HB, Parekh HK, Chow KC, Simpkins H. Increased expression of dihydrodiol dehydrogenase induces resistance to cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002; 277:15035-15043
- 27 Takada D, Ezura Y, Ono S, Iino Y, Katayama Y, Xin Y, Wu LL, Larringa-Shum S, Stephenson SH, Hunt SC, Hopkins PN, Emi M. Apolipoprotein H variant modifies plasma triglyceride phenotype in familial hypercholesterolemia:a molecular study in an eight-generation hyperlipidemic family. *J Atheroscler Thromb* 2003;10:79-84
- 28 Lin KY, Pan JP, Yang DL, Huang KT, Chang MS, Ding PY, Chiang AN. Evidence for inhibition of low density lipoprotein oxidation and cholesterol accumulation by apolipoprotein H (beta2-glycoprotein I). *Life Sci* 2001;69:707-719
- 29 Mehdi H, Manzi S, Desai P, Chen Q, Nestlerode C, Bontempo F, Strom SC, Zarnegar R, Kamboh MI. A functional polymorphism at the transcriptional initiation site in beta2-glycoprotein I (apolipoprotein H) as associated with reduced gene expression and lower plasma levels of beta2-glycoprotein I. *Eur J Biochem* 2003;270:230-238

# 基因表达谱芯片筛选NS5A TP3转染细胞差异表达基因

刘妍, 杨倩, 成军, 王建军, 纪冬, 党晓燕, 王春花

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

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

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

## Screening of genes differentially expressed in HepG2 cells transfected with gene 3 transactivated by hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5ATP3) using cDNA microarray

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

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

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn  
Received: 2003-07-12 Accepted: 2003-08-16

## Abstract

**AIM:** NS5ATP3 obtained from suppression subtractive hybridization screening is a novel gene transactivated by nonstructural protein 5A (NS5A) of hepatitis C virus (HCV), which possesses unknown function. To study the difference in gene expression in human hepatoblastoma cell line HepG2 cells transfected with NS5ATP3-expressing plasmid and further elucidate its potential molecular biological function, we compared the differentially expressed genes between the HepG2 transfected by pcDNA3.1(-)-NS5ATP3 and pcDNA3.1(-), respectively by cDNA microarray technique.

**METHODS:** Sequence specific primers were designed and synthesized and the NS5ATP3 DNA fragment was amplified with polymerase chain reaction (PCR) technique. The expressive vector of pcDNA3.1(-)-NS5ATP3 was constructed by routine molecular biological methods. cDNA microarray technology was employed to detect the mRNA from the HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-)-NS5ATP3 and pcDNA3.1(-), respectively using lipofectamine.

**RESULTS:** The expressive vector has been constructed and

confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing analysis. High quality mRNA and cDNA were prepared and successful microarray screening was conducted. The scanning results indicated that among 1 152 genes which were gotten from gene expression profile analysis, there were 21 differences in which 6 genes were up-regulated and 18 genes were down-regulated in NS5ATP3-expressing HepG2 cells. These genes differentially regulated by NS5ATP3 included human genes encoding proteins involved in cell signal transduction, cell apoptosis, cell proliferation and differentiation.

**CONCLUSION:** cDNA microarray technology is successfully used to screen the genes differentially expressed in NS5ATP3-expressing HepG2 cells, which brings some new clues for studying the potential molecular mechanism of NS5ATP3 protein.

Liu Y, Yang Q, Cheng J, Wang JJ, Ji D, Dang XY, Wang CH. Screening of genes differentially expressed in HepG2 cells transfected with gene 3 transactivated by hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5ATP3) using cDNA microarray. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):306-310

## 摘要

**目的:** 应用基因芯片技术, 检测丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白5A(NS5A)反式激活基因NS5ATP3的表达对肝母细胞瘤细胞HepG2基因表达谱的影响, 进一步阐明NS5ATP3蛋白可能的分子生物学功能。

**方法:** 设计并合成NS5ATP3基因序列特异性的引物, 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增NS5ATP3蛋白编码基因片段, 以常规的分子生物学技术将获得的NS5ATP3编码基因片段克隆到TA载体中进行核苷酸序列的测定, 构建真核表达载体pcDNA3.1(-)-NS5ATP3。以脂质体转染肝母细胞瘤细胞系HepG2, 提取mRNA, 逆转录为cDNA, 与转染空白表达载体pcDNA3.1(-)的HepG2细胞进行cDNA芯片分析。

**结果:** 构建的表达载体经过限制性内切酶分析和DNA序列测定, 证实准确无误。提取高质量的mRNA, 逆转录为cDNA, 进行DNA芯片技术分析。在1 152个基因表达谱的筛选中, 发现有6个基因表达水平显著上调, 18个基因表达水平显著下调。

**结论:** 应用基因表达谱芯片技术成功筛选了NS5ATP3转染细胞后差异表达基因, 为进一步阐明NS5ATP3蛋白可能的生物学功能提供依据。

刘妍, 杨倩, 成军, 王建军, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 基因表达谱芯片筛选NS5ATP3转染细胞差异表达基因. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):306-310  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/306.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)感染, 与肝纤维化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发生发展过程密切相关, 而病毒基因组编码的蛋白与宿主肝细胞蛋白之间的相互作用, 可能是HCV致病(癌)的重要分子机制. 研究发现, HCV非结构蛋白5A(HCV NS5A)基因(位于6 258-7 601 nt之间)编码的56 kD的NS5A蛋白(448 aa)除了参与HCV多蛋白的成熟和RNA的复制过程外, 还具有多种生物学功能. 不同磷酸化形式的NS5A蛋白具有反式激活作用更是目前关于NS5A生物学功能研究的热点, NS5A蛋白是一种作用很强的转录激活因子, 能够影响细胞信号转导途径, 激活多种病毒及细胞基因启动子, 调控着细胞基因的转录, 推测NS5A蛋白的这种反式激活作用, 可能是HCV感染与肝细胞癌发生发展密切相关的重要分子生物学机制<sup>[1-3]</sup>. 本室在利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)筛选NS5A蛋白反式激活作用的部分靶基因时, 结合生物信息学技术(bioinformatics)克隆了NS5A蛋白反式激活作用的新靶基因, 即HCV NS5A蛋白反式激活基因3(NS5ATP3), 该新基因的开放读码框架(ORF)长度为1 572个核苷酸(nt), 编码产物由524个氨基酸残基(aa)组成<sup>[4-6]</sup>.

为了探索NS5ATP3的生物学功能, 深入了解HCV NS5A蛋白的反式激活作用, 我们构建了NS5ATP3基因真核表达载体, 应用基因表达谱芯片技术, 筛选NS5ATP3基因转染细胞后差异表达的基因, 检测NS5ATP3蛋白的表达对肝细胞基因表达谱的影响, 推测其在体内可能存在功能的线索, 为研究HCV的致病机制及探索未知基因的功能提供了新的方向.

## 1 材料和方法

1.1 材料 肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞由本室保存, 细胞培养相关试剂、总 RNA 提取试剂 Trizol 及真核表达载体 pcDNA3.1(-) 均购自 Invitrogen 公司. 人类基因组分类 I 芯片包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、细胞信号转导相关基因等 1 152 个 cDNA, 由上海联合基因有限公司提供. mRNA 纯化试剂 Oligotex mRNA Midi Kit 购自 Qiagen 公司.

### 1.2 方法

1.2.1 真核表达载体构建及细胞转染 设计并合成 NS5ATP3 基因序列特异性引物, 上下游引物序列分别为: 5' - GAA TTC ATG GTG CCG CCA CGA CGC CAT C-3', 5' - GGA TCC CTA ACT AGC TCC ATC CTC CTG-3' 下划线部分为引物两端的酶切位点, EcoRI 和 BamHI. 以转染了 HCV NS5A 表达载体的 HepG2 细胞 cDNA 作为模板, 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增 NS5ATP3 的全长编码基因. 先克隆到 TA 载体中进行序列测定, 然后再亚克隆到真核表达载体 pcDNA3.1(-) 中, 构建真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5ATP3. 在 35 mm 培养皿中常规培养 HepG2 细胞, 细胞生长至对数期时, 分别以脂质

体转染试剂 Lipofectamine PLUS 将 2  $\mu$ g pcDNA3.1(-)-NS5ATP3 和空载体 pcDNA3.1(-) 转染 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞, 每  $5 \times 10^6$  个细胞加入 1 ml Trizol 试剂. 立即于液氮中保存.

1.2.2 总 RNA 提取及 mRNA 纯化 使用 Trizol 试剂一步法提取转染 pcDNA3.1(-)-NS5ATP3 和空载体 pcDNA3.1(-) 的细胞 HepG2 总 RNA (分别标记为实验组和对照组), 样品经分光光度计检测吸光度 A 值, 并行热稳定实验, 于 -20  $^{\circ}$ C 和 70  $^{\circ}$ C 保温 1 h 后, 经琼脂糖凝胶电泳检测 28 S、18 S 条带变化. 纯化 mRNA 并行电泳检测.

1.2.3 探针标记及芯片制备 常规方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA (5  $\mu$ g), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA (5  $\mu$ g). 乙醇沉淀后溶解在 20  $\mu$ L 5  $\times$  SSC+0.2% SDS 杂交液中. 芯片包含的 1 152 个 cDNA 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000-3 000 bp. 靶基因以 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L 溶解于 3  $\times$  SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(0.5 h), UV 交联, 再分别用 0.2% SDS、水及 0.2% 的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用.

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

1.2.5 检测与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点)对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene 3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3 > 1.9, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3 < 0.6, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

## 2 结果

2.1 NS5ATP3 蛋白真核表达载体的构建 真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5ATP3 经过限制性内切酶作图分析和核苷酸序列的测定, 证实含有完整的开放读码框架, 序列准确无误<sup>[6]</sup>.

2.2 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 实验组和对照组总 RNA 的吸光度比值 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 分别为 1.998 和 2.014, 热稳定实验 70  $^{\circ}$ C 保温 1 h 与 -20  $^{\circ}$ C 1 h 电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA (图 1). mRNA 主要集中于 0.9-4.0 kb 的连续条带.

2.3 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有 1 152 个 cDNA. 为了监控芯片杂交技术体系的整个过程, 在芯片上设置了阴性对照(8 条水稻基因, 共 8 个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记 Cy5 荧光素(呈红色), 对照组探针标记 Cy3 荧光素(呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在

实验组和对照组中基因表达水平上的差异,黄色代表表达水平无差异.按阳性标准,从1 152个基因中筛选出差异表达基因共24条,其中6条基因表达增强,18条基因表达降低.

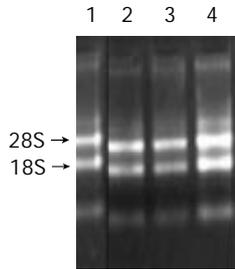


图1 总RNA 1%琼脂糖凝胶电泳. 1, 2: 对照组; 3, 4: 实验组.

2.4 差异表达基因分析 NS5ATP3上调基因类型:在基因芯片的扫描分析中,如果荧光染料的Cy5/Cy3比值在1.900以上,就判断为NS5ATP3的上调基因.在本研究中发现有6种基因的表达水平上调(表1).

NS5ATP3下调基因类型:在基因芯片的扫描分析中,如果荧光染料的Cy5/Cy3比值在0.500以下,就判断为NS5ATP3的下调基因.在本研究中发现有18种基因的表达水平下调(表2).

表1 部分表达显著增强的基因

序号	GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_013230	小细胞肺癌相关抗原 CD24	1.955
2	D50683	转化生长因子 $\beta$ II 受体 $\alpha$	1.983
3	L04569	L型电压依赖的钙离子通道 $\alpha$ 1 亚单位 hHT	1.991
4	NM_004661	细胞周期分裂蛋白 CDC23	2.068
5	NM_002736	cAMP 依赖的蛋白激酶调节亚单位 II $\beta$ PRKAR2B	2.073
6	AF012086	Ran 结合蛋白 RanBP2 $\alpha$	2.183

表2 部分表达显著降低的基因

序号	GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	AL117234	定位于 X 染色体上的新基因	0.147
2	NM_003034	唾液转移酶 8A	0.240
3	NM_014337	肽基辅氨酰异构 PP1L2	0.280
4	NM_001764	CD1B 抗原 $\beta$ 多肽	0.307
5	NM_002982	小的可诱导细胞因子 A2	0.326
6	NM_022110	FK506 结合蛋白样蛋白	0.355
7	NM_007177	TU3A 蛋白	0.355
8	NM_000844	谷氨酸酯受体	0.358
9	NM_014451	甲状旁腺激素应答的骨肉瘤 B1 蛋白	0.361
10	NM_000851	谷胱甘肽 S 转移酶	0.371
11	NM_001775	CD38 抗原	0.374
12	NM_001648	前列腺特异性抗原	0.376
13	NM_003254	金属蛋白酶 1 组织抑制因子	0.395
14	BC004309	RAS 癌基因家族成员 RAB4	0.414
15	NM_000732	CD3D 抗原 $\delta$ 多肽	0.414
16	NM_014020	LR8 蛋白	0.434
17	NM_002183	白介素 3 受体 $\alpha$ IL3RA	0.447
18	NM_000609	基质细胞来源因子 1	0.493

### 3 讨论

HCV 基因组含有单一的开放读码框架,编码3 010-3 033个氨基酸残基的多蛋白肽前体,两侧是5' - 非翻译区及3' - 非翻译区,多肽前体至少被加工为10种结构蛋白和非结构蛋白<sup>[7-9]</sup>.临床和实验研究显示,HCV 核心蛋白、非结构蛋白3(NS3)具有多种调控细胞、病毒基因表达、细胞生长以及免疫调节等功能,分别在HCV 感染及致肝细胞癌(HCC)发生发展过程中扮演重要的角色<sup>[10-11]</sup>.非结构蛋白5A(NS5A)蛋白也不例外<sup>[4-5]</sup>.HCV NS5A 位于HCV 多蛋白的羧基末端,是丝氨酸磷酸化蛋白质,依磷酸化程度的不同而产生两种不同分子量大小的多肽 p56 和 p58.由于NS5A表现出对抗干扰素  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) 的治疗效应而引起人们广泛的关注,NS5A 能够与肝细胞中的 IFN $\alpha$  刺激蛋白 - 双链 RNA 依赖的激酶 (PKR) 相互作用,抑制 PKR 的功能,从而下调 IFN $\alpha$  刺激的抗病毒效应<sup>[12-13]</sup>.近年研究发现,NS5A 是转录反式激活因子,其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸,这是真核细胞转录因子特有的结构特征.但是其参与细胞转录调节的机制仍不十分清楚.一般来说,转录的反式激活因子是在细胞核中起作用的,而NS5A 定位于细胞内质网(ER),因此推测NS5A 必定参与了细胞信号传导途径.NS5A 能够反式激活核转录因子 NF- $\kappa$ B 及 STAT3,在细胞炎症反应、肿瘤发生及转移过程中起重要作用<sup>[14]</sup>. Ghosh et al <sup>[15]</sup> 研究发现,NS5A 蛋白能够抑制细胞周期调节基因 p21WAF1,激活人肝癌细胞中增生的细胞核抗原基因(PCNA),从而调节细胞凋亡,促进细胞增生.NS5A cDNA 能够使转染的小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 具有转化特性,且转化细胞移植入裸鼠体内可形成纤维肉瘤灶,这一证据直接证明了HCV NS5A 蛋白的恶性转化潜能.可见,HCV 非结构蛋白NS5A 的反式激活功能在HCV 致病中发挥了重要作用,那么,肝细胞内表达的NS5A 蛋白,究竟激活了哪些特定基因的表达?这些表达产物对细胞的损害、增生分化的作用如何?

基于上述研究目的,我们采用抑制性消减杂交方法,成功筛选并克隆了HCV 非结构蛋白NS5A 基因转染细胞反式激活基因cDNA 文库,对挑选的克隆进行分析发现其中一个新基因与GenBank 中注册的已知功能基因序列没有同源.电子拼接推定该基因的开放读码框架,获得相应的全长编码基因,将该未知功能基因命名为NS5ATP3.根据这一序列设计引物,以人肝癌细胞cDNA 为模板,PCR 反应扩增NS5ATP3 基因序列.反应产物经测序完全符合计算机分析结果,这表明我们已顺利得到了NS5ATP3 编码序列.NS5ATP3 的ORF 长度为1 572 bp,编码524 个氨基酸残基的蛋白,然而NS5ATP3 基因的生物学功能及其在丙型肝炎发病机制中的作用目前还不清楚,为进一步研究NS5ATP3 的生物学功能,我们利用基因芯片技术对其上调、下调基因进行分析<sup>[16-18]</sup>.结果表明,6 种基因的表达水平上调,18 种基因的表达水平下调.这些基因包括细胞生长、

细胞凋亡、信号转导、免疫调节、肿瘤发生等基因。

分析表达增强的基因, B 淋巴细胞表面的分化抗原 CD24 是 B 细胞表面的信号转导分子, 能够调节多种信号活化的应答, 能诱导 B 淋巴细胞凋亡, 下游信号分子是丝裂素活化的蛋白激酶有丝分裂原激活蛋白基酶 (MAPK) 的激活以及细胞外信号调节的激酶 1 (ERK1) 的活化。研究还发现, CD24 抗原是肝细胞癌细胞中高度表达的基因, 与 p53 基因突变及肿瘤分化高度相关, CD24 抗原是潜在的肝细胞肿瘤早期标志基因<sup>[19-20]</sup>。细胞分裂周期蛋白 CDC23 与酿酒酵母的 CDC23 高度同源, 是促进细胞分裂后期复合物 (anaphase-promoting complex, APC) 的成员, 对于细胞周期由 G2 期向 M 期过渡是必不可少的, APC 能够催化细胞周期蛋白 B 与泛素 (cyclin B-ubiquitin) 形成共轭复合物, 在泛素介导的细胞周期蛋白 B 的蛋白水解过程中起重要作用, 推测 NS5ATP3 通过上调 CDC23 的表达对细胞周期有调控作用<sup>[21]</sup>。L 型电压依赖的钙离子通道是细胞电信号转导途径中重要的调节因子<sup>[22]</sup>, cAMP 依赖的蛋白激酶调节亚单位 II $\beta$ PRKAR2B 是参与细胞信号转导途径主要因子<sup>[23]</sup>。Ran 是真核细胞核运输过程中必需的小 GTP 酶, 在细胞 mRNA 加工, 细胞周期调节等方面发挥作用, Ran 结合蛋白 2 即 RanBP2 是核孔蛋白, 在细胞核浆物质转运过程中起重要作用<sup>[24]</sup>, NS5ATP3 通过上调上述基因的表达, 提示该蛋白可能对细胞信号传递途径及核内外物质运输等过程有正调控作用, 而促进某些与细胞转录调节密切相关的基因, 如癌基因的转录, 在 HCV 感染过程中发挥一定的作用。

分析表达降低的基因, 胸腺细胞抗原 CD1B 是参与胸腺细胞分化以及抗原递呈的非专职递呈抗原, 能够向 T 细胞递呈各种不同的短链糖脂类抗原, 而树突状细胞 (DC) 递呈的是长链糖脂类抗原<sup>[25-26]</sup>。TU3A 是编码 144 个氨基酸残基的肿瘤抑制因子, 在肾细胞肿瘤中该基因的表达下调, 并发现广泛存在的缺失突变, 该基因是否在其他肿瘤如肝细胞肿瘤中也具有同样的生物行为有待于进一步研究<sup>[27-28]</sup>。甲状旁腺激素 (PTH) 应答的骨肉瘤 B1 蛋白是 PTH 刺激下调的造骨细胞功能形成过程中表达的一个新蛋白, 在骨形成时参与甲状旁腺激素的调节<sup>[29]</sup>。谷胱甘肽 S 转移酶 M5 属于 mu 类, 具有对亲电子化合物的解毒功能, 包括致癌物质、治疗药物、环境毒素和氧化应激产物等有害物质通过与谷胱甘肽结合而发挥其解毒功效, 该基因的变异可以改变个体对致癌物质和毒物的易感性, 同时也影响某些药物的毒性和药效<sup>[30]</sup>。CD38 蛋白是广泛表达于各种细胞和组织尤其是白细胞的一种多功能的胞外酶, 参与细胞黏附、信号转导和钙信号传递等生物过程<sup>[31]</sup>。CD3D 抗原  $\delta$  多肽是与 T 淋巴细胞表面的抗原受体结合的小完整膜蛋白, 能将活化信号转移到细胞内, 参与免疫信息的传递<sup>[32-33]</sup>。LR8 蛋白是应用差异显示方法从肺纤维细胞克隆的未知功能蛋白<sup>[34]</sup>。已知趋化因子是一类与靶细胞表面特异性受

体结合而活化并介导白细胞迁移的蛋白, 依据半胱氨酸残基的位置不同而分为 4 类: C、CC、CXC 和 CX3C。而 CXCR4 受体的配体 - 基质细胞来源因子 SDF1 是直接激活并介导白细胞迁移的趋化因子, 又称为 CXC 趋化因子, 是免疫缺陷病毒 HIV-1 入侵 T 细胞的辅助受体分子, 是通过 G 蛋白耦连的 7 个跨膜受体而行使淋巴细胞趋化效应, 同时这 7 个跨膜受体也是免疫缺陷病毒 HIV-1 入侵 T 细胞的辅因子。SDF1 是 HIV-1 入侵细胞的辅因子 LESTR 的生物配体, 能够激活细胞内游离钙, 抑制 HIV-1 病毒感染 T 细胞<sup>[35-36]</sup>。NS5ATP3 通过下调上述基因的表达水平, 推测其在调节细胞免疫应答、信号转导及物质代谢等方面具有一定作用。

总之, 利用基因表达谱芯片分析了 NS5ATP3 蛋白对肝细胞基因表达谱的影响, NS5ATP3 蛋白能够上调或下调 HepG2 细胞中许多不同基因表达的变化, 这些基因变化是复杂的, 有的甚至是矛盾的, 这些基因与细胞信号转导、细胞增生与分化、免疫应答、物质运输、细胞凋亡等生物过程密切相关。本实验结果对于初步了解新基因 NS5ATP3 在肝细胞中的生物学效应提供某些线索, 当然, 还需要进一步的实验加以深入研究。

#### 4 参考文献

- Neddermann P, Clementi A, De Francesco R. Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polyprotein. *J Virol* 1999;73:9984-9991
- Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol* 2001;313:451-464
- Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 刘妍, 段惠娟, 成军, 王建军, 陆荫英, 牟劲松, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. *军医进修学院学报* 2003;24:81-83
- 刘妍, 陆荫英, 成军, 王建军, 李莉, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因的克隆化研究. *解放军医学杂志* 2003;28:40-43
- 刘妍, 杨倩, 成军, 王建军, 纪冬, 王春花, 党小燕, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因 NS5ATP3 的克隆化研究. *解放军医学杂志* 2004;(待发表)
- Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 2001;55:133-159
- De Francesco R. Molecular virology of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999;31(Suppl 1):47-53
- Kim JE, Song WK, Chung KM, Back SH, Jang SK. Subcellular localization of hepatitis C viral proteins in mammalian cells. *Arch Virol* 1999;144:329-343
- 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 董菁, 洪源, 张跃新, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. *解放军医学杂志* 2001;26:880-883
- 刘妍, 成军, 牟劲松, 陆荫英, 王建军, 李克, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. *解放军医学杂志* 2003;28:44-46
- Koch JO, Bartenschlager R. Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J Virol* 1999;73:7138-7146
- Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001;59:1271-1276

- 14 Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
- 15 Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80(Pt 5):1179-1183
- 16 Lakhani SR, Ashworth A. Microarray and histopathological analysis of tumours: the future and the past? *Nat Rev Cancer* 2001;1:151-157
- 17 Kaminski S. DNA microarrays-a methodological breakthrough in genetics. *J Appl Genet* 2002;43:123-130
- 18 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:461-463
- 19 Kay R, Rosten PM, Humphries RK. CD24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor. *J Immunol* 1991;147:1412-1426
- 20 Huang LR, Hsu HC. Cloning and expression of CD24 gene in human hepatocellular carcinoma: a potential early tumor marker gene correlates with p53 mutation and tumor differentiation. *Cancer Res* 1995;55:4717-4721
- 21 Zhao N, Lai F, Fernald AA, Eisenbart JD, Espinosa R, Wang PW, Le Beau MM. Human CDC23: cDNA cloning, mapping to 5q31, genomic structure, and evaluation as a candidate tumor suppressor gene in myeloid leukemias. *Genomics* 1998;53:184-190
- 22 Schultz D, Mikala G, Yatani A, Engle DB, Iles DE, Segers B, Sinke RJ, Weghuis DO, Klockner U, Wakamori M. Clonal expression of the alpha 1 subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel from normal human heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6228-6232
- 23 Solberg R, Sistonen P, Traskelin AL, Berube D, Simard J, Krajci P, Jahnsen T, de la Chapelle A. Mapping of the regulatory subunits RI beta and RII beta of cAMP-dependent protein kinase genes on human chromosome 7. *Genomics* 1992;14:63-69
- 24 Nothwang HG, Rensing C, Kubler M, Denich D, Brandl B, Stubanus M, Haaf T, Kurnit D, Hildebrandt F. Identification of a novel Ran binding protein 2 related gene (RANBP2L1) and detection of a gene cluster on human chromosome 2q11-q12. *Genomics* 1998;47:383-392
- 25 Moody DB, Briken V, Cheng TY, Roura-Mir C, Guy MR, Geho DH, Tykocinski ML, Besra GS, Porcelli SA. Lipid length controls antigen entry into endosomal and nonendosomal pathways for CD1b presentation. *Nat Immunol* 2002;3:435-442
- 26 Sugita M, Cao X, Watts GF, Rogers RA, Bonifacio JS, Brenner MB. Failure of trafficking and antigen presentation by CD1 in AP-3-deficient cells. *Immunity* 2002;16:697-706
- 27 Wang L, Darling J, Zhang JS, Liu W, Qian J, Bostwick D, Hartmann L, Jenkins R, Bardenhauer W, Schutte J, Opalka B, Smith DI. Loss of expression of the DRR 1 gene at chromosomal segment 3p21.1 in renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;27:1-10
- 28 Yamato T, Orikasa K, Fukushige S, Orikasa S, Horii A. Isolation and characterization of the novel gene, TU3A, in a commonly deleted region on 3p14.3-->p14.2 in renal cell carcinoma. *Cytogenet Cell Genet* 1999;87:291-295
- 29 Adams AE, Rosenblatt M, Suva LJ. Identification of a novel parathyroid hormone-responsive gene in human osteoblastic cells. *Bone* 1999;24:305-313
- 30 Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J Biol Chem* 1998;273:3517-3527
- 31 Munshi CB, Graeff R, Lee HC. Evidence for a causal role of CD38 expression in granulocytic differentiation of human HL-60 cells. *J Biol Chem* 2002;277:49453-49458
- 32 Gold DP, Clevers H, Alarcon B, Dunlap S, Novotny J, Williams AF, Terhorst C. Evolutionary relationship between the T3 chains of the T-cell receptor complex and the immunoglobulin supergene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7649-7653
- 33 Kastrup J, Pedersen LO, Dietrich J, Lauritsen JP, Menne C, Geisler C. In vitro production and characterization of partly assembled human CD3 complexes. *Scand J Immunol* 2002;56: 436-442
- 34 Lurton J, Rose TM, Raghu G, Narayanan AS. Isolation of a gene product expressed by a subpopulation of human lung fibroblasts by differential display. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:327-331
- 35 Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996;382:829-833
- 36 Barbero S, Bajetto A, Bonavia R, Porcile C, Piccioli P, Pirani P, Ravetti JL, Zona G, Spaziant R, Florio T, Schettini G. Expression of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1 in human brain tumors and their involvement in glial proliferation in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 2002;973:60-69

## World Journal of Gastroenterology 栏目设置

《World Journal of Gastroenterology, WJG》主要开设以下栏目。(1)文献综述: 基于作者自己研究为主的综述性论文。(2)特色栏目 如食管癌、胃癌、肝癌、病毒性肝炎、中医中药、中西医结合等, 具有我国特色及国际领先水平的原创性研究论文。(3)基础研究 报道学术价值高、实验数据完整、具有原始性和创新性的研究成果。(4)临床研究 报道安全性和有效性的随机、双盲双模拟、多中心平行对照临床试验的临床研究论文。(5)研究快报 报道具有原始性和创新性的阶段性成果。(6)病例报告: 报道对临床工作者有指导意义的个案。

# 基因表达谱芯片技术筛选NS5A - TP4蛋白反式调节基因

杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 洪源, 张树林

杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 洪源, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市100039  
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061  
杨倩, 女, 1970-11-06, 广西桂平人, 汉族. 1994年西安医科大学本科毕业, 1999年西安医科大学硕士毕业, 目前为西安交通大学第一医院博士研究生, 主要从事传染病临床与基础研究工作.  
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

## Screening and identification of genes transactivated by NS5A-TP4 protein by cDNA microarray assay

Qian Yang, Jun Cheng, Yan Liu, Jian-Jun Wang, Yuan Hong, Shu-Lin Zhang

Qian Yang, Jun Cheng, Yan Liu, Jian-Jun Wang, Yuan Hong, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China  
Shu-Lin Zhang, Xi'an Jiaotong University First Hospital, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China  
Supported by the National Natural Science Foundation No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA. No. 98H038  
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn  
Received: 2003-07-12 Accepted: 2003-08-16

## Abstract

**AIM:** To study the molecular mechanism of NS5A-TP4 in the up- and down-regulated genes of hepatocyte by cDNA microarray assay.

**METHODS:** HepG2 cells were transfected by recombinant expression plasmid pcDNA3.1(-)-NS5A-TP4. Total RNA was isolated from the transfected HepG2 cells with pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1(-)-NS5A-TP4, respectively. cDNA was prepared by reverse transcription. cDNA microarray was conducted for screening of up- and down-regulated genes of both HepG2 cells.

**RESULTS:** After screening with cDNA microarray, we found that 12 genes were up-regulated, and 6 genes down-regulated. Some of them were involved in cell signal transduction, cell proliferation, and carcinogenesis.

**CONCLUSION:** cDNA microarray is an important choice for the analysis of target genes of NS5A-TP4 transactivation. The obtained sequences bring some new clues for studying the

biological functions of NS5A-TP4 and infection mechanism of HCV.

Yang Q, Cheng J, Liu Y, Wang JJ, Hong Y, Zhang SL. Screening and identification of genes transactivated by NS5A-TP4 protein by cDNA microarray assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):311-314

## 摘要

**目的:** 对新基因NS5A - TP4转染肝癌细胞的基因表达谱进行分析, 探索该基因表达对肝细胞基因表达的调节机制及其生物学功能.

**方法:** 应用生物信息学(bioinformatics)技术, 分析我室通过抑制性消减杂交技术筛选得到的新基因NS5A - TP4的全长编码序列, 并NS5A - TP4构建基因的真核表达载体pcDNA3.1(-)-NS5A - TP4. 应用基因表达谱芯片技术对重组表达质粒pcDNA3.1(-)-NS5A - TP4转染的HepG2细胞和空载体处理的相同细胞差异表达的mRNA进行检测.

**结果:** 确定基因NS5A - TP4由762 nt组成, 编码253 aa的蛋白. 基因表达谱芯片所检测的1152条目的基因均为GenBank中登录的基因, NS5A - TP4表达质粒转染的细胞有18条差异表达基因, 其中12条基因表达增强, 6条基因表达降低. 这些差异表达的基因与细胞信号转导、凋亡、生长调节密切相关.

**结论:** 基因表达谱芯片技术可为初步探索新基因的功能提供重要的资料. 本实验结果为进一步阐明NS5A - TP4生物学功能及HCV - NS5A的致病机制提供了理论依据.

杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 洪源, 张树林. 基因表达谱芯片技术筛选NS5A - TP4蛋白反式调节基因. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):311-314  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/311.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是含外膜蛋白的单股正链RNA病毒, 属黄病毒科肝炎病毒类. 在大多数感染人群中丙型肝炎病毒表现为持续性感染, 并可导致慢性肝炎、肝硬化, 或肝癌. HCV基因组包括5'非编码区, 一个长约9400 bp的单一开放阅读框(open reading frame, ORF)和3'非编码区(3' non-encode region, 3' - NCR), 其中ORF包括结构区(structural region)和非结构区(nonstructural region), 在非结构基因区中有NS2, NS3, NS4A, NS5A和NS5B区等<sup>[1-2]</sup>. 近年来, HCV NS5A区的结构与功能倍受关注, 研究者发现在NS5A蛋白2209-2248 aa间存在一个与干扰素治疗效果紧密相关的

区域,称为“干扰素敏感决定区(interferon sensitivity determining region, ISDR)”。他们认为 ISDR 氨基酸序列的变异与 IFN 的应答率直接相关。在体外实验中证实 NS5A 对于 HCV 体外复制有重要作用,更为重要的是 NS5A 对细胞周期及细胞生长具有调节作用,可能与慢性肝炎、肝细胞癌的发生发展有着密切的关系<sup>[3-5]</sup>。我室利用 SSH 技术,对于 NS5A 表达载体转染的肝母细胞瘤细胞系 HepG2 的基因表达谱变化进行比较研究,发现了 NS5A 蛋白可上调一些基因的表达。其中包括未知功能基因,命名为 NS5ATP4<sup>[6-7]</sup>。为了从不同的角度对 NS5A 的反式调节基因进行验证及研究,我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)对 NS5ATP4 反式调节的靶基因进行了筛选,为今后更加广泛深入地研究新基因 NS5ATP4 功能及 NS5A 的反式调节作用打下了基础。

## 1 材料和方法

1.1 材料 人肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞由本室保存,细胞培养相关试剂及总 RNA 提取试剂 Trizol 均购自 Gibco 公司,脂质体转染试剂 FuGENE6 购自罗氏公司,NS5ATP4 真核表达质粒由本室构建。

### 1.2 方法

1.2.1 SSH 筛选 HCV-NS5A 差异性显示 cDNA 文库,具体方法、操作参考文献[8]。

1.2.2 细胞培养及取材 NS5ATP4 真核表达质粒由本室构建。在 35 mm 培养皿中常规培养 HepG2 细胞,细胞生长至对数期时,分别以脂质体转染试剂 FuGENE6 将 2 μg pcDNA3.1(-)-NS5ATP4 和空载体 pcDNA3.1(-) 转染 HepG2 细胞,48 h 后收获细胞,每 5×10<sup>6</sup> 个细胞加入 1 mL Trizol 试剂,立即于液氮中保存<sup>[9-11]</sup>。

1.2.3 总 RNA 提取 使用 Trizol 试剂一步法提取 pcDNA 3.1(-)-NS5ATP4 和空载体 pcDNA3.1(-) 转染的 HepG2 细胞总 RNA(分别标记为实验组和对照组),样品经分光光度计检测吸光度 A 值,并行热稳定实验,于 -20 °C 和 70 °C 保温 1 h 后,经琼脂糖凝胶电泳检测 28 S、18 S 条带变化。

1.2.4 探针标记 参照 Schena et al<sup>[27]</sup> 方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化。Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA(5 μg),Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA(5 μg)。乙醇沉淀后溶解在 20 μL 5×SSC+0.2% SDS 杂交液中。

1.2.5 芯片制备 芯片包含的 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供,包括原癌基因、抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等。以通用引物进行 PCR 扩增,PCR 产物长度为 1 000 bp-3 000 bp。靶基因以 0.5 μg/μL 溶解于 3×SSC 溶液中,用 Cartesian 公司的 Cartesian 7500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样。玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min),紫外线交联,再分别用 0.2% SDS、水及 0.2% 的硼氢化钠溶液处理 10 min,晾干备用。

1.2.6 预杂交 将预杂交液放入 95 °C 水浴锅内变性 2 min,

将待预杂交的芯片放入 95 °C 水浴锅内变性 30 s,芯片取出后即放入无水乙醇中 30 s,晾干。将已变性的预杂交液加到芯片的点样区域内,盖上盖玻片,放入杂交箱内 42 °C 预杂交 5-6 h。

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

1.2.8 扫描与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3000 扫描芯片。用预先选定的内参照基因(24 条管家基因,每个基因点 2 个点,共 48 个点)对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正。用 ImaGene3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度,计算 Cy5/Cy3 比值。阳性结果判断: Cy5/Cy3>2.0,红色荧光,显示表达增强; Cy5/Cy3<0.5,为绿色荧光,显示表达减弱。

## 2 结果

2.1 以我室通过 SSH 筛选得到的 HCV-NS5A 差异性显示 cDNA 文库为基础,将其中一个新基因命名为 NS5ATP4,电子推定其编码的氨基酸序列,以人肝癌细胞 cDNA 为模板,对 NS5ATP4 进行了克隆化研究,得到了 NS5ATP4 的编码的氨基酸序列。

2.2 总 RNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>>1.92,热稳定实验 70 °C 保温 1 h 与 -20 °C 1 h 的电泳条带比较,显示 28 S 条带无明显降解,电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA。

表 1 NS5A-TP4 上调表达基因

编号	Cy5/Cy3	基因名称
1	2.014	NCK 相关蛋白(NCKAP1)
2	2.026	小诱导细胞因子 A3(SCYA3)
3	2.030	富含半胱氨酸的血管生成诱导因子(CYR61)
4	2.081	来自 BCRA2 区域的猜想蛋白(CG005)
5	2.154	肿瘤抑制亚转移物候选物 1
6	2.226	未知功能基因 FLJ21985
7	2.236	核转录因子 NFκB1
8	2.326	plexin C1 (PLXNC1)
9	2.519	谷胱甘肽过氧化物酶 1(GPX1)
10	2.655	细胞色素 P450, 亚家族 IID 多肽 6
11	2.699	硫氧还蛋白还原酶 1(TXNRD1)
12	3.169	T 细胞受体重排 β 链基因 V 区(V-D-J)

2.3 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有 1 152 个 cDNA。为了监控芯片杂交体系,在芯片上设置了阴性对照(8 条水稻基因,共 8 个点),这些点的杂交信号均很低,证实了数据的可靠性。由于实验组探针标记

Cy5 荧光素(呈红色), 对照组探针标记 Cy3 荧光素(呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 按阳性标准, 从 1 152 个基因中筛选出差异常表达基因共 18 条, 其中 12 条基因表达增强(表 1), 6 条基因表达降低(表 2).

## 2.4 芯片结果

表 2 NS5A-TP4 下调表达基因

编号	Cy5/Cy3	基因名称
1	0.367	干扰素诱导的丙型肝炎相关微管聚合蛋白(MTAP44)
2	0.410	transgelin 2(TAGLN2)
3	0.435	G 蛋白信号 5 调节子(RGS5)
4	0.455	HGF 激活因子(HGFAC)
5	0.467	exostoses (multiple)-like 3 (EXTL3)
6	0.496	prefoldin 5(PFDN5)

## 3 讨论

基因芯片(gene chip)也称为 DNA 微距阵(DNA microarray)、DNA 芯片(DNA chip)等, 是近年发展起来的一项前沿生物技术. 他是指将大量靶基因或寡核苷酸片段有序地高密度地排列固定于玻片、硅片等固相载体上, 然后与待测的标记样品的基因按碱基互补配对原理进行杂交, 通过激光共聚焦荧光检测系统等对芯片进行扫描, 再经计算机软件处理, 从而获取大量生命信息. 该技术可以将极其大量的探针同时固定于支持物上, 所以一次可以对大量的生物分子进行检测分析, 从而解决了传统核酸印记杂交(southern blotting 和 northern blotting 等)技术复杂、自动化程度低、检测目的分子数量少、低通量等不足. 该技术的出现使全面综合分析某些生命现象成为可能<sup>[12]</sup>.

HCV 基因组的翻译是在有关酶的作用下合成一个长约 3 011 氨基酸的多蛋白前体, 然后在宿主信号肽酶和病毒编码的蛋白酶作用下裂解为各种蛋白. NS5A 是非结构蛋白的一种, 哺乳动物细胞表达的 NS5A 蛋白以两种形式存在, 分子量分别为 56 kD 和 58 kD, p58 被认为是 p56 的超级磷酸化产物, 目前认为 NS5A 蛋白是在细胞蛋白激酶作用下发生磷酸化修饰后发挥生物调节作用的<sup>[13-14]</sup>. 近年研究发现, NS5A 是转录反式激活因子, 其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸, 这是真核细胞转录因子特有的结构特征. 尽管 NS5A 蛋白是存在于胞质中, 但其具有功能性核定位信号(nucleic localization signal, NLS)序列, 即 PPRKRRVV (354-362 aa), 因此有核信号转导功能. 研究者发现 NS5A 蛋白可以抑制细胞周期调节基因 p21/WAF1 的转录, 而后者是介导细胞凋亡的 p53 的下游效应基因, 说明 NS5A 对细胞凋亡有抑制作用, 对细胞生长有促进作用<sup>[15-18]</sup>. 我室利用 SSH 筛选出 HCV NS5A 反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库, 对挑选的克隆进行分析发现其中一个新基因与 GenBank 中注册的已知功能基因序列没有同源性.

电子拼接推定该基因的 ORF 获得相应的全长编码基因, 将该未知功能基因命名为 NS5ATP4. 根据这一序列设计引物, 以人肝癌细胞 cDNA 为模板, PCR 反应扩增 NS5ATP4 基因序列. 反应产物经测序完全符合计算机分析结果, 这表明我们已顺利得到了 NS5ATP4 编码序列. NS5ATP4 的 ORF 长度为 762 bp, 编码 253 个氨基酸残基, NS5ATP4 基因的生物学功能及其在丙型肝炎发病机制中的作用目前还不清楚, 为进一步研究 NS5ATP4 的生物学功能, 我们利用基因芯片技术对其上调、下调基因进行分析<sup>[19]</sup>. 结果表明, 12 种基因的表达水平上调, 6 种基因的表达水平下调. 这些基因包括细胞生长、细胞凋亡、信号转导、免疫调节、肿瘤发生等基因, 如: 细胞色素 P450, HGF 激活因子, 谷胱甘肽过氧化酶 1, 肿瘤抑制亚转移物候选物 1. CD95 (CD95/APO-1) 受体/CD95 配体 (CD95L) 是调节不同细胞凋亡的关键信号传导系统. 表达水平上调的基因谷胱甘肽过氧化酶 1 能够阻断 CD95 诱导的凋亡, 保护细胞免受过氧化作用诱发的凋亡<sup>[20-21]</sup>. 表达水平上调的基因富含半胱氨酸的血管生成诱导因子(CYR61)是生长调节因子家族成员之一, 能够与细胞外基质、细胞表面受体结合促进细胞生长、迁移. 研究者发现 CYR61 能够通过激活 MAPK 和 Akt 信号转导途径, 诱导胸壁肿瘤的形成及肿瘤血管化. 研究者亦发现 CYR61 是整合素受体的配体之一, 当配体与整合素受体结合可以介导细胞内外的信号传导, 从而激活五种与血管化有关的反应, 包括: 上皮细胞的黏附、迁移、增生、存活、血管化<sup>[22-25]</sup>. 在下调表达的基因中, transgelin 2 的缺失与肿瘤的发生密切相关, Shields et al<sup>[26-29]</sup>在研究胸壁及大肠肿瘤时, 发现癌基因 Ras 依赖于 Raf 和非依赖于 Raf 的信号转导中, Ras 均抑制 transgelin 2 基因的表达<sup>[26-29]</sup>. 对新基因的研究及其功能的确定是分子生物学领域一项很具有挑战性的工作, 基因芯片技术是研究反式调节基因的有效技术<sup>[30-31]</sup>.

本研究结果表明, NS5A-TP4 对于肝细胞的基因表达谱有显著的影响, 他上调一些抑制细胞凋亡或与细胞信号转导有关的基因表达, 为我们进一步深入研究 NS5A-TP4 的功能提供了理论依据, 并为 HCV 感染慢性化机制及 HCV 致癌机制提供了新的研究方向.

## 4 参考文献

- 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1997:89-103
- 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林. 丙型肝炎病毒 5' - 非翻译区的结构与功能研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1020-1022
- Francois C, Duverlie G, Rebouillat D, Khorsi H, Castelain S, Blum HE, Gatignol A, Wychowski C, Moradpour D, Meurs EF. Expression of hepatitis C virus proteins interferes with the antiviral action of interferon independently of PKR-mediated control of protein synthesis. *J Virol* 2000;74:5587-5596
- 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 董菁, 洪源, 张跃新, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核

- 心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26:880-883
- 7 成军. 慢性丙型肝炎肝脏脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 8 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 董菁, 洪源, 张跃新, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26:880-883
- 9 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 反式调节靶基因. 世界华人消化杂志 2003;11:930-934
- 10 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式调节基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:939-942
- 11 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白反式调节基因. 世界华人消化杂志 2003;11:920-924
- 12 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究的应用. 世界华人消化杂志 2003;11:461-463
- 13 成军. 丙型肝炎病毒基因组的翻译及其产物的加工. 国外医学微生物学分册 1995;18:14-16
- 14 成军. 丙型肝炎病毒致病的分子生物学机制. 解放军医学杂志 2003;28:23-27
- 15 刘妍, 陆荫英, 成军, 王建军, 李莉, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因的克隆化研究. 解放军医学杂志 2003;28:40-43
- 16 Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ, Yen SH, Chen SY, Wu JC, Wang YJ, Kato N, Omata M, Chang FY, Lee SD. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2002;21:4801-4811
- 17 Shirota Y, Luo H, Qin W, Kaneko S, Yamashita T, Kobayashi K, Murakami S. Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem* 2002;277:11149-11155
- 18 Gimenez-Barcons M, Franco S, Suarez Y, Fornis X, Ampurdanes S, Puig-Basagoiti F, Sanchez-Fueyo A, Barrera JM, Llovet JM, Bruix J, Sanchez-Tapias JM, Rodes J, Saiz JC. High amino acid variability within the NS5A of hepatitis C virus (HCV) is associated with hepatocellular carcinoma in patients with HCV-1b-related cirrhosis. *Hepatology* 2001;34:158-167
- 19 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 王春花, 纪冬, 党晓燕. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 4 的克隆化研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:248-250
- 20 Gouaze V, Andrieu-Abadie N, Cuvillier O, Malagarie-Cazenave S, Frisach MF, Mirault ME, Levade T. Glutathione peroxidase-1 protects from CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:42867-42874
- 21 Wedi B, Straede J, Wieland B, Kapp A. Eosinophil apoptosis is mediated by stimulators of cellular oxidative metabolisms and inhibited by antioxidants: involvement of a thiol-sensitive redox regulation in eosinophil cell death. *Blood* 1999;94:2365-2373
- 22 Kolesnikova TV, Lau LF. Human CYR61-mediated enhancement of bFGF-induced DNA synthesis in human umbilical vein endothelial cells. *Oncogene* 1998;16:747-754
- 23 Tsai MS, Bogart DF, Li P, Mehmi I, Lupu R. Expression and regulation of Cyr61 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 2002;21:964-973
- 24 Leu SJ, Lam SC, Lau LF. Pro-angiogenic activities of CYR61 (CCN1) mediated through integrins alphavbeta3 and alpha6beta1 in human umbilical vein endothelial cell. *J Biol Chem* 2002;277:46248-46255
- 25 Grzeszkiewicz TM, Lindner V, Chen N, Lam SC, Lau LF. The angiogenic factor cysteine-rich 61 (CYR61, CCN1) supports vascular smooth muscle cell adhesion and stimulates chemotaxis through integrin alpha(6)beta(1) and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Endocrinology* 2002;143:1441-1450
- 26 Shields JM, Rogers-Graham K, Der CJ. Loss of transgelin in breast and colon tumors and in RIE-1 cells by Ras deregulation of gene expression through Raf-independent pathways. *J Biol Chem* 2002;277:9790-9799
- 27 Lawson D, Harrison M, Shapland C. Fibroblast transgelin and smooth muscle SM22alpha are the same protein, the expression of which is down-regulated in many cell lines. *Cell Motil Cytoskeleton* 1997;38:250-257
- 28 Prinjha RK, Shapland CE, Hsuan JJ, Totty NF, Mason JJ, Lawson D. Cloning and sequencing of cDNAs encoding the actin cross-linking protein transgelin defines a new family of actin-associated proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 1994;28:243-255
- 29 Shapland C, Hsuan JJ, Totty NF, Lawson D. Purification and properties of transgelin: a transformation and shape change sensitive actin-gelling protein. *J Cell Biol* 1993;121:1065-1073
- 30 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 生物信息学技术与新基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:474-477
- 31 成军. 新基因结构与功能研究的策略. 世界华人消化杂志 2003;11:373-377

## World Journal of Gastroenterology 稿件管理

为了加快《World Journal of Gastroenterology, WJG》稿件管理的信息化、电子化进程, 提高办刊质量, 规范编辑工作流程, 提高工作效率, 我们成功开发了世界胃肠病学杂志社稿件管理系统, 并于 2003-04-15 投入使用, 来稿登记、稿件回执、稿件初审、二审(包括选择审稿专家和发送审稿通知书)、审稿意见、终审定稿、发送录用通知书、退稿、编辑加工、数据交换、网上投稿查询等, 全部实现了自动生成, 电子化处理. 作者在 WJG 网上投稿查询系统内提交用户名(第一作者)和密码(文章编号)后可查询到稿件的处理状态, 如编号、刊名、题名、作者、收稿日期、送审日期、接受日期、退稿日期、发票编号、待发表日期、入卷(期)和出版页码等在内的 28 个项目.

# HCV 包膜糖蛋白 E2 基因的克隆、蛋白表达及纯化

杜德伟, 贾战生, 秦鸿雁, 刘秋平, 周永兴, 韩 骅

杜德伟, 贾战生, 刘秋平, 周永兴, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038

秦鸿雁, 韩骅, 中国人民解放军第四军医大学基础部医学遗传学与发育生物学教研室 陕西省西安市 710032

杜德伟, 男, 1966-08-30 生, 吉林德惠市人, 汉族. 1989 年第四军医大学本科毕业, 2001 年第四军医大学硕士研究生毕业, 医学博士研究生, 主治医师, 讲师, 主要从事病毒性肝炎致病机制及基因治疗研究.

国家自然科学基金资助课题, No. 30070687

项目负责人: 贾战生, 710038, 陕西省西安市灞桥区新医路 1 号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. jiazsh@fmmu.edu.cn  
电话: 029-3377742

收稿日期: 2003-10-15 接受日期: 2003-11-19

## Cloning of HCV E2 gene and expression and purification of HCV envelope glycoprotein E2

De-Wei Du, Zhan-Sheng Jia, Hong-Yan Qin, Qiu-Ping Liu, Yong-Xing Zhou, Hua Han

De-Wei Du, Zhan-Sheng Jia, Qiu-Ping Liu, Yong-Xing Zhou, Chinese PLA Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, 710038, Shaanxi Province, China

Hong-Yan Qin, Hua Han, Department of Medical Genetics and Developmental Biology, the Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, Shaanxi Province, China

Supported by the National Natural Science foundation of China, No.30070687

Correspondence to: Zhan-Sheng Jia, Department of Medical Genetics and Developmental Biology, the Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, Shaanxi Province, China. jiazsh@fmmu.edu.cn

Received: 2003-10-15 Accepted: 2003-11-19

## Abstract

AIM: To obtain large amount of HCV E2 protein, and to understand the function of the protein and to prepare the antibody against this protein.

METHODS: A 831bp of E2 gene fragment was amplified by PCR method from HCV genome and cloned into pET32a (+) vector, an *E. coli* expression vector, to construct a recombinant plasmid pET32a-HCVE2. The plasmid was transformed into *E. coli* BL-21 (DE3) to express E2 protein with IPTG induced. The protein E2 fused with HIS tag was purification by Ni-NTA resin column. The protein E2 fused with His tag was detected by SDS-PAGE electrophoresis and Western blot.

RESULTS: A novel protein with molecular weight of  $M_r$  55 000 was expressed upon induction with IPTG in *E. coli*. The expressed product showed good reactivity to anti-His tag antibody and the HCV positive serum.

CONCLUSION: Cloning of HCV E2 gene and the expression and purification of envelope glycoprotein E2 lay a foundation of further study on HCV E2 protein and the receptors of

hepatitis virus C.

Du DW, Jia ZS, Qin HY, Liu QP, Zhou YX, Han H. Cloning of HCV E2 gene and expression and purification of HCV envelope glycoprotein E2. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):315-318

## 摘要

目的: 获得大量重组 HCVE2 蛋白, 为研究 E2 蛋白的功能及制备其抗体奠定基础.

方法: 利用 PCR 方法从 HCV 基因组序列中扩增出 831 bp (384-661 aa) 的 E2 基因片段并按读框克隆到原核表达载体 pET32a(+) 上, 得到重组质粒 pET32a-HCVE2, 转化大肠杆菌 BL-21 (DE3) 菌株, IPTG 诱导 HCV E2 蛋白表达, SDS-PAGE 和 Western blot 检测蛋白表达, Ni-NTA 偶联的琼脂糖黏附柱纯化融合蛋白.

结果: 经 IPTG 诱导后, 可见分子量约 55 000 的融合蛋白表达; 表达的蛋白主要以包涵体形式存在; 经 Ni-NTA 偶联的琼脂糖黏附柱纯化的融合蛋白与抗 His 抗体及 HCV 阳性血清具有良好的反应原性.

结论: HCV E2 基因的克隆、表达及其融合蛋白的纯化为进一步开展 HCV E2 蛋白功能和 HCV 受体的研究奠定了基础.

杜德伟, 贾战生, 秦鸿雁, 刘秋平, 周永兴, 韩骅. HCV 包膜糖蛋白 E2 基因的克隆、蛋白表达及纯化. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):315-318

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/315.asp>

## 0 引言

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(HCV)感染引起的世界性传染病<sup>[1-13]</sup>. 全世界约有 1.7 亿 HCV 感染者, 是 HIV-1 感染者的 5 倍<sup>[13]</sup>. HCV 感染后约 70% 转化为慢性, 并与肝硬化、肝衰竭和肝癌的发生密切相关. HCV 感染已经成为威胁人类健康的重要因素之一. 长期以来, 由于缺乏稳定的 HCV 体外感染的细胞模型和小动物模型, 限制了对 HCV 发病机制的研究, 迄今为止, 对于 HCV 的肝细胞嗜性尚无合理解释, 肝细胞表面参与 HCV 识别、黏附、及入胞的分子还不完全清楚. 研究表明, E2 糖蛋白是介导 HCV 与细胞表面 CD81<sup>[14-18]</sup>, B 族 I 型清道夫受体(SR-BI)<sup>[19]</sup>和 DC-SIGN/DL-SIGN<sup>[20-22]</sup> 等候选受体结合的配体. 本文利用基因工程技术克隆了 HCV E2 基因, 并利用 pET 原核表达系统进行表达,

通过 Ni-NTA 偶联的琼脂糖黏附柱纯化了 HCV 包膜糖蛋白 E2, 为进一步开展该蛋白的功能和 HCV 受体的研究奠定了基础.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** T 载体 PMD18-T 系 Takara 公司产品. pET32a (+) 为 Novagen 产品. 含有 HCV H77 株全基因序列的质粒 pBRTM/HCV1-3011 由美国华盛顿大学的 Rice CM 惠赠, HCV 阳性血清为本室保存. 大肠杆菌 BL-21(DE3)、XL-10-gold 菌株均由第四军医大学医学遗传学与发育生物学教研室提供. 限制性内切酶、DNA 连接溶液 Solution I、CIAP、标准分子量 DNA、标准分子量蛋白质、PCR 试剂盒、IPTG 等购自 Takara 公司. 质粒纯化、DNA 回收试剂盒购自华舜公司. 用于蛋白纯化的 Ni-NTA 偶联的琼脂糖黏附柱、Western blot 检测使用的 Hybond ECL 硝酸纤维素膜均为 Pharmacia 公司产品. ECL 发光试剂购自 Pierce 公司.

## 1.2 方法

**1.2.1 HCV 包膜蛋白 E2 基因的扩增及序列测定** 根据 Genbank 中 HCV H 株基因序列, 设计出针对 HCV E2 基因序列的引物, 上游引物序列为: 5' -GGA TCC GAA ACC CAC GTC ACC- 3', 下游引物: 5' -GAG CTC GGA CCT GTC CCT GTC- 3', 其中上、下游引物的 5' 端分别引入 BamH I 和 Sac I 酶切位点. 应用 PCR 试剂盒扩增目的基因, 总反应体积为 50  $\mu$ L, 循环参数为: 95 $^{\circ}$ C 4 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环, 再于 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min. 将 PCR 扩增产物克隆入载体 pMD18-T 中, 构建 pMD18-T-HCVE2, 酶切鉴定正确后, 交由上海生工公司进行 DNA 序列测定.

**1.2.2 HCV 包膜糖蛋白原核表达载体的构建** 以 BamH I 和 Sac I 双酶切测序正确的 PMD18-T-HCVE2, 获取 HCVE2 基因. 以 BamH I 和 Sac I 双酶切 pET32a(+) 载体, 分别回收 HCVE2 基因和 pET32a(+) 载体片段, Solution I 连接上述基因和载体片段, 构建 HCV 包膜糖蛋白 E2 原核表达载体 pET32-HCVE2, 转化 E.coli XL-10 感受态细胞, 用含 Amp 的 LB 平板筛选阳性克隆, 小量提取质粒并酶切鉴定.

**1.2.3 HCV 包膜糖蛋白的原核表达、纯化及检测** 以 HCV 包膜糖蛋白 E2 原核表达载体 pET32 a-HCVE2 转化 E.coli BL-21(DE3) 感受态细胞, 挑取用含 Amp 的 LB 平板筛选的阳性克隆于 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振摇过夜, 按 1:100 转接到 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振摇约 4 h, 使 A600 约 0.6 (0.4-1), 加入终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG 继续培养诱导 3 h, 于 4 $^{\circ}$ C 离心 10 000 r/min  $\times$  1, 收集菌体并裂解, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 000 r/min  $\times$  10, 分别取上清及沉淀(包涵体), 进行 SDS-PAGE 电泳进行可溶性分析. 同等条件下进行大量诱导, 收集并用 8 mol/L (pH 8.0)

尿素溶解包涵体后, Ni-NTA 偶联的琼脂糖珠黏附融合蛋白, 用 pH 值分别为 6.3, 5.9 及 4.5 的 8 mol/L 尿素液体洗脱蛋白, 不同浓度的尿素梯度透析复性, Western blot 检测蛋白抗原性.

## 2 结果

**2.1 HCV 包膜蛋白 E2 基因的扩增、克隆及序列测定** HCV 包膜蛋白 E2 基因的 PCR 产物 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳可见约 840 bp 特异性条带(图 1), 回收片段后插入 pMD18-T, 形成 pMD18-T-HCVE2, 酶切鉴定得到正确克隆, 以 M13+/M13- 为引物进行序列测定. 测序结果与 Genbank 中 HCV 77 株基因序列比对无突变.

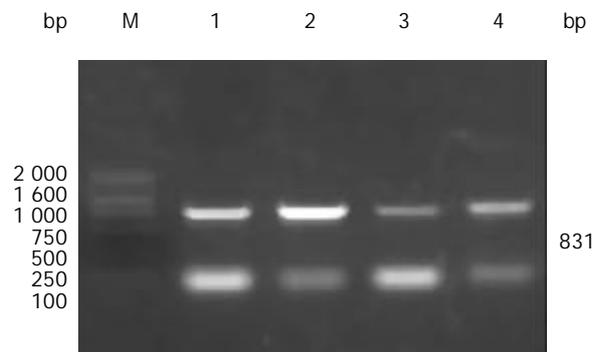


图 1 HCVE2 基因的克隆. M: DL2000 DNA Marker 1-4: HCVE2 基因的 PCR 产物 (小片段为引物二聚体).

**2.2 HCV 包膜蛋白 E2 原核表达载体 pET32a-HCVE2 构建** 用 BamH I 和 Sac I 双酶切 pMD18-T-HCVE2, 回收片段后与经过相同酶切的 pET32a(+) 连接, 转化 E.coli XL-10-gold 感受态细胞, 用含 Amp 的 LB 平板筛选阳性克隆, 挑单克隆扩增小量提取质粒并酶切鉴定. BamH I 和 Sac I 双酶切得到约 840 bp 和 4 500 bp 的片段, 与预期的大小一致(图 2).

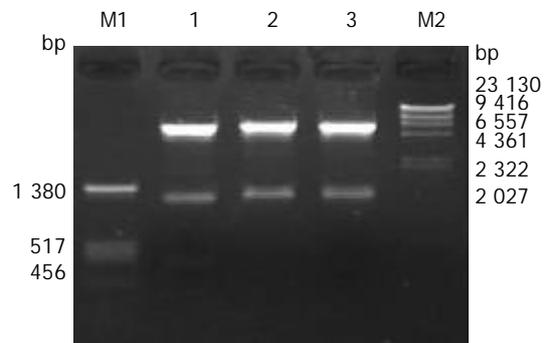


图 2 质粒 pET32a-HCVE2 酶切鉴定. M1、M2: 标准 DNA Marker; 1-3: pET32a-HCVE2 经 BamH I 和 Sac I 双酶切鉴定.

**2.3 pET32a-HCVE2 的原核表达及鉴定** 将原核表达载体 pET32a-HCVE2 转化到 E.coli BL-21 (DE3) 感受态细胞中, 经 IPTG 诱导后, 可见 M<sub>r</sub> 55 000 的融合蛋白(图 3A), 可溶性分析显示融合蛋白主要以包涵体形式表达, 用

pH 值为 8.0 的 8 mol/L 尿素溶液溶解包涵体, Ni-NTA 偶联的琼脂糖珠亲和纯化融合蛋白, 用 pH 值为 4.5 的 8mol/L 尿素溶液洗脱融合蛋白(图 3B), 用薄层扫描分析融合蛋白的纯度达到 95.6%. 转化 pET32a(+) 空载体的 BL-21 菌仅表达  $M_r$  20 400 的 Trx-His 标签蛋白, 分别以 anti-His 及 HCV 阳性血清为一抗做 Western blot, 均可检测到表达的融合蛋白(图 4、5).

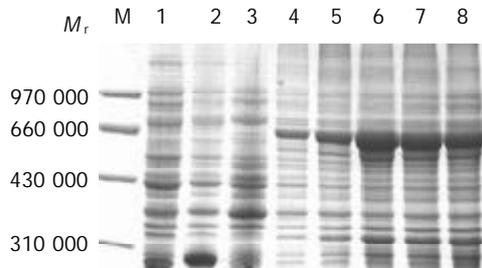


图 3A 不同诱导时间融合蛋白表达的 SDS-PAGE 分析. M: 低分子量蛋白质; 1: 未诱导的 pET32a(+) 空载体; 2: 诱导的 pET32a(+) 空载体; 3: 未诱导的 pET32a-HCVE2; 4: 4-8: pET32a-HCVE2 经 0.5 mmol/L IPTG 诱导 1-5 h 融合蛋白的表达.

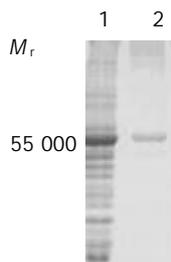


图 3B HCVE2-His 融合蛋白纯化. 1: BL-21(DE3) 全菌中的融合蛋白; 2: Ni-柱纯化的融合蛋白.

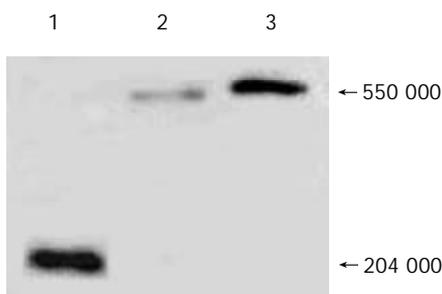


图 4 抗-His 抗体 Western blot 检测 HCVE2-His 融合蛋白的表达. 1: 转化空载体 pET32a 的 BL-21 细菌; 2: 转化 pET32a-HCVE2 的 BL-21 细菌裂解上清; 3: 转化 pET32a-HCVE2 的 BL-21 细菌包涵体.

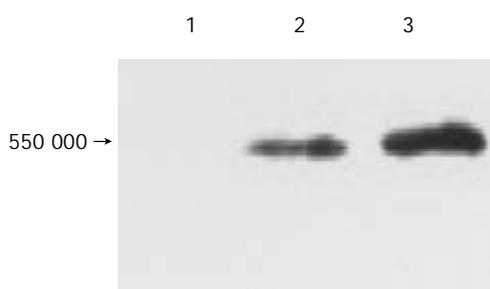


图 5 HCV 阳性血清 Western blot 检测 HCVE2-His 融合蛋白的表达. 1: 转化空载体 pET32a 的 BL-21 细菌; 2: 转化 pET32a-HCVE2 的 BL-21 细菌裂解上清; 3: 转化 pET32a-HCVE2 的 BL-21 细菌包涵体.

### 3 讨论

HCV 为正链 RNA 包膜病毒, 与庚型肝炎病毒、黄热病毒及登革热病毒同属黄病毒属, HCV 基因组含有一个大的读码框, 编码一个约含有 3 000 个氨基酸的前体蛋白, 经过翻译及翻译后加工, 形成结构蛋白和非结构蛋白<sup>[23-25]</sup>. 其中结构蛋白 E1, E2 形成复合物构成 HCV 的包膜蛋白<sup>[26-27]</sup>. 肝细胞为其天然靶细胞, 同时 B 淋巴细胞、单核巨噬细胞及树突状细胞也是 HCV 的易感细胞<sup>[28]</sup>. 在病毒感染细胞的过程中包膜糖蛋白与细胞表面膜受体结合, 介导病毒入胞是病毒感染致病的关键. HCV 感染的持续性表明宿主对病毒缺乏有效的免疫应答. HCV 的 E2 区基因 N 末端高变区 HVR1 含有三个 B 细胞表位: 400-409 aa, 398-410aa 以及 399-405 aa, 这个区域内基因的变化, 可能允许病毒逃避免疫监视; 对 E2 区多肽产生的细胞免疫应答, 可能对抵抗 HCV 攻击和清除 HCV 感染起重要的作用<sup>[29]</sup>. 另外, E2(614-622) 是 HLA-A2+ 慢性感染者的 CTL 表位, 此区的可变性位于 aa622, 锚定在 HLA-A2 分子上, 改变该氨基酸残基可影响肽段与 HLA 的结合和 CTL 识别, 此肽段对 CTL 的识别作用高度保守. 通过对这一表位的修饰可以达到提高 HCV 细胞免疫的作用<sup>[30]</sup>.

由于机体清除体内感染的病毒常与针对病毒包膜糖蛋白产生的抗体有关, 因此, 对 HCV 包膜糖蛋白 E2 的研究具有重要的意义. Shi et al<sup>[31]</sup> 用原核表达的 HCV 包膜糖蛋白 E2 检测 HCV 感染者, 其血清抗 E2 抗体的阳性率达 60% 以上, 且部分 E2 抗体阳性血清抗 HCV 核心抗体阴性. 慢性 HCV 感染者有很高的 HCV 包膜糖蛋白 E2 抗体阳性率, 且能够很好地反应 HCV mRNA 的存在, 因此, 许多学者认为抗 HCV 包膜糖蛋白 E2 抗体是 HCV 感染检测的新指标. 了解 HCV 靶向肝细胞及肝外组织的分子基础对于揭示丙型肝炎的发病机制至关重要. 尽管在 HCV 蛋白及其基因复制方面已经取得了很大的进步. 但是, 缺乏可靠的病毒培养扩增体系成为研究 HCV 组装及入胞的主要障碍. 利用昆虫细胞组装 HCV 病毒样颗粒(VLP)可作为 HCV 的替代品, 以帮助研究 HCV 的入胞过程<sup>[32-34]</sup>. 但是, VLP 不具有感染细胞的能力, 无法用于 HCV 受体的功能研究. 我们成功地克隆了 HCV 包膜糖蛋白 E2 的基因并构建了其原核表达载体, 转化 BL-21(DEC)后, 经 IPTG 诱导后获得高效表达, NI-NTA 黏附柱纯化获得了与 His 标签融合的 E2 包膜糖蛋白, 分别以 anti-His 及 HCV 阳性血清为一抗做 Western blot 检测证实该融合蛋白具有一定的生物学活性. 用此融合蛋白免疫新西兰兔后, 获得了高效价的抗血清(未发表). 如将 E2 抗原加入目前的 HCV 检测试剂中, 有可能改善现有 HCV 检测试剂的特异性和敏感性<sup>[35]</sup>. 而抗血清的获得为研究 HCV 包膜糖蛋白 E2 的生物学特性及其功能提供了有效工具.

由于包膜糖蛋白 E2 是糖蛋白, 糖基化对其抗原性影响很大<sup>[27, 36-37]</sup>, 而真核表达系统才具有糖基化功能, 本研究已经获得编码正确的 HCV E2 基因, 对于真核表达载体的构建及今后 HCV 的疫苗研究都具有重要价值. 同时为进一步组装具有感染能力的假病毒<sup>[38]</sup>奠定了基础.

#### 4 参考文献

- 1 Assy N, Minuk GY. A comparison between previous and present histologic assessments of chronic hepatitis C viral infections in humans. *World J Gastroenterol* 1999;5:107-110
- 2 Caselmann WH, Serwe M, Lehmann T, Ludwig J, Sproat BS, Engels JW. Design, delivery and efficacy testing of therapeutic nucleic acids used to inhibit hepatitis C virus gene expression in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2000; 6:626-629
- 3 Cheng JL, Tong WB, Liu BL, Zhang Y, Yan Z, Feng BF. Hepatitis C virus in human B lymphocytes transformed by Epstein-Barr virus *in vitro* by *in situ* reverse transcriptase polymerase chain reaction. *World J Gastroenterol* 2001;7:370-375
- 4 Dai YM, Shou ZP, Ni CR, Wang NJ, Zhang SP. Localization of HCV RNA and capsid protein in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2000;6:136-137
- 5 Feng DY, Chen RX, Peng Y, Zheng H, Yan YH. Effect of HCV NS-3 protein on p53 protein expression in hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 1999;5:45-46
- 6 Huang F, Zhao GZ, Li Y. HCV genotypes in hepatitis C patients and their clinical significances. *World J Gastroenterol* 1999; 5:547-549
- 7 邵清, 成军, 白雪帆, 王琳, 张健, 梁耀东, 刘敏, 李强. 酵母双杂交技术筛选白细胞中 HCV NS3 蛋白结合蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:1897-1900
- 8 阚全程, 余祖江, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰. 人工构建含丙型肝炎病毒核糖体插入位点的双顺反子表达载体. *世界华人消化杂志* 2003;11:1520-1523
- 9 郝春秋, 冯志华, 周永兴, 聂青和, 李谨革, 贾战生, 梁雪松, 谢玉梅, 曹义战, 康文臻. 复制缺陷型 HCV C 基因腺病毒表达载体的构建包装及鉴定. *世界华人消化杂志* 2003;11:144-147
- 10 梁雪松, 连建奇, 周永兴, 聂青和, 郝春秋. IRES 特异性 IRNA 对 HCV IRES 启动蛋白翻译细胞内抑制作用. *世界华人消化杂志* 2003;11:157-160
- 11 孙利, 周永兴, 郝春秋, 冯志华, 赵君, 胡沛臻, 付勇, 马福成, 常吉庆, 王九平, 聂青和. DNA 疫苗对小鼠 HCV-C 皮下移植瘤的防治. *世界华人消化杂志* 2003;11:165-168
- 12 王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因 TAHCCP2 的克隆. *世界华人消化杂志* 2003;11:1893-1896
- 13 Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345:41-52
- 14 Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938-941
- 15 VanCompernelle SE, Wiznycia AV, Rush JR, Dhanasekaran M, Baures PW, Todd SC. Small molecule inhibition of hepatitis C virus E2 binding to CD81. *Virology* 2003;314:371-380
- 16 Cocquerel L, Kuo CC, Dubuisson J, Levy S. CD81-dependent binding of hepatitis C virus E1E2 heterodimers. *J Virol* 2003; 77:10677-10683
- 17 Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, Scarselli E, Cortese R, Nicosia A, Cosset FL. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* 2003;278:41624-41630
- 18 Tan YJ, Lim SP, Ng P, Goh PY, Lim SG, Tan YH, Hong W. CD81 engineered with endocytotic signals mediates HCV cell entry: implications for receptor usage by HCV in vivo. *Virology* 2003;308:250-269
- 19 Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acal S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A. The

- human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002;21:5017-5025
- 20 Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, Donovan GP, Maddon PJ, Dragic T, Olson WC. L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Natl Acad Sci USA* 2003; 100:4498-4503
- 21 Lozach PY, Lortat-Jacob H, De Lacroix De Lavalette A, Staropoli I, Fong S, Amara A, Houles C, Fieschi F, Schwartz O, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Altmeyer R. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis c virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 2003;278:20358-20366
- 22 Pohlmann S, Zhang J, Baribaud F, Chen Z, Leslie GJ, Lin G, Granelli-Piperno A, Doms RW, Rice CM, McKeating JA. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 2003;77:4070-4080
- 23 张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 梁耀东, 刘敏. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因 NS5ATP5 的克隆. *世界华人消化杂志* 2003;11:1901-1904
- 24 Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000;14:241-254
- 25 Reed KE, Rice CM. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;242:55-84
- 26 Dubuisson J. Folding, assembly, and subcellular localization of hepatitis C virus glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;242:135-148
- 27 Flint M, McKeating JA. The role of the hepatitis C virus glycoproteins in infection. *Rev Med Virol* 2000;10:101-117
- 28 Navas MC, Fuchs A, Schvoerer E, Bohbot A, Aubertin AM, Stoll-Keller F. Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. *J Med Virol* 2002;67:152-161
- 29 Lee JW, Kim K, Jung SH, Lee KJ, Choi EC, Sung YC, Kang CY. Identification of a domain containing B-cell epitopes in hepatitis C virus E2 glycoprotein by using mouse monoclonal antibodies. *J Virol* 1999;73:11-18
- 30 Sarobe P, Huarte E, Lasarte JJ, Lopez-Diaz de Cerio A, Garcia N, Borrás-Cuesta F, Prieto J. Characterization of an immunologically conserved epitope from hepatitis C virus E2 glycoprotein recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocytes. *J Hepatol* 2001;34:321-329
- 31 Shi XL, Cao F, Ji Y, Du Y, Hou LH, Wang HT. Cloning, expression of e2 gene in hepatitis c virus envelope region and significance of anti-HCV E2 detection in patients with HCV infection. *Zhongguo Shuxue Zazhi* 2001;14:1-3
- 32 Owsianka A, Clayton RF, Loomis-Price LD, McKeating JA, Patel AH. Functional analysis of hepatitis C virus E2 glycoproteins and virus-like particles reveals structural dissimilarities between different forms of E2. *J Gen Virol* 2001;82:1877-1883
- 33 Triyatni M, Saunier B, Maruvada P, Davis AR, Ulianich L, Heller T, Patel A, Kohn LD, Liang TJ. Interaction of hepatitis C virus-like particles and cells: a model system for studying viral binding and entry. *J Virol* 2002;76:9335-9344
- 34 Wellnitz S, Klumpp B, Barth H, Ito S, Depla E, Dubuisson J, Blum HE, Baumert TF. Binding of hepatitis C virus-like particles derived from infectious clone H77C to defined human cell lines. *J Virol* 2002;76:1181-1193
- 35 Cerion A, Bissolati M, Cividinia A, Esumi M, Hayashi N, Mizuno K, Slobbe R, Oudshoorn P, Silini E, Asti M, Mondelli MU. Antibodies responsible to the hepatitis C virus E2 protein: relationship to viremia and prevalence in anti-HCV seronegative subject. *J Med Virol* 1997; 51:1-5
- 36 Takikawa S, Ishii K, Aizaki H, Suzuki T, Asakura H, Matsuura Y, Miyamura T. Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *J Virol* 2000;74:5066-5074
- 37 Flint M, Dubuisson J, Maidens C, Harrop R, Guile GR, Borrow P, McKeating JA. Functional characterization of intracellular and secreted forms of a truncated hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol* 2000;74:702-709
- 38 Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. The journal of experimental medicine infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003;197:633-642

# 应用表达谱芯片技术对NS5A TP7反式调节基因的研究

张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 梁耀东, 李强, 刘敏

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

张健, 男, 北京市人, 汉族, 医师, 内科传染病学专业硕士研究生, 主要从事传染病的临床与基础研究工作。

国家自然科学基金攻关项目, No.C03011402, No.C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No.98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

## Screening and identification of human genes transactivated by NS5A TP7 by cDNA microarray assay

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

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

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

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

Received: 2003-07-12 Accepted: 2003-08-16

## Abstract

**AIM:** To study of genes trans-regulated by human gene 7 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus (NS5A TP7) by cDNA microarray assay.

**METHODS:** The recombinant expression plasmid pcDNA 3.1(-)-NS5A TP7 was constructed, and HepG2 cells were transfected. Total mRNA was isolated from the HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-) and pcDNA3-NS5A TP7, respectively. Microarray was conducted for screening of up- and down-regulated genes of both HepG2 cells.

**RESULTS:** After transfecting HepG2 cells, we found 4 genes were up-regulated, and 8 genes down-regulated.

**CONCLUSION:** cDNA microarray is successfully used to screen the genes trans-regulated by NS5A TP7, which brings some new clues for studying the trans-regulated and immune regulation mechanism of NS5A TP7.

Zhang J, Liu Y, Cheng J, Wang L, Shao Q, Liang YD, Li Q, Liu M. Screening and identification of human genes transactivated by NS5A TP7 by cDNA microarray assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12(2):319-322

## 摘要

**目的:** 应用基因表达谱芯片研究丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活蛋白7(human gene 7 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus, HCV NS5A TP7)的反式调节基因。

**方法:** 构建NS5A TP7基因的真核表达载体pcDNA3.1(-)-NS5A TP7, 应用基因表达谱芯片技术对pcDNA3.1(-)-NS5A TP7转染的HepG2(人肝母细胞瘤细胞系)细胞和转染空载体pcDNA3.1(-)的相同细胞的差异表达mRNA进行检测和分析。

**结果:** HepG2细胞经转染NS5A TP7后, 有12条差异基因表达, 其中4条基因表达增强, 8条基因表达降低。

**结论:** 应用基因表达谱芯片成功筛选了NS5A TP7的反式调节基因, 为进一步阐明NS5A TP7的反式激活作用及免疫调节机制提供了新的依据。

张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 梁耀东, 李强, 刘敏. 应用表达谱芯片技术对NS5A TP7反式调节基因的研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):319-322  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/319.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)属于黄病毒属, 是含外膜蛋白的单股正链RNA病毒。在大多数感染人群中HCV表现为持续性感染, 并可导致慢性肝炎、肝硬化, 或肝细胞癌, 而且与肝脏脂肪变、糖代谢紊乱有关<sup>[1-10]</sup>。HCV至少被分为10种结构蛋白和非结构蛋白, 其中非结构蛋白NS5A基因(位于6 258 bp-7 601 nt之间)编码的58 kD的NS5A蛋白(448 aa)具有多种生物学功能, 在HCV多蛋白的成熟和RNA的复制过程中具有十分重要的作用<sup>[11-14]</sup>。研究表明, NS5A上存在干扰素 $\alpha$  (IFN $\alpha$ )敏感决定区(ISDR), 与干扰素 $\alpha$ 治疗的敏感性相关<sup>[15-16]</sup>; 此外, NS5A还是一种作用很强转录激活因子<sup>[17-21]</sup>, 调控着细胞内许多病毒及细胞基因的转录, 与感染HCV的细胞发生恶性转化过程有关。我实验室应用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)对NS5A的反式调节基因进行了初步的研究, 筛选出了一系列已知及未知功能基因, 并把其中一个未知功能基因克隆化, 命名为丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活蛋白7(human gene 7 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus, HCV NS5A TP7)<sup>[22]</sup>。此外, 本实

实验室正在对 NS5ATP7 进行酵母双杂交研究, 观察与之有相互作用的蛋白. 为了从不同的角度对 NS5ATP7 的反式调节基因进行验证及研究, 我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)<sup>[23-26]</sup>对 NS5ATP7 反式调节的靶基因成功地进行了筛选, 为今后更加广泛深入地研究 NS5ATP7 的反式调节基因打下了基础.

## 1 材料和方法

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

1.2 真核表达载体及细胞转染 NS5ATP7 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS5ATP7 为本室构建. 用 Lipofectamine PLUS 转染试剂将 2 μg pcDNA3.1(-)-NS5ATP7 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞.

1.3 细胞 mRNA 提取 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了 NS5ATP7 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性、定量分析.

1.4 探针标记 参照 Schena et al 的方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA (5 μg), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA (5 μg). 乙醇沉淀后溶解在 20 μL 5 × SSC+0.2% SDS 杂交液中.

1.5 芯片制备 包含的 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000-3 000 bp. 靶基因以 0.5 μg/μL 溶解于 3 × SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合 (2 h)、室温干燥 (30 min), 紫外线 (UV) 交联, 再分别用 0.2% SDS、水及 0.2% 的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用.

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

1.7 检测与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因 (24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点) 对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值.

阳性结果判断: Cy5/Cy3 > 2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3 < 0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

## 2 结果

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

2.2 NS5ATP7 蛋白上调基因类型 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 2.000 以上, 就判断为 HCV NS5ATP7 蛋白的上调基因. 在本研究中发现有 4 种基因的表达水平上调 (表 1).

表 1 NS5ATP7 上调基因类型

编号	Cy3/Cy5 比值	基因名称
1	2.012	细胞色素 P450, 亚科 IIC (美芬妥英 4-羟化酶), 多肽 9 (CYP2C9)
2	2.092	干扰素诱导丙型肝炎相关的微管聚集物蛋白 (MTAP44)
3	2.134	钾内部矫正通道, 亚科 J, 10 号 (KCNJ10)
4	2.288	钾电压门通道, KQT 样亚科, 3 号 (KCNQ3)

2.3 HCV NS5ATP7 蛋白下调基因类型 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 0.500 以下, 就判断为 HCV NS5ATP7 蛋白的下调基因. 在本研究中发现有 8 种基因的表达水平下调 (表 2).

表 2 NS5ATP7 下调基因类型

编号	Cy3/Cy5 比值	基因名称
1	0.220	小的可诱导的细胞因子 A2 (单核细胞趋化性蛋白 1) (SCYA2)
2	0.227	异常的人体基因图, 染色体 X, dbl 同功型 (原癌基因)
3	0.294	主要组织相容性复合体 1- 样序列 (HLALS)
4	0.371	舒血管素 3 (前列腺特异抗原) (KLK3)
5	0.416	钙激活蛋白酶, 小亚单位 1 (CAPNS1)
6	0.422	蛋白激酶 C, α (PRKCA)
7	0.454	叶酸盐水解酶 1 (前列腺特异的膜抗原) (FOLH1)
8	0.472	前脑肽 (PENK)

## 3 讨论

丙型肝炎病毒基因组的翻译是在有关酶的作用下合成一个长约 3 011 氨基酸的多蛋白前体, 然后在宿主信号肽酶和病毒编码的蛋白酶作用下裂解为各种蛋白, 即: 结构蛋白 C、E1、E2、p7, 和非结构蛋白 NS2、NS3、

NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B<sup>[27-32]</sup>。其中非结构蛋白 NS5A 具有多种生物学功能, HCV NS5A 是病毒编码的一种功能广泛的蛋白质, 参与许多重要的调节过程。HCV NS5A 位于 HCV 多蛋白的羧基末端, 是丝氨酸磷酸化蛋白质, 依磷酸化程度的不同而产生两种不同分子量大小的多肽 p56 和 p58, p58 被认为是 p56 的超级磷酸化产物。由于 NS5A 表现出对抗干扰素  $\alpha$  的治疗效应而引起人们广泛的关注, NS5A 能够与肝细胞中的 IFN $\alpha$  刺激蛋白 - 双链 RNA 依赖的激酶(PKR)相互作用, 抑制 PKR 的功能, 从而下调 IFN $\alpha$  刺激的抗病毒效应。位于 NS5A 蛋白中央包括一段干扰素敏感决定区(ISDR), 该区被认为是介导 NS5A 与 IFN $\alpha$  诱导的双链 RNA 依赖的蛋白激酶(PKR)结合的部位, 后者是 IFN $\alpha$  诱导的早期细胞内抗病毒合成反应。同时 NS5A 显示出诱导 CXC 趋化因子、白介素 - 18(IL-18), 可抵消了 IFN $\alpha$  抗病毒效应<sup>[32-33]</sup>。目前认为 NS5A 蛋白是在细胞蛋白激酶作用下发生磷酸化修饰后发挥生物调节作用的。不同磷酸化形式的 NS5A 蛋白具有反式激活作用是关于 NS5A 生物学功能研究的热点。研究发现, NS5A 片段转录激活作用最强的位点定位于 2 135 和 2 331 aa 之间。NS5A 的转录激活区域包括两个酸性氨基酸区(2 143-2 184, 2 220-2 273 aa)和一个脯氨酸富集区(2 282-2 327 aa)。酸性氨基酸区的酸性氨基酸残基的数量与 NS5A 的反式激活活性相关, 两个酸性氨基酸区是 NS5A 的转录激活作用的核心区域, 因此酸性氨基酸区的一些氨基酸的突变可明显影响 NS5A 的转录激活作用, 但是这些突变更多的是引起蛋白的二级结构的改变。Gong et al 研究发现, NS5A 能够反式激活核转录因子 NF- $\kappa$ B 及 STAT3, 在细胞炎症反应、肿瘤发生及转移过程中起重要作用。通过反式激活作用, NS5A 还可抑制细胞周期调节基因 p21WAF1 的表达, 抑制 p53 介导的对转录的反式激活作用和细胞凋亡作用<sup>[34-36]</sup>。

我实验室应用 SSH 技术对 NS5A 的反式调节基因进行了初步的研究, 筛选出了一系列已知及未知功能基因, 并把其中一个未知功能基因克隆化, 命名为 NS5ATP7。为进一步研究 NS5ATP7 的功能, 从而对 NS5A 的生理学功能有进一步的了解, 我们应用表达谱芯片技术对 NS5ATP7 的反式调节基因进行研究。

因基因表达谱芯片技术可快速有效地检测到 2 组组织或细胞基因表达谱的差异, 故在 HCV 感染及其致癌机制的研究中具有重要的应用价值。我们以 HepG2 细胞基因组 DNA 为模板, 应用聚合酶链反应技术(PCR)扩增的 NS5ATP7 基因片段, 常规分子生物学技术构建 NS5ATP7 的真核表达载体 pcDNA3- NS5ATP7, 利用脂质体转染技术转染 HepG2 细胞。从转染和非转染细胞 HepG2 种提取总 mRNA, 逆转录为 cDNA, 并进行基因芯片技术分析。结果表明, 细胞色素 P450、干扰素  $\alpha$  诱导丙型肝炎相关的微管聚集物蛋白、钾电压门通道及钾内部矫正通道 4 种基因的表达水平上调, 主要组织

相容性复合体 1、钙激活蛋白酶、蛋白激酶 C 及叶酸盐水解酶 1 等 8 种基因的表达水平下调。总之, 本研究的结果表明, NS5ATP7 对于肝细胞的基因表达谱有显著的影响, 基因芯片技术是研究反式调节基因的有效技术。他为我们进一步深入研究 NS5ATP7 的反式调节基因的功能打下了重要基础。

#### 4 参考文献

- 1 成军, 斯崇文, 刘芳华. HCV RNA 定量 PCR 检测研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 1994;21:20-23
- 2 成军. 丙型肝炎病毒基因组的翻译及其产物的加工. 国外医学·微生物学分册 1995;18:14-16
- 3 成军, 张玲霞. 抗 HCV 的基因治疗方案 - 从 HCV - 肝细胞相互作用的分子生物学机制设计. 国外医学·流行病学传染病学分册 1999;26:59-61
- 4 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎新型治疗方法的研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 1999;26:158-162
- 5 钟彦伟, 成军, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 张玲霞. 可溶性 HCV 非结构蛋白 NS3 人源单链抗体在大肠杆菌中的表达. 肝脏 1999;4:73-76
- 6 钟彦伟, 成军, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 张玲霞. HCV 非结构蛋白 NS3 人源单链抗体的筛选与鉴定. 中华传染病杂志 2000;18:84-87
- 7 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 3' - 非翻译区 RNA 结合蛋白的研究进展. 国外医学·病毒学分册 2000;7:17-21
- 8 成军, 张玲霞. 丙型肝炎病毒干扰素敏感决定区的研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 2000;27:55-58
- 9 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4A 的研究进展. 国外医学·病毒学分册 2000;7:14-17
- 10 成军, 朱传琳. 丙型肝炎病毒感染慢性化的分子生物学机制. 国外医学·病毒学分册 2000;7:29-32
- 11 钟彦伟, 成军, 施双双, 杨继珍, 董菁, 夏小兵, 李克, 刘妍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体的筛选与表达. 中华中西医杂志 2001;2:97-99
- 12 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的生物学调节作用. 国外医学·微生物学分册 2001;24:12-14
- 13 成军, 钟彦伟, 施双双, 倪勤, 刘妍, 王刚, 董菁, 夏小兵, 刘友昭, 王琳, 李克, 杨继珍, 邵得志, 陈菊梅. HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链可变区抗体基因的筛选与鉴定. 中华实验和临床病毒学杂志 2001;15:216-218
- 14 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 5' - 非翻译区及其结合蛋白的研究进展. 国外医学·微生物学分册 2001;24:7-9
- 15 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 北京: 人民军医出版社, 1997:37-42
- 16 Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001;59:1271-1276
- 17 钟彦伟, 成军, 田小军, 陈新华, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 抗原模拟表位的筛选与鉴定. 中华肝脏病杂志 2002;10:266-268
- 18 成军. 慢性丙型肝炎病毒性肝炎肝脏脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 19 Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997;71:8856-8859
- 20 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 21 刘妍, 段惠娟, 成军, 王建军, 陆荫英, 牟劲松, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活 SV40 病毒启动子的研究. 军医进修学院学报 2003;24:81-83
- 22 刘妍, 陆荫英, 成军, 王建军, 李莉, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因的克隆化研究. 解放军医学杂志 2003;28:40-43
- 23 成军. 基因芯片技术的原理及其在肝病研究中的应用. 中华肝脏病杂志 2002;10:302

- 24 Stipp D. Gene chip breakthrough. *Fortune* 1997;31:195-197
- 25 Chan K, Baker S, Kim CC. Genomic comparison of salmonella enterica serovars and salmonella bongori by Use of an S. enterica serovar typhimurium DNA microarray. *J Bacteriol* 2003;185:553-563
- 26 李瑶, 陈菊祥, 袁敏燕. 基因芯片的制备研究. 第二军医大学学报 2000;21:812-814
- 27 成军, 钟彦伟, 施双双, 王刚, 董菁, 夏小兵, 杨继珍, 陈菊梅. HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体可变区基因的筛选与鉴定. 中华微生物和免疫学杂志 2000;20:567
- 28 钟彦伟, 成军, 施双双, 杨继珍, 董菁, 夏小兵, 李克, 刘妍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体的筛选与表达. 中华中西医杂志 2001;2:97-99
- 29 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136
- 30 钟彦伟, 成军, 田小军, 陈新华, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 抗原模拟表位的筛选与鉴定. 中华肝脏病杂志 2002;10:266-268
- 31 刘妍, 陆荫英, 成军, 王建军, 李莉, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因的克隆化研究. 解放军医学杂志 2003; 28:40-43
- 32 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
- 33 Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001;75:6095-6106
- 34 Kaneda Y, Yoshida MC, Kohno K, Uchida T, Okada Y. Chromosomal assignment of the gene for human elongation factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3158-3162
- 35 Gasparini P, Calvano S, Memeo E, Bisceglia L, Zelante L. Assignment of ferritin L gene (FTL) to human chromosome band 19q13.3 by in situ hybridization. *Ann Genet* 1997;40: 227-228
- 36 Guo W, Adams V, Mason J, McCabe ER. Identification of a ferritin light chain pseudogene near the glycerol kinase locus in Xp21 by cDNA amplification for identification of genomic expressed sequences. *Biochem Mol Med* 1997;60:169-173

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

• 消息 •

## 国科技论文产出世界第五 医药卫生期刊竞争力强劲

健康报 记者张荔子 2003-12-10 报到: 这是一连串枯燥的数字, 却是大量科研人员辛勤一年的收获. 12月9日, 中国科学技术信息研究所在京发布的2002年度中国科技论文统计结果显示, 我国科技论文产出由2001年全世界第六位上升为第五位, 在世界论文总数中首次超过5%. 论文数据统计取自3种在国际上颇具影响的检索工具: 《科学引文索引》(SCI)、《工程索引》(EI)和《科学技术会议录索引》(ISTP). 2002年我国科技论文产出比2001年增长19.9%, 达77395篇, 占世界论文总数的5.37%. 排在前四位的国家依次是美国、日本、英国和德国. 我国国际论文被引用数和被引用次数也分别增长31.6%和33.3%, 其中临床医学国内论文数量和被引用次数居各学科第一, 基础医学论文在国内被引用次数排名第四. 临床医学和基础医学论文较以前都显示出更多的国际合作. 分类统计还排列出高等院校、科研机构、医疗机构各类机构论文产出和被引用情况前20位, 其中解放军总医院连续3年获国内科技论文被引用数量全国医疗机构第一名, 第四军医大学西京医院连续3年获国内科技论文数量全国医疗机构第一. 10位国际论文高产作者和高引用作者中有3位是来自上海第二医科大学的沈志祥、陈国强和牛超, 他们因在《血液》发表的论文被广泛引用而分别名列第三、六、九. 共有387种医药卫生类期刊进入今年的影响因子分类排序, 其中影响因子超过1的期刊有12种, 除《世界华人消化杂志》和《世界胃肠病学杂志》外, 其余10种均为“中华牌”期刊. 此外, 刚选出的第二届中国百种杰出学术期刊中, 19种医药卫生类期刊及其主编榜上有名. 纵观2002年中国科技论文各项统计, 可以看到中国科技论文数量和影响力水平继续保持上升趋势, 但中国与世界科技强国还有很大差距. 据《国际竞争力度报告》评价, 中国科技竞争力在49个被评价的国家和地区中处于中等偏下的水平. 据SCI统计, 中国论文平均被引用率低于世界平均水平.

# 应用表达谱芯片技术筛选NS5A TP9反式调节基因的研究

李强, 梁耀东, 成军, 王琳, 王建军, 张健, 刘妍, 程明亮

李强, 梁耀东, 成军, 王琳, 王建军, 张健, 刘妍, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
程明亮, 贵阳医学院传染科 贵州省贵阳市 550004  
李强, 男, 1969-09-10, 四川省泸州市人, 汉族, 1992年重庆医科大学本科毕业. 贵阳医学院2001级内科传染病学专业硕士研究生, 主要从事病毒性肝炎研究.  
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

## Screening of genes trans-regulated by NS5A TP9 with cDNA microarray assay

Qiang Li, Yao-Dong Liang, Jun Cheng, Lin Wang, Jian-Jun Wang, Jian Zhang, Yan Liu, Ming-Liang Cheng

Qiang Li, Yao-Dong Liang, Jun Cheng, Lin Wang, Jian-Jun Wang, Jian Zhang, Yan Liu, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China  
Ming-Liang Chen, Department of Infectious Diseases, Guiyang Medical University First Hospital, Guiyang 550004, Guizhou Province, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA.  
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn  
Received: 2003-07-12 Accepted: 2003-08-16

## Abstract

AIM: To screen the genes trans-regulated by NS5A TP9 with cDNA microarray assay.

METHODS: The recombinant expressive plasmid pcDNA 3.1(-)-NS5A TP9 was constructed, and HepG2 cells were transfected. Total mRNA was isolated from the HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1(-)-NS5A TP9, respectively. cDNA microarray was employed for detecting and analyzing of mRNA from both HepG2 cells transfected.

RESULTS: From the microarray assay, 3 genes were found up-regulated, and 13 genes down-regulated. Their encoding proteins were involved in cell signal transduction, cell proliferation, cell apoptosis and differentiation.

CONCLUSION: cDNA microarray technology is successfully used to screen diversity genes expressed by NS5A TP9 in HepG2 cells, which brings some new clues for the study of the function of NS5A TP9.

Li Q, Liang YD, Cheng J, Wang L, Wang JJ, Zhang J, Liu Y, Cheng ML. Screening of genes trans-regulated by NS5A TP9 with cDNA microarray assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):323-326

## 摘要

目的: 应用基因表达谱芯片技术研究丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活蛋白9(NS5A TP9)的反式调节基因。

方法: 构建 NS5A TP9 基因的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5A TP9, 应用基因表达谱芯片技术对 pcDNA3.1(-)-NS5A TP9 转染的 HepG2 (人肝母细胞瘤细胞系) 细胞和转染空载体 pcDNA3.1(-) 的相同细胞的差异表达 mRNA 进行检测和分析。

结果: HepG2 细胞经转染 NS5A TP9 后, 有 16 条差异基因表达水平发生显著改变, 其中 3 条基因表达增强, 13 条基因表达降低. 这些差异表达的基因与细胞的增生、分化、凋亡及细胞的信号转导密切相关。

结论: 应用基因表达谱芯片成功筛选了丙型肝炎病毒 NS5A TP9 作用 HepG2 细胞后差异表达基因, 为阐明 NS5A TP9 的作用提供了新的依据。

李强, 梁耀东, 成军, 王琳, 王建军, 张健, 刘妍, 程明亮. 应用表达谱芯片技术筛选 NS5A TP9 反式调节基因的研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):323-326  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/323.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是正链 RNA 病毒, 是慢性肝炎、肝纤维化、肝癌的病因, 而且与肝脏脂肪变、糖代谢紊乱有关. 全世界慢性感染的人数超过 1.7 亿<sup>[1]</sup>. 而病毒基因组编码的蛋白与宿主肝细胞蛋白之间的相互作用, 可能是 HCV 致病的重要分子机制. HCV 非结构蛋白 5A(HCV NS5A)基因编码蛋白除了参与 HCV 多蛋白的成熟和 RNA 的复制过程外, 还具有多种生物学功能. 不同磷酸化形式的 NS5A 蛋白具有反式激活作用, 这引起许多学者研究 NS5A 生物学功能的兴趣.

我们实验室应用抑制性消减杂交技术(SSH)及生物信息学技术, 筛选出 HCV NS5A 反式激活新型靶基因 NS5A TP9, 在 GenBank 中注册, 注册号为 AF529370. NS5A TP9 基因的编码序列全长为 336 个核苷酸(nt), 编码产物由 111 个氨基酸残基(aa)组成. 为了进一步研究 NS5A TP9 的作用, 我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)<sup>[2-3]</sup> 对于 NS5A TP9 的反式调节基因进行了筛选, 以便对这种基因的功能进行初步研究.

## 1 材料和方法

1.1 细胞培养及取材 人肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞

由本室保存, 细胞培养相关试剂及总 RNA 提取试剂 Trizol 均购自 Gibco 公司, NS5ATP9 真核表达质粒由本室构建. 在 35 mm 培养皿中常规培养 HepG2 细胞, 细胞生长至对数期时, 分别以脂质体转染试剂 FuGENE 将 2  $\mu$ g pcDNA3.1(-)-NS5ATP9 和空载体 pcDNA3.1(-) 转染 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞, 每  $5 \times 10^6$  个细胞加入 1 mL Trizol 试剂, 立即于液氮中保存.

1.2 总 RNA 提取 使用 Trizol 试剂一步法提取 NS5ATP9 表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS5ATP9 和空载体 pcDNA3.1(-) 转染的 HepG2 细胞总 RNA (分别标记为实验组和对照组), 样品经分光光度计检测吸光度 A 值, 并行热稳定实验, 于  $-20^\circ\text{C}$  和  $70^\circ\text{C}$  保温 1 h 后, 经琼脂糖凝胶电泳检测 28S、18S 条带变化.

1.3 探针标记 参照 Schena et al<sup>[4]</sup> 方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA (5  $\mu$ g), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA (5  $\mu$ g). 乙醇沉淀后溶解在 20  $\mu$ L  $5 \times \text{SSC} + 0.2\%$  SDS 杂交液中.

1.4 芯片制备 芯片包含的 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因、抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000-3 000 bp. 靶基因以 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L 溶解于  $3 \times \text{SSC}$  溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合 (2 h)、室温干燥 (30 min), 紫外线交联, 再分别用 0.2% SDS、水及 0.2% 的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用.

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

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

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

## 2 结果

2.1 总 RNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度  $A_{260}/A_{280} > 1.92$ , 热稳定实验  $70^\circ\text{C}$  保温 1 h 与  $-20^\circ\text{C}$  1 h 的

电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA.

2.2 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有 1 152 个 cDNA. 为了监控芯片杂交体系, 在芯片上设置了阴性对照 (8 条水稻基因, 共 8 个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记 Cy5 荧光素 (呈红色), 对照组探针标记 Cy3 荧光素 (呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 按阳性标准, 从 1 152 个基因中筛选出差异表达基因共 16 条, 占 1.4%, 其中 3 条基因表达增强, 13 条基因表达降低.

2.3 差异表达基因分析 表达增强的基因有 3 条, 见表 1. 表达降低的基因有 13 条, 见表 2.

表 1 表达显著增加的基因

编号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NY 肾癌抗原 -62(NY-REN-62)	2.023
2	脆性 X 综合征 1(FMR1)	2.144
3	硫氧还蛋白还原酶(TXNRD1)	2.174

表 2 表达显著降低的基因

编号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	核因子 $\kappa$ B 轻链多肽增强子 1(NFKB1)	0.250
2	亲代谢性谷氨酸盐受体 7 型 GRM7	0.327
3	TU3A 蛋白(TU3A)	0.331
4	核糖核苷酸还原酶 M2 多肽(RRM2)	0.345
5	未知 KIAA0668 蛋白	0.349
6	未知 FLJ21985	0.371
7	细胞分化相关 ATP 结合蛋白(APACD)	0.377
8	甲状旁腺激素应答骨肉瘤 B1 蛋白(B1)	0.400
9	金属蛋白酶的抑制因子 1(TIMPI)	0.419
10	谷胱甘肽过氧化物酶 1(GPX1)	0.422
11	细胞色素 P450 亚目 2 多肽 6(CYP2D6)	0.427
12	GGI99 蛋白(LOC51637)	0.473
13	4-氨基丁酸氨基转移酶(ABAT)	0.493

## 3 讨论

丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活蛋白 9 是 NS5A 的反式激活新型靶基因编码的蛋白, 研究他的功能对理解 NS5A 蛋白的作用具有重要意义. 丙型肝炎病毒编码的 NS5A 蛋白对 HCV 感染与肝纤维化及肝细胞癌的发生密切相关. HCV NS5A 位于 HCV 多蛋白的羧基末端, 是丝氨酸磷酸化蛋白质, 依磷酸化程度的不同而产生两种不同分子量大小的多肽 p56 和 p58. Kato et al<sup>[5-6]</sup> 研究发现, NS5A 是转录反式激活因子, 其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸, 这是真核细胞转录因子特有的结构特征, 但是其参与细胞转录调节的机制仍不十分

清楚. 由于NS5A表现出对抗干扰素 $\alpha$ (IFN $\alpha$ )的治疗效应而引起人们广泛的关注, NS5A能够与肝细胞中的IFN刺激蛋白-双链RNA依赖的激酶(PKR)相互作用, 抑制PKR的功能, 从而下调IFN刺激的抗病毒效应<sup>[7-8]</sup>.

基因表达谱芯片是将大量的基因特异的探针或其cDNA片段固定在一块基因芯片上, 对来源不同的个体、不同组织、不同细胞周期、不同发育阶段、不同分化阶段、不同病变、不同刺激(包括不同诱导、不同治疗手段)下的细胞内的mRNA或逆转录产物cDNA进行检测, 从而大规模对这些基因表达的个体特异性、组织特异性、发育阶段特异性、分化阶段特异性、病变特异性、刺激特异性进行综合分析和判断, 本研究应用基因表达谱芯片NS5ATP9对HepG2细胞基因表达谱差异的检测, 发现16个差异表达的基因, 表达增强的基因有3条. 表达降低的基因有13条. 表达变化显著的基因, 涉及细胞信号传导、免疫调节、炎症反应、肿瘤的发生、能量代谢等生物过程, 说明NS5ATP9具有多种生物学调节功能.

分析表达增强的基因, NY-REN-62与人肿瘤自身抗体IgG有关, FMR1基因变异可导致精神发育迟缓脆性X染色体综合征, 表现为中\重度发育迟缓, 大耳, 颌隆凸, 高声调等症状.TXNRD1是硫氧还蛋白家族的成员. 此蛋白准确功能还未知, 但他与细胞分化有关. 表达降低的基因主要有: NF- $\kappa$ B在生理和病理状态下表达的细胞因子、趋化因子、生长因子、细胞黏附分子和急性时相蛋白都能检测到. 能被细胞因子、氧自由基、吸入颗粒、紫外线照射、细菌及病毒产物激活. 异常激活后相关炎症因子与自身免疫关节炎、哮喘、感染性休克、肺纤维症、肾小球肾炎、动脉粥样硬化的发生有关. 相反, 完全持续的抑制直接与凋亡、异常免疫细胞的发育有关系<sup>[9-17]</sup>. L-谷氨酸盐是中枢神经系统主要兴奋神经递质, 激活亲代谢性谷氨酸盐受体. 谷氨酸神经递质参与正常脑功能的许多方面活动, 干扰神经病理发生过程<sup>[18-21]</sup>. CYP2D6基因编码细胞色素P450超家族酶. 细胞色素P450蛋白是单加氧酶, 参与药物代谢, 胆固醇、类固醇、脂类合成. 他位于内质网, 通常药物代谢的20%由他完成<sup>[22-24]</sup>. 4-氨基丁酸氨基转移酶(ABAT)对 $g$ -氨基丁酸起分解代谢的作用, 抑制神经递质转化为琥珀酸半醛. ABAT cDNA编码500个氨基酸蛋白. 大约人类1/3的突触能检测到GABA. ABAT在肝、脑受2个共显性等位基因的调控. ABAT缺乏型包括精神发育迟缓, 张力减退, 反射亢进, 嗜睡, 癫痫发作, EEG异常<sup>[25-27]</sup>. TIMP1编码蛋白是基质金属蛋白酶的天然抑制因子. 这个基因位于突触蛋白I基因的内含子6区, 进行反转录. TIMP1在转录水平上应答细胞因子和激素的诱导分子. 而且, 一些未完全失活的X染色体表达提示: 这个基因的灭活方式在女性中是多种多样的<sup>[28-31]</sup>. 这些提示NS5ATP9作用是相当复杂的.

因基因表达谱芯片技术可快速有效地检测到两组组

织或细胞基因表达谱的差异, 故在HCV感染及其致癌机制的研究中具有重要的应用价值. 本实验我们用分子生物学技术构建了NS5ATP9的真核表达载体pcDNA3.1(-)-NS5ATP9, 并用空载体作为阴性对照, 利用脂质体转染HepG2细胞, 之后从中提取总RNA, 逆转录为cDNA, 进行基因芯片技术分析. 结果表明, 这些基因包括细胞生长、细胞凋亡、信号转导、免疫调节、肿瘤发生等基因. 我们下一步将对这一未知蛋白进行更深入的研究. 总之, 本研究的结果表明, NS5ATP9对于肝细胞的基因表达谱有显著的影响, 他为我们进一步深入研究NS5ATP9的功能奠定基础.

#### 4 参考文献

- Shiratori Y, Shiina S, Imamura M, Kato N, Kanai F, Okudaira T, Teratani T, Tohgo G, Toda N, Ohashi M. Characteristic difference of hepatocellular carcinoma between hepatitis B and C-viral infection in Japan. *Hepatology* 1995;22:1883-1885
- Stipp D. Gene chip breakthrough. *Fortune* 1997;31:195-197
- Chan K, Baker S, Kim CC. Genomic comparison of salmonella enterica serovars and salmonella bongori by Use of an S. enterica serovar typhimurium DNA microarray. *J Bacteriol* 2003;185:553-563
- Schena M, Shalon D, Dais RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-470
- Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997;71:8856-8859
- Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 北京: 人民军医出版社, 1997:37-42
- Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001;59:1271-1276
- Meyer R, Hatada EN, Hohmann HP, Haiker M, Bartsch C, Rothlisberger U, Lahm HW, Schlaeger EJ, van Loon AP, Scheidereit C. Cloning of the DNA-binding subunit of human nuclear factor kappa B: the level of its mRNA is strongly regulated by phorbol ester or tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:966-970
- Liptay S, Schmid RM, Perkins ND, Meltzer P, Altherr MR, McPherson JD, Wasmuth JJ, Nabel GJ. Related subunits of NF-kappa B map to two distinct loci associated with translocations in leukemia, NFKB1 and NFKB2. *Genomics* 1992;13:287-292
- Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-683
- Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999;45:7-17
- Cahir-McFarland ED, Davidson DM, Schauer SL, Duong J, Kieff E. NF-kappa B inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein-Barrvirus-transformed lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:6055-6060
- Nemeth ZH, Deitch EA, Szabo C, Fekete Z, Hauser CJ, Hasko G. Lithium induces NF-kappa B activation and interleukin-8 production in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002;277:7713-7719
- Narayanan K, Seufzer BJ, Brockman-Schneider RA, Gern JE, Balakrishnan A, Miyamoto S. CD14-dependent activation of NF-kappaB by filarial parasitic sheath proteins. *Cell Biol Int* 2002;26:43-54

- 16 Liu L, Eby MT, Rathore N, Sinha SK, Kumar A, Chaudhary PM. The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein physically associates with and persistently activates the I $\kappa$ B kinase complex. *J Biol Chem* 2002;277:13745-13751
- 17 Bottex-Gauthier C, Pollet S, Favier A, Vidal DR. The Rel/NF-kappa-B transcription factors: complex role in cell regulation. *Pathol Biol (Paris)* 2002;50:204-211
- 18 Okamoto N, Hori S, Akazawa C, Hayashi Y, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction. *J Biol Chem* 1994;269:1231-1236
- 19 Scherer SW, Duvoisin RM, Kuhn R, Heng HH, Belloni E, Tsui LC. Localization of two metabotropic glutamate receptor genes, GRM3 and GRM8, to human chromosome 7q. *Genomics* 1996;31:230-233
- 20 Makoff A, Pilling C, Harrington K, Emson P. Human metabotropic glutamate receptor type 7: molecular cloning and mRNA distribution in the CNS. *Brain Res Mol Brain Res* 1996;40:165-170
- 21 Flor PJ, Van Der Putten H, Ruegg D, Lukic S, Leonhardt T, Bence M, Sansig G, Knopfel T, Kuhn R. A novel splice variant of a metabotropic glutamate receptor, human mGluR7b. *Neuropharmacology* 1997;36:153-159
- 22 Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA. Gonzalez the human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am J Hum Genet* 1989;45:889-904
- 23 Chinta SJ, Pai HV, Upadhyay SC, Boyd MR, Ravindranath V. Constitutive expression and localization of the major drug metabolizing enzyme, cytochrome P4502D in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;103:49-61
- 24 Bapiro TE, Hasler JA, Ridderstrom M, Masimirembwa CM. The molecular and enzyme kinetic basis for the diminished activity of the cytochrome P450 2D6.17 (CYP2D6.17) variant. Potential implications for CYP2D6 phenotyping studies and the clinical use of CYP2D6 substrate drugs in some African populations. *Biochem Pharmacol* 2002;64:1387-1398
- 25 Jaeken J, Casaer P, de Cock P, Corbeel L, Eeckels R, Eggermont E, Schechter PJ, Brucher JM. Gamma-aminobutyric acid-transaminase deficiency: a newly recognized inborn error of neurotransmitter metabolism. *Neuropediatrics* 1984;15:165-169
- 26 De Biase D, Barra D, Simmaco M, John RA, Bossa F. Primary structure and tissue distribution of human 4-aminobutyrate aminotransferase. *Eur J Biochem* 1995;227:476-480
- 27 Medina-Kauwe LK, Tobin AJ, De Meirleir L, Jaeken J, Jakobs C, Nyhan WL, Gibson KM. 4-Aminobutyrate aminotransferase (GABA-transaminase) deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1999;22:414-427
- 28 Carmichael DF, Sommer A, Thompson RC, Anderson DC, Smith CG, Welgus HG, Stricklin GP. Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2407-2411
- 29 Anderson CL, Brown CJ. Polymorphic X-chromosome inactivation of the human TIMP1 gene. *Am J Hum Genet* 1999;65:699-708
- 30 Hoashi T, Kadono T, Kikuchi K, Etoh T, Tamaki K. Differential growth regulation in human melanoma cell lines by TIMP-1 and TIMP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:371-379
- 31 Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002;277:11069-11076

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

• 消息 •

## 2002 年度医学 SCI 论文的高产机构

排名	单位	论文篇数	排名	单位	论文篇数
1	北京大学	108	11	中山大学	38
2	复旦大学	86	12	第四军医大学西京医院	37
3	中科院上海生命科学院	79	13	第二军医大学	33
4	浙江大学	61	14	中南大学	32
5	中山大学附 1 院	52	15	北京大学附 1 院	30
6	解放军总医院	50	15	沈阳药科大学	30
7	上海第二医科大学瑞金医院	46	15	四川大学	30
8	中国药科大学	44	18	复旦大学中山医院	29
9	第四军医大学	39	19	四川大学华西医院	28
9	华中科技大学同济医院	39	20	第一军医大学南方医院	26

中国科学技术信息研究所 2003-12-09 发布 2002 年度中国科技论文统计结果

# 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒反式调节靶基因的抑制性 消减杂交和基因芯片分析结果的比较

成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 王琳

成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 王琳, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治重点实验室  
北京市 100039

成军, 男, 1963-08-17 生, 山东省淄博市人, 汉族. 1986 年毕业于第一军医大学军医系, 获医学学士学位, 1989 年毕业于军医进修学院, 获传染病学硕士学位, 1994 年毕业于北京医科大学, 获传染病学博士学位, 1994-11-17/1997-12-01 在美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病学完成博士后研究, 主任医师. 回国后从事传染病特别是病毒性肝炎的临床工作和基础研究, 主要学术研究方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制. 国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

## Comparisons of differentially expressed genes transactivated by hepatitis B and C viral proteins using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray techniques

Jun Cheng, Yan Liu, Yuan Hong, Jian-Jun Wang, Qian Yang, Lin Wang

Jun Cheng, Yan Liu, Yuan Hong, Jian-Jun Wang, Qian Yang, Lin Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Supported by Grants from National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C39900130 and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038. Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn  
Received: 2003-07-12 Accepted: 2003-08-16

## Abstract

**AIM:** To clone and identify human genes transactivated by hepatitis B and C viral proteins via construction of a cDNA subtractive library with suppression subtractive hybridization (SSH) technique and cDNA microarray techniques.

**METHODS:** Suppression subtractive hybridization (SSH) and cDNA microarray techniques were used for screening and cloning of the target genes transactivated by hepatitis B and C viral proteins. The mRNA was isolated from HepG2 cells transfected recombinant vector expressing hepatitis B and C viral proteins and pcDNA3.1(-) empty vector, respectively. SSH and cDNA microarray were employed to analyze the differentially expressed DNA sequence between the two groups. In SSH assay, after restriction enzyme Rsa I digestion, small sizes of cDNAs were obtained. Then

tester cDNA was divided into two groups and ligated to the specific adaptor 1 and adaptor 2, respectively. After tester cDNA was hybridized with driver cDNA twice and underwent two times of nested PCR and then was subcloned into T/A plasmid vectors to set up the subtractive library. Amplification of the library was carried out with *E. coli* strain JM109. The cDNA was sequenced and analyzed in GenBank with Blast search after PCR.

**RESULTS:** The subtractive library of genes transactivated by hepatitis B and C viral proteins was constructed successfully. The up-regulated and down-regulated genes from cDNA microarray assay was conducted for each of the hepatitis B and C viral proteins. The results were compared.

**CONCLUSION:** The obtained sequences may be target genes transactivated by hepatitis B and C viral proteins, among which some genes coding proteins involve cell cycle regulation, signal transduction, tumor immunity and development, and apoptosis.

Cheng J, Liu Y, Hong Y, Wang JJ, Yang Q, Wang L. Comparisons of differentially expressed genes transactivated by hepatitis B and C viral proteins using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray techniques. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):327-331

## 摘要

**目的:** 筛选与克隆 HBV 和 HCV 蛋白反式调节靶基因, 阐明 HBV 和 HCV 感染后慢性肝脏疾病的发病机制。

**方法:** 应用抑制性消减杂交(SSH)技术及表达谱基因芯片(cDNA microarray)技术筛选并克隆 HBV 和 HCV 蛋白反式调节的靶基因。以 HBV 和 HCV 蛋白的表达质粒转染 HepG2 细胞, 以空载体 pcDNA3.1(-) 为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取 mRNA 并逆转录为 cDNA, 经 Rsa I 酶切后, 将实验组 cDNA 分成两组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与对照组 cDNA 进行 2 次消减杂交及 2 次抑制性聚合酶链反应(PCR), 将产物与 T/A 载体连接, 构建 cDNA 消减文库, 并转染大肠杆菌进行文库扩增, 随机挑选克隆 PCR 扩增后进行测序及同源性分析。同时进行表达谱基因芯片技术分析。

**结果:** 成功构建人 HBV 和 HCV 蛋白反式调节基因差异表达的 cDNA 消减文库, 对 HBV 和 HCV 蛋白反式调节的靶基因同时进行基因表达谱芯片的分析。在 SSH 分析中, 文库扩增后均得到 200-800 bp 插入片段。对插入片段测序, 并通过生物信息学分析获得其全长基因序列。对于不同的肝炎病毒蛋白反式调节的靶基因类型, 以及不同的分析技术研究

的结果进行比较分析,发现了一系列的共同调节的靶基因,说明不同的肝炎病毒蛋白反式调节具有共同的作用途径。

结论:筛选到的反式调节靶基因,包括一些与细胞生长调节、信号转导、肿瘤免疫发生及细胞凋亡密切相关的蛋白编码基因,推测了HBV和HCV蛋白可能存在的调控机制,有助于阐明HBV和HCV蛋白的反式调节在慢性肝脏疾病的发生发展中的作用。

成军,刘妍,洪源,王建军,杨倩,王琳.乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒反式调节靶基因的抑制性消减杂交和基因芯片分析结果的比较.世界华人消化杂志 2004;12(2):327-331

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/327.asp>

## 0 引言

引起慢性病毒性肝炎和终末性肝病(ESLD)的肝炎病毒主要包括乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)<sup>[1]</sup>.肝炎病毒感染肝细胞之后,在肝细胞中完成复制和表达的生活周期,翻译而成的肝炎病毒蛋白除了完成病毒颗粒自身的装配之外,在肝细胞中会产生一系列的生物学效应<sup>[2]</sup>.一方面作为机体免疫系统识别的靶抗原,使得肝炎病毒感染的靶细胞转变成成为机体免疫系统识别和攻击的对象,这是慢性病毒性肝炎发病的基本过程和基本机制<sup>[3]</sup>.其次,肝细胞中的肝炎病毒蛋白,不是孤立存在的,或者是与其自身结合,形成同二聚体结构,或者与肝细胞中的蛋白结合形成异二聚体,甚至是多聚体形式,改变肝细胞中蛋白激酶的活性或者酶活性底物的性质<sup>[4]</sup>.第三,有些肝炎病毒蛋白,在翻译之后,可以发生细胞内转位,在肝细胞核中分布的肝炎病毒蛋白不少具有直接的DNA结合活性,对于肝细胞的基因启动子序列产生直接的影响,或者在肝细胞核中,与转录因子蛋白结合,间接影响肝细胞的基因转录过程<sup>[5]</sup>.肝炎病毒蛋白通过蛋白与蛋白之间的结合,通过对肝细胞基因组表达谱的调节,影响肝细胞本身正常的代谢和信号转导途径,进而影响肝细胞的细胞周期、细胞凋亡、细胞的恶性转化等过程<sup>[6]</sup>.

无论是直接还是间接形式,肝炎病毒蛋白对于肝细胞基因表达谱的影响是肝炎病毒感染导致各种肝脏病变的基本机制,因此,对于肝炎病毒蛋白的反式调节作用的机制研究显得非常重要<sup>[7]</sup>.近年来差异显示技术的出现和发展,大大促进了慢性病毒性肝炎及其相关疾病机制的研究进展,从目前的研究结果来看,DNA芯片(DNA chip)、抑制性消减杂交(SSH, suppression subtractive hybridization)是研究肝炎病毒蛋白反式调节作用靶基因的有效技术类型<sup>[8-10]</sup>.我们选择了HBV基因组编码的截短型表面抗原中蛋白(MHBst)<sup>[11]</sup>、X蛋白(HBxAg)<sup>[12]</sup>、HCV基因组编码的核心蛋白(core)<sup>[13]</sup>、非结构蛋白3(NS3)<sup>[14]</sup>、非结构蛋白5A(NS5A)<sup>[15]</sup>等5种肝炎病毒的反式调节蛋白,利用基因芯片和SSH技术同时进行研究,对肝炎病毒蛋白反式调节作用的靶基

因,以及研究肝炎病毒蛋白反式调节作用的分子生物学技术进行了比较研究。

## 1 材料和方法

1.1 反式调节作用肝炎病毒蛋白表达载体的构建 表达MHBst的真核表达载体pcDNA3.1(-)-MHBst<sup>[16]</sup>、表达X蛋白的真核表达载体pcDNA3.1(-)-HBxAg<sup>[17]</sup>、表达HCV核心蛋白的真核表达载体pcDNA3.1(-)-core<sup>[18]</sup>、表达HCV非结构蛋白3的真核表达载体pcDNA3.1(-)-NS3<sup>[19]</sup>、表达HCV非结构蛋白5A的真核表达载体pcDNA3.1(-)-NS5A<sup>[20]</sup>,由本基因治疗研究中心构建。

1.2 基因芯片分析技术<sup>[16]</sup> 人肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞由本室保存,细胞培养相关试剂及总RNA提取试剂Trizol均购自Gibco公司,真核表达质粒由本室构建.在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞,细胞生长至对数期时,分别以脂质体转染试剂FuGENE将2 μg载体质粒转染HepG2细胞,48 h后收获细胞,每5 × 10<sup>6</sup>个细胞加入1 mL Trizol试剂,立即于液氮中保存。

使用Trizol试剂一步法提取表达质粒和空载体转染的HepG2细胞总RNA(分别标记为实验组和对照组),样品经分光光度计检测吸光度A值,并行热稳定实验,于-20 °C和70 °C保温1 h后,经琼脂糖凝胶电泳检测28 S、18 S条带变化。

参照Schena et al方法逆转录标记cDNA探针并纯化.Cy3-dUTP标记对照组细胞mRNA(5 μg),Cy5-dUTP标记实验组细胞mRNA(5 μg).乙醇沉淀后溶解在20 μL 5 × SSC+0.2% SDS杂交液中。

芯片包含的1 152个cDNA由上海联合基因有限公司提供,包括原癌基因、抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等.以通用引物进行PCR扩增,PCR产物长度为1 000-3 000 bp.靶基因以0.5 μg/μL溶解于3 × SSC溶液中,用Cartesian公司的Cartesian 7 500点样仪及TeleChem公司的硅烷化玻片进行点样.玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min),紫外线交联,再分别用0.2% SDS、水及0.2%的硼氢化钠溶液处理10 min,晾干备用。

将预杂交液放入95 °C水浴锅内变性2 min,将待预杂交的芯片放入95 °C水浴锅内变性30 s,芯片取出后即放入无水乙醇中30 s,晾干.将已变性的预杂交液加到芯片的点样区域内,盖上盖玻片,放入杂交箱内42 °C预杂交5-6 h。

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

用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点)对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3>2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3<0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

1.3 抑制性消减杂交技术的分析<sup>[6]</sup> 用FuGENE6 转染试剂将表达载体及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞. 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析. 用 Clontech 公司的 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 中的试剂, 以获得的 mRNA 为模板逆转录合成 cDNA.

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

扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 JM109 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 °C 培养 18 h. 挑取白色菌落, 增菌, 以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增, 证明含有插入片段后(100-1 000 bp), 测序(上海申友公司). 应用生物信息学将测得序列 GenBank 数据库进行同源性分析.

1.4 生物信息学技术分析与新基因的克隆化<sup>[17-18]</sup> 对于阳性克隆插入的 DNA 片段进行序列测定, 并通过在线软件进行生物信息学分析.

## 2 结果

2.1 在 SSH 分析中 5 种肝炎病毒蛋白共同调节的靶基因的类型 应用 SSH 技术对于 5 种肝炎病毒蛋白的反式调节基因进行筛选, 分别获得了一系列的反式调节靶基因. 对于各种肝炎病毒蛋白反式调节基因进行对比分析, 发现 6 种基因至少受到 3 种肝炎病毒蛋白的反式调节. 包括核糖体蛋白(RP)、NADH 脱氢酶、真核翻译延伸因子、纤维连接蛋白(Fn)、磷脂酶 A2(PPA2)、真核翻译启动因子等(表 1).

2.2 在基因芯片分析中 5 种肝炎病毒蛋白共同调节的靶基因的类型 在基因芯片研究中, 发现 RET、FAP48、MDM4、PRKAR2B、KCNJ3 等基因类型至少受到 2 种肝炎病毒的反式调节(表 2).

表 1 5 种肝炎病毒反式调节蛋白靶基因的 SSH 分析

	RP	NADH 脱氢酶	真核翻译延伸因子	Fn	PPA2	真核翻译启动因子
MHBst	+	+	+	+	+	+
X	+	+				+
Core	+	+	+	+		+
NS3	+		+		+	
NS5A	+			+	+	+

表 2 5 种肝炎病毒反式调节蛋白靶基因的基因芯片分析

	RET	FAP48	MDM4	PRKAR2B	KCNJ3
MHBst	+	+	+		
X	+	+	+	+	+
Core	+		+	+	+
NS3		+	+		
NS5A	+		+		

2.3 基因芯片技术与 SSH 筛选得到的结果的重叠 对于 5 种肝炎病毒反式调节作用蛋白的 SSH 和表达谱基因芯片技术分析结果进行比较研究, 发现一些共同的反式调节靶基因. 2 种技术同时发现的反式调节基因类型包括: MHBst 调节原癌基因 c-myc、HBxAg 蛋白反式调节 S-100 钙结合蛋白 A11、HCV 核心蛋白反式调节、HCV NS3 蛋白反式调节真核翻译延伸因子 2(EEF2)、HCV NS5A 蛋白反式调节新基因序列 KIAA1641 等.

2.4 新基因的克隆化 在本项研究中, 还发现了一系列的未知功能基因, 如 MHBst 反式调节基因 TTP1, HBxAg 蛋白反式调节基因 XTP1、XTP3、XTP4、XTP5、XTP6、XTP7、XTP8、XTP9、XTP10, HCV 核心蛋白反式调节基因 TAHCCP1、TAHCCP2、TAHCCP4, HCV NS3 蛋白反式调节基因 NS3TP1、NS3TP2、NS3TP6, HCV NS5A 蛋白反式调节基因 NS5ATP1、NS5ATP3、NS5ATP4、NS5ATP5、NS5ATP6、NS5ATP7、NS5ATP9、NS5ATP10、NS5ATP11、NS5ATP13 等<sup>[19-30]</sup>.

## 3 讨论

关于 SSH 和基因芯片分析技术的价值的评价, 认为目前这 2 种技术都是研究反式调节作用的重要技术类型, 至少在相当长的一段时间内, 2 种技术都有重要的应用前景, 不可相互替代. SSH 技术由于对于筛选的对象没有先决条件, 因此可以筛选到一些未知基因. 但是由于 SSH 技术的局限性, 一次 SSH 技术分析不可能将所有的反式调节基因一网打尽. 因此, SSH 结果具有相当的或然性. 表达谱基因芯片研究虽然可以进行高通量筛选, 但是却受到芯片容量的限制. 对于人类基因组编码基因数量估计目前仍然有争议, 但是不管是 3-6 万个还是 10 万个, 我们应用的 1 152 点的基因芯片的容量仍然是全部基因的一小部分. 这样的基因芯片分析结果

会漏掉大部分的基因. 虽然SSH和基因芯片技术的特点和明显的局限性, 但是这2种技术在肝炎病毒蛋白反式调节作用研究中仍然具有十分重要的应用前景<sup>[31-34]</sup>. Miyasaka et al<sup>[35]</sup>采用SSH技术, 对于HCC和非HCC组织中基因表达差异进行了筛选. 从中鉴定出7种已知功能基因: 局灶黏附激酶、结肠癌缺失基因、鸟嘌呤结合抑制蛋白 $\alpha$ 、谷酰胺合成酶、鸟氨酸氨基转移酶、M130和胃蛋白酶原C, 以及2种在HCC组织中过表达的新基因. 只有一种基因(decorin)在HCC中的表达水平下调. 建立了定量RT-PCR对于这些基因的表达水平进行检测, 证实了这些基因在实验组HCC组织和其他HCC组织中高表达. Patzwahl et al<sup>[36]</sup>对于HCV感染肝组织的基因表达谱变化进行了研究. 发现一些基因的表达水平有显著改变: IFN $\gamma$ 诱导的趋化因子IP-10、IFN $\alpha/\beta$ 诱导的MxA基因、IFN $\alpha/\beta$ 诱导的p44、IFN $\alpha/\beta/\gamma$ 诱导的IFI-56K基因等. 因此, 我们和其他的研究者的结果都表明, 在肝炎病毒以及病毒性肝炎研究中, SSH和表达谱基因芯片技术都是重要的技术类型<sup>[37-44]</sup>.

关于肝炎病毒调节共同机制问题的研究十分重要. HBV和HCV分属于DNA和RNA病毒, 引起肝脏疾病的分子生物学机制不尽相同, 但是, 引起的慢性病毒性肝炎、肝硬化、肝细胞癌的特点却十分相似, 因此我们不能不重视不同肝炎病毒引起肝脏疾病的共同的机制途径. 在本项研究中, 我们不仅发现了不同的肝炎病毒蛋白反式调节相同的靶基因, 而且利用不同的差异显示技术, 同时证实了对于相同基因的反式调节作用. 研究的5种肝炎病毒反式调节作用蛋白都对于核糖体蛋白(RP)的基因具有反式调节作用, 或者一种基因受到大多数肝炎病毒蛋白的反式调节, 另外也发现在SSH和基因芯片研究中都能发现MHBst调节原癌基因c-myc、HBxAg蛋白反式调节S-100钙结合蛋白A11、HCV NS3蛋白反式调节真核翻译延伸因子2(EEF2)、HCV NS5A蛋白反式调节新基因序列KIAA1641等. 因此, 从这些反式调节作用的共同特点方面, 也可以推测肝炎病毒蛋白反式调节作用的基本情况和机制.

SSH和基因芯片技术分析也是发现肝炎病毒蛋白调节新基因的重要研究思路. 基因芯片研究的结果, 受到基因芯片容量及选择对象的限制, 但是如果将一些推测的未知功能基因做成基因芯片, 就可以发现新的基因. SSH技术分析的结果因为是随机的, 对于所克隆的基因对象没有先决条件, 而且近年来SSH技术的改进, 通过对于低丰度基因的扩增, 不仅可以克隆到丰度较高的基因, 也可以克隆到丰度较低的基因<sup>[45-55]</sup>. 由于SSH基因的操作的随意性和效率方面的限制, 不可能一次实验操作把所有的基因都筛选到, 但是可以筛选到任何表达类型的基因. 所以, 这2种技术对于发现新的反式调节的新基因类型都是适用的. 我们在本项研究中克隆了一系列的肝炎病毒反式作用的靶基因, 说明了SSH和基因芯片技术在克隆反式调节作用新基因研

究中的重要应用前景. 但是必须指出, 无论是SSH还是基因芯片技术, 除了存在前面讨论的假阴性之外, 都存在一定比例的假阳性, 因此还必须结合其他类型的分析技术进行甄别. 我们利用启动子指导的报告基因的表达载体的构建以及真核细胞共转染技术的分析, 证实了大部分的SSH和基因芯片的分析结果都是比较可靠的. 这一点特别令人鼓舞. 相信SSH和基因表达谱芯片技术, 随着技术本身的不断改进, 将会在肝炎病毒蛋白的反式调节作用的研究中发挥更大的作用.

#### 4 参考文献

- 1 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 2 成军, 李莉. 清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制. 世界华人消化杂志 2002;10:73-76
- 3 成军. 慢性丙型肝炎肝脏脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 4 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:472-474
- 5 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 肿瘤抑制因子p21/waf1与肝炎病毒复制与表达的调节研究. 世界华人消化杂志 2003;11:469-471
- 6 成军. 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制. 世界华人消化杂志 2003;11:880-889
- 7 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 8 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林. 抑制性消减杂交技术原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:456-458
- 9 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. 世界华人消化杂志 2003;11:461-463
- 10 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 生物信息学技术与新基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:474-477
- 11 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:217-219
- 12 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒X基因酵母表达载体的构建与表达. 世界华人消化杂志 2002;10:15-18
- 13 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白A1结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 14 牟劲松, 刘妍, 王刚, 成军, 段惠娟, 李克, 陆荫英, 王琳, 王惠芬. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3反式激活的相关基因. 世界华人消化杂志 2003;11:399-403
- 15 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式调节基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:939-942
- 16 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. 世界华人消化杂志 2003;11:394-398
- 17 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因和蛋白的生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2003;11:378-384
- 18 成军. 新基因结构与功能研究的策略. 世界华人消化杂志 2003;11:373-377
- 19 王刚, 刘妍, 牟劲松, 洪源, 邵得志, 张耀新, 李莉, 成军. 大鼠肝再生相关基因LRRP1的克隆化. 世界华人消化杂志 2002;10:165-168
- 20 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L, Chen JM. Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein-a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2003; 9:300-303
- 21 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选Hcbp6结合的肝细胞蛋白编码基因. 世界华人消化杂志 2003;11:385-388
- 22 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源,

- 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001; 9:1379-1383
- 23 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 10 的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11:935-938
- 24 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白反式调节基因. 世界华人消化杂志 2003;11:920-924
- 25 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 反式调节靶基因. 世界华人消化杂志 2003;11:930-934
- 26 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因 10 的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11: 925-929
- 27 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:943-946
- 28 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调 NIP3 基因表达研究. 世界华人消化杂志 2003;11:951-954
- 29 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调细胞周期调节蛋白 Wee1 基因表达研究. 世界华人消化杂志 2003;11:947-950
- 30 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 杨艳杰, 张树林. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调层粘连蛋白 B1 链基因表达. 世界华人消化杂志 2003;11: 955-958
- 31 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒 NS2 基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132
- 32 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:426-429
- 33 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBcAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:422-425
- 34 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- 35 Miyasaka Y, Enomoto N, Nagayama K, Izumi N, Marumo F, Watanabe M, Sato C. Analysis of differentially expressed genes in human hepatocellular carcinoma using suppression subtractive hybridization. *Br J Cancer* 2001;85:228-234
- 36 Patzwahl R, Meier V, Ramadori G, Mihm S. Enhanced expression of interferon-regulated genes in the liver of patients with chronic hepatitis C virus infection: detection by suppression-subtractive hybridization. *J Virol* 2001;75:1332-1338
- 37 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:213-215
- 38 钟彦伟, 成军, 王刚, 洪源, 陈菊梅. 肝炎病毒基因工程抗体的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:219-221
- 39 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. 世界华人消化杂志 2002;10:161-164
- 40 陆荫英, 李克, 刘妍, 王琳, 成军, 张玲霞. 乙型及丙型肝炎病毒受体的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:211-213
- 41 成军, 董菁, 刘妍, 李莉, 斯崇文, 王勤环, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒准种研究的临床意义. 世界华人消化杂志 2002;10:209-211
- 42 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136
- 43 洪源, 成军, 董菁, 李克, 王琳, 王刚, 刘妍. 乙型肝炎病毒 HBsAg 重组疫苗与表面抗原 DNA 疫苗诱导 H-2<sup>b</sup> 小鼠免疫应答的实验研究. 世界华人消化杂志 2002;10:137-140
- 44 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙肝病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:765-769
- 45 钟彦伟, 成军, 蔡炯, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 抗独特型人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. 世界华人消化杂志 2002;10:897-901
- 46 李莉, 成军, 李梵, 王建军, 张健, 吴勤, 韩萍, 陈国凤, 纪冬, 李克. 慢性丙型肝炎病毒性肝炎脂肪变的临床与病理学特点. 世界华人消化杂志 2002;10:1009-1013
- 47 张健, 成军, 李莉, 刘爱兵, 吴勤, 李克, 董菁, 王琳, 陆荫英. 丙型肝炎病毒感染血清载脂蛋白 AI 及 AII 水平的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1014-1017
- 48 成军, 任进余, 李莉, 陆志檬, 李克, 洪源, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. 世界华人消化杂志 2002;10:1022-1026
- 49 陆荫英, 成军, 李克, 刘妍, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒进入肝细胞机制的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1028-1029
- 50 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健. 丙型肝炎病毒蛋白与脂蛋白之间的相互作用. 世界华人消化杂志 2002;10:1030-1032
- 51 洪源, 成军, 李莉. 丙型肝炎病毒转基因小鼠模型的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1032-1034
- 52 董菁, 成军. 脂肪肝形成分子机制的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1035-1037
- 53 钟彦伟, 成军, 张忠东, 孙敏, 李强, 李克, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 噬菌体表面展示技术筛选 HCBP6 人源单链可变区抗体. 世界华人消化杂志 2003;11:389-393
- 54 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 丙型肝炎病毒与 MAPK 信号转导系统. 世界华人消化杂志 2003;11:466-469
- 55 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 丙型肝炎病毒与 JAK-STAT 信号转导系统. 世界华人消化杂志 2003;11:464-466

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

• 消息 •

## World Journal of Gastroenterology 出版周期

《World Journal of Gastroenterology, WJG》将从 2004 年起由月刊改为半月刊, 以期在不增加出版篇幅的前提下进一步缩短出版周期, 力争论文的投稿时滞控制在 1-4 个月内出版, 并进入 Science Citation Index-Expanded 及 Index Medicus/MEDLINE 等国际著名检索系统, 以展示我国消化病学者在该领域的国际领先地位。例如, 2003 年第 10 期刊出的浙江大学医学院附属第二医院普外科彭淑牖教授等撰写的“采用 PMOD 和刮吸术通过不同途径进行肝尾叶切除术: 76 例”, 是一篇具有国际领先水平的论文, 该文从收稿至出版仅用 45 天。

# 多对型特异性引物巢式PCR检测湖南省乙肝病毒基因型

温志立, 谭德明

温志立, 谭德明, 中南大学湘雅医院传染科 湖南省长沙市 410008  
温志立, 男, 1972-06-16 生, 江西省吉安市人, 汉族. 2001 年湖南医科大学病原生物学硕士, 现为中南大学湘雅医院传染病学博士生. 主要从事病毒性肝炎的分子生物学研究.  
项目负责人: 温志立, 410008, 湖南省长沙市湘雅路 141 号, 中南大学湘雅医院传染科. zhiliwen@sina.com  
电话: 0731-4362611  
收稿日期: 2003-08-08 接受日期: 2003-09-24

## Detection for genotypes of hepatitis B virus in Hunan Province of China by nested PCR with multiplex pairs of primers

Zhi-Li Wen, De-Ming Tan

Zhi-Li Wen, De-Ming Tan, Department of Infectious Disease, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China  
Correspondence to: Dr. Zhi-Li Wen, Department of Infectious Disease, Xiangya Hospital, 141 Xiangya Road, Changsha 410078, Hunan Province China. zhiliwen@sina.com  
Received: 2003-08-08 Accepted: 2003-09-24

### Abstract

**AIM:** To determine the genotypes of hepatitis B virus (HBV) in Hunan Province of China by nested PCR with multiplex pairs of genotype-specific primers.

**METHODS:** Ten outer and inner primers were designed on the basis of the conserved nature of nucleotide sequences in regions of the Pre-S1 through S genes, in which 8 inner primers were divided into mix A and B to amplify HBV of genotype A, B, C and D, E, F respectively. The two different products from one sample in second-round PCR were separately electrophoresed on a 3% agarose gel. Genotypes of HBV were determined directly by the size of PCR products. To test its reliability and veracity, we compared new nested PCR with popular PCR-RFLP, followed by repeated experiments. This nested PCR was also used in the genotyping of HBVs in 220 Hunan patients with chronic hepatitis B to know the distribution of HBV genotype in Hunan Province of China.

**RESULTS:** The results showed complete concordance between the two assays and 100% recurrence in the repeated experiments. Of the 220 Hunan patients, 190 (86.4%) were genotype B and 30 (13.6%) were genotype C.

**CONCLUSION:** This new nested PCR can help to determine HBV genotypes clearly and directly with reliable and accurate results. With the application of this new method, the predominant HBV genotypes in Hunan are confirmed to be genotypes B and C.

Wen ZL, Tan DM. Detection for genotypes of hepatitis B virus in Hunan Province of China by nested PCR with multiplex pairs of primers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):332-335

### 摘要

**目的:** 采用多对型特异性引物, 通过巢式 PCR 法检测湖南省乙肝患者血清中乙型肝炎病毒(HBV)基因型的分布情况.

**方法:** 根据从前S1基因到S基因中的保守序列设计出10条内外引物, 并将其中8条内引物分成A、B两组, 分别扩增A、B、C和D、E、F型HBV, 然后将第2轮PCR的两组产物分别用3%琼脂糖进行电泳, 根据PCR产物片段大小直接判定HBV基因型. 与目前常用的PCR-RFLP法进行了比较, 并做重复试验以证实该方法的可靠性和准确性. 用此法检测了220例湖南籍慢性乙肝血清中的HBV基因型, 以了解湖南人群的HBV基因型分布情况.

**结果:** 多对型特异性引物巢式PCR与PCR-RFLP法的检测结果完全一致, 重现率(100%); 湖南人群HBV基因分型结果为B型190例(86.4%)、C型30例(13.6%).

**结论:** 这种新的巢式PCR分型法能清晰直观地辨别HBV基因型, 结果准确可靠. 用此法证实了湖南人群的HBV优势基因型以B型为主, C型次之.

温志立, 谭德明. 多对型特异性引物巢式PCR检测湖南省乙肝病毒基因型. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):332-335

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/332.asp>

### 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是引起慢性肝炎的最常见病毒之一,<sup>[1-12]</sup> 目前全世界至少有3.5亿慢性乙肝患者<sup>[13-16]</sup>. HBV具有环状双链DNA结构, 3.2 kb长的基因组中含有4个开放读码框架. 根据HBV基因序列的差异可将其分为A-F六种基因型. HBV的基因型具有明显的地理分布特点, 如A型主要在北欧和非洲, B型和C型主要在东亚, D型在中东、北非和南欧, E型在非洲, F型仅在南美<sup>[17]</sup>. 近年研究发现HBV基因型的类别与HBV传播方式、临床疾病谱、预后判断及抗病毒治疗的选择都有一定的相关性. 目前诊断HBV基因型的方法有全基因分析<sup>[18]</sup>或S基因测序法<sup>[19]</sup>、聚合酶链反应(PCR)法<sup>[20-21]</sup>、聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法<sup>[22-27]</sup>、微板核酸杂交ELISA法<sup>[28-29]</sup>等. 在大规模检测方面, PCR因为具有简单快速的特点而使用普遍, 而巢式PCR使检测的特异性又进一步增高. 我们利用巢式PCR这一特性, 并采用多对型特异性引物同时进行扩增, 通过PCR产物片段的大小直接判定HBV基因型. 该法简捷快速, 准确性和特异性都很

高, 便于大批量标本的检测. 用此法检测了湖南省 HBV 基因型的分布情况, 结果如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 PCR 扩增仪(美国 SABC 公司); 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司, 型号 GS-15R); 稳压稳流电泳仪和紫外分析仪均为上海 Tanon 公司产品, 型号分别为 EPS-300 和 UV-2000; 血清 DNA 抽提所用试剂盒购自上海申友公司; dNTP、PCR 缓冲液、超纯型 Taq Plus 多聚酶、Marker(DGL2000)、琼脂糖均为北京鼎国公司

产品; 引物由上海申友公司合成; 限制性内切酶 StyI 和 BsrI 分别为日本 TaKaRa 公司和美国 MBI 公司产品; 所用水均为已灭菌的二次蒸馏水(DDW). 2002-06/2003-03 中南大学湘雅医院传染科门诊和住院部的湖南籍慢性乙肝血清, 经传染科检验室荧光 PCR 鉴定 HBV-DNA 为阳性者 220 例. 引物设计参照文献[30], 根据从前 S1 基因到 S 基因中的保守序列设计出 10 条引物(外引物 2 条, 内引物 8 条), 包含 6 种基因型在内. 每条内引物均具有型特异性, 同时还能使每种基因型最终 PCR 产物的片段大小各不相同, 以便通过琼脂糖电泳能辨别出来(表 1).

表 1 巢式 PCR 进行 HBV 基因分型所用引物的序列

引物	序列(位点, 特异性, 方向)
第 1 轮 PCR(外引物)	
P1-----	-5' -TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA-3'(nt 2821-2843, 通用, 正义)
Ps-----	-5' -AGA TGT TGT ACA GAC TTG G-3'(nt 763 - 781, 通用, 反义)
第 2 轮 PCR(内引物)	
A 组	
B2-----	-5' -GGC TCC AGT TCA GGA ACA GT-3'(nt 65-84, A-E 型特异, 正义)
BA1R-----	-5' -CTC GCG GAG ATT GAC GAG ATG T-3' (nt 111-132, A 型特异, 反义)
BB1R-----	-5' -CAG GTT GGT GAG TGA CTG GAG A-3'(nt 322-343, B 型特异, 反义)
BC1R-----	-5' -GGT CCT AGG AAT CCT GAT GTT G-3'(nt163-184, C 型特异, 反义)
B 组	
BD1-----	-5' -GCC AAC AAG GTA GGA GCT-3'(nt 2977-2994, D 型特异, 正义)
BE1-----	-5' -CAC CAG AAA TCC AGA TTG GGA CCA-3'(nt2953-2976, E 型特异, 正义)
BF1-----	-5' -GCT ACG GTC CAG GGT TAC CA-3'(nt 3030-3049, F 型特异, 正义)
B2R-----	-5' -GGA GGC GGA TCT GCT GGC AA-3'(nt 3076-3095, D-F 型特异, 反义)

1.2 方法 血清 DNA 提取按照试剂盒说明书进行, 采用浓缩裂解法, 略改动, 即取浓缩液 50  $\mu$ L 到 0.5 mL 离心管中, 再加入待测血清 50  $\mu$ L, 振荡混匀后静置 2 min, 8 000 r/min 离心 5 min, 弃上清. 加入裂解液 10  $\mu$ L, 剧烈振荡至无沉淀后短暂离心, 沸水浴 10 min, 14 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 2  $\mu$ L 做多对型特异性引物巢式 PCR(图 1), PCR 按 Naito et al [30]方法进行, 稍作改动. 首先用一对外引物(P<sub>1</sub>、Ps)进行第 1 轮 PCR, 在 0.5 mL 离心管中依次加入 P<sub>1</sub>(50 pmol/ $\mu$ L)1  $\mu$ L、Ps(50 pmol/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L、dNTP(10mM) 1  $\mu$ L、Taq 聚合酶(2u/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L、10 $\times$ PCR 缓冲液(含 20 mM Mg<sup>2+</sup>) 5  $\mu$ L、血清 DNA 提取物 2  $\mu$ L, 加 DDW 至 50  $\mu$ L, 混匀后加 40  $\mu$ L 石蜡油覆盖液面. 扩增条件为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 60 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 30 个循环后 72  $^{\circ}$ C 再延伸 5 min. 然后分别以 A 组(B2、BA1R、BB1R、BC1R)和 B 组(B2R、BD1、BE1、BF1)为内引物进行第 2 轮 PCR, 分别检测 A-C 型和 D-F 型 HBV, PCR 反应体系中除引物外的其余成分同第 1 轮. 扩增条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 20 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30s, 40 个循环后 72  $^{\circ}$ C 再延伸 10 min.

最后将两组 PCR 产物分别在 3% 琼脂糖中进行电泳, 同时加入低分子量 Marker, 通过产物片段的大小来判断基因型. 随机选取 30 份已用多对型特异性引物巢式 PCR 鉴定基因型的血清, 再用目前常用的 PCR-RFLP 法检测这些血清中 HBV 的基因型, 方法参照文献[26]. 由于我国的 HBV 基因型以 B、C、D 型为主, 故只选取其中检测 B-D 三型的方法进行检测. 用引物对 YS<sub>1</sub>(nt205-223, 5' -GCG GGG TTT TTC TTG TTG A-3') 和 YS<sub>2</sub>(nt769-789, 5' -GGG ACT CAA GAT GTT GTA CAG-3')扩增出 585 bp 大小的 S 基因片段, 限制性内切酶 StyI 和 BsrI 分别仅在 C 型第 456 位和 B 型第 329 位有酶切位点, S 基因片段分别被切成 252 bp, 333 bp 和 125 bp, 460 bp 两个片段, 可区别 B、C 两型. 用引物对 YP<sub>1</sub>(nt 2 820-2 841, 5' -CAC CAT ATT CTT GGG AAC AAG A-3')及 YP<sub>2</sub>(nt 3 024-3 042, 5' -GCC CGA ATG CTC CCA CTC C-3')扩增前 S1 基因片段, 非 D 基因型长度为 223 bp, D 基因型由于在 nt 2 852 后(即前 S1 起始密码子 ATG 之后)连续缺失 33 个碱基, 只有 190 bp 大小, 可以此鉴定 D 基因型. 随机选取 30 份已用多对型特异性引物巢式 PCR 鉴定过基因型的血清

样品,再次采用此种巢式PCR法进行检测,以了解该方法的重现性和准确性.

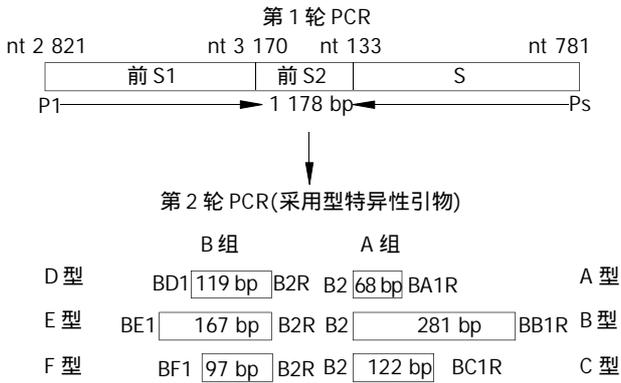


图1 多对型特异性引物巢式PCR基因分型的原理.

### 2 结果

通过两轮PCR进行扩增,能清晰直观地辨别出HBV的基因型(图2). 实验中还发现有些血清样品第一轮扩增为阴性,但在第2轮呈阳性,表明此种巢式PCR的特异性较高,可减少假阴性和假阳性的发生. 已用多对型特异性引物巢式PCR法鉴定基因型的30份血清样品中,有5例PCR产物为阴性,无法进行分型,可能为样品中HBV浓度较低的原因所致,其余25例样品的分型结果与多对型特异性引物巢式PCR完全一致,相符率达100%(图3). 随机选取的30份血清样品经2次多对型特异性引物巢式PCR重复扩增,其结果均一致,重现率100%,表明该法准确性和可靠性较高. 此次对220例湖南籍慢性乙肝患者进行HBV基因分型,结果为B型190例(86.4%),C型30例(13.6%),未检测到A、D、E、F型. 结果提示湖南人群携带的乙肝病毒大多数为B型,少数为C型.

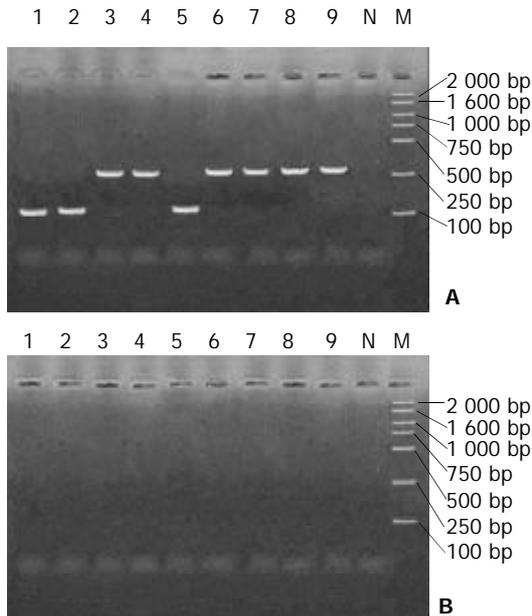


图2 多对型特异性引物巢式PCR分型结果. A: 组引物对, 1、2、5为C型, 3、4、6、7、8、9为B型, N为阴性对照, M为Marker; B: 组引物对, 1-9均为非D、E、F型, N为阴性对照, M为Marker.

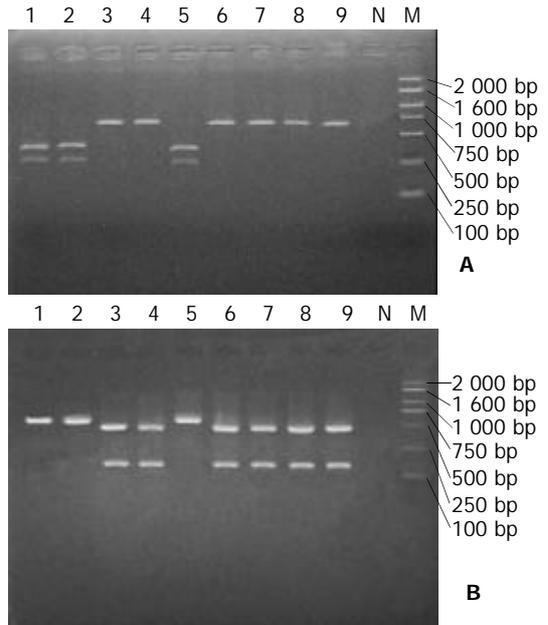


图3 PCR-RFLP分型结果. A: Styl 37 °C酶切3 h后, 1, 2, 5为C型, 其余为非C型; N为阴性对照, M为Marker; B: BsrI 65 °C酶切3 h后, 3, 4, 6, 7, 8, 9为B型, 其余为非B型; N为阴性对照, M为Marker.

### 3 讨论

HBV基因型与乙肝的传播方式、临床疾病谱、预后判断及抗病毒治疗的选择都有一定的相关性,因此对HBV基因型的检测意义重大. 目前现有的分型方法尚有一些不足之处,如测序法价格昂贵,需反复比较分析才能得出结论,无法进行大规模检测;一般的PCR或巢式PCR大多也是扩增后再测序,比直接测序法也只稍微节省成本,或用型特异性引物进行单引物对PCR,1份标本需做6次PCR才能鉴定基因型,试剂用量大,操作繁琐;微板核酸杂交ELISA法虽然特异性较高,但杂交后需复杂的显色步骤,杂交背景也很容易受各种因素的干扰.

我们采用多对型特异性引物,经两轮PCR分别扩增A-C和D-F型HBV,从PCR产物片段的大小即可直接判定HBV基因型,方法简便易行、特异性高. 通过与PCR-RFLP法进行对比,显示两种方法分型结果完全一致,重复试验也表明该方法重现性良好,重现率达100%,表明这种型特异性引物对巢式PCR的分型结果准确、稳定、可靠. 同时需要指出的是,PCR-RFLP法虽然由于限制型内切酶对酶切位点的严格选择性而有很好的特异性,但有少量样品由于HBV浓度较低等原因呈假阴性而导致无法分型,且由于酶切不完全等原因,可能会出现较复杂的带型,不利于结果判断,尤其当同一标本混有两种基因型时更无能为力,而且由于HBV基因变异的多样性和酶切位点单一性之间的矛盾,PCR-PFLP分型法不能鉴定100%的样品. 本方法通过合理设计型特异性引物,理论上可鉴定100%的样品,且不需酶切步骤,因此本文认为此法优于PCR-RFLP法. 采用此种多对型特异性引物巢式PCR法检测了220例湖南籍慢性乙肝患者的HBV基因

型, 发现 B 型 190 例(84.6%)、C 型 30 例(13.6%), 未检测到 A、D、E、F 型, 与文献[31]报道的 HBV 湖南优势基因型相同, 但与其 B 型 73.5%、C 型 26.5% 略有出入. 考虑到 HBV 基因型与临床表型有关, 可能为二者采集的标本结构组成不同所致, 有待进一步研究证实.

#### 4 参考文献

- 1 阚全程, 余祖江, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰. 慢性乙型肝炎病毒清除自杀基因平衡制约载体系统的构建. 世界华人消化杂志 2003; 11:1515-1519
- 2 余祖江, 杨东亮, 张俊, 郝友华, 王宝菊, 郝连杰. 乙型肝炎病毒 S 基因系列单突变克隆人工构建. 世界华人消化杂志 2003;11: 1500-1504
- 3 王永刚, 王宇明. 肝移植后乙型肝炎病毒再感染相关因素的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:1460-1464
- 4 代志琰, 徐启桓, 李刚, 马会慧, 汤正好, 舒欣, 姚集鲁. 肝癌患者乙型肝炎病毒 X 基因变异的研究. 世界华人消化杂志 2003;11: 1349-1352
- 5 李永纲, 刘明旭, 王福生, 金磊, 洪卫国. 汉族人 IL-12b 和 IL-10 启动子区基因多态性与 HBV 感染的相关性. 世界华人消化杂志 2003;11:1139-1143
- 6 张忠东, 成军, 钟彦伟, 杨倩, 王业东, 董菁, 杨艳杰, 张树林. 羧肽酶 N 调节乙型肝炎病毒核心启动子表达活性的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1131-1134
- 7 陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 邵清, 李克, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 蛋白与去唾液酸糖蛋白受体 2 突变体相互作用的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1126-1130
- 8 成军, 董菁. 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的新认识. 世界华人消化杂志 2003;11:1073-1080
- 9 周永兴. 隐匿性 HBV 感染是一个潜在的威胁. 世界华人消化杂志 2003;11:246-248
- 10 游磊, 庄林, 唐宝璋, 杨惠, 杨微波, 李武, 张宏丽, 张艳梅, 张禄, 严绍明. 干扰素联合胸腺肽治疗慢性乙型肝炎. 世界华人消化杂志 2001;9:388-391
- 11 陈雪娟, 李刚, 刘淑芳, 陈文思, 李桂侠. HBV 感染者 HBV DNA 与抗原抗体标志物的关系. 世界华人消化杂志 2003;11:870-871
- 12 段国荣, 聂青和, 周永兴, 王全楚, 田长印, 刘拉羊, 薛红安. 胸腺肽 alpha1 对慢性乙型肝炎患者免疫系统的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:701-704
- 13 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Microbiol* 2002;40:1207-1209
- 14 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000;118:554-559
- 15 Kao JH. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17: 643-650
- 16 Tsubota A, Arase Y, Ren F, Tanaka H, Ikeda K, Kumada H. Genotype may correlate with liver carcinogenesis and tumor characteristics in cirrhotic patients infected with hepatitis B virus subtype adw. *J Med Virol* 2001;65:257-265
- 17 Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus-large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis* 1997; 175:1285-1293
- 18 Norder H, Hammas B, Lee SD, Bile K, Courouce AM, Mushahwar IK, Magnius LO. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *J Gen Virol* 1993;74(Pt 7):1341-1348
- 19 Borchani-Chabchoub I, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. Genotyping of tunisian hepatitis B virus isolates based on the sequencing of preS2 and S regions. *Microbes Infect* 2000;2: 607-612
- 20 杨洁, 骆抗先, 郭亚兵, 戴琳, 阎丽, 侯金林. 乙型肝炎病毒基因型 (A-F) 多引物 PCR 分型法的初步建立. 中华肝脏病杂志 2002;10: 55-57
- 21 王永忠, 周国平, 李夏亭, 周志武, 周胜生, 阮雨花, 陈敏, 邓为群. 乙型肝炎病毒基因分型及临床应用研究. 中华实验和临床病毒学杂志 2002;16:367-369
- 22 Lee CM, Chen CH, Lu SN, Tung HD, Chou WJ, Wang JH, Chen TM, Hung CH, Huang CC, Chen WJ. Prevalence and clinical implications of hepatitis B virus genotypes in southern Taiwan. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:95-101
- 23 Kato H, Ruzibakiev R, Yuldasheva N, Hegay T, Kurbanov F, Achundjanov B, Tuichiev L, Usuda S, Ueda R, Mizokami M. Hepatitis B virus genotypes in Uzbekistan and validity of two different systems for genotyping. *J Med Virol* 2002;67: 477-483
- 24 Li KS, Yamashiro T, Sumie A, Terao H, Mifune K, Nishizono A. Hepatitis B virus harboring nucleotide deletions in the core promoter region and genotype B correlate with low viral replication activity in anti-HBe positive carriers. *J Clin Virol* 2001; 23:97-106
- 25 De Castro L, Araujo NM, Sabino RR, Alvarenga F, Yoshida CF, Gomes SA. Nosocomial spread of hepatitis B virus in two hemodialysis units, investigated by restriction fragment length polymorphism analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19:531-537
- 26 阎丽, 侯金林, 郭亚兵, 王战会, 林裕龙, 骆抗先. 乙型肝炎病毒基因型 S 基因 PCR-RFLP 分型方法的建立. 中华传染病杂志 2001;19:224-228
- 27 丁红兵, 郭亚兵, 戴琳, 阎丽, 彭吉力, 周福元. RFLP 基因分型在动态监测乙型肝炎病毒基因变异中的应用. 第一军医大学学报 2001;21:81-84
- 28 王虹, 万成松, 王省良, 彭华国. 采用 PCR 微板核酸杂交 ELISA 技术进行 HBV DNA 基因分型的研究. 中华微生物学和免疫学杂志 2001;21:234-236
- 29 苏冬娜, 吴诗品, 石之磷. HBV 基因分型的检测及其意义. 临床荟萃 2002;17:1303-1304
- 30 Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J Clin Microbiol* 2001;39:362-364
- 31 刘映霞, 胡国龄, 谭德明. 湖南省乙肝病毒基因型分布及临床意义. 湖南医科大学学报 2002;27:29-31

# 人肝素酶基因正反义腺病毒表达载体的构建及鉴定

蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 杨孟华, 王东旭

蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 杨孟华, 王东旭, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化中心 重庆市 400038  
蔡永国, 男, 1970-11-11 生, 山东沂水人, 汉族. 博士研究生, 发表论文 6 篇, 主要从事消化道肿瘤的研究  
国家自然科学基金资助项目, No. 30200123  
项目负责人: 杨仕明, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心. shimingyang@yahoo.com  
电话: 023-68754000-73057  
收稿日期: 2003-08-08 接受日期: 2003-09-24

## Construction and identification of sense and antisense human heparanase adenovirus expression vector

Yong-Guo Cai, Dian-Chun Fang, Shi-Ming Yang, Yuan-Hui Luo, Meng-Hua Yang, Dong-Xu Wang

Yong-Guo Cai, Dian-Chun Fang, Shi-Ming Yang, Yuan-Hui Luo, Meng-Hua Yang, Dong-Xu Wang, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30200123  
Correspondence to: Dr. Shi-Ming Yang, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. shimingyang@yahoo.com  
Received: 2003-08-08 Accepted: 2003-09-24

## Abstract

**AIM:** To construct an adenovirus expressing vector of sense and antisense human heparanase gene.

**METHODS:** The human heparanase cDNA fragment contained in the pcDNA3-hpa vector was cloned into the adenovirus expressing vector pDC315 in cis-direction or trans-direction using DNA recombinant technology. The recombinant vectors were identified by digestion of BamH I. The sense recombinant vector was further identified by DNA sequencing.

**RESULTS:** After digested by BamH I, two fragments which lengthened 4.3 and 1.4 kb were formed in sense recombinant vector (pDC315-sHpa), while two fragments which lengthened 5.1 kb and 0.4 kb were formed in antisense vector (pDC315-aHpa). Electrophoresis results were completely coincident with theoretical calculation. pDC315-sHpa DNA sequence was identical to the heparanase sequence published in the Gene Bank.

**CONCLUSION:** The sense and antisense human heparanase adenovirus expressing vectors are successfully constructed.

Cai YG, Fang DC, Yang SM, Luo YH, Yang MH, Wang DX. Construction and identification of sense and antisense human heparanase adenovirus expression vector. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):336-338

## 摘要

**目的:** 构建人肝素酶正义和反义腺病毒表达载体。

**方法:** 用EcoR I从pcDNA3-hpa质粒上切下约1.7 kb的人肝素酶全长cDNA片段, 然后连入pDC315质粒的EcoR I酶切位点上, 经BamH I酶切鉴定出正义和反义表达载体, 并对正义重组质粒进一步采用测序鉴定其方向性。

**结果:** 经BamH I酶切后, 正义质粒形成4.3 + 1.4 kb两条带, 而反义重组质粒为5.1 + 0.4 kb两条带, 与理论计算值完全一致; 测序结果与Gene Bank报告的肝素酶序列完全一致。

**结论:** 成功构建了人肝素酶的正、反义腺病毒表达载体, 为进一步研究正、反义肝素酶基因转染对肿瘤细胞的影响奠定了基础。

蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 杨孟华, 王东旭. 人肝素酶基因正反义腺病毒表达载体的构建及鉴定. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):336-338  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/336.asp>

## 0 引言

肝素酶是近年来克隆成功的与肿瘤转移相关的一种葡萄糖苷内切酶, 其编码基因定位于4q21.3, 1999年最先由Voldavsky et al (*Nat Med* 1999;5:793)和Hulett et al (*Nat Med* 1999;5:803)克隆鉴定. 肝素酶能够降解细胞外基质和基底膜的主要组成成分硫酸肝素蛋白聚糖(HSPG), 从而促进肿瘤细胞的浸润与转移. 肝素酶成为肿瘤转移治疗的一个新的基因靶点. 我们通过构建人肝素酶正反义腺病毒表达载体, 为进一步研究肝素酶对肿瘤转移细胞的生物学影响创造了条件。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** DH5  $\alpha$  大肠杆菌菌株由本室保存; pDC315 腺病毒质粒由第三军医大学全军免疫研究中心邹强博士惠赠; 含人全长肝素酶cDNA的pcDNA3-Hpa质粒由澳大利亚学者Parish及Hulett教授惠赠; 限制性内切酶EcoR I, BamH I和牛小肠碱性磷酸酶(CIP)购自美国New England Biolabs公司; 质粒提取试剂盒购自美国Omega公司; 琼脂糖DNA回收试剂盒购自Roche公司。

**1.2 方法** 肝素酶正、反义腺病毒表达载体的构建及初步鉴定策略见图1。

pcDNA3-Hpa与pDC315质粒的转化采用氯化钙法, 质粒提取采用Omega公司的质粒提取试剂盒, 并用EcoR I酶切鉴定; 肝素酶全长1.72 kb, 克隆在质粒pcDNA3-hpa的EcoR I酶切位点, 用EcoR I酶切该

质粒, 8 g/L 琼脂糖电泳, 然后用琼脂糖 DNA 回收试剂盒回收含肝素酶 cDNA 的 DNA 片段(1.72 kb), 溶于去离子水中, -20 °C 冻存备用; 用 *EcoR* I 酶切 pDC315 质粒使其线性化, 试剂盒回收片段, 牛小肠碱性磷酸酶去磷酸化, 然后酚氯仿抽提, 无水乙醇沉淀, TE 缓冲液溶解, -20 °C 保存备用; 2.5 μL 去磷酸化的 pDC315/*EcoR* I 与 2.5 μL 肝素酶 cDNA 片段混合均匀, 45 °C 反应 5 min, 迅速转移到冰上, 加 *T*<sub>4</sub> DNA 连接酶 1 μL 混匀, 4 °C 过夜进行连接反应; 将连接产物用氯化钙法转化大肠杆菌, 将 200 μL 转化产物涂于含氨苄青霉素的 LB 培养板上, 37 °C 过夜. 次日挑取数个菌落置于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡过夜, 质粒提取试剂盒提取质粒, 与空载体一起用 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳筛选出重组质粒, 然后按重组质粒图谱, 用 *Bam*H I 限制性内切酶进行酶切鉴定. 将 *Bam*H I 鉴定正确的正义肝素酶重组子交上海生物工程公司进行基因测序以进一步鉴定连接的正确性.

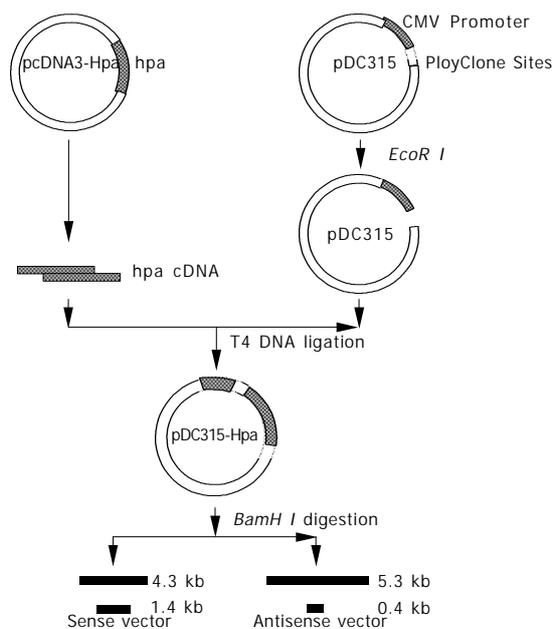


图1 肝素酶正、反义腺病毒表达载体的构建及鉴定策略.

## 2 结果

如图2、图3所示: pcDNA3-Hpa 质粒经 *EcoR* I 酶切后, 形成 5.4 kb 和 1.7 kb 两个电泳条带, 试剂盒回收 1.7 kb 的电泳条带; pDC315 腺病毒载体经 *EcoR* I 酶切后, 形成 3.9 kb 一条带, 片段经试剂盒回收、CIP 去磷酸化后, 与肝素酶片段相连接, 连接产物转化大肠杆菌后, 得到大量阳性菌落, 随机挑取数个菌落小提质粒, 琼脂糖凝胶电泳筛选出重组体, 然后用 *Bam*H I 酶切鉴定, 正义重组质粒为 4.3+1.4 kb 两条带, 而反义重组质粒为 5.3+0.4 kb 两条带, 与理论计算完全符合. 基因测序结果表明全长人肝素酶cDNA序列正确接入到重组质粒中, 如图4所示. 证明含有人肝素酶的正、反义腺病毒表达载体构建成功, 分别命名为 pDC315-sHpa 和

pDC315-aHpa.

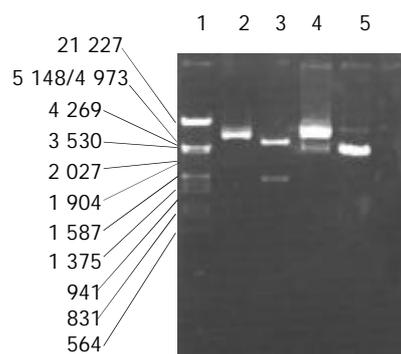


图2 pcDNA<sub>3</sub>-hpa 和 pDC315 经 *EcoR* I 酶切鉴定. 1: Marker( $\lambda$  DNA/*Hind* III + *EcoR* I); 2: pcDNA<sub>3</sub>-Hpa; 3: pcDNA<sub>3</sub>-Hpa/*EcoR* I; 4: pDC315; 5: pDC315/*EcoR* I.

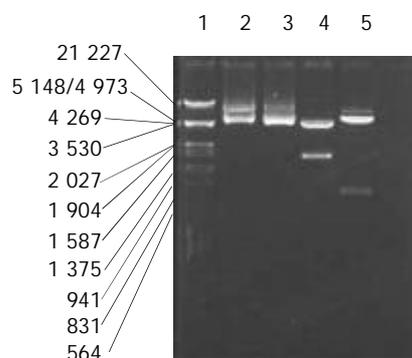


图3 肝素酶正、反义腺病毒表达载体的鉴定. 1: Marker( $\lambda$  DNA/*Hind* III + *EcoR* I); 2、3: 肝素酶重组子; 4: 肝素酶正义载体; 5: 肝素酶反义载体.

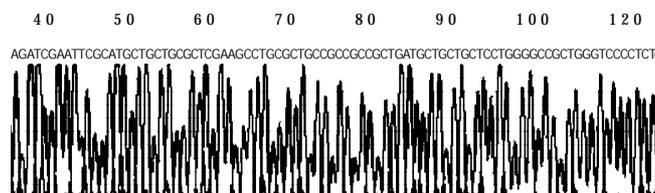


图4 正义肝素酶表达质粒 pDC315-sHpa DNA 序列(局部).

## 3 讨论

硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparin sulphate proteoglycan HSPG)是组成细胞外基质和基底膜的重要组成成分. 肝素酶是一种葡糖苷酸内切酶, 它能够裂解连接于硫酸乙酰肝素蛋白多糖核心分子上的硫酸肝素, 破坏细胞外基质和基底膜结构的完整性, 在促进肿瘤细胞的浸润及转移过程中发挥重要作用.

肝素酶基因于 1999 年被克隆成功后, 现已明确肝素酶基因位于人染色体 4q21.3<sup>[1-2]</sup>. 之后研究发现在人类多种肿瘤组织中均有肝素酶的表达, 而且肝素酶的表达水平与恶性肿瘤细胞的转移潜能相关, 并与肿瘤患者的预后相关<sup>[3-19]</sup>. 在高转移的鼠腺癌细胞系中肝素酶 mRNA 高表达, 而在低转移或不转移的细胞系中只有极少量表达<sup>[20]</sup>. 高转移潜能的肿瘤细胞的肝素酶活性比低转移潜能的肿瘤细胞高 4-10 倍, 无转移潜力的鼠淋巴瘤和低转移潜力的黑色素瘤细胞系导入肝素酶基因

后,均获得了高转移潜力<sup>[21]</sup>。临床研究发现反义介导抑制人肝素酶基因表达可以抑制人癌细胞的胸膜播散<sup>[22]</sup>,通过抑制肝素酶活性可以抑制肿瘤细胞的转移<sup>[23-26]</sup>,目前肝素酶的抑制剂PI-88已经进入II期临床试验。

肝素酶促进肿瘤细胞转移的机制除通过降解HSPG,破坏细胞外基质和基底膜,促进肿瘤细胞的侵袭与转移外,还通过促进HS结合性生长因子或细胞因子释放,间接促进肿瘤细胞的转移<sup>[27]</sup>。

研究表明胃癌组织肝素酶阳性率为80%左右<sup>[5,28-29]</sup>,由于在大多数胃癌组织中肝素酶均有表达,肝素酶可以成为针对胃癌转移的基因治疗的良好靶位。采用分子克隆技术,构建腺病毒表达载体是目前基因治疗的常用方法<sup>[30-32]</sup>,我们将人全长肝素酶cDNA导入到腺病毒载体pDC315中,成功构建了人肝素酶正、反义腺病毒表达载体,为进一步研究肝素酶基因转染对肿瘤细胞生物学行为的影响奠定了基础。

#### 4 参考文献

- Dong J, Kukula AK, Toyoshima M, Nakajima M. Genomic organization and chromosome localization of the newly identified human heparanase gene. *Gene* 2000;253:171-178
- Baker E, Crawford J, Sutherland GR, Freeman C, Parish CR, Hulett MD. Human HPA endoglycosidase heparanase. Map position 4q21.3. *Chromosome Res* 1999;7:319
- Marchetti D, Li J, Shen R. Astrocytes contribute to the brain-metastatic specificity of melanoma cells by producing heparanase. *Cancer Res* 2000;60:4767-4770
- Rohloff J, Zinke J, Schoppmeyer K, Tannapfel A, Witzigmann H, Mossner J, Wittekind C, Caca K. Heparanase expression is a prognostic indicator for postoperative survival in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002;86:1270-1275
- Endo K, Maejara U, Baba H, Tokunaga E, Koga T, Ikeda Y, Toh Y, Kohnoe S, Okamura T, Nakajima M, Sugimachi K. Heparanase gene expression and metastatic potential in human gastric cancer. *Anticancer Res* 2001;21:3365-3369
- Maxhimer JB, Quiros RM, Stewart R, Dowlatshahi K, Gattuso P, Fan M, Prinz RA, Xu X. Heparanase-1 expression is associated with the metastatic potential of breast cancer. *Surgery* 2002;132:326-333
- Zcharia E, Metzger S, Chajek-Shaul T, Friedmann Y, Pappo O, Aviv A, Elkin M, Pecker I, Peretz T, Vlodavsky I. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer progression and mammary gland morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001;6:311-322
- Ikuta M, Podyma KA, Maruyama K, Enomoto S, Yanagishita M. Expression of heparanase in oral cancer cell lines and oral cancer tissues. *Oral Oncol* 2001;37:177-184
- Mikami S, Ohashi K, Usui Y, Nemoto T, Katsube K, Yanagishita M, Nakajima M, Nakamura K, Koike M. Loss of syndecan-1 and increased expression of heparanase in invasive esophageal carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:1062-1073
- Friedmann Y, Vlodavsky I, Aingorn H, Aviv A, Peretz T, Pecker I, Pappo O. Expression of heparanase in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa and stroma. Evidence for its role in colonic tumorigenesis. *Am J Pathol* 2000;157: 1167-1175
- Inoue H, Mimori K, Utsunomiya T, Sadanaga N, Barnard GF, Ueo H, Mori M. Heparanase expression in clinical digestive malignancies. *Oncol Rep* 2001;8:539-542
- El-Assal ON, Yamanoi A, Ono T, Kohno H, Nagasue N. The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1299-1305
- Ikeguchi M, Ueta T, Yamane Y, Hirooka Y, Kaibara N. Quantitative analysis of heparanase messenger RNA expression in hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol* 2002;81:148-154
- Kim AW, Xu X, Hollinger EF, Gattuso P, Godellas CV, Prinz RA. Human heparanase-1 gene expression in pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2002;6:167-172
- Koliopoulos A, Friess H, Kleeff J, Shi X, Liao Q, Pecker I, Vlodavsky I, Zimmermann A, Buchler MW. Heparanase expression in primary and metastatic pancreatic cancer. *Cancer Res* 2001;61:4655-4659
- Gohji K, Hirano H, Okamoto M, Kitazawa S, Toyoshima M, Dong J, Katsuoka Y, Nakajima M. Expression of three extracellular matrix degradative enzymes in bladder cancer. *Int J Cancer* 2001;95:295-301
- Gohji K, Okamoto M, Kitazawa S, Toyoshima M, Dong J, Katsuoka Y, Nakajima M. Heparanase protein and gene expression in bladder cancer. *J Urol* 2001;166:1286-1290
- Ginath S, Menczer J, Friedmann Y, Aingorn H, Aviv A, Tajima K, Dantes A, Glezerman M, Vlodavsky I, Amsterdam A. Expression of heparanase, Mdm2, and erbB2 in ovarian cancer. *Int J Oncol* 2001;18:1133-1144
- Bitan M, Polliack A, Zecchina G, Nagler A, Friedmann Y, Nadav L, Deutsch V, Pecker I, Eldor A, Vlodavsky I, Katz BZ. Heparanase expression in human leukemias is restricted to acute myeloid leukemias. *Exp Hematol* 2002;30:34-41
- Hulett MD, Freeman C, Hamdorf BJ, Baker RT, Harris MJ, Parish CR. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat Med* 1999;5: 803-809
- Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Bitan M, Pappo O, Peretz T, Michal I, Spector L, Pecker I. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med* 1999;5:793-802
- Uno F, Fujiwara T, Takata Y, Ohtani S, Katsuda K, Takaoka M, Ohkawa T, Naomoto Y, Nakajima M, Tanaka N. Antisense-mediated suppression of human heparanase gene expression inhibits pleural dissemination of human cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:7855-7860
- Demir M, Iqbal O, Hoppensteadt DA, Piccolo P, Ahmad S, Schultz CL, Linhardt RJ, Fareed J. Anticoagulant and antiprotease profiles of a novel natural heparinomimetic mannopentaose phosphate sulfate (PI-88). *Clin Appl Thromb Hemost* 2001;7:131-140
- Miao HQ, Elkin M, Aingorn E, Ishai-Michaeli R, Stein CA, Vlodavsky I. Inhibition of heparanase activity and tumor metastasis by laminarin sulfate and synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Int J Cancer* 1999; 83:424-431
- Bentolila A, Vlodavsky I, Ishai-Michaeli R, Kovalchuk O, Haloun C, Domb AJ. Poly(N-acryl amino acids): a new class of biologically active polyanions. *J Med Chem* 2000;43:2591-2600
- Yang YJ, Zhang YL, Li X, Dan HL, Lai ZS, Wang JD, Wang QY, Cui HH, Sun Y, Wang YD. Contribution of eIF-4E inhibition to the expression and activity of heparanase in human colon adenocarcinoma cell line: LS-174T. *World J Gastroenterol* 2003;9:1707-1712
- Eccles SA. Heparanase: breaking down barriers in tumors. *Nat Med* 1999;5:735-736
- Tang W, Nakamura Y, Tsujimoto M, Sato M, Wang X, Kurozumi K, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. Heparanase: A key enzyme in invasion and metastasis of gastric carcinoma. *Mod Pathol* 2002;15:593-598
- Takaoka M, Naomoto Y, Ohkawa T, Uetsuka H, Shirakawa Y, Uno F, Fujiwara T, Gunduz M, Nagatsuka H, Nakajima M, Tanaka N, Haisa M. Heparanase Expression correlates with invasion and poor prognosis in gastric cancers. *Lab Invest* 2003;83:613-622
- Chen JP, Lin C, Xu CP, Zhang XY, Wu M. The therapeutic effects of recombinant adenovirus RA538 on human gastric carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *World J Gastroenterol* 2000;6:855-860
- Pan X, Li Z, Zhang M, Wang Y, Pan W, Qi ZT. Therapeutic effect of endostatin-vascular endothelial growth inhibitor recombinant adenoviruses on gastric carcinoma in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:1282-1285
- Li XL, Peng YZ, Yuan ZQ, Tai GP, Chen Y. Preparation of human HSP72 cDNA recombinant adenovirus and its expression in IEC-6 cell. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10: 1162-1165

# 正常与硬化肝组织基因表达差异的初步分析

刘连新, 陈志宏, 武林枫, 李宏伟, 刘芝华, 姜洪池, 王秀琴, 吴 旻

刘连新, 武林枫, 姜洪池, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科  
黑龙江省哈尔滨市 150001  
陈志宏, 李宏伟, 哈尔滨市第四医院 黑龙江省哈尔滨市 150028  
刘芝华, 王秀琴, 吴旻, 中国医学科学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室 北京市 100021  
刘连新, 男, 1970-10-15 生, 黑龙江省哈尔滨市人, 汉族, 1993 年哈尔滨医科大学本科毕业, 1997 年哈尔滨医科大学硕士研究生毕业, 2000 年哈尔滨医科大学和中国协和医科大学博士研究生毕业, 2003 年中国医学科学院博士后出站, 主任医师, 教授, 主要从事普通外科的基础和临床研究。  
黑龙江省自然科学基金资助项目, No. QC01C11  
项目负责人: 刘连新, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街 23 号, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科。liulianxin@sohu.com  
电话: 0451-53658828 传真: 0451-53670428  
收稿日期: 2003-07-04 接受日期: 2003-10-07

## Gene expression profiles in liver cirrhosis and normal liver tissues

Lian-Xin Liu, Zhi-Hong Chen, Lin-Feng Wu, Hong-Wei Li, Zhi-Hua Liu, Hong-Chi Jiang, Xiu-Qin Wang, Min Wu

Lian-Xin Liu, Lin-Feng Wu, Hong-Chi Jiang, Department of Surgery, First Clinical College, Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China  
Zhi-Hong Chen, Hong-Wei Li, Department of General Surgery, The Fourth Hospital of Harbin, Harbin 150028, Heilongjiang Province, China  
Zhi-Hua Liu, Xiu-Qin Wang, Min Wu, National Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China  
Supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang, No. QC01C11  
Correspondence to: Dr. Lian-Xin Liu, Department of Surgery, First Clinical College, Harbin Medical University, 23 Youzheng Street, Nangang District, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. liulianxin@sohu.com  
Received: 2003-07-04 Accepted: 2003-10-07

## Abstract

**AIM:** To describe liver specific gene expression profiles and to identify genes with differential expression between liver cirrhotic tissues and normal liver tissues.

**METHODS:** The cDNA probes which were labeled with  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dATP were synthesized from total RNAs of liver cirrhosis and normal liver tissues and hybridized to two identical Atlas human cDNA expression arrays membranes containing 588 known genes respectively.

**RESULTS:** Autoradiographic results were analyzed by specific AtlasImage™ (version1.01a) software. Among the 588 genes analyzed, 17 genes were found up-regulated in cirrhosis, including integrin beta 7 and collagen type XVIII, and 98 genes were down-regulated in cirrhosis, including TFDP2, BAK and ABL. Expression of the genes was associated with the regulation of cell proliferation, apoptosis, differentiation, cell-cell interaction, invasion regulators and cytokines altered.

**CONCLUSION:** The results obtained from Atlas microarray provide a comprehensive liver cirrhosis specific expression

profile. These results may be helpful for identification of target genes for diagnosis and designing rational therapeutic strategies.

Liu LX, Chen ZH, Wu LF, Li HW, Liu ZH, Jiang HC, Wang XQ, Wu M. Gene expression profiles in liver cirrhosis and normal liver tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):339-343

## 摘要

**目的:** 了解肝硬化的基因表达概况, 寻找在肝硬化及正常肝组织中差异表达基因。

**方法:** 以各24例肝硬化及正常肝组织的总RNA混合定量后反转录合成含有  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dATP 的 cDNA 为探针, 与 Atlas 微阵列表达分析膜杂交。

**结果:** 放射自显影结果经 AtlasImage™ 软件分析显示: 在所分析的 588 种已知基因中, Integrin beta 7、collagen type XVIII 等 17 个基因在肝硬化组织中表达上调, TFDP2、BAK、ABL 等 98 个表达下调, 参与细胞增生、凋亡、分化、细胞间相互作用、与细胞侵袭相关的基因表达水平发生了明显改变。

**结论:** 通过 Atlas 微阵列系统分析发现的这些基因的表达改变组成了一个肝硬化特异的基因表达谱。系统地研究肝硬化的基因表达改变, 与肝硬化发生相关基因的差异变化可为肝硬化诊断和治疗提供线索。

刘连新, 陈志宏, 武林枫, 李宏伟, 刘芝华, 姜洪池, 王秀琴, 吴旻. 正常与硬化肝组织基因表达差异的初步分析. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):339-343  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/339.asp>

## 0 引言

肝硬化是常见的消化系统疾病之一, 在我国主要是由于肝炎病毒感染后形成的, 其次是由于血吸虫感染形成, 部分是由于过量饮酒形成的酒精性肝硬化<sup>[1-5]</sup>。目前对肝硬化的研究多集中在肝炎病毒或某些原因在肝硬化的发生、发展、诊断、治疗及预后的作用上, 这样就很难揭示肝硬化演进的全貌<sup>[6-18]</sup>。很少有研究着眼于肝硬化发展的过程 and 在此过程中那些基因发生了显著的变化? 这些变化的基因都起了什么样的作用? 如何通过这些变化的基因来寻找逆转肝硬化的方法? Atlas 微阵列表达分析膜利用微阵列(Microarray) 及差异杂交技术, 可快速了解我们感兴趣的许多基因的表达状况<sup>[19]</sup>。为了解肝硬化特异的基因表达谱, 寻找在肝硬化与正常肝组织中的差异表达基因, 我们采用该技术分析了

588种已知基因在肝硬化中的表达概况,为揭示肝硬化的分子遗传学变化,阐明肝硬化的发生机制,以及肝硬化的早期诊断和逆转治疗提供线索。

## 1 材料和方法

1.1 材料 各24例肝硬化及正常肝组织取自哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科。肝硬化标本取自因门静脉高压症行脾切除贲门周围血管离断术患者肝脏;正常肝脏标本取自因肝脏外伤行剖腹探查术患者的肝脏,肉眼下于MEM培养液中行显微剥离后置于液氮中保存。

1.2 试剂 Atlas人类cDNA表达分析微阵列(atlas human cDNA expression array)购自Clontech公司。Trizol™ RNA提取试剂盒及第一链cDNA合成扩增试剂盒(SuperScript™ preamplification system for first strand cDNA synthesis)均购自Gibco BRL公司。DNA酶(DNase), RNA酶抑制剂(RNasin)购自Promega公司。放射性同位素 $\alpha$ -<sup>32</sup>P dATP, dCTP购自NEN Du-Pont公司。

1.3 方法 将各24例的肝硬化和正常肝组织分别混合后,提取组织的总RNA,再各取5 $\mu$ g,按照Clontech公司Atlas试剂盒操作手册,分别反转录合成cDNA第一条链,并掺入放射性同位素 $\alpha$ -<sup>32</sup>P dATP作探针,与一套两张已经预杂交2h的相同的Atlas微阵列膜于68℃

杂交16h。洗膜条件为2 $\times$ SSC、1%SDS 68℃ 15min两次,0.5 $\times$ SSC、0.5%SDS 68℃ 20min 2次,应用富士胶片(Fuji Film)于-70℃放射自显影36-48h。

1.4 结果分析 放射自显影的X光片采用Bio-Rad公司Fluor-S™ MultiImager成像仪扫描生成相应格式的灰度文件。再由Clontech公司专用的AtlasImage™ (Version1.01a)软件进行分析,生成差异图像及表格。

## 2 结果

两张放射自显影的X光片(见图1)经Fluor-S™ MultiImager成像仪扫描后,由AtlasImage™ 软件分析后得到对比图像。是以正常肝脏为对照,以肝硬化相对正常肝脏的变化比率(Ratio)和二者之间的密度值差异(Difference)来反映肝硬化的变化。为准确反映基因的变化差异,我们以看家基因泛素(Ubiquitin)来校正二者之间的信号差异。在所分析的588个基因中,二者之间的差异大于50%或密度值差异大于10000单位的共有115个,其中在肝硬化中表达上调的有17个,表达下调的有98个(见表1,其中Ratio>1为在肝硬化组织中表达上调;Ratio<1为在肝硬化组织中表达下调)。许多与细胞周期调控,细胞增生与分化,细胞间相互作用,细胞间信号传递,细胞凋亡有关的基因以及癌基因和抑癌基因等均有明显的改变。

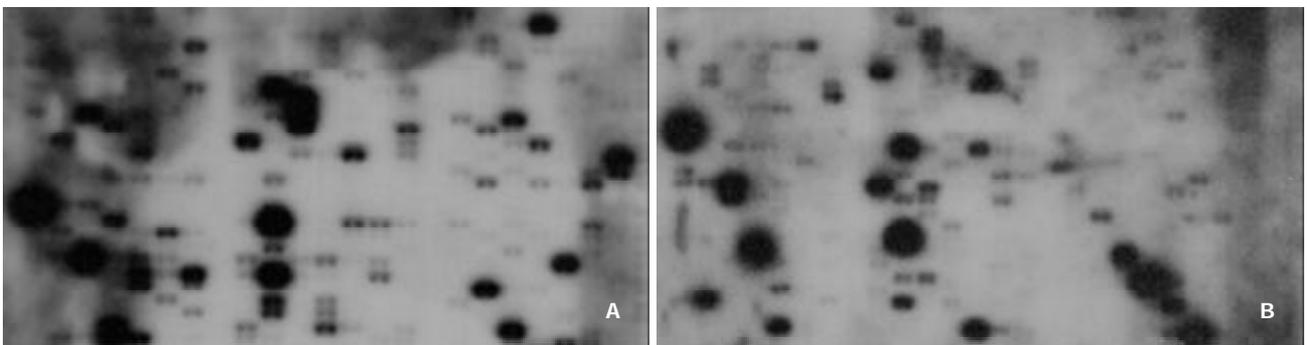


图1 正常肝组织与肝硬化的放射自显影照片。A: 正常肝组织; B: 肝硬化。

表1 肝硬化与正常肝组织基因表达差异情况

位置	比例	差值	基因	位置	比例	差值	基因
D7f		-46 583	placenta growth factor	D3a		-13 878	versican isoforms
F5l		-45 246	IL - inducible peptide	B1h		-13 644	BAK
F5e	0.170	-41 164	IL - 13	A5b	0.204	-12 751	MEK1
C4b		-40 337	Wnt -5a	B3l	0.153	-12 644	DAP kinase 1
C7l		-39 092	RAR gamma	D7i	0.150	-12 490	GLG1
E2f	0.290	-36 259	emmprin	E6b	0.422	-12 411	catenin alpha -2
C3i	0.228	-35 930	Notch4	F6k		-12 372	TDGF 1, 2, 3
A3i	0.080	-33 464	p19INK4d	D2c		-12 339	collagen type XI
C7m		-32 988	retinoid X receptor	A3j		-12 219	WEE1HU
D5f		-32 437	CD9	B1l		-11 664	FLAME - 1
B2g	0.254	-32 317	TRIP	C2d		-11 434	ERCC5
C4k	0.146	-31 082	DVL	A7n		-11 310	desmin
B3j		-30 455	caspase - 10	A5l		-11 230	TFDP2

C2j		-30 318	Rad	D2m		-11 077	tenascin-C
F2g	0.388	-30 177	endothelin ET2	F2f		-10 796	EGF-like growth factor
E4j	0.097	-30 058	CDC42	D4f		-10 779	GPIIIA; integrin beta3
D5k	0.085	-28114	ninjurin-1	A7g		-10 686	K4; CK4
B7j	0.250	-27 838	ABL2; ABLL	B2j		-10 436	C-IAP2; IAP1; MIHC
E7n		-27 258	HCK	A1c	0.203	-10 422	CDPK3
E2a		-26 725	MMP-19	A1e		-10 334	kinase PSSALRE
C6n		-26 592	sex gene	F3j	0.791	-10 331	EGR-1; KROX24; AT225
E2d	0.164	-26 409	TIMP-3;	B6d		-10 284	p55-c-fgr protein
E5m		-26 206	H-cadherin	C4n		-10 111	smoothened
D7g		-25 952	FLT3/FLK2	B7l	0.265	-9 485	STAT1
F5k		-25 326	IFN-gamma	B7k	0.444	-9 301	ZAP-70; ZAP70
D5g	0.170	-25 132	cytovillin 2	E4n	0.330	-8 337	P115
D6c	0.281	-23 356	semaphorin E	B4c	0.262	-8 173	WSL-LR; Apo-3
B3h	0.465	-23 309	FLICE; CAP4; CASP8; MCH5	D7n	0.353	-7 249	homeobox HOX 4A
C2n	0.087	-23 014	replication factor C	A3m	0.292	-7 008	NEDD5 protein homolog
D4b	0.136	-22 957	integrin alpha8	C3e	0.458	-6 939	RAD23
B2i	0.122	-21 022	CRAF1	A2e	0.351	-6 736	PCTAIRE-3
E4e		-20 262	P21-RAC2	A5a	0.367	-6 249	MAPKK 5;
B3i	0.536	-20 089	ICE-LAP6	E1k	0.449	-5 473	MMP-14 (MT1-MMP)
D5e	0.159	-19 823	cytohesin-1	A1i	0.455	-5 260	P23; P25; P35
F3k	0.137	-19 389	hepatocyte growth factor	C3b	0.352	-5 111	superoxide dismutase 1
E1m	0.095	-19 179	MMP-16 (MT3-MMP)	A4n	0.464	-4 929	JNK3; JNK3; P49
D6f		-18 894	semaphorin-1	A7a	0.352	-4 649	K16; CK 16;
E2b	0.636	-18 636	TIMP-1; EPA	C1m	0.380	-4 399	DNA TOPO I
C3j		-18 316	Jagged 1	B4d	0.473	-4 221	Akt1; c-Akt
C1a		-18 130	DNA-PK; XRCC7	A2f	0.449	-4 152	PITALRE
C6m		-17 970	CCK4; PTK7	D2e	2.162	10 343	collagen type XVIII
B2n	0.100	-17 919	TRAIL receptor	A5e		1 0747	PCNA; cyclin
D6h		-17 735	LAR	E1e	1.583	11 610	MMP-8; collagenase-2
A7d		-17 478	K1; CK 1	E3e	2.141	1 1693	NDK A; NM23-H1
C2c		-17 212	XRCC1	D3f		13 084	fibronectin
E1j		-17 010	MMP-13; collagenase-3	E6d		14 470	plakoglobin;
F6b		-16 980	NT-3	E3l		14 883	rhoB
B1k	0.644	-16 741	NIK	D4j	1.702	16 207	integrin beta7
B3f		-16 474	LICE2	A7m		16 433	vimentin
C5f		-15 882	eps15	D1b		16 589	byglican
D6e		-15 220	semaphorin V	F4k		16 800	IL-5
B7g		-15 072	SKY	D1a	1.842	1 8757	CSPCP; aggrecan 1;
A6f		-14 898	b-raf	A6i		1 9497	c-myc binding protein
B5l	0.670	-14 354	rhoA	B5c		19 662	CD27BP (Siva)
E4i	0.181	-14 319	p160ROCK	A3e		28 403	mda-6; CAP20
F5d		-13 972	IL-12	F5n		32 402	MIF
C1i		-13 927	DNA polymerase	B5b		36 045	GST homolog
A4j	0.216	-13 888	ERK6; ERK5				

### 3 讨论

自1995年Brown实验室首次报道了微阵列技术(Microarray)以来, 因其信息量大, 操作简单、可靠, 可重复性

强且可以反复利用, 迅速被用于基因表达检测、DNA测序、寻找新基因、突变体和多态性的检测、药物筛选、疾病诊断和基因文库作图等方面<sup>[20]</sup>. Atlas微阵列

膜是微阵列系统的一种,也称为DNA芯片(DNA chip).本研究结果表明:在肝硬化中,对细胞增生起促进作用的基因表达明显下调,对细胞增生起抑制作用的基因表达明显上调;与细胞间相互作用、细胞粘连、生长因子受体和细胞因子有关的基因也发生了明显改变.这些改变构成了肝硬化不同于正常肝脏特异的基因表达谱.

在对细胞增生周期调控的基因中,转录因子E2F家族中的配体DP2(TFDP2)在肝硬化中有明显的下降.TFDP2是E2F家族的重要配体,虽然E2F家族有1-5五个基因,但其配体却只有DP1和DP2两个,尤以DP2的功能更为重要.其是通过与E2F组分形成DNA结合复合体而发挥作用,在细胞周期的调节和分化中发挥重要作用,可以促进S期的进程<sup>[21]</sup>.TFDP2还可以通过调节E2F而在细胞周期中发挥作用,其在肝硬化组织中的表达下降,说明肝硬化时细胞的倍增时间延长.促分裂原活化激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MAP kinase kinase 1, MAPKK1)是胞外信号调节激酶的亚类,其可被丝氨酸磷酸化所激活,上游的激活因子c-raf, ras和MEK激酶均可以调节其活性<sup>[22]</sup>.在肝硬化中表达明显下降的基因还有LAR, LAR是跨膜蛋白酪氨酸磷酸酯酶的前体,有调节细胞与细胞粘连分子之间的作用<sup>[23]</sup>,其在肝硬化中表达下降亦可能起同样的作用.

与细胞凋亡有关的基因在肝硬化中表达下调,BAK可以直接刺激细胞凋亡,他通过BH3结构域和Bcl-2结合,抑制Bcl-2的功能,进而发挥促进凋亡作用<sup>[24]</sup>,其在肝硬化组织中的表达明显下降.DNA-PK由催化亚单位和由G22P1基因编码的自身免疫性抗原Ku构成,催化亚单位的活性是依赖于Ku的活性来调节,许多DNA结合蛋白,包括许多转录因子等都是DNA-PK的底物<sup>[25]</sup>.DNA-PK还可以控制转录、凋亡和染色体端粒的长度,他的催化亚基是Caspase家族Caspase-3介导凋亡通路上的一个重要目标蛋白<sup>[26]</sup>.DNA-PK还参与双股DNA断裂(DNA double strand breaks, DSBs)的修复和V(D)J重组,其活性的调节可通过自身磷酸化的过程进行<sup>[25]</sup>.DNA拓扑异构酶(DNA TOPI)催化超螺旋DNA的解链,并且在DNA的复制、转录和重组中发挥重要作用,同时还可以改变DNA的立体构象<sup>[27]</sup>.真核生物物的DNA TOPI是高度保守的,他的功能受抑制时,将导致DNA双链断裂、堆积,进而造成细胞死亡.

此外,在肝硬化中表达上调的基因有整合蛋白 $\beta 7$ (integrin beta7),他调节细胞与细胞,细胞与基质之间的相互作用,同时还可以将各种刺激转变为细胞内信号<sup>[28]</sup>.XVIII型胶原(collagen type XVIII)属于胶原超家族中的一类,Endostatin是他的20 kDa的C末端,而且是表皮细胞增生和血管化的一种特异的抑制剂,同时可以使上皮细胞停止于G<sub>1</sub>期<sup>[29]</sup>.他们在肝硬化中的表达上调是我们首次发现.

总之,肝硬化的基因表达改变是非常复杂的,肝

硬化的发生、发展及演进正是这些基因改变共同作用的结果<sup>[30-32]</sup>.应用Atlas微阵列膜可以同时分析上千个基因的变化,可以提供特殊疾病的基因表达谱;可以为人们提供研究正常细胞和疾病细胞分子解剖学的第一手资料<sup>[33]</sup>.本研究发现的在肝硬化中较之正常肝组织有变化的许多基因大多数未见诸肝硬化研究的报道.这些基因改变的发现必将为人类研究肝硬化提供新的思路,为肝硬化逆转的基因治疗提供新的可能的靶点.

#### 4 参考文献

- Reshetnyak VI, Sharafanova TI, Ilchenko LU, Golovanova EV, Poroshenko GG. Peripheral blood lymphocytes DNA in patients with chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2001; 7:235-237
- Shen LJ, Zhang HX, Zhang ZJ, Li JY, Chen MQ, Yang WB, Huang R. Detection of HBV, PCNA and GST-pi in hepatocellular carcinoma and chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2003;9:459-462
- Dai WJ, Jiang HC. Advances in gene therapy of liver cirrhosis: a review. *World J Gastroenterol* 2001;7:1-8
- Zheng M, Cai WM, Weng HL, Liu RH. ROC curves in evaluation of serum fibrosis indices for hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2002;8:1073-1076
- Wang JY, Guo JS, Yang CQ. Expression of exogenous rat collagenase in vitro and in a rat model of liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2002;8:901-907
- Cheng XD, Jiang XC, Liu YB, Peng CH, Xu B, Peng SY. Effect of ischemic preconditioning on P-selectin expression in hepatocytes of rats with cirrhotic ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol* 2003;9:2289-2292
- Jiang XH, Zhong RQ, Yu SQ, Hu Y, Li WW, Kong XT. Construction and expression of a humanized M2 autoantigen trimer and its application in the diagnosis of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1352-1355
- Wang XZ, Chen ZX, Zhang LJ, Chen YX, Li D, Chen FL, Huang YH. Expression of insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 1 receptor and its intervention by interleukin-10 in experimental hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1287-1291
- Wang HT, Chen S, Wang J, Ou QJ, Liu C, Zheng SS, Deng MH, Liu XP. Expression of growth hormone receptor and its mRNA in hepatic cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:765-770
- Wang XZ, Zhang LJ, Li D, Huang YH, Chen ZX, Li B. Effects of transmitters and interleukin-10 on rat hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>. *World J Gastroenterol* 2003;9:539-543
- Liu YK, Shen W. Inhibitive effect of cordyceps sinensis on experimental hepatic fibrosis and its possible mechanism. *World J Gastroenterol* 2003;9:529-533
- Wang X, Zhong YX, Zhang ZY, Lu J, Lan M, Miao JY, Guo XG, Shi YQ, Zhao YQ, Ding J, Wu KC, Pan BR, Fan DM. Effect of L-NAME on nitric oxide and gastrointestinal motility alterations in cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:328-332
- Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Bai XG, Cao YZ. Methodologic research on TIMP-1, TIMP-2 detection as a new diagnostic index for hepatic fibrosis and its significance. *World J Gastroenterol* 2002;8:282-287
- Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Cao YZ. Inhibiting effect of antisense oligonucleotides phosphorothioate on gene expression of TIMP-1 in rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:363-369
- Weng HL, Cai WM, Liu RH. Animal experiment and clinical study of effect of gamma-interferon on hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:42-48
- 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

- 17 Assy N, Paizi M, Gaitini D, Baruch Y, Spira G. Clinical implication of VEGF serum levels in cirrhotic patients with or without portal hypertension. *World J Gastroenterol* 1999;5:296-300
- 18 Wang X, Chen YX, Xu CF, Zhao GN, Huang YX, Wang QL. Relationship between tumor necrosis factor-alpha and liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 1998;4:18
- 19 Sehgal A, Boynton AL, Young RF, Vermeulen SS, Yonemura KS, Kohler EP, Aldape HC, Simrell CR, Murphy GP. Application of the differential hybridization of Atlas Human expression arrays technique in the identification of differentially expressed genes in human glioblastoma multiforme tumor tissue. *J Surg Oncol* 1998;67:234-241
- 20 Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-470
- 21 Zhang Y, Venkatraj VS, Fischer SG, Warburton D, Chellappan SP. Genomic cloning and chromosomal assignment of the E2F dimerization partner TFDP gene family. *Genomic* 1997;39:95-98
- 22 Zheng CF, Guan KL. Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J* 1994;13:1123-1131
- 23 Aicher B, Lerch MM, Muller T, Schilling J, Ullrich A. Cellular redistribution of protein tyrosine phosphatases LAR and PTPsigma by inducible proteolytic processing. *J Cell Biol* 1997;138:681-696
- 24 Chittenden T, Harrington EA, O' Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, Guild BC. Introduction of apoptosis by Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 1995;374:733-736
- 25 Jin S, Inoue S, Weaver DT. Functions of the DNA-dependent protein kinase. *Cancer Surv* 1997;29:221-261
- 26 Teraoka H, Yumoto Y, Watanabe F, Tsukada K, Suwa A, Enari M, Nagata S. CPP32/Yama/apopain cleaves the catalytic component of DNA-dependent protein kinase in the holoenzyme. *FEBS Lett* 1996;393:1-6
- 27 Pommier Y. Eukaryotic DNA topoisomerase I: genome gatekeeper and its intruders, camptothecins. *Semin Oncol* 1996;23(1 Suppl 3):3-10
- 28 Yano Y, Geibel J, Sumpio BE. Cyclic strain induces reorganization of integrin alpha 5 beta 1 and alpha 2 beta 1 in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Biochem* 1997;64:505-513
- 29 Dhanabal M, Volk R, Ramchandran R, Simons M, Sukhatme VP. Cloning, expression, and in vitro activity of human endostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;258:345-352
- 30 Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Mori N, Tamesa T, Okada T, Takemoto N, Hashimoto K, Tangoku A, Hamada K, Nakayama H, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y. Differential gene expression in distinct virologic types of hepatocellular carcinoma: association with liver cirrhosis. *Oncogene* 2003;22:3007-3014
- 31 Anders RA, Yerian LM, Tretiakova M, Davison JM, Quigg RJ, Domer PH, Hoberg J, Hart J. cDNA microarray analysis of macroregenerative and dysplastic nodules in end-stage hepatitis C virus-induced cirrhosis. *Am J Pathol* 2003;162:991-1000
- 32 Chen L, Goryachev A, Sun J, Kim P, Zhang H, Phillips MJ, Macgregor P, Lebel S, Edwards AM, Cao Q, Furuya KN. Altered expression of genes involved in hepatic morphogenesis and fibrogenesis are identified by cDNA microarray analysis in biliary atresia. *Hepatology* 2003;38:567-576
- 33 Cole KA, Krizman DB, Emmert-Buck MR. The genetics of cancer - a 3D model. *Nat Genet* 1999;21(1 Suppl):38-41

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

• 消息 •

## 2002 年度总被引频次较高的 20 种期刊

排名	单位	总被引频次	排名	单位	总被引频次
1	世界华人消化杂志	4151	11	中国实用外科杂志	2044
2	科学通报	3321	12	第四军医大学学报	2025
3	植物学报	2927	13	中国中西医结合杂志	2003
4	物理学报	2870	14	中华医学杂志	2002
5	高等学校化学学报	2707	15	中草药	1999
6	中华外科杂志	2653	16	中国临床康复	1984
7	中华骨科杂志	2463	17	中华内科杂志	1902
8	分析化学	2268	18	中华儿科杂志	1863
9	生态学报	2257	19	中华妇产科杂志	1838
10	中华放射学杂志	2241	20	中华结核和呼吸杂志	1812

中国科学技术信息研究所 2003-12-09 发布 2002 年度中国科技论文统计结果

# 癌基因对大鼠肝卵圆细胞分化和转化的影响

廖冰, 薛玲, 何萍, 赵国强, 车丽洪

廖冰, 薛玲, 何萍, 赵国强, 车丽洪, 广州中山大学中山医学院病理学教研室 广东省广州市 510080

廖冰, 女, 1975-09-16 生, 广东省湛江市人, 汉族. 1998 年广州中山大学医学学士, 2003 年广州中山大学医学硕士, 在读医学博士生, 助教. 主要从事肝癌及消化系统肿瘤研究.

国家教委回国人员启动基金资助项目, No. 2000479

国家自然科学基金资助项目, No. 30170473

项目负责人: 薛玲, 510080, 广东省广州市中山二路 74 号, 中山大学中山医学院病理教研室. lxue99@pub.guangzhou.gd.cn

电话: 020-87330525 传真: 020-87331679

收稿日期: 2003-06-26 接受日期: 2003-09-18

## Effect of oncogenes on differentiation and transformation of rat oval cells

Bing Liao, Ling Xue, Ping He, Guo-Qiang Zhao, Li-Hong Che

Bing Liao, Ling Xue, Ping He, Guo-Qiang Zhao, Li-Hong Che, Department of Pathology, Zhongshan Medical College, Zhongshan University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Supported by the Foundation of National Education Committee, No. 2000479 and National Natural Science Foundation of China, No.30170473

Correspondence to: Dr. Ling Xue, Department of Pathology, Zhongshan Medical College, 74 Zhongshan 2th Road, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. lxue99@pub.guangzhou.gd.cn

Received: 2003-06-26 Accepted: 2003-09-18

## Abstract

AIM: To study the effects of oncogenes on differentiation and transformation of oval cells by detecting and characterizing the expression of AFP and *Ha-ras*, *c-myc* genes of rat oval cells *in vitro*.

METHODS: Proliferation of rat oval cells was induced by chemical carcinogen, 3'-Me-DAB. By using Percoll density gradient centrifugation method, oval cells were isolated, followed by continuous cultivation *in vitro*. The expression of *Ha-ras* and *c-myc* genes and AFP in the oval cells from cultures was dynamically observed by RNA-DNA slot blot hybridization and flow cytometry.

RESULTS: The expression of AFP and *Ha-ras*, *c-myc* genes in the cultured oval cells from different phases was synchronous: At the beginning of oval cell cultivation *in vitro*, both of AFP and oncogenes displayed a higher level expression and then declined. Up to 20<sup>th</sup> passage, the expression of AFP and oncogenes went up again and then kept a lower level. To 65<sup>th</sup> passage, the oval cells not only presented a growth rate increased, population doubling time shortened, adiploid chromosomes and growing on soft agar, but also the expression of oncogenes and AFP went up again.

CONCLUSION: Oncogenes and their products participate not only in the regulation of cellular transformation, but also in the process of cell differentiation.

Liao B, Xue L, He P, Zhao GQ, Che LH. Effect of oncogenes on differentiation and transformation of rat oval cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):344-346

## 摘要

目的: 通过对体外培养的大鼠卵圆细胞进行 AFP 和 *c-ras*、*c-myc* 基因的动态测定, 观察二者在卵圆细胞转化过程中的变化特点, 探讨癌基因对细胞分化和转化的影响。

方法: 用化学致癌剂 3'-Me-DAB 诱发出 SD 大鼠肝卵圆细胞增生, 采用 Percoll 密度梯度离心法分离之, 并进行长期体外培养. 在培养过程中, 通过免疫荧光流式细胞仪和 RNA-DNA slot blot 杂交分别测定细胞 AFP 及癌基因的表达情况。

结果: AFP 及 *c-ras*、*c-myc* 在卵圆细胞体外培养的不同时期呈现同步升高或降低: 培养初期, 卵圆细胞 AFP 及癌基因均呈高表达, 而后下降; 第 20 代时再次升高, 之后维持在较低的表达水平. 至第 65 代时, 卵圆细胞不仅呈现出生长速度加快、群体倍增时间缩短、多倍体核型及软琼脂生长, 而且癌基因及 AFP 的表达亦第 3 次升高。

结论: 癌基因及其产物不仅参与细胞的转化过程, 亦可调节细胞的分化。

廖冰, 薛玲, 何萍, 赵国强, 车丽洪. 癌基因对大鼠肝卵圆细胞分化和转化的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):344-346

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/344.asp>

## 0 引言

细胞的体外转化与体内肿瘤的形成一样, 涉及到多种原癌基因的激活、抑癌基因的失活及一系列复杂的调控机制失常<sup>[1-18]</sup>. 实验证实, *myc* 和 *ras* 基因属两类不同的原癌基因, 二者在细胞的转化过程中起协同作用, 共同维持细胞的恶性转化表型. 卵圆细胞是肝内的干细胞, 在原发性肝癌的发生中可能具有重要作用. 通过对卵圆细胞在体外培养过程中癌基因及 AFP 的表达变化的观察, 对于探讨癌基因对细胞转化和分化过程的作用及影响具有重要意义。

## 1 材料和方法

1.1 材料 我校动物中心提供二级标准 SD 大鼠, 体重 100-120 g, 稳定饲养 1 wk 后, 改喂含 0.6 g/L 致癌剂 3'-Me-DAB(东京化成工业株式会社)的饲料. 4 wk 后, 取动物肝脏, 用 Percoll 密度梯度离心法分离出卵圆细胞, 并接种于塑料培养瓶, 加入含 20% 小牛血清及各种氨基酸的培养液, 置 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养. 自 15 代开始, 在培养液中加入 20 mg/L EGF 继续培养.

1.2 方法 将 10 万细胞接种于直径 6 cm 的塑料培养皿

中, 第 2 d 计数活细胞数作为基数, 以后连续 7 d, 每天数 3 个平皿, 取其平均数, 计算倍增时间并绘制生长曲线. 从第 10 代起, 每隔 5-10 代进行 1 次测定. 卵圆细胞培养转化过程中染色体制作参照鄂征主编的《组织培养技术》一书中介绍的方法进行. 油镜下至少数 50 个完整的分散好的中期分裂相细胞, 计数其染色体数目. 制备双层琼脂, 其中上层琼脂含 10 万个细胞, 凝固后置于 37°C CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 4 wk 后观察结果. 从培养的第 35 代起, 每 10 代进行 1 次 Balb/c 裸小鼠接种成瘤试验. 接种细胞数为 5 × 10<sup>6</sup>, 接种部位为腋窝下, 4 wk 后观察有无成瘤.

1.2.1 卵圆细胞<sup>ras</sup>P21、AFP 免疫荧光 FCM 测定 收集不同培养时期的卵圆细胞, 700 mL/L 酒精固定, 离心后 PBS 洗 2 次, 不锈钢网过滤除去细胞团块. 调整细胞数至 5 × 10<sup>9</sup>/L. 取样本 100 μL, 分别加入一抗<sup>ras</sup>P21 (Dako 公司)和 AFP(Dako 公司), 室温孵育 30 min. 加入荧光标记抗体, 室温 30 min. 加 PBS 1 mL, 吹打细胞至均匀的单细胞相, 即行测定. 阴性对照管不加一抗. 所用流式细胞仪(epics elite)检测的激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm. 检测细胞数为 5 000-10 000 个. 上样测定前用人红细胞对仪器进行调整校对. 所有标本一次测完, 使其处于同一测定条件下.

1.2.2 卵圆细胞总 RNA 的提取及 RNA-DNA Slot blot 杂交 常规提取不同培养时期卵圆细胞的总 RNA, 用狭缝点样器将变性之 RNA 点于尼龙膜(宝灵曼)后进行杂交. 所用癌基因探针质粒(c-Ha-ras PBR322, 6.6 kb, Bam H I, Ki-ras PBR322 1.0 kb EcoR I, c-myc PBR322 8.5 kb Hind III /EcoR I)由北京中国医学科学院肿瘤研究所提供, DIG 标记(标记试剂盒为德国宝灵曼公司产品), 标记方法为随机引物法. 常规洗膜. 将尼龙膜封入杂交袋内, 加入 CSPD(宝灵曼), 5 min 后倾出 CSPD 液, 将膜压入 X 光暗盒曝光于 X 光胶片, 常规显影、定影. 胶片用 Kontron IBASS 2.0 图像分析处理仪(German)扫描分析结果.

## 2 结果

卵圆细胞的生长速度随着体外培养时间的增长而加快, 传代时间从最初的 10-14 d 一代缩短至 2-3 d 一代, 且细胞由单层生长变为重叠生长. 细胞的群体倍增时间随着培养代数的增高而缩短, 第 10 代时为 40.9 h, 第 35 代时为 18.9 h, 至第 65 代时减至 15.65 h, 呈明显的递减趋势. 卵圆细胞体外培养过程中染色体数目在第 10 代时, 基本为整倍体; 第 35 代时染色体数目为 29-61, 异倍体细胞率为 80%; 第 65 代时, 则染色体数目范围为 23-81, 异倍体细胞率达 82%. 卵圆细胞在体外培养至第 35 代, 将细胞接种于软琼脂中, 4 wk 后在倒置显微镜下可见少数克隆生长, 3 个平皿分别可见 2, 5, 7 个克隆, 平均克隆数为 4.7 个, 且克隆较小, 其直径为 0.1 mm. 当卵圆细胞培养至 65 代时, 软琼脂克隆形成数目大大

增多, 3 个平皿分别见 7 865, 5 875 和 6 960 个克隆生长, 平均克隆数为 6 900 个, 且克隆体积较第 35 代时明显大, 直径大于 0.1 mm, 表明细胞生长异常活跃. 从卵圆细胞体外培养至第 35 代起, 每 10 代进行一次裸鼠皮下接种细胞成瘤实验, 但至第 65 代仍未能成瘤.

2.1 <sup>ras</sup>P21, AFP 的表达 卵圆细胞体外培养转化过程中, 正常肝细胞<sup>ras</sup>P21 及 AFP 荧光强度值 FCM 测定与阴性对照无明显差别, 故我们视之为<sup>ras</sup>P21 及 AFP 表达阴性. 卵圆细胞培养的初期,<sup>ras</sup>P21 与 AFP 均有较高水平的表达, 而后下降; 当第 15 代加入 EGF 后, 第 20 代细胞再次出现<sup>ras</sup>P21 和 AFP 的表达升高; 以后虽然各代细胞均有<sup>ras</sup>P21、AFP 的表达, 但水平较低, 至第 65 代时又再次升高(表 1).

表 1 卵圆细胞<sup>ras</sup>P21, AFP 免疫荧光值及 c-myc、Ha-ras、Ki-ras mRNA 的表达

细胞代数	荧光强度(mean±SD)		平均灰度		
	<sup>ras</sup> P21	AFP	c-myc	Ha-ras	Ki-ras
P10	2.87 ± 1.58	1.95 ± 1.01	12.22	9.93	6.64
P15	1.86 ± 1.30	0.63 ± 0.30	8.3	4.82	
P20	2.82 ± 2.16	1.75 ± 1.24	11.65	8.6	
P25	1.98 ± 0.59	0.96 ± 0.43	3.22	5.96	
P35	1.86 ± 1.31	0.86 ± 0.54	9.82	6.24	
P45	1.76 ± 1.85	0.51 ± 0.26	11.45	11.79	5.81
P55	1.77 ± 1.80	0.55 ± 0.38	8.67	5.56	
P65	2.66 ± 1.64	1.36 ± 0.92	13.21	7.5	3.34

2.2 c-myc、Ha-ras、Ki-ras mRNA 的表达 卵圆细胞在体外培养转化过程中, c-myc, Ha-ras 和 Ki-ras 三种癌基因的表达不是呈持续性升高或持续性降低, 而是表现为升高、降低交替出现. 在细胞生长的早期阶段, 三种癌基因均保持在一定的高表达水平, 而后下降. 第 35 代(开始出现软琼脂生长)时 c-myc 和 Ha-ras 再次升高, 但 Ki-ras 未能检测到. 至第 45 代, c-myc, Ha-ras 和 Ki-ras 均升高, 直至第 65 代(表 1). 总体来说, 三种癌基因的表达基本保持同步升高或降低.

## 3 讨论

癌基因与细胞的生长、发育、分化及癌变密切相关<sup>[1-18]</sup>. 在致癌因素的作用下, 原癌基因被激活并高度表达, 产生大量转化蛋白, 使正常细胞的增生和分化机制发生紊乱, 导致细胞无控制地增生, 从而引起细胞癌变. 已知 myc 和 ras 基因属两类不同的原癌基因, 前者的产物为一种转化蛋白, 位于细胞核内, 在细胞增生过程中起重要作用, 可使原代培养细胞获得永生性而具有无限制生长的能力, 同时参与细胞分化的调节; 后者的产物位于细胞质膜内面, 具有与 G 蛋白相似的功能, 并有 GTase 活性, 其作用是使细胞处于激发状态, 并使细胞表型发生变化. c-myc 与 c-ras 基因在细胞的转化过程中起协同作用, 共同维持细胞的恶性转化表型<sup>[19-20]</sup>. 过去认为原癌基因仅同细胞分裂、生长及转化有关, 现已

有证据表明,原癌基因至少在人体和动物的某些组织、个体发育的某个特定阶段参与调节细胞的分化,因为在胚胎组织中可检测到不少原癌基因的明显表达。

本实验中,<sup>ras</sup>P21有三次升高,且均与ras mRNA的表达升高保持同步,提示<sup>ras</sup>P21的增高可能是ras基因放大或过表达所引起。同时我们推测,第一次升高的P21蛋白与后两次升高的P21蛋白可能是不同性质的ras基因产物:设想当致癌剂作用于肝脏后,引起ras基因扩增并过表达,产生较多的野生型P21蛋白参与卵圆细胞的增生与分化调节。已知GF具有某些癌基因产物的作用,可通过调节其他癌基因的表达和影响细胞的信号传导而促进细胞生长,加速细胞转化<sup>[20-23]</sup>。卵圆细胞培养至15代后,由于EGF的介入(可能还有其他因素的参与),不仅引起c-myc和Ha-ras再次过表达,同时亦可能引起了基因的突变(点突变、基因重排等),由此导致其表达产物P21蛋白不仅在量上发生了变化,而且在质上亦发生了改变(即编码产生突变型P21蛋白)。这种改变导致了细胞朝着恶性转化方向发展,不仅使细胞有了恶性表型(包括生长加快、形态变化、核型改变等),同时在c-myc的协同作用下获得了永生性并不断增生,最终发生转化。

AFP是肝细胞癌重要的标志物之一。由于他在人的胚胎时期有高表达(由胚胎肝细胞和卵黄囊产生),而出生后则迅速降低,故而AFP既可作为幼稚肝细胞和肝癌细胞的标志物,亦可作为卵圆细胞具有肝细胞某些表型特点的佐证。从我们的实验结果可见,卵圆细胞在体外培养、转化过程中,AFP与Ha-ras和c-myc mRNA的表达一样,反复出现了三次升高。结合相应时期细胞的形态、生长速度、核型变化及软琼脂生长与否,我们认为,第1次AFP的升高(第10代)主要为未分化幼稚的卵圆细胞所产生,他表明卵圆细胞具有肝细胞的某些表型特征。AFP的再次升高(第15代)可视为在癌基因及其产物的作用下,卵圆细胞逐步增生、转化成为具有某些恶性性质的群体(至少有部分细胞如此)。而AFP的第3次升高(第65代),此时卵圆细胞无论在核型、倍增时间、或是软琼脂生长方面都表现出恶性细胞的特点,而AFP的升高则进一步提示卵圆细胞此时可能转化为具有一定恶性表型、可表达AFP的肝肿瘤细胞。

综观卵圆细胞体外培养转化过程中c-myc、Ha-ras、Ki-ras mRNA、<sup>ras</sup>P21及AFP的表达变化,提示细胞的体外转化有赖于两种或两种以上癌基因的协同作用;癌基因及其产物不仅参与细胞的转化过程,亦可调节细胞的分化。

#### 4 参考文献

- 1 Lin GY, Chen ZL, Lu CM, Li Y, Ping XJ, Huang R. Immunohistochemical study on p53, H-rasp21, c-erbB-2 protein and PCNA expression in HCC tissues of Han and minority ethnic patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:234-238
- 2 Feng DY, Zheng H, Tan Y, Cheng RX. Effect of phosphorylation of MAPK and Stat3 and expression of *c-fos* and *c-jun*

- proteins on hepatocarcinogenesis and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 2001;7:33-36
- 3 Guo XZ, Shao XD, Liu MP, Xu JH, Ren LN, Zhao JJ, Li HY, Wang D. Effect of bax, bcl-2 and bcl-xL on regulating apoptosis in tissues of normal liver and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:1059-1062
- 4 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
- 5 Liu LH, Xiao WH, Liu WW. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on the P16 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *World J Gastroenterol* 2001;7:131-135
- 6 Cui J, Yang DH, Bi XJ, Fan ZR. Methylation status of *c-fms* oncogene in HCC and its relationship with clinical pathology. *World J Gastroenterol* 2001;7:136-139
- 7 Jiang Y, Zhou XD, Liu YK, Wu X, Huang XW. Association of hTcf-4 gene expression and mutation with clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:804-807
- 8 Qin LL, Su JJ, Li Y, Yang C, Ban KC, Yian RQ. Expression of IGF- II, p53, p21 and HBxAg in precancerous events of hepatocarcinogenesis induced by AFB1 and/or HBV in tree shrews. *World J Gastroenterol* 2000;6:138-139
- 9 Sun BH, Zhang J, Wang BJ, Zhao XP, Wang YK, Yu ZQ, Yang DL, Hao LJ. Analysis of in vivo patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to p21(WAF1) expression and hepatic apoptosis. *World J Gastroenterol* 2000;6:356-360
- 10 Zhao LS, Qin S, Zhou TY, Tang H, Liu L, Lei BJ. DNA-based vaccination induces humoral and cellular immune responses against hepatitis B virus surface antigen in mice without activation of *C-myc*. *World J Gastroenterol* 2000;6:239-243
- 11 Luo D, Liu QF, Gove C, Naomov N, Su JJ, Williams R. Analysis of *N-ras* gene mutation and p53 gene expression in human hepatocellular carcinomas. *World J Gastroenterol* 1998;4:97-99
- 12 Zuo LF, Lin PZ, Qi FY, Guo JW, Liu JH. Flow cytometric analysis of DNA, telomerase content and multi-gene expression in esophageal epithelial dysplasia. *World J Gastroenterol* 2003;9:2409-2412
- 13 Wang Q, Lin ZY, Feng XL. Alterations in metastatic properties of hepatocellular carcinoma cell following H-ras oncogene transfection. *World J Gastroenterol* 2001;7:335-339
- 14 Yin ZZ, Jin HL, Yin XZ, Li TZ, Quan JS, Jin ZN. Effect of *Boschniakia rossica* on expression of GST-P, p53 and p21(ras) proteins in early stage of chemical epatocarcinogenesis and its anti-inflammatory activities in rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:812-818
- 15 Boivin-Angele S, Lefrancois L, Froment O, Spiethoff A, Bogdanffy MS, Wegener K, Wesch H, Barbin A, Bancel B, Trepo C, Bartsch H, Swenberg J, Marion MJ. Ras gene mutations in vinyl chloride-induced liver tumours are carcinogen-specific but vary with cell type and species. *Int J Cancer* 2000;85:223-227
- 16 De La Coste A, Mignon A, Fabre M, Gilbert E, Porteu A, Van Dyke T, Kahn A, Perret C. Paradoxical inhibition of *c-myc*-induced carcinogenesis by Bcl-2 in transgenic mice. *Cancer Res* 1999;59:5017-5022
- 17 Fang JY, Lu J, Chen YX, Yang L. Effects of DNA methylation on expression of tumor suppressor genes and proto-oncogene in human colon cancer cell lines. *World J Gastroenterol* 2003;9:1976-1980
- 18 Ouyang GL, Li QF, Peng XX, Liu QR, Hong SG. Effects of tachyplesin on proliferation and differentiation of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:1053-1058
- 19 薛玲, 廖冰, 赵国强, 胡瑞德, 车丽洪, 董郡. 大鼠肝癌形成过程中癌基因表达变化的意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:904-907
- 20 施秀清, 李功, 李春生, 倪灿荣, 梁汛, 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
- 21 凌昌全, 钱妍, 赵江安, 金岩. 实验性肝癌形成过程中c-myc IGF-II基因与CyclinD1的表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:1452-1453
- 22 王朝晖, 张雪梅, 战敏, 唐凤仙, 李利. 大肠癌转化生长因子β及其受体的表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:462-463
- 23 范子荣, 杨冬华, 覃汉荣, 黄纯焯, 徐重, 邱庆林. 肝癌和癌旁肝组织中IGF- I, IGF受体mRNA的表达. *世界华人消化杂志* 1999;7:848-850

# 中药抗纤软肝颗粒抑制PDGF诱导的肝星状细胞MEK-1和c-fos表达

杨玲, 朱清静, 笄邦红, 张赤志

杨玲, 笄邦红, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科湖北省武汉市 430022  
朱清静, 张赤志, 湖北中医学院附属医院肝病研究所 湖北省武汉市 430061  
杨玲, 女, 1970-12生, 四川省名山县人, 汉族, 1994年泸州医学院本科毕业, 2002年湖北中医学院博士研究生毕业, 讲师, 主治医师。主要从事慢性肝病的中医药防治研究。  
湖北省自然科学基金资助项目, No. 2000J042  
湖北省教育厅科研基金资助项目, No. 2000A06010  
项目负责人: 张赤志, 430061, 湖北省武汉市武昌区花园山4号, 湖北中医学院附属医院肝病研究所。hepayang@163.com  
电话: 027-85351414  
收稿日期: 2003-08-11 接受日期: 2003-09-24

## Chinese herbs Kangxian ruangan keli inhibits expression of MEK-1 and c-fos in hepatic stellate cell induced by PDGF

Ling Yang, Qing-Jing Zhu, Bang-Hong Da, Chi-Zhi Zhang

Ling Yang, Bang-Hong Da, Department of Traditional Chinese Medicine, Union Hospital, Tongji Medical college, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China  
Qing-Jing Zhu, Chi-Zhi Zhang, Institute of Liver Diseases, Affiliated Hospital of Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China  
Supported by the Natural Scientific Foundation of Hubei Province, No. 2000J042, and the Science Research Foundation of the Education Office of Hubei Province, No. 2000A06010  
Correspondence to: Dr. Chi-Zhi Zhang, Institute of Liver Diseases, Affiliated Hospital of Hubei College of Traditional Chinese Medicine, 4 Huayuanshan, Wuchang, Wuhan 430061, Hubei Province, China. hepayang@163.com  
Received: 2003-08-11 Accepted: 2003-09-24

### Abstract

**AIM:** To investigate the effect of Kangxian ruangan keli (KXR) on the expression of MEK-1 and c-fos in hepatic stellate cell (HSC) induced by PDGF.

**METHODS:** In a serum-free culture system, HSC was treated with a KXR preparation for 24 hours, followed by stimulation with PDGF-BB for 24 hours. Then the cells were incubated again in the medium containing KXR for 3 hours stimulated with PDGF-BB for 5 minutes, and collected. The proliferation of HSC was examined using an MTT assay. MEK-1 was detected with Western blotting and visualized by the enhanced chemiluminescent (ECL) method. The expression of c-fos mRNA was analyzed with in situ hybridization.

**RESULTS:** The A values for the HSC growing in the media without and with addition of PDGF were  $0.170 \pm 0.060$  and  $0.820 \pm 0.050$ , respectively. The PDGF-induced increase was hindered remarkably by KXR preparation in a dose-dependent manner. Reaction values for the systems with 5 g/L and 1.25 g/L of KXR were  $0.280 \pm 0.030$  and  $0.430 \pm 0.040$

respectively, lower significantly than that in the culture free of KXR ( $0.820 \pm 0.050$ ,  $P < 0.01$ ). In addition, values for MEK-1 in HSC treated with 5 mg/mL and 1.25 mg/mL of KXR were  $0.143 \pm 0.013$ , and  $0.170 \pm 0.007$ , respectively, being lower than that in the cells treated only with PDGF-BB ( $0.186 \pm 0.010$ ,  $P < 0.01$ ). The expression level of c-fos mRNA was  $0.152 \pm 0.010$  and  $0.163 \pm 0.005$ , respectively, also lower than that of the PDGF group ( $0.183 \pm 0.014$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Within the dose range used in the present study, KXR preparation shows an inhibitory effect on HSC proliferation induced by PDGF. The mechanism of this process may involve interference with Ras-MEK-MAPK signal transduction mediated by PDGF.

Yang L, Zhu QJ, Da BH, Zhang CZ. Chinese herbs Kangxian ruangan keli inhibits expression of MEK-1 and c-fos in hepatic stellate cell induced by PDGF. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):347-350

### 摘要

**目的:** 探讨抗纤软肝颗粒对PDGF诱导的肝星状细胞MEK-1和c-fos表达的影响。

**方法:** 采用无血清培养, 不同浓度的抗纤软肝颗粒温育肝星状细胞24 h后, PDGF-BB(10 pg/L)刺激24 h, 再加入上述浓度的抗纤软肝颗粒, 3 h后, 又加入PDGF-BB(10 pg/L)作用5 min, 然后收集细胞。采用MTT法测定细胞增生, 免疫印迹化学发光法检测MEK-1, 原位杂交法检测c-fos mRNA。

**结果:** 无血清培养显示抗纤软肝颗粒对于PDGF诱导的细胞增生具有抑制作用, 并呈剂量依赖性, 抗纤软肝颗粒5 g/L、1.25 g/L各组的MTT测定值分别为 $0.28 \pm 0.03$ 和 $0.43 \pm 0.04$ , 与PDGF对照组( $0.82 \pm 0.05$ )相比 $P < 0.01$ ; 对PDGF诱导的MEK-1及c-fos mRNA表达均有显著的抑制作用: 抗纤软肝颗粒5 g/L、1.25 g/L各组细胞的MEK-1表达水平分别为 $0.143 \pm 0.013$ 、 $0.169 \pm 0.007$ , 与PDGF组( $0.186 \pm 0.010$ )比较有显著性差异( $P < 0.01$ ); c-fos mRNA表达水平分别为 $0.152 \pm 0.010$ 、 $0.163 \pm 0.005$ , 与PDGF组( $0.183 \pm 0.014$ )比较也显著减弱( $P < 0.01$ )。

**结论:** 在所应用的剂量范围内, 抗纤软肝颗粒可抑制PDGF诱导的HSC增生, 其机制与干扰Ras-MEK-MAPK信号通路有关。

杨玲, 朱清静, 笄邦红, 张赤志. 中药抗纤软肝颗粒抑制PDGF诱导的肝星状细胞MEK-1和c-fos表达. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):347-350  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/347.asp>

## 0 引言

肝纤维化是由各种致病因子(包括慢性病毒性肝炎、酒精、药物等)导致的一种增生性疾病,以肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)的过度增生及所分泌的细胞外基质过度沉积为特征.因此阻抑激活的肝星状细胞增生是治疗慢性肝损伤和肝纤维化的重要策略<sup>[1-6]</sup>.血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是HSC最强的有丝分裂原,尤其是PDGF-BB<sup>[7-8]</sup>.Ras-MEK-MAPK信号途径是PDGF诱导肝星状细胞增生的重要胞内信号转导途径<sup>[9]</sup>.因此阻断细胞因子的促增生作用,则有望成为肝纤维化治疗的有效手段.中药复方抗纤软肝颗粒具有活血化痰,软坚散结的功效.对于慢性肝病有良好疗效,能防治CCl<sub>4</sub>所致的大鼠肝纤维化形成,并能抑制HSC增生<sup>[10-15]</sup>.我们探讨抗纤软肝颗粒对Ras-MEK-MAPK信号途径的影响如下:

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 肝星状细胞系(HSC-T<sub>6</sub>)由上海中医药大学徐列明教授惠赠,其表现型为活化的HSC.抗纤软肝颗粒由丹参、莪术、海藻、鳖甲等组成,由湖北中医学院附属医院制备,含生药2 g/g,用DMEM溶解,经0.45 μm滤器过滤除菌备用.DMEM培养基、小牛血清(fetal calf serum, FCS)美国GIBCO公司产品,PDGF-BB购自Sigma公司产品,MEK-1单抗购自Santa Cruz公司、c-fos原位杂交试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,ECL试剂购自Pierce公司.

**1.2 方法** 细胞培养及药物处理 HSC-T<sub>6</sub>复苏后,接种于含100 ml/L小牛血清,1 × 10<sup>-5</sup> U/L青霉素,100 mg/L链霉素,10 g/L谷氨酰胺和0.1 mmol/L HEPES的DMEM培养基中.在含50 ml/L CO<sub>2</sub>培养箱中于37 °C培养.亚单层HSC无血清培养24 h后,加入无血清培养基稀释的抗纤软肝颗粒(设5 g/L, 1.25 g/L 2个组)作用24 h后,加入PDGF(10 pg/L),经24 h培养后,再加入上述浓度的抗纤软肝颗粒,作用3 h后再加入PDGF 10 pg/L,5 min后将细胞消化离心.并设空白对照组和PDGF组,每组设4复孔,结果取均值.

HSC-T<sub>6</sub>细胞增生的检测采用MTT比色法.细胞按1 × 10<sup>8</sup> cells/L接种于96孔培养板,按上述药物处理后,加入1 g/L的MTT液20 ul,37 °C孵育4 h,加入二甲基亚砷溶解结晶,2 min后,用全自动酶标仪测定波长570 nm处各组细胞的吸光度A值.

Western blot分析MEK-1的表达上述药物处理的细胞用冰冷的PBS洗涤2次,加入样品裂解液[50 mmol/L Tris, CL, pH8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.2 g/L叠氮钠, 1 g/L SDS, 100 mg/L苯甲基磺酰氟, 1 mg/L Aprotinin, 10 g/L Nonidet P-40, 5 g/L去氧胆酸钠],置冰上孵育20 min,4 °C, 12 000 g,离心2 min,用70 g/L SDS-PAGE,每孔上样6 μg蛋白进行电泳,电转移至硝酸纤维素膜上,MEK-1 mAb 1:400稀释,二抗1:2 000稀释,

应用ECL增强化学发光法显迹,X光片显影,HPIAS-1 000图像分析仪进行半定量分析.

原位杂交分析c-fos mRNA的表达 以地高辛标记c-fos寡核苷酸探针进行原位杂交.细胞爬片经40 g/L多聚甲醛固定,5 ml/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/甲醛室温处理,蛋白酶K消化;每张爬片加20 ul含寡核苷酸探针的原位杂交液,37 °C,杂交过夜;采用过氧化物酶标记地高辛抗体-DAB显色系统显色,阳性杂交信号呈棕黄色;以不加含探针的原位杂交液作阴性对照,结果为阴性;阳性结果用HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文分析系统进行显微图像分析(结果以平均光密度A值表示).

统计学处理 结果用mean±SD表示,采用t检验,P < 0.05则具有统计学差异.

## 2 结果

**2.1 抗纤软肝颗粒对PDGF诱导的HSC-T<sub>6</sub>细胞增生的影响** 抗纤软肝颗粒呈剂量依赖性抑制PDGF诱导的细胞分裂增生,以5 g/L浓度时最为显著,与PDGF对照组比较差异显著(P < 0.01,表1).

表1 抗纤软肝颗粒对PDGF诱导的HSC-T<sub>6</sub>增生的影响(mean±SD)

组别	药物浓度 (g/L)	A	抑制率(%)
对照组		0.170 ± 0.060 <sup>b</sup>	-
PDGF组		0.820 ± 0.050	0.000
抗纤软肝颗粒+PDGF组	5.00	0.280 ± 0.030 <sup>b</sup>	65.900
	1.25	0.430 ± 0.040 <sup>b</sup>	47.600

<sup>b</sup>P < 0.01 vs PDGF.

**2.2 抗纤软肝颗粒对PDGF诱导的HSC-T<sub>6</sub>表达MEK-1的影响** 无血清培养的HSC经PDGF诱导后引起MEK-1表达增强,PDGF组为0.186 ± 0.010(图1),而空白组为0.122 ± 0.008, P < 0.01;经抗纤软肝颗粒作用后引起MEK-1表达呈剂量依赖性减弱,5 g/L与1.25 g/L组MEK-1表达水平分别为0.143 ± 0.013、0.169 ± 0.007,其中以抗纤软肝颗粒5 g/L组作用最显著.

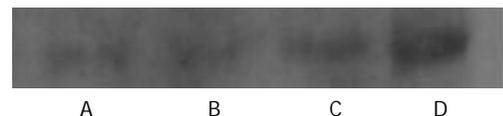


图1 抗纤软肝颗粒对PDGF诱导的MEK-1的影响. A: 空白对照; B: 5 g/L抗纤软肝颗粒; C: 1.25 g/L抗纤软肝颗粒; D: PDGF 10 pg/L.

**2.3 抗纤软肝颗粒对PDGF诱导的HSC-T<sub>6</sub>表达c-fos基因的影响** 为观察抗纤软肝颗粒对PDGF信号的影响,我们进一步研究了其对MEK-1激活后的下游信号分子c-fos基因表达的影响,结果表明与空白组(0.130 ± 0.010,图2A)比较,PDGF能显著增强c-fos mRNA的表达(0.183 ± 0.014,图2B, P < 0.01),而抗纤软肝颗粒则能显著抑

制 c-fos mRNA 的表达, 5 g/L 与 1.25 g/L 组 c-fos mRNA 的表达水平分别为  $0.152 \pm 0.010$ 、图 2D,  $0.163 \pm 0.005$ , 图 2C, 与 PDGF 组比较有显著性差异,  $P < 0.01$ .

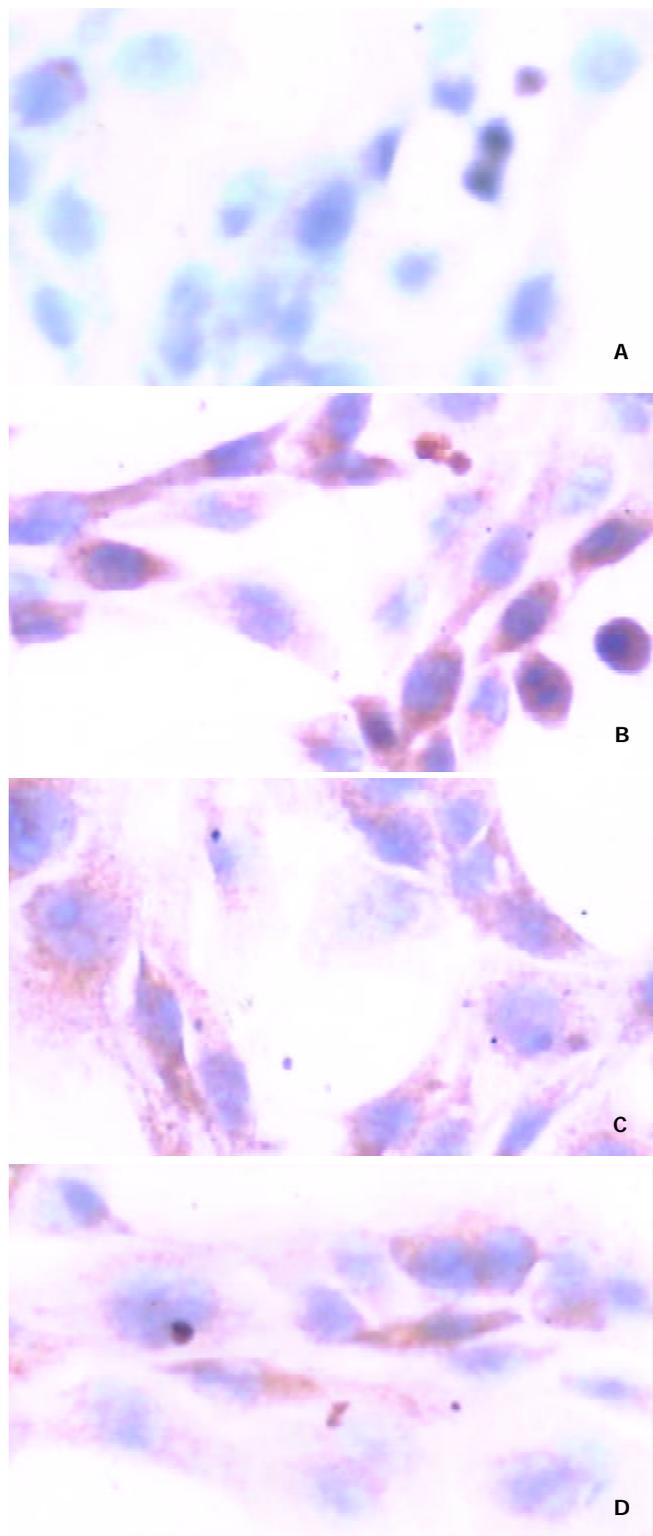


图 2 抗纤软肝颗粒对 c-fos mRNA 的影响原位杂交  $\times 400$ . A: 空白对照组表达呈弱阳性; B: PDGF 组表达呈强阳性; C: PDGF+KXR 1.25 mg/mL 组表达减弱; D: PDGF+KXR 5 mg/mL 组表达显著减弱.

### 3 讨论

抗纤软肝颗粒中丹参具有一系列重要药理作用如抗炎、抗氧化、抑制 HSC 增生等<sup>[16-17]</sup>, 其提取物还能

诱导 HSC 凋亡<sup>[18-19]</sup>; 莪术油能抑制成纤维细胞增生及肝癌增生细胞核抗原(PCNA)的表达<sup>[20-21]</sup>; 海藻能提高机体清除具有重要致纤维化作用的活性氧的能力<sup>[22]</sup>. 该方能改善慢性肝病和肝硬化患者的肝功能, 降低血清肝纤维化指标, 并能防治 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化大鼠细胞外基质的产生和沉积, 抑制体外 HSC 增生、分泌胶原及 PDGF 诱导的酪氨酸磷酸化蛋白的表达<sup>[23]</sup>. HSC 被激活后获得了成纤维样细胞的表型特征: 表达  $\alpha$ -SMA、增殖活跃、细胞外基质合成增加<sup>[4, 24, 35]</sup>. 在这一过程中, 细胞因子及其胞内信号转导途径发挥了重要作用<sup>[9, 24-29]</sup>. 近年来, 已有不少研究揭示了在肝纤维化形成过程中肝星状细胞激活的胞内信号途径, 其中 PDGF 诱导 HSC 增生的胞内机制研究得相对清楚. 因此以抑制 PDGF 及其信号传递为目标的治疗策略备受重视.

细胞因子与其相应受体结合后, 可启动胞质中信号转导, 通过多种途径将信号传递到胞核内, 促进或抑制特定靶基因的表达<sup>[26, 28]</sup>. MEK-1 是 MAP Kinases 的上游激酶, MAPK 被激活后, 可催化 c-jun、c-fos、c-myc 以及核糖体 S6 蛋白激酶(RSK)的磷酸化, 以调节基因转录和 mRNA 的翻译, 使细胞由 G<sub>0</sub> 期进入到 G<sub>1</sub> 期<sup>[30-35]</sup>. 在 HSC 中, MAPK 通路是 PDGF 激活 c-fos 表达和丝裂原作用的重要信号通路之一. PDGF 受体和接头蛋白 arb2 的联接导致交换因子 mSos 的聚集, 同时激活 Ras, 进一步促使 Raf-1、MEK 和 ERK 的级联激活, 而药物在 MAPK 活化通路中的干扰作用, 可以减低 PDGF 对 HSC 的潜在丝裂原作用<sup>[28, 33]</sup>.

我们采用 Western blotting 方法, 分析了抗纤软肝颗粒对 PDGF 诱导的 HSC Ras-MEK-1-MAPK 信号通路的影响, 结果表明 HSC 中 MEK-1 的表达, PDGF 组明显高于空白对照组及抗纤软肝颗粒各剂量组, 其中 5 mg 组显著低于 1.25 mg 组, 各组间有显著性差异. 本实验所采用的抗纤软肝颗粒的浓度是经预实验获得的, 并在安全范围内, 细胞成活率在 95% 以上. 因此所观察到的以上结果具有一定的特异性, 而与药物的细胞毒作用无关. 进一步研究了抗纤软肝颗粒对 MEK-1 激活后的下游信号分子 c-fos 基因表达的影响, 表明 PDGF 能显著增强 c-fos mRNA 的表达, 而抗纤软肝颗粒则能显著抑制 c-fos 基因的表达. c-fos 基因是 PDGF 丝裂原信号经胞质传递至核内引起细胞增生的转录因子. 结合前期研究表明抗纤软肝颗粒可能通过抑制酪氨酸磷酸化蛋白的表达, 进而使 HSC 内酪氨酸激酶活性水平降低, 导致下游的蛋白激酶水平(如 MEK-1)下调, 核内增生信号减弱, 从而使细胞的生长状态受到抑制, 这可能是该方抑制肝星状细胞增生的作用机制之一.

### 4 参考文献

- 1 Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999; 19:129-140
- 2 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

- 3 Wang JY, Zhang QS, Guo JS, Hu MY. Effects of lycyrrhetic acid on collagen metabolism of hepatic stellate cells at different stages of liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2001; 7:115-119
- 4 Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells-a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d808-826
- 5 Pinzani M, Marra F, Carloni V. Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver* 1998;18:2-13
- 6 Kinnman N, Gorla O, Wendum D, Gendron MC, Rey C, Poupon R, Housset C. Hepatic stellate cell proliferation is an early platelet-derived growth factor-mediated cellular event in rat cholestatic liver injury. *Lab Invest* 2001;81:1709-1716
- 7 Iwamoto H, Nakamura M, Tada S, Sugimoto R, Enjoji M, Nawata H. Platelet derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor AG1295 attenuates rat hepatic stellate cell growth. *J Lab Clin Med* 2000;135:406-412
- 8 Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin Liver Dis* 2001;21:437-451
- 9 Marra F, Arrighi MC, Fazi M, Caligiuri A, Pinzani M, Romanelli RG, Efsen E, Laffi G, Gentilini P. Extracellular signal-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factor's actions in hepatic stellate cells, and is induced by *in vivo* liver injury in the rat. *Hepatology* 1999;30:951-958
- 10 熊益群, 严红梅, 张赤志. 抗纤软肝冲剂抗大鼠肝纤维化的实验研究. *中国实验方剂学杂志* 2000;6:28-30
- 11 杨玲, 朱清静, 张赤志. 抗纤软肝冲剂药物血清对激活肝星状细胞表达 I 型前胶原及 TGF- $\beta_1$  mRNA 的影响. *中国中医基础医学杂志* 2001;7:38-40
- 12 杨玲, 程红球, 朱清静, 张赤志. 抗纤软肝颗粒对 PDGF 诱导下 HSC 细胞周期及胞内  $Ca^{2+}$  浓度的影响. *中西医结合肝病杂志* 2002;12:20-22
- 13 周正, 张赤志, 陈婕, 周萍. 抗纤软肝冲剂药物血清对肝星状细胞增生的影响. *中药材* 2001;24:809-810
- 14 冯汉鹤, 张洪, 谈道彬. 抗纤软肝冲剂的制备及质量研究. *中西医结合肝病杂志* 2000;10:31-32
- 15 杨玲, 张赤志, 朱清静, 杨胜兰. 抗纤软肝颗粒对肝星状细胞增生的影响. *中国中西医结合消化杂志* 2002;10:323-324
- 16 Liu CH, Liu P, Hu YY, Xu LM, Tan YZ, Wang ZN, Liu C. Effects of salvianolic acid-A on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen production in culture. *Acta Pharmacol Sin* 2000;21:721-726
- 17 Liu P, Liu CH, Wang HN, Hu YY, Liu C. Effect of salvianolic acid B on collagen production and mitogen-activated protein kinase activity in rat hepatic stellate cells. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:733-738
- 18 Zhang XL, Liu L, Jiang HQ. Salvia miltiorrhiza monomer IH764-3 induces hepatic stellate cell apoptosis via caspase-3 activation. *World J Gastroenterol* 2002;8:515-519
- 19 Yao XX, Tang YW, Yao DM, Xiu HM. Effects of Yigan Decoction on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:511-514
- 20 石灵春, 吴万垠, 张维彬, 区勇全, 谭敏, 肖楚梅. 莜术油对小鼠肝癌增生细胞核抗原的影响. *世界华人消化杂志* 1999;7:156-157
- 21 辛建杰, 李光友, 崔科远. 海藻硒多糖对小鼠免疫功能的影响. *中国海洋药物* 1999;3:36-38
- 22 郑刚, 郝军, 贾钢锐, 钟慧闽. 褐藻胶对大鼠实验性肝纤维化的防治作用. *新消化病学杂志* 1997;5:353-354
- 23 Yang L, Zhang CZ, Zhu QJ. Kangxian ruangan keli inhibits hepatic stellate cell proliferation mediated by PDGF. *World J Gastroenterol* 2003;9:2050-2053
- 24 Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:397-416
- 25 Iredale JP. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis* 2001;21:427-436
- 26 Britton RS, Bacon BR. Intracellular signaling pathways in stellate cell activation. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:922-925
- 27 Maeda N, Kawada N, Seki S, Arakawa T, Ikeda K, Iwao H, Okuyama H, Hirabayashi J, Kasai KI, Yoshizato K. Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. *J Biol Chem* 2003; [epub ahead of print]
- 28 Pinzani M. Pdgf and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci* 2002;7:D1720-1726
- 29 Liu XI, Yang L, Mao YQ, Wang Q, Huang MH, Wang YP, Wu HB. Effects of the tyrosine protein kinase inhibitor genistein on the proliferation, activation of cultured rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:739-745
- 30 Carloni V, Defranco RM, Caligiuri A, Gentilini A, Sciammetta SC, Baldi E, Lottini B, Gentilini P, Pinzani M. Cell adhesion regulates platelet-derived growth factor-induced MAP kinase and PI-3 kinase activation in stellate cells. *Hepatology* 2002; 36:582-591
- 31 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
- 32 刘涛, 胡晋红, 蔡溱, 计一平. 贮脂细胞内的信号传导分子. *世界华人消化杂志* 2001;9:805-807
- 33 蒋明德, 马洪德, 解方为. ERK 信号传导通路与肝星状细胞周期调控. *世界华人消化杂志* 2003;11:1037-1039
- 34 梁增文, 张国, 王天才. 大鼠肝纤维化中细胞外信号调节激酶的作用. *世界华人消化杂志* 2003;11:730-732
- 35 秦建平, 蒋明德. 肝星状细胞的表型及调控与肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2001;9:801-804

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

• 消息 •

## World Journal of Gastroenterology 排版印刷

《World Journal of Gastroenterology, WJG》全文模板设计从书眉、栏目、题名、作者、作者单位、基金资助、通讯作者、E-mail、电话、传真、收稿日期、接受日期、摘要、文献著录格式、一级标题字体、二级标题字体、图、表、参考文献, 均制订了统一的字体及格式要求, 每篇文章结束后不再续接其他文章, 适用于摘要数据库、ASP、XML、PDF 格式的要求. WJG 使用的排版软件为国际流行的 PageMaker 软件, 可自动生成 ASP、XML、PDF, 为 WJG 进入电子版格式起到了重要的作用. WJG 出片为进口片, 黑白和彩色印刷用海德堡彩色印刷, 采用三面刀剪切. 北京科信印刷厂承担 WJG 印刷业务, 一条龙服务, 包括出片、打样、装订前书样, 全部送杂志社审核, 达到标准后才能印刷和装订. WJG 出版后, 赠送给国内外专家, 他们认为 WJG 封面、内文印刷和装订可与国际著名期刊相媲美.

# 实验性肝硬化大鼠小肠血红素氧合酶的表达

田德安, 周晓黎

田德安, 周晓黎, 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

田德安, 男, 1961-02-19 生, 湖北武汉人, 汉族. 1990 年. 德国 ULM 大学  
博士研究生毕业, 副主任医师, 硕士生导师. 主要从事肝病研究.

项目负责人: 田德安, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附  
属同济医院消化内科. xlzh2000@sohu.com

电话: 027-83663611

收稿日期: 2003-06-28 接受日期: 2003-07-24

## Heme oxygenase expression in small intestine of experimental hepatic cirrhosis rats

De-An Tian, Xiao-Li Zhou

De-An Tian, Xiao-Li Zhou, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. De-An Tian, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. xlzh2000@sohu.com

Received: 2003-06-28 Accepted: 2003-07-24

### Abstract

AIM: To investigate the expression of heme oxygenase (HO) in the small intestine in cirrhotic rats and control rats.

METHODS: The expression of heme oxygenase isoenzyme 1 and 2 (HO-1, HO-2) proteins in the small intestine was assessed by immunohistochemistry. The change of expression of HO was studied by computer image system and quantitative analysis.

RESULTS: The portal venous pressure (PVP) of cirrhotic rats was significantly higher than that of controls ( $2.609 \pm 0.144$  versus  $0.916 \pm 0.034$ ,  $t=39.37$ ,  $P<0.01$ ), whereas the mean arterial pressure (MAP) was significantly lower than that of controls ( $13.411 \pm 1.208$  versus  $17.423 \pm 1.472$ ,  $t=7.297$ ,  $P<0.05$ ). It was found that HO-1 positive staining localized in submucosal small artery and small vein, the layer of muscle, serosa, even in submucosal gland of cirrhotic rats, but only poor positive staining in those of normal controls ( $0.4813 \pm 0.1223$  versus  $0.3762 \pm 0.0689$ ,  $t=19.022$ ,  $P<0.01$ ). In both groups, HO-2 was observed in submucosal blood vessel and gland, the layer of muscle, serosa. In cirrhotic rats, HO-2 staining did not display any notable changes compared with that of in control rats ( $0.4834 \pm 0.0997$  versus  $0.4813 \pm 0.1056$ ,  $t=0.595$ ,  $P>0.05$ ). In addition, the expression levels of heme oxygenase were correlated positively with portal venous pressure ( $r=0.655$ ,  $P<0.05$ ) and negatively with the mean arterial pressure ( $r=-0.852$ ,  $P<0.01$ ).

CONCLUSION: The expression of HO-1 is elevated in the small intestine of cirrhotic rats. It may play an important role in the development of portal hypertension enteropathy.

Tian DA, Zhou XL. Heme oxygenase expression in small intestine of experimental hepatic cirrhosis rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12(2):351-354

### 摘要

目的: 观察血红素氧合酶在肝硬化大鼠小肠组织中的表达.

方法: 建立大鼠四氯化碳肝硬化模型, 采用免疫组化法显示血红素氧合酶异构酶 HO-1、HO-2 在肝硬化实验组与正常对照组大鼠小肠组织中的表达, 应用图像分析系统对免疫组化的结果进行定量分析.

结果: 肝硬化实验组大鼠的门静脉压力较正常对照组显著增高 ( $2.609 \pm 0.144$  及  $0.916 \pm 0.034$ ,  $t=39.37$ ,  $P<0.01$ ), 而平均动脉压降低则低于正常对照组 ( $13.411 \pm 1.208$  及  $17.423 \pm 1.472$ ,  $t=7.297$ ,  $P<0.05$ ). 肝硬化实验组大鼠小肠黏膜下层的小动脉及小静脉、肌层、浆膜层, 甚至黏膜腺体内 HO-1 的表达均较强, 而正常对照组中的表达则较弱 ( $0.4813 \pm 0.1223$  及  $0.3762 \pm 0.0689$ ,  $t=19.022$ ,  $P<0.01$ ). HO-2 在两组大鼠的小肠组织中差异无统计学意义 ( $0.4834 \pm 0.0997$  及  $0.4813 \pm 0.1056$ ,  $t=0.595$ ,  $P>0.05$ ). 并且, 肝硬化实验组小肠 HO-1 的表达与门静脉压力呈正相关, 而与外周动脉压呈负相关.

结论: 肝硬化大鼠小肠组织中 HO-1 的表达增高, 可能参与了肝硬化门静脉高压性肠病的发生.

田德安, 周晓黎. 实验性肝硬化大鼠小肠血红素氧合酶的表达. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):351-354

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/351.asp>

### 0 引言

肝硬化门静脉高压时, 内脏血流动力学发生了明显的变化, 整个胃肠道的血流增加, 心排血量增加, 外周阻力下降. 肠黏膜血管扩张是门静脉高压性肠病的主要且具有特征性的病理变化, 肠道各个部位均有静脉曲张出血的报道, 但肝硬化门静脉高压时小肠病理生理改变的发生机制尚未完全阐明. 血红素氧合酶(heme oxygenase, HO)是合成内源性一氧化碳(endogenous carbon monoxide, CO)的起始酶和限速酶, HO/CO系统已成为当前的一项研究热点. 我们应用免疫组化法研究肝硬化大鼠小肠组织中血红素氧合酶异构酶 HO-1, HO-2 的表达, 探讨 HO/CO 系统在肝硬化小肠组织病变中的作用.

## 1 材料和方法

1.1 材料 抗HO-1和HO-2多克隆羊抗鼠抗体购于美国Santa Cruz生物技术公司,免疫组化过氧化物酶标记的链霉素卵白素(SP)染色试剂盒购于北京中山公司,浓缩型DAB试剂盒北京中山公司。

1.2 方法 选择健康成年♂SD大鼠,体重为(250 ± 25 g)(由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供),随机分为肝硬化实验组及正常对照组。肝硬化实验组大鼠给予500 ml/L四氯化碳(3 ml/g)皮下注射,2次/wk,连续16 wk。成功制得肝硬化模型12只(肝硬化形成经病理证实)。正常对照组大鼠(12只)给予生理盐水(3 ml/g)皮下注射。于第16 wk进行血流动力学测定,以3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,游离回结肠静脉和右侧股动脉,分别穿刺,连接压力换能器,多道生理仪记录,测定门静脉压力(PVP)和平均动脉压力(MAP)。取新鲜大鼠小肠组织,放入中性甲醛溶液中固定,制成石蜡切片。切片脱蜡至水,放入新鲜配制的30ml/LH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中,室温10 min以灭活内源性过氧化物酶,置入1 g/L TritonX-100/PBS溶液内15 min,增加胞膜的通透性,滴加正常血清封闭液,室温20 min,以封闭非特异性结合位点。滴加0.2 mol/L磷酸盐缓冲液(PB)稀释的一抗,HO羊抗鼠多克隆抗体(HO-1, 1:200; HO-2, 1:200),4℃孵育过夜,0.01 mol/L PBS洗5 min × 3次;滴加生物素化二抗(兔抗羊IgG),湿盒内室温下孵育45 min,0.01 mol/L PBS洗5 min × 3次;3,3'-二甲基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,封片。免疫组化检测结果应用HPIAS-1000型全自动医学彩色图像分析系统(由同济医学院提供)进行HO染色的定量分析,测定其阳性反应产物的面积和平均积分光密度值。每个标本取连续3张切片进行测量,每张切片测量10个视野的参数,取平均值。以上参数均在相同光强度、相同面积下以同种方法测量。

**统计学处理** 数据采用均数 ± 标准差(mean ± SD)表示,两组间差异用*t*检验,以*P* < 0.05为差异有统计学意义;两变量之间的关系应用线性相关与回归分析。

## 2 结果

肝硬化动物模型成功建立。肝脏大体形态观察:正常对照组大鼠肝脏体积基本正常,呈鲜红色;肝硬化组大鼠肝脏体积明显缩小,色灰暗,表面呈颗粒隆起状,肝脏切面呈豆渣样改变,可见圆形或类圆形岛屿状结节。HE染色后光镜观察:正常对照组大鼠肝内可见中央静脉周围排列正常的肝小叶结构,肝细胞索排列正常(图1)。肝硬化组大鼠肝内正常肝小叶结构被破坏,由广泛增生的纤维组织将原来的肝小叶分割包裹成大小不等,圆形或椭圆形的肝细胞团即假小叶形成。假小叶内肝细胞呈不同程度的浊肿变性、脂肪浸润,有再生肝细胞结节形成,肝细胞排列紊乱,胞体较大,核大着色较深,可见双核肝细胞。汇管区内结缔组织增生形成条索,伴有不同程度的炎性细胞浸润(图2)。

2.1 两组大鼠的血液动力学指标 表1所示可见:实验性肝硬化组大鼠的(PVP)门静脉压力较正常对照组高(*P* < 0.05),而平均动脉压(MAP)低于正常对照组(*P* < 0.05)。

表1 两组大鼠血液动力学参数

组别	<i>n</i>	PVP (Kpa)	MAP (Kpa)
正常对照组	12	0.916 ± 0.034	17.423 ± 1.472
肝硬化实验组	12	2.609 ± 0.144 <sup>b</sup>	13.411 ± 1.208 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>*P* < 0.05 vs 对照组。

2.2 小肠HO分布特点 HO-1与HO-2蛋白属膜结合蛋白类,主要表达于核被膜及核周的胞质内<sup>[1]</sup>,呈棕黄色。光镜下观察,肝硬化大鼠小肠黏膜下层的小动脉、小静脉、肌层及浆膜层HO-1染色强阳性,黏膜腺体亦可见HO-1的表达(图3);正常对照组大鼠小肠的HO-1染色呈弱阳性(图4)。正常对照组及肝硬化组大鼠小肠组织中HO-2呈弥漫性表达,在小肠黏膜下血管、肌层、浆膜层及黏膜腺体内染色均呈强阳性(图5,6)。比较肝硬化组与正常组大鼠的小肠组织,可见肝硬化组大鼠的小肠黏膜充血、水肿,黏膜下血管扩张,甚至变形,部分有上皮细胞脱落。

2.3 小肠HO免疫组织化学染色图像定量分析 从表2可以看出,肝硬化实验组小肠组织中HO-1的着色面积为14.4 859 ± 7.0 148,较正常对照组显著升高(*P* < 0.01),平均光密度值(0.4 813 ± 0.1 223)较正常对照组(0.3 762 ± 0.0 689)升高,差异有显著性意义(*P* < 0.01),说明肝硬化实验组大鼠小肠组织中HO-1的表达明显强于正常对照组。而HO-2的着色面积和平均光密度值在两组间差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

表2 小肠HO免疫组化染色的图像定量分析结果

	HO-1		HO-2	
	平均面积	平均光密度	平均面积	平均光密度
正常对照组	4.5959 ± 2.9497	0.3762 ± 0.0689	9.8472 ± 2.3415	0.4834 ± 0.0997
肝硬化实验组	14.4859 ± 7.0148 <sup>b</sup>	0.4813 ± 0.1223 <sup>b</sup>	11.583 ± 3.7987	0.4813 ± 0.1056

<sup>b</sup>*P* < 0.01 vs 对照组。

2.4 肝硬化组小肠HO-1的表达与血液动力学指标的相关系数 表3所示,肝硬化门静脉高压组大鼠小肠HO-1表达水平与门静脉压力呈正相关,平均动脉压呈负相关。

表3 血液动力学指标与HO-1表达水平的相关系数

血流动力学指标	小肠HO-1表达		
PVP	<i>r</i> = 0.655	<i>P</i> < 0.05	正相关
MAP	<i>r</i> = -0.852	<i>P</i> < 0.01	负相关

表3所示,肝硬化门静脉高压组大鼠小肠HO-1表达水平与门静脉压力呈正相关,平均动脉压呈负相关。

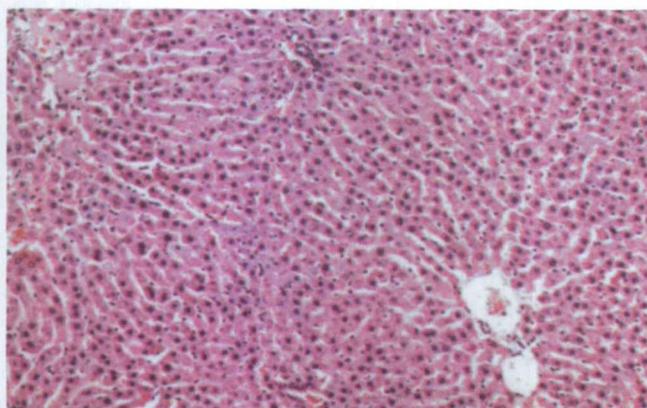


图1 正常对照组大鼠肝脏 HE × 100.



图5 正常对照组大鼠小肠中HO-2的表达 DAB × 400.

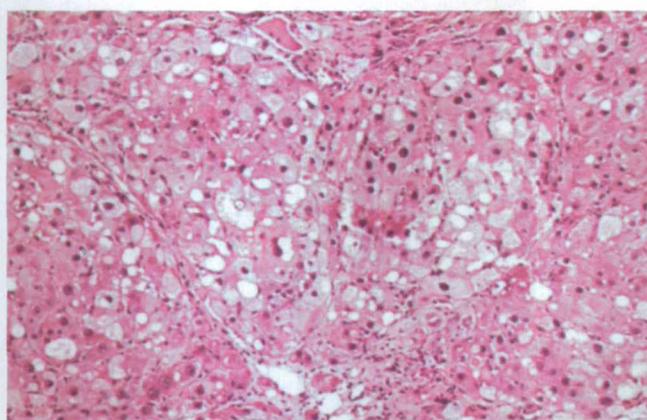


图2 肝硬化实验组大鼠肝脏 HE × 100.

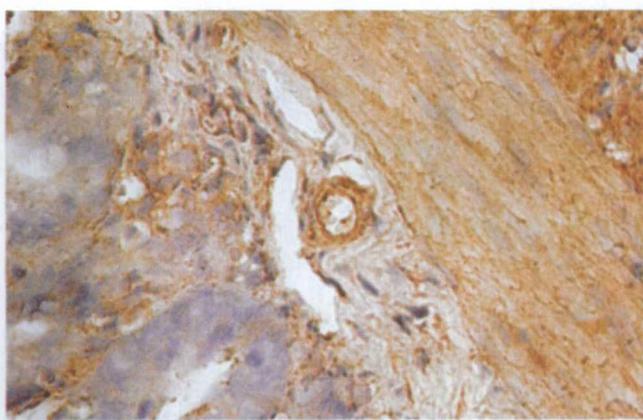


图6 肝硬化实验组大鼠小肠中HO-2的表达 DAB × 400.

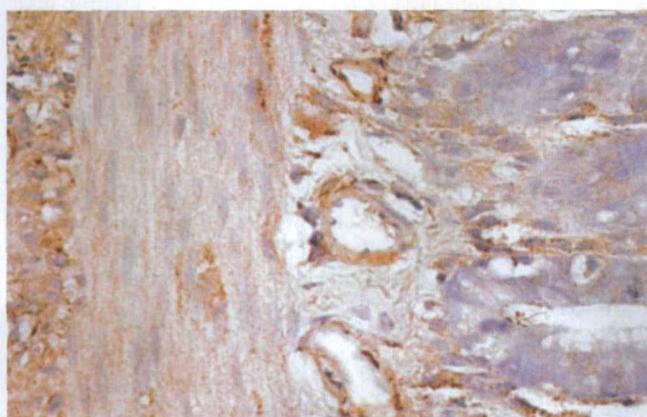


图3 肝硬化实验组大鼠小肠中HO-1的表达 DAB × 400.

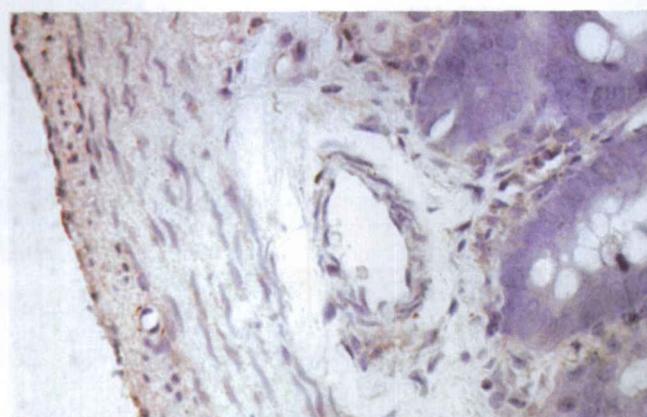


图4 正常对照组大鼠小肠中HO-1的表达 DAB × 400.

### 3 讨论

内脏高动力循环为肝硬化门静脉高压的发生及存在的重要因素, 这种高动力循环状态(hyperdynamic circulatory state, HCS)主要表现为: 心输出量增加, 心率加快, 内脏血流量增加, 外周血管阻力和内脏血管阻力下降. 高动力循环状态主要由外周动脉扩张引起, 在腹腔内脏中尤为突出. 肠黏膜下血管扩张、淤血、血流量增加, 动-静脉短路, 以及毛细血管内皮和黏膜上皮细胞超微结构改变是门静脉高压性肠病的特征性病变. 血红素氧合酶(heme oxygenase, HO)是催化血红素在体内氧化降解的起始酶和限速酶, 具有重要的生物学作用. 迄今为止, 在人和哺乳动物体内发现HO有3种异构体, 即HO-1, HO-2和HO-3. HO-1为诱生型HO,  $M_r$ 为30 000-32 000, 主要分布于脾脏、肝脏、网状内皮细胞系统和骨髓, 多种因素可诱导HO-1表达增高, 包括血红素<sup>[2-4]</sup>、重金属<sup>[5-6]</sup>、低氧<sup>[7]</sup>、高氧<sup>[8-9]</sup>、化学物<sup>[10]</sup>、感染<sup>[11-13]</sup>、损伤<sup>[14]</sup>、高温<sup>[15]</sup>等. HO-2为组成型HO,  $M_r$ 为36 000, 主要分布于脑和睾丸中, 其表达不受氧应激等的诱导, 仅受肾上腺糖皮质激素的诱导. HO-3是近几年内发现的又一种HO异构酶, 亦为组成型, 多种诱导因素均不能诱导其表达增高, 其特异性酶活性很低. HO几乎分布于人体所有组织和器官. HO在NADPH、细胞色素P450还原酶和氧分子存在的条件下氧化降解血红素生成等摩尔数的胆绿素(biliverdin)、一氧化碳及铁. 血红素的分解

产物具有重要的生理功能。胆绿素在胆绿素还原酶(biliverdin reductase, BVR)的作用下很快生成胆红素,胆绿素和胆红素均具有抗氧化功能,保护血管壁细胞,抑制黏附分子及炎症细胞入侵血管壁。铁能诱导产生铁蛋白,铁蛋白与游离的铁结合,减少自由态铁的含量,从而中和铁的氧化毒性。由HO催化血红素分解产生的CO是内源性一氧化碳的主要来源,另一种是由依赖NADPH通过微粒体的脂质过氧化产生。内源性CO在体内具有广泛的生物学活性,目前研究发现内源性CO参与了多种疾病的病理生理过程,包括调节血压<sup>[16-17]</sup>、维持血管紧张度<sup>[18-20]</sup>、神经递质的传递、氧应激、血小板的激活及松弛平滑肌等。

本组研究结果显示四氯化碳诱导的肝硬化大鼠门静脉压力增高、平均动脉压降低。我们观察到HO-1在肝硬化组大鼠的小肠组织中表达较高,而在正常对照组中的表达较弱,且肝硬化组小肠HO-1表达与门静脉压力呈正相关,与平均动脉压呈负相关。结果提示肝硬化大鼠的小肠组织内HO-1的诱导增加,继而局部组织产生的内源性CO增加,使肠血管持续处于扩张状态,从而增加门静脉血流量,与肠淤血等因素一起,构成门静脉高压性肠病的病理生理基础,且黏膜腺泡中HO-1的表达亦增加,可能影响肠道的分泌与吸收功能。HO-2在两组大鼠的小肠中的表达均较高,提示HO-2与正常生理条件下肠道平滑肌的肌电活动、小肠液的分泌等生理活动相关。门静脉高压症发病的液递物质假说认为肝功能损害使肝脏对循环中有血管活性作用的液递物质的灭活能力下降,而侧枝循环的形成使大量液递物质得以绕过肝脏对其的灭活作用,导致循环中扩血管物质过多,诱发循环紊乱,是门静脉高压症的高动力循环状态得以维持的基础。基于上述假说,我们认为HO/CO系统可能参与了肝硬化门静脉高压的发病机制。Fernandez *et al*在部分结扎门静脉引起鼠门静脉高压模型中发现肝细胞、Kupper细胞、肝星状细胞及腹腔内脏器均有HO-1 mRNA的高表达,肠系膜、小肠、肝脏、脾脏血红素氧合酶活性明显升高,且血红素氧合酶抑制剂可逆转肠系膜血管床对氯化钾的低反应性。

本研究中肝硬化小肠组织HO-1合成增加的因素可能有:(1)交感神经系统兴奋性增高,去甲肾上腺素水平增加可激活HO/CO系统;(2)肝硬化时机体血液循环中内毒素及其他细胞因子增多有关;(3)Chica *et al*研究发现肝硬化肠道组织中自由基代谢产物较正常增加,致肠道黏膜屏障被破坏,HO可通过抗氧化应激作用对机体起保护作用;(4)研究认为门静脉高压时一氧化氮(NO)产生的第二信使(cGMP)能激活周期蛋白核苷酸反应元件和应急蛋白-1刺激HO-1的转录。因此我们认为,HO/CO系统参与了肝硬化门静脉高压性肠病的病理生理进程,其确切的作用机制及HO抑制剂或激动剂在临床上的应用尚值得进一步深入探讨。

#### 4 参考文献

- 1 Parfenova H, Neff RA 3rd, Alonso JS, Shlopov BV, Jamal CN, Sarkisova SA, Leffler CW. Cerebral vascular endothelial heme oxygenase: expression, localization, and activation by glutamate. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:C1954-1963
- 2 Regan RF, Kumar N, Gao F, Guo Y. Ferritin induction protects cortical astrocytes from heme-mediated oxidative injury. *Neuroscience* 2002;113:985-994
- 3 Hosein S, Marks GS, Brien JF, McLaughlin BE, Nakatsu K. An extracellular source of heme can induce a significant heme oxygenase mediated relaxation in the rat aorta. *Can J Physiol Pharmacol* 2002;80:761-765
- 4 Ndisang JF, Wu L, Zhao W, Wang R. Induction of heme oxygenase-1 and stimulation of cGMP production by hemin in aortic tissues from hypertensive rats. *Blood* 2003;101:3893-3900
- 5 Regan RF, Kumar N, Gao F, Guo Y. Ferritin induction protects cortical astrocytes from heme-mediated oxidative injury. *Neuroscience* 2002;113:985-994
- 6 Ishizaka N, Saito K, Mitani H, Yamazaki I, Sata M, Usui S, Mori I, Ohno M, Nagai R. Iron overload augments angiotensin II-induced cardiac fibrosis and promotes neointima formation. *Circulation* 2002;106:1840-1846
- 7 Ryter SW, Xi S, Hartsfield CL, Choi AM. Mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway regulates heme oxygenase-1 gene expression by hypoxia in vascular cells. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:587-592
- 8 Lu R, Peng J, Xiao L, Deng HW, Li YJ. Heme oxygenase-1 pathway is involved in delayed protection induced by heat stress against cardiac ischemia-reperfusion injury. *Int J Cardiol* 2002;82:133-140
- 9 Singhal AB, Wang X, Sumii T, Mori T, Lo EH. Effects of normobaric hyperoxia in a rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:861-868
- 10 Naughton P, Foresti R, Bains SK, Hoque M, Green CJ, Motterlini R. Induction of heme oxygenase 1 by nitrosative stress. A role for nitroxyl anion. *J Biol Chem* 2002;277:40666-40674
- 11 Fujii H, Takahashi T, Nakahira K, Uehara K, Shimizu H, Matsumi M, Morita K, Hirakawa M, Akagi R, Sassa S. Protective role of heme oxygenase-1 in the intestinal tissue injury in an experimental model of sepsis. *Crit Care Med* 2003;31:893-902
- 12 Vicente AM, Guillin MI, Alcaraz MJ. Participation of heme oxygenase-1 in a model of acute inflammation. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228:514-516
- 13 De las Heras D, Fernandez J, Gines P, Cardenas A, Ortega R, Navasa M, Barbera JA, Calahorra B, Guevara M, Bataller R, Jimenez W, Arroyo V, Rodes J. Increased carbon monoxide production in patients with cirrhosis with and without spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2003;38:452-459
- 14 Carratu P, Pourcyrous M, Fedinec A, Leffler CW, Parfenova H. Endogenous heme oxygenase prevents impairment of cerebral vascular functions caused by seizures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H1148-1157
- 15 Grasso S, Scifo C, Cardile V, Gulino R, Renis M. Adaptive responses to the stress induced by hyperthermia or hydrogen peroxide in human fibroblasts. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228:491-498
- 16 Ndisang JF, Zhao W, Wang R. Selective regulation of blood pressure by heme oxygenase-1 in hypertension. *Hypertension* 2002;40:315-321
- 17 Ndisang JF, Wang R. Alterations in heme oxygenase/carbon monoxide system in pulmonary arteries in hypertension. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228:557-563
- 18 Motterlini R, Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Mann BE, Green CJ. Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities. *Circ Res* 2002;90:E17-24
- 19 Jaggar JH, Leffler CW, Cheranov SY, Tcheranova D, ES, Cheng X. Carbon monoxide dilates cerebral arterioles by enhancing the coupling of Ca<sup>2+</sup> sparks to Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Circ Res* 2002;91:610-617
- 20 Naik JS, Walker BR. Heme oxygenase-mediated vasodilation involves vascular smooth muscle cell hyperpolarization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H220-228

# 胃黏膜保护剂预防幽门螺杆菌培养上清液所致小鼠胃黏膜损伤

崔梅花, 胡伏莲, 董欣红

崔梅花, 胡伏莲, 董欣红, 北京大学第一医院消化科 北京市 100034  
崔梅花, 女, 1971-02-16 生, 朝鲜族, 1994 年白求恩医科大学学士, 2003 年北京大学硕士, 主治医师, 主要从事幽门螺杆菌的基础和临床研究。  
项目负责人: 胡伏莲, 100034, 北京市西城区西什库大街 8 号, 北京大学第一医院消化科. hufli@263.net  
电话: 010-66121882  
收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-10-12

## Preventive effects of gastric mucosal protective on *H pylori* CCS-induced gastric mucosal lesion in rats

Mei-Hua Cui, Fu-Lian Hu, Xin-Hong Dong

Mei-Hua Cui, Fu-Lian Hu, Xin-Hong Dong, Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China  
Correspondence to: Fu-Lian Hu, Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, 8 Xishiku Street, Beijing 100034, China. hufli@263.net  
Received: 2003-06-06 Accepted: 2003-10-12

### Abstract

**AIM:** To determine the roles of *H pylori* concentrated culture supernatants (CCS) on the gastric mucosa of mouse and to investigate the protective effects of gastric mucosal protectives sucralfate and sanjiuweitai on CCS-induced gastric mucosal lesion in Balb/c rats.

**METHODS:** Fifty-six healthy male Balb/c rats were randomly divided into seven groups: normal saline control (I), injured simply (II A, II B), sucralfate pretreatment (II A, II B), sanjiuweitai pretreatment (II A, II B). Group A was dealt with small amounts of CCS and group B with large amounts of CCS. CCS were drawn from cytotoxic *H pylori* strain (NCTC11637). The four protective groups were pretreated with sucralfate and sanjiuweitai separately, and then infused orally with different amounts of CCS. The pathological changes on histological sections and ultrastructural sections of gastric mucosa were assessed under microscope or electron microscope. The epithelial damage scoring (EDS) of the gastric mucosa was measured.

**RESULTS:** The management with large amounts of CCS from cytotoxic strains induced various epithelial lesions, which included vacuolation, erosions, ulcers and loss of gastric gland architecture. Infiltration of inflammatory cells in the lamina propria was not significant. At ultrastructural level, there was the presence of intracytoplasmic vacuoles, dilation of endoplasmic reticulum and mitochondrion, increasing of phagolysosomes, loose connection between cells and degenerative changes of microvilli. Small amounts of CCS from cytotoxic strain induced epithelial lesions less seriously than large amounts of CCS. The results of the

EDS of the gastric mucosa in the groups I, II A, II B, III A, III B, IV A and IV B arranged successively as follows,  $1.13 \pm 0.35$ ,  $2.25 \pm 0.46$ ,  $3.63 \pm 0.52$ ,  $1.25 \pm 0.46$ ,  $1.75 \pm 0.71$ ,  $1.50 \pm 0.53$  and  $1.63 \pm 0.74$  respectively. A remarkable protection was found in gastric mucosa pretreated with sucralfate and sanjiuweitai. In comparison with the purely injured group, the EDS of the gastric mucosa descended significantly ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Cytotoxin has an important role in the induction of gastric mucosa lesions, but not in eliciting obvious inflammation; The gastric mucosal protection of sucralfate and sanjiuweitai against CCS-induced gastric mucosal lesion in rats is significant.

Cui MH, Hu FL, Dong XH. Preventive effects of gastric mucosal protective on *H pylori* CCS-induced gastric mucosal lesion in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):355-358

### 摘要

**目的:** 研究产毒幽门螺杆菌(*H pylori*)的浓缩培养上清液(CCS)对小鼠胃黏膜的致病作用及胃黏膜保护剂硫糖铝和三九胃泰对CCS所致小鼠胃黏膜损伤的保护作用。

**方法:** 56只健康♂Balb/c小鼠随机分成7组:生理盐水组(I组)、单纯损伤组(II A组、II B组)、硫糖铝保护组(III A组、III B组)、三九胃泰保护组(IV A组、IV B组),其中A组为小剂量毒素组,B组为大剂量毒素组。分别用硫糖铝和三九胃泰提前给小鼠灌胃,其后用不同剂量的产毒*H pylori*菌株(NCTC11637)的CCS灌胃致急性胃黏膜损伤,然后在显微镜及电镜下观察胃黏膜组织学改变,分别测定各组胃黏膜损伤积分(EDS),以评价胃黏膜损伤程度及药物的预防保护效果。

**结果:** 产毒*H pylori*的CCS可以对小鼠胃黏膜产生明显的损害,包括空泡变性、腺体排列紊乱以及糜烂、溃疡形成,但炎症反应不明显。在超微结构水平,*H pylori*的CCS引起细胞间隙增宽、空泡变性、细胞质肿胀、线粒体及内质网扩张、微绒毛排列紊乱及脱落、吞噬溶酶体增多等改变。小剂量毒素引起的损害不如大剂量毒素引起的损害严重。I, II A, II B, III A, III B, IV A, IV B各组的胃黏膜损伤积分依次为  $1.13 \pm 0.35$ ,  $2.25 \pm 0.46$ ,  $3.63 \pm 0.52$ ,  $1.25 \pm 0.46$ ,  $1.75 \pm 0.71$ ,  $1.50 \pm 0.53$ ,  $1.63 \pm 0.74$ ;单纯损伤组(II A, II B)与生理盐水组(I组)比较,胃黏膜损伤明显( $P < 0.01$ );硫糖铝保护组(III A, III B)、三九胃泰保护组(IV A, IV B)与单纯损伤组(II A, II B)比较,

不论小剂量毒素组, 还是大剂量毒素组, 胃黏膜损伤程度均减轻, 损伤积分均明显下降( $P < 0.05$ ).

结论: *H pylori*的细胞毒素对鼠胃黏膜上皮细胞损害起重要作用, 但并不引起明显的炎症反应; 胃黏膜保护剂硫糖铝和三九胃泰对不同浓度*H pylori*培养上清液所致的小鼠胃黏膜损伤有明显的预防和保护作用.

崔梅花, 胡伏莲, 董欣红. 胃黏膜保护剂预防幽门螺杆菌培养上清液所致小鼠胃黏膜损伤. 世界华人消化杂志 2004;12(2):355-358

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/355.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌及胃黏膜组织相关性(MALT)淋巴瘤等疾病关系密切<sup>[1-15]</sup>, 其确切的致病机制还不十分清楚. 目前关于*H pylori*毒素对胃黏膜的损伤作用已经得到许多学者的关注, 而*H pylori*毒素对胃黏膜的病理损伤以及胃黏膜保护剂对*H pylori*毒素所致的胃黏膜损伤是否有保护作用, 目前研究甚少. 我们研究胃黏膜保护剂硫糖铝和三九胃泰干预*H pylori*毒素对Balb/c小鼠胃黏膜的损伤作用如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori*培养及CCS制备参照Leunk (J Med Microbiol 1998;26:93-99)<sup>[16]</sup>的方法. 标准产毒菌NCTC11637接种于固体培养基上, 在37℃微需氧条件下培养3-7 d. 用无菌接种环挑取适量*H pylori*菌落, 接种于液体培养基中, 松瓶盖, 在CO<sub>2</sub>培养箱(37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>)放置2 h, 然后盖紧瓶口, 置于恒温振荡器上(37℃, 140-150 r/min)培养48-72 h. 液体培养基离心后加等量饱和硫酸铵溶液沉淀上清, 留集沉淀, 加入0.1 mol/L PBS稀释, 用0.22 μm的滤膜过滤除菌, 分装保存于-70℃冰箱备用. 取固体培养菌落及液体培养沉淀, 分别进行革兰染色、尿素酶试验、过氧化氢试验等, 证明无杂菌生长才留取CCS. 用考马斯亮兰法在紫外分光光度计上测定*H pylori*培养上清液的蛋白含量. 硫糖铝(协和药业有限公司)配置成浓度为48 g/L, 相当于600 mg/kg; 三九胃泰颗粒(由三桠苦、九里香、白芍、生地、木香等组成, 深圳南方制药厂)配置成浓度为60 g/L, 相当于750 mg/kg.

1.2 方法 健康♂ Balb/c小鼠(北京大学医学部动物实验室提供)56只, 质量20 ± 2 g, 随机分为7组, 每组8只, 分别为生理盐水组(I)、单纯损伤组(II A, II B)、硫糖铝保护组(III A, III B)、三九胃泰保护组(IV A, IV B), 其中A为小剂量毒素组, B为大剂量毒素组. 所有动物实验前禁食12 h, 可自由饮水, 然后分别予生理盐水0.25 mL, 硫糖铝(600 mg/kg)或三九胃泰(750 mg/kg)灌胃, 0.5 h后予生理盐水或不同浓度*H pylori*的CCS 100 μg (0.25 mL), 1000 μg (0.25 mL)灌胃, 2次灌胃结束2 h后进食. 48 h后将小鼠断颈处死(处死前一晚禁

食), 立即开腹取胃, 沿胃大弯侧剪开胃壁, 在胃窦小弯侧剪下1块组织放置于40 g/L甲醛溶液中固定, 石蜡包埋, 制成4-6 μm厚的切片, 采用HE染色, 光镜下观察胃黏膜的改变. 胃黏膜损伤组织形态学分级, 以黏膜损伤积分(EDS)计数<sup>[17-18]</sup>: 黏膜正常为1分, 黏膜表层细胞受损为2分, 损伤累及腺体细胞为3分, 黏膜糜烂、出血或溃疡形成为4分. I, II A, II B, IV B四组各取1只在胃窦部剪下0.1 cm × 0.1 cm黏膜组织块置于20 g/L戊二醛中, 制成电镜标本, 观察超微结构改变.

统计学处理 采用方差分析,  $P < 0.05$ 表示差异有显著性.

## 2 结果

2.1 病理改变 I组黏膜层、固有层、肌层结构完整连续, 依次排列, 腺体排列紧密, 极少炎症细胞浸润. II B组小鼠胃黏膜上皮细胞可见大量的空泡, 部分上皮细胞及腺体排列紊乱, 有的腺体结构被完全破坏. 5只发现糜烂, 但炎症细胞浸润不明显, 偶见几个单核细胞, 其中2只发现溃疡, 2只在胃黏膜固有层内见到灶性出血; II A组可见部分上皮细胞里有空泡, 与大剂量毒素组比较, 空泡数量少, 有1只发现糜烂, 未发现溃疡, 上皮细胞及腺体排列凌乱不明显, 炎症细胞浸润不明显. 药物保护组各层组织排列完整连续, 损伤情况明显较单纯损伤组为轻. IV A组, IV B组各层排列整齐, 偶见表层黏膜上皮细胞损伤, 未见糜烂、溃疡、出血灶, 炎症细胞浸润不明显(图1).

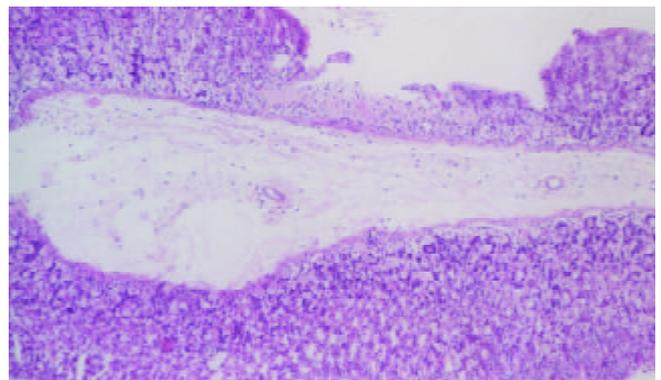


图1 大剂量毒素损伤组: 溃疡形成, 炎细胞浸润不明显×125.

2.2 超微结构的改变 I组小鼠的超微结构可见细胞排列紧密, 细胞器结构完整, 未见到变性, 微绒毛排列整齐, 无脱落, 吞噬溶酶体少见, 可见到正常的分泌颗粒及黏液颗粒. II A组小鼠的超微结构见细胞排列比较紧密, 可见到线粒体及内质网肿胀变性, 微绒毛排列紊乱、肿胀、部分脱落, 溶酶体增加; II B组小鼠的超微结构可见到细胞间隙明显增宽, 微绒毛稀疏、脱落, 线粒体和内质网高度肿胀扩张, 基本结构不清楚, 有的形成空泡, 吞噬溶酶体增多. IV B组小鼠其超微结构基本

类似于生理盐水组(图 2-3).

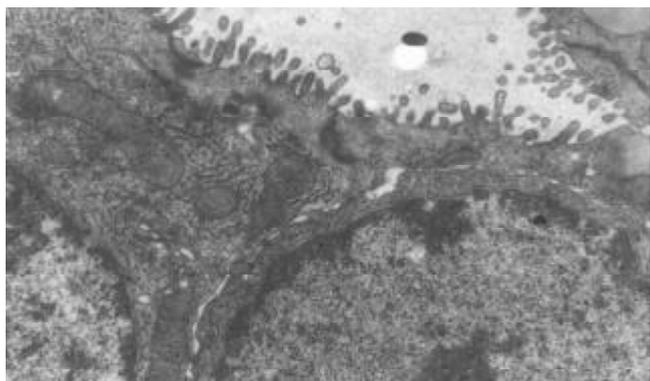


图 2 生理盐水组: 整齐的微绒毛, 细胞之间排列紧密, 正常的细胞器  $\times 10\ 000$ .

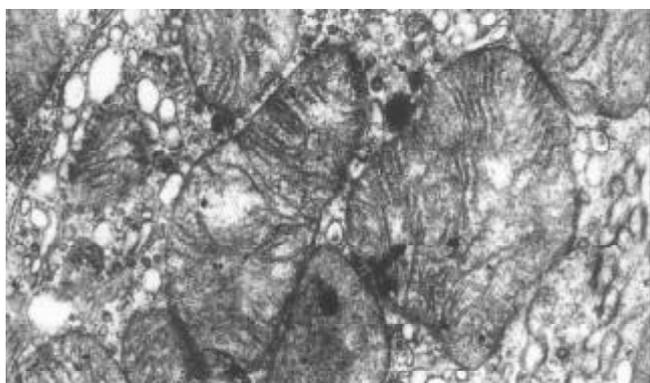


图 3 大剂量毒素组: 线粒体、粗面内质网肿胀, 嵴断裂  $\times 20\ 000$ .

2.3 胃黏膜损伤积分 II A, II B 组损伤积分( $2.25 \pm 0.46$ ,  $3.63 \pm 0.52$ )均明显高于 I 组( $1.13 \pm 0.35$ )( $P < 0.01$ ); 硫糖铝和三九胃泰保护组的损伤积分, 不论小剂量毒素处理组( $1.25 \pm 0.46$ ,  $1.50 \pm 0.53$ ), 还是大剂量毒素处理组( $1.75 \pm 0.71$ ,  $1.63 \pm 0.74$ ), 均低于单纯损伤组( $P < 0.01$ , IV A vs II A,  $P < 0.05$ ); 而硫糖铝与三九胃泰保护组比较, 不论小剂量毒素处理组, 还是大剂量毒素处理组, 胃黏膜损伤程度均无明显差异( $P > 0.05$ ).

### 3 讨论

幽门螺杆菌(*H pylori*)的细胞毒素引起了人们的普遍关注<sup>[19-22]</sup>. 我们探讨了*H pylori*的毒力因子-细胞毒素对胃黏膜的损伤作用及胃黏膜保护剂硫糖铝和三九胃泰颗粒干预后的影响. 孙兆金 et al<sup>[23]</sup>应用 EDTA 抑制尿素酶活性, 产毒株与非产毒株采用同样条件处理后, 产毒株的 CCS 引起明显的胃黏膜上皮损伤, 而非产毒株的 CCS 却没有引起相应的损伤, 说明胃黏膜上皮损伤是由*H pylori*培养上清液里的空泡毒素导致的. 我们<sup>[24]</sup>曾证明*H pylori*细胞毒素可引起胃黏膜细胞 c-met, c-myc 基因高表达, 从而造成细胞损伤. 我们采用产毒*H pylori*的 CCS 灌服 Balb/c 小鼠, 观察到黏膜上皮细胞产生了大量的空泡、腺体结构排列紊乱及黏膜糜烂、溃疡形成.

超微结构发现细胞质肿胀变性, 微绒毛排列紊乱、脱落, 细胞间隙增宽, 吞噬溶酶体增多等改变, 这些损伤改变与文献<sup>[16, 25-26]</sup>报道类似. 本结果表明*H pylori*毒素可致胃黏膜病理损伤, 提示细胞毒素在导致胃部疾病方面起重要作用.

胃黏膜损伤的程度依赖于灌服 CCS 的次数, 给小鼠灌服一次即可引起胃黏膜损伤, 若 48 h 后再灌服一次可获得更加严重的损伤, 口服多次并不能加重胃黏膜损伤程度<sup>[24]</sup>. 胃黏膜损伤程度还依赖于灌服的剂量<sup>[25]</sup>, 我们的研究亦发现大剂量毒素组所引起的鼠胃黏膜损伤远重于小剂量毒素组. 众所周知, 胃黏膜屏障的破坏、黏膜损伤及溃疡形成是由于损害因素与防御因素的失衡. 胃黏膜的防御因素通常包括黏膜、黏液屏障、黏液及碳酸氢盐的分泌、黏膜血流、细胞更新、生长抑素、表皮生长因子、前列腺素、氨基己糖、NO、巯基等<sup>[27-29]</sup>. 损害因素则包括了*H pylori*. 如前所述, *H pylori*能引起胃黏膜损伤, 诱发胃十二指肠糜烂及溃疡. 如何预防和保护*H pylori*所致的胃黏膜损伤就成为目前摆在大家面前需要研究和解决的问题.

硫糖铝是传统的胃黏膜保护剂, 长期以来作为主要胃黏膜保护剂广泛用于临床. 三九胃泰颗粒<sup>[30-31]</sup>是中药复方制剂, 具有消炎止痛, 理气健胃等功效. 药效学研究证明其有消炎、止血, 促进胃黏膜上皮修复, 纠正胃肠功能紊乱, 促进胃、脑等组织器官蛋白质合成, 抑制和黏附胃蛋白酶, 促进胸腺核蛋白、胸腺 RNA、脾脏 RNA 的合成, 增强和调节机体免疫功能等作用, 因此三九胃泰也是治疗慢性胃炎的常用药物. 北京地区的一个多中心研究<sup>[32]</sup>还显示了“三九胃泰四联疗法”在治疗消化性溃疡以及根除幽门螺杆菌的作用. 国内作者报道<sup>[33]</sup>用三九胃泰能预防或减轻乙醇所致的小鼠急性胃黏膜损伤. 三九胃泰是否对*H pylori*毒素所致的胃黏膜损伤有预防保护作用, 目前国内外尚无类似报道. 我们在此实验中利用三九胃泰对*H pylori*浓缩培养上清液造成的小鼠胃黏膜损伤的保护作用的小鼠模型作了初步探讨. 其结果发现三九胃泰保护组小鼠胃黏膜各层组织排列完整连续, 损伤情况较单纯损伤组明显减轻, 偶见表层黏膜上皮细胞损伤, 未见糜烂、溃疡、出血灶, 炎症细胞浸润不明显, 其超微结构也基本正常. 无论小剂量毒素处理组, 还是大剂量毒素处理组其胃黏膜损伤积分均低于单纯损伤组, 差异明显, 但与硫糖铝保护组比较则无明显差异. 结果提示胃黏膜保护剂硫糖铝和三九胃泰颗粒对*H pylori*的 CCS 所致胃黏膜损伤都具有明显的预防保护作用.

### 4 参考文献

- 1 Tabata H, Fuchigami T, Kobayashi H, Sakai Y, Nakanishi M, Tomioka K, Nakamura S, Fujishima M. *Helicobacter pylori* and mucosal atrophy in patients with gastric cancer: a special study regarding the methods for detecting *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 1999;44:2027-2034

- 2 Meining AG, Bayerdorffer E, Stolte M. *Helicobacter pylori* gastritis of the gastric cancer phenotype in relatives of gastric carcinoma patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:717-720
- 3 Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham DY. Antibody against *Helicobacter pylori* CagA and VacA and the risk for gastric cancer. *J Clin Pathol* 1999;52:215-218
- 4 Danesh J. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: systematic review of the epidemiological studies. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:851-856
- 5 Scheiman JM, Cutler AF. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Am J Med* 1999;106:222-226
- 6 Kuipers EJ. Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13 (suppl 1):3-11
- 7 Pena A. Genetic factors determining the host response to *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2000;6:624-625
- 8 James CB, Robert SB. Alterations in gastric mucin synthesis by *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2000; 6(Suppl 3):13
- 9 Huang XQ. *Helicobacter pylori* infection and gastrointestinal hormones:a review. *World J Gastroenterol* 2000;6:783-788
- 10 庄小强, 林三仁. 幽门螺杆菌与胃癌的研究进展. 世界华人消化杂志 2000;8:206-207
- 11 姚金锋, 姚希贤. 慢性萎缩性胃炎与幽门螺杆菌感染的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:1042-1045
- 12 于君, 沈祖尧. 幽门螺杆菌感染所致胃黏膜分子生物学行为改变在胃癌发生中的作用. 世界华人消化杂志 2002;10:499-502
- 13 纪开宇, 胡伏莲. 幽门螺杆菌与细胞因子研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:503-508
- 14 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 王国安, 滕小春. 幽门螺杆菌感染与胃癌前病变演化的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:912-915
- 15 Wang X, Willen R, Svensson M, Ljungh A, Wadstrom T. Two-year follow-up of *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 and Balb/cA mice. *APMIS* 2003;111:514-522
- 16 Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* 1988;26:93-99
- 17 Fiocca R, Villani L, De Giacomo C, Perego M, Trespi E, Solcia E. Morphological evidence of *Campylobacter pylori* pathogenicity in chronic gastric and peptic ulcer. *Acta Gastroenterol Belg* 1989;52:324-335
- 18 Genta RM, Lew GM, Graham DY. Changes in the gastric mucosa following eradication of *Helicobacter pylori*. *Mod Pathol* 1993;6:281-289
- 19 潘秀珍, 陈明红. 幽门螺杆菌的毒力研究与分型. 世界华人消化杂志 2000;8:551-553
- 20 张玲霞, 张沥, 刘永国, 张宁霞, 阎小君, 韩锋产, 侯瑜. 幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白A与胃十二指肠溃疡关系的病例对照研究. 世界华人消化杂志 2000;8:733-736
- 21 李娟君, 阎小君, 刘智广, 苏成芝. 幽门螺杆菌细胞毒素相关抗原A的表达纯化及其临床研究. 世界华人消化杂志 2002;10:271-274
- 22 Pai R, Sasaki E, Tarnawski AS. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) alters cytoskeleton-associated proteins and interferes with re-epithelialization of wounded gastric epithelial monolayers. *Cell Biol Int* 2000;24:291-301
- 23 孙兆金, 胡伏莲. 幽门螺杆菌的培养上清液诱发鼠胃黏膜组织学损伤的研究. 胃肠病学和肝病学杂志 1998;7:219-221
- 24 郭飞, 胡伏莲, 贾博琦, 白歌. 幽门螺杆菌毒素对胃黏膜细胞系 c-met、c-myc 基因表达的影响. 中华消化杂志 1999; 19:137-138
- 25 Ghiara P, Marchetti M, Blaser MJ, Tummuru MK, Cover TL, Segal ED, Tompkins LS, Rappuoli R. Role of the *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin, CagA, and urease in a mouse model of disease. *Infect Immun* 1995;63:4154-4160
- 26 Ohkusa T, Okayasu I, Miwa H, Ohtaka K, Endo S, Sato N. *Helicobacter pylori* infection induces duodenitis and superficial duodenal ulcer in Mongolian gerbils. *Gut* 2003;52:797-803
- 27 Larache M, Anton PM, Garcia-Villar R, Theodorou V, Frexinós J, Bueno L, Fioramonti J. Protective effect of dietary nitrate on experimental gastritis in rats. *Br J Nutr* 2003;89:777-786
- 28 Hawkey CJ. Management of gastroduodenal ulcers caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000;14:173-192
- 29 Gyires K, Mullner K, Ronai AZ. Activation of central opioid receptors may induce gastric mucosal defence in the rat. *J Physiol Paris* 2001;95:189-196
- 30 智发朝, 张万岱, 张振书, 沈鹰, 张仲海, 吕永慧. 三九胃泰冲剂治疗慢性胃炎疗效观察. 中国中西医结合消化杂志 2002;10:231-232
- 31 张万岱, 姚永莉. 慢性萎缩性胃炎治疗新进展. 新中医 2000;32:3-5
- 32 董欣红, 胡伏莲, 李世荣, 杨昭徐, 叶剑雄, 王世鑫, 张平. 三九胃泰四联疗法治疗消化性溃疡及根除幽门螺杆菌的多中心临床研究. 中国新药杂志 2002;11:476-479
- 33 张万岱, 姚永莉. 三九胃泰颗粒对大鼠急性胃黏膜损伤的修复作用. 中国中西医结合消化杂志 2002;10:148-150

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

• 消息 •

## World Journal of Gastroenterology 电子版

《World Journal of Gastroenterology, WJG》网(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)于2003-04-15开通,截止2003-10-26点击率已达452392人次. WJG电子版由以下7个栏目组成. (1)期刊介绍: 编委成员, 编委成员简介, 编辑, 检索系统收录, 影响因子. (2)出版: 出版, 版权, 征订. (3)投稿: 投稿细则、文献综述、研究论文、研究快报、病例报告等的书写格式. (4)新闻: IM收录期刊、JCR报道的影响因子. (5)投稿查询: 提交用户名和密码, 可查询到稿件的全部流程, 共计28项. (6)电子期刊: 现刊和过刊(1995-2003), 全刊索引. WJG电子期刊功能包括HTML、PDF、摘要、相关性文献、被引频次、点击次数、下载次数、评论等. (7)参考文献链接: WJG对刊出论文的全部参考文献与原文的首页进行校对, 保证了每条参考文献的作者、题名、年、卷号、页码、PMID等内容的正确性, 并与PubMed和<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>中的摘要及全文进行链接, 提高了参考文献的引用准确性, 也方便了读者查阅参考文献的全文及摘要.

# 结肠充气CT对检测大肠肿瘤的敏感性和特异性

王毅, 龚水根, 张伟国, 陈金华, 张连阳, 陈金萍

王毅, 龚水根, 张伟国, 陈金华, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所影像诊断科 重庆市 400042  
张连阳, 陈金萍, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科 重庆市 400042  
王毅, 男, 1970-10-24 生, 重庆市人, 汉族, 2002 年第三军医大学硕士, 主治医师, 讲师, 主要从事消化系统疾病的影像学研究。  
项目负责人: 王毅, 400042, 重庆市第三军医大学大坪医院野战外科研究所影像诊断科. ywxxl@yahoo.com.cn  
电话: 023-68712367  
收稿日期: 2003-06-17 接受日期: 2003-09-18

## Sensitivity and specificity of pneumocolon CT in detecting colorectal neoplasms

Yi Wang, Shui-Gen Gong, Wei-Guo Zhang, Jin-Hua Chen, Lian-Yang Zhang, Jin-Ping Chen

Yi Wang, Shui-Gen Gong, Wei-Guo Zhang, Jin-Hua Chen, Department of Radiology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China  
Lian-Yang Zhang, Jin-Ping Chen, Department of General Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China  
Correspondence to: Dr. Yi Wang, Department of Radiology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China. ywxxl@yahoo.com.cn  
Received: 2003-06-17 Accepted: 2003-09-18

### Abstract

**AIM:** To evaluate the sensitivity and specificity of pneumocolon computed tomography (CT) in the detection of colorectal neoplasms.

**METHODS:** A total of 100 patients with suspected colorectal neoplasms underwent both pneumocolon CT and colonoscopy.

**RESULTS:** On colonoscopy 13 colorectal carcinomas were detected in 13 patients, and 46 polyps in 24 patients (11 polyps were  $\geq 1$  cm in diameter, 14 were 6-9 mm, and 21 were  $\leq 5$  mm). Pneumocolon CT detected 15 cancers (included one false positive cancer), but only 16 polyps (9 were  $\geq 1$  cm). This resulted in a sensitivity of 100% (95% confidence interval (CI) 75-100%) and specificity of 93% (95% CI 66-100%) for detection of colorectal carcinoma, and a sensitivity of 93% (95% CI 73-99%) and specificity of 96% (95% CI 78-100%) for detection of carcinoma and/or  $\geq 1$  cm polyps. Pneumocolon CT also identified carcinoma not seen at colonoscopy in one patient, and detected metastases in 2 colorectal carcinoma patients and extracolonic carcinoma in one patient.

**CONCLUSION:** Pneumocolon CT has a high sensitivity and specificity for detection of colorectal carcinoma and/or  $\geq 1$  cm colorectal polyps but not for  $<1$  cm colorectal polyps. Pneumocolon CT may be suitable for initial investigation of patients with symptoms of colorectal malignancy.

Wang Y, Gong SG, Zhang WG, Chen JH, Zhang LY, Chen JP. Sensitivity and specificity of pneumocolon CT in detecting colorectal neoplasms. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):359-362

### 摘要

**目的:** 评价结肠充气CT对检测大肠肿瘤的敏感性和特异性。  
**方法:** 对100例临床怀疑大肠肿瘤的患者进行结肠充气CT和结肠镜检查。

**结果:** 结肠镜检查出大肠癌13例, 大肠息肉23例, 共46个息肉(11个直径大于或等于1 cm, 14个直径在6-9 mm, 21个直径 $\leq 5$  mm)。结肠充气CT检测出大肠癌15例(其中假阳性1例), 大肠息肉16个(9个直径大于或等于1 cm)。结肠充气CT对检测大肠癌的敏感性100% (95%可信区间(confidence interval, CI) (75-100%), 特异性93% (95% CI 66-100%); 对检测大肠癌+直径大于或等于1 cm息肉的敏感性92% (95% CI 73-99%), 特异性96% (95% CI 78-100%)。结肠充气CT还检测出结肠镜未发现的大肠癌1例, 2例大肠癌患者的远处转移和1例其他肿瘤。

**结论:** 结肠充气CT对检测大肠癌和直径1cm以上息肉有很高的敏感性和特异性, 但对直径1cm以下息肉检出率低。对于临床可疑的大肠癌患者, 结肠充气CT可作为检测结肠癌的初步检查手段。

王毅, 龚水根, 张伟国, 陈金华, 张连阳, 陈金萍. 结肠充气CT对检测大肠肿瘤的敏感性和特异性. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):359-362  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/359.asp>

### 0 引言

结肠镜是目前检测大肠肿瘤最准确的方法<sup>[1-10]</sup>, 并能通过他进行活组织检查和息肉切除<sup>[11-14]</sup>。但大肠CT检查无创伤性, 可供观察全段大肠, 主要的技术有结肠充气CT、CT结肠造影术和CT仿真结肠镜<sup>[2, 15-17]</sup>。结肠充气CT较CT仿真结肠镜的优势是检查时间短, 操作简便, 无需特殊软件来进行三维重建, 并能清晰观察CT仿真结肠镜显示不理想的肠管外软组织结构<sup>[18-21]</sup>。我们评价结肠充气CT对检测大肠肿瘤的敏感性和特异性。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 疑有大肠肿瘤的患者100例, 男63例, 女37例, 平均年龄61(43-82)岁。临床表现有腹痛47例, 便血41例, 排便习惯改变32例, 可疑腹部肿块21例, 贫血18例, 消瘦16例, 钡剂灌肠检查提示结肠异常11例

和结肠梗阻2例. 具有大肠癌家族史的无症状个体不作为本研究的对象.

1.2 方法 检查前1 d对患者作清洁肠道准备, 扫描前10 min 静脉内注射盐酸山莨菪碱 10 mg, 然后向直肠内插入 Foley 管, 缓慢地注入空气直到患者有腹胀感, 最大用量不超过2 L. 采用Siemen Somatom Plus 4型螺旋CT机进行检查. 患者于仰卧位, 扫描条件: 准直8 mm, 螺距1.5 cm, 完成扫描后用4 mm 间隔重建. 所有患者均行平扫加增强, 增强扫描以3 mL/s 的速度注入造影剂100 mL. 扫描范围下至耻骨联合, 上至膈顶. CT检查后休息1 h以上, 行结肠镜检查. 检查前静脉注射安定及哌替啶. 设备为Olympus Keymed CF 200-HL结肠镜及其附件. 操作时做到手法轻柔, 合理注气, 循腔进镜, 反复钩拉, 必要时变换体位, 争取较短的时间到达回盲部. 记录每段结肠(包括右侧结肠、横结肠、左侧结肠和乙直肠)的异常发现, 通过活检钳估计息肉的大小, 或切除息肉术直接测量, 并记录检查的完整性和患者的耐受情况.

统计学处理 采用NoSA统计分析软件对所得数据进行χ<sup>2</sup>检验.

2 结果

2.1 结肠镜检查 结肠镜检查成功到达盲肠89例(89%), 其中51例表现正常. 11例失败的原因包括肠道准备不足(6例)、肠管结构复杂(2例)、肿瘤梗阻(2例)和患者不能耐受(1例), 其中8例所见肠管无异常发现. 结肠镜共检出大肠肿瘤36例(36%), 其中13例为侵袭性大肠癌, 46个息肉分布于23例患者中, 其中1例合并有侵袭性大肠癌. 9例大肠癌和37个息肉位于左侧结肠内或其远端, 均在距离肛缘60cm的范围内(表1). 对46个息肉中的41个进行了病理学检查, 40个得到证实, 而1个位于降结肠大小约1 cm的息肉病理学结果为原位腺癌. 5个息肉未能得到病理学检查, 直径均在5 mm以下. 13例大肠癌均得到病理学证实. 另外结肠镜还发现5例其他异常, 包括3例结肠憩室和2例溃疡性结肠炎.

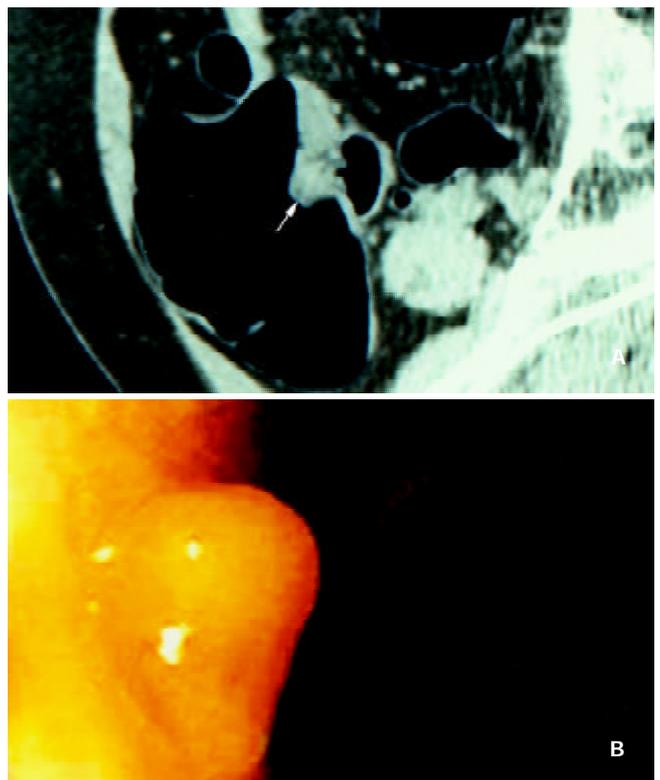
表1 结肠充气CT检测100例患者大肠肿瘤的结果(n)

检查方法	息肉直径(mm)			息肉部位				癌
	1-5	6-9	≥ 10	右	横	左	乙直	
结肠充气CT	2	5	9	1	2	4	9	14
结肠镜	21	14	11	5	4	13	24	13

P < 0.05, χ<sup>2</sup> = 7.368 息肉直径与检出率相关.

2.2 结肠充气CT检查 结肠充气CT检查100例中, 2例分别是乙状结肠和横结肠, 1为乙状结肠和降结肠, 另1例为乙状结肠、降结肠和横结肠未得到充盈. 该检查未发现任何并发症. 结肠镜检查出的36例大肠肿瘤

(13例癌和46个息肉)中, 27例(13例大肠癌和14例患者的16个息肉)于结肠充气CT检查中得到检出(图1, 2), 结肠充气CT还检测出未被结肠镜发现的升结肠癌1例、假阳性乙状结肠癌1例和假阳性息肉2例(直径分别是7 mm和6 mm). 1例患者大肠癌与息肉合并发生, 结肠充气CT仅检出了大肠癌, 而遗漏了1个直径小于5 mm的息肉. 以结肠镜检查结果作为标准, 结肠充气CT对检测大肠肿瘤总的敏感性49% (95% CI44-63%), 特异性91% (95% CI75-98%). 结肠充气CT诊断大肠肿瘤15例, 其中13例是为结肠镜检出的侵袭性大肠癌, 1例为假阳性, 1例为结肠镜检查所漏诊. 结肠充气CT对于检测大肠癌的敏感性100%(95% CI75-100%), 特异性93% (95% CI66-100%). 对结果进一步分析还发现, 随着息肉直径的增加, 结肠充气CT对大肠息肉的检出率明显增大(1-5 mm, 2/21; 6-9 mm, 5/14; 大于或等于10 mm, 9/11), 并有统计学意义(P < 0.05) (表1). 当越多直径越小的息肉列入计算, 结肠充气CT对大肠肿瘤检测的敏感性与特异性也随之而逐渐降低(大肠癌 + 直径大于或等于10 mm的息肉时, 敏感性92% (95% CI73-99%), 特异性96% (95% CI78-100%); 大肠癌 + 直径大于或等于6 mm的息肉时, 敏感性71%(95% CI54-91%), 特异性90% (95% CI74-98%); 大肠癌 + 所有息肉时, 敏感性49% (95% CI44-63%), 特异性91%(95%CI75-98%)(表1). 结肠充气CT对大肠息肉的检出率与其发生部位无关(右结肠, 1/5; 横结肠, 2/4; 左结肠, 4/13; 乙直肠9/24) (P > 0.05). 另外结肠充气CT还发现6例其他病变, 包括脂肪肝3例, 大肠癌远处转移2例(肝转移1例, 癌性腹水1例)和可疑胰腺癌1例.



B

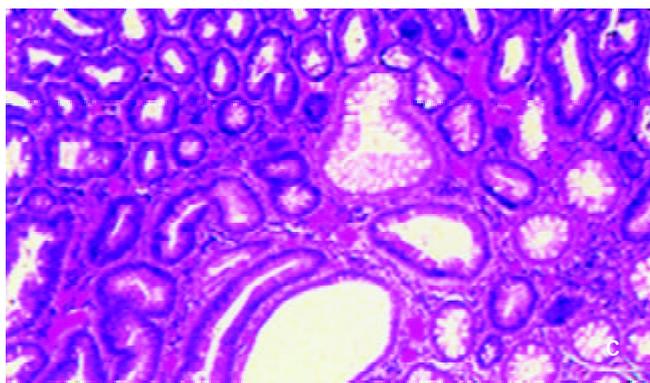


图1 盲肠息肉. A: 结肠充气CT清晰显示盲肠内有一1.5 cm息肉; B: 结肠镜显示息肉无蒂、基底宽、边缘光整; C: 腺瘤性息肉HE  $\times$  20.

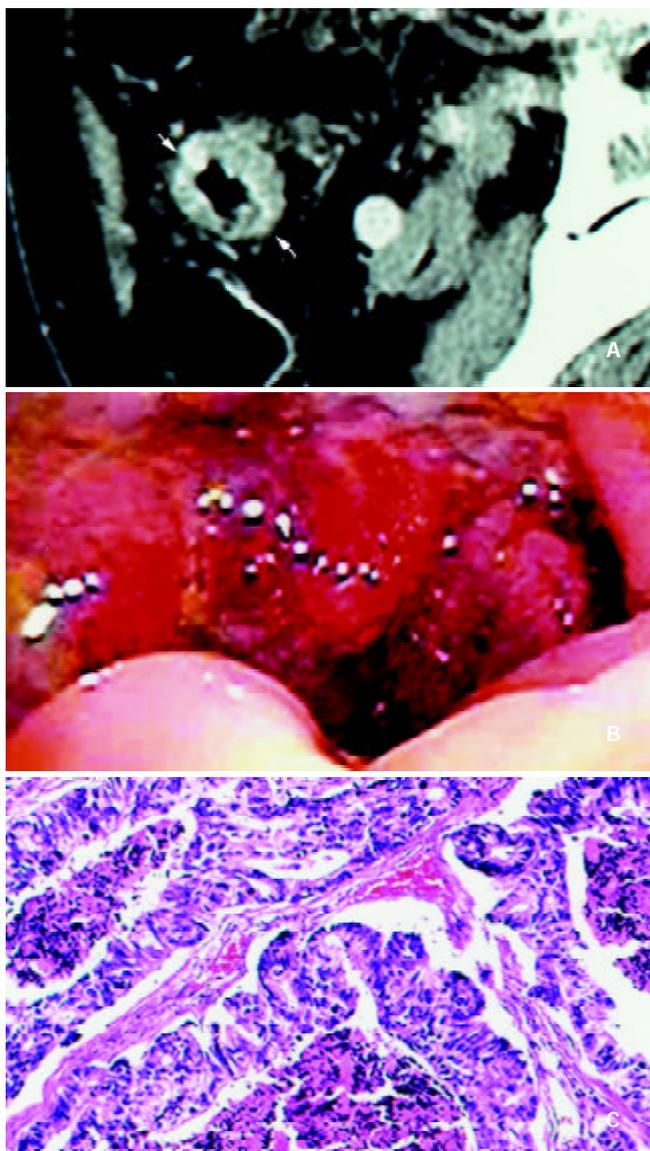


图2 降结肠癌. A: 结肠充气CT显示降结肠浸润型癌, 肠壁显著增厚、管腔狭窄、肿瘤明显强化; B: 结肠镜显示肿瘤边缘不整, 肠管明显狭窄; C: 腺癌HE  $\times$  100.

### 3 讨论

本研究表明, 虽然结肠充气CT对检测大肠肿瘤的总敏感性较低(49%, 95% CI 144-63%), 但对大肠癌的检测却有很高的敏感性和特异性, 另外结肠充气CT还

可提供常规结肠镜不能获得的关于肿瘤局部浸润范围与远处转移等方面的信息, 且不需要特殊的软件, 检查时间也较短. 尽管如此, 其影像表现需要谨慎解释, 原因是: (1)大肠癌的实际发病率远远低于本研究的计算结果(14%); (2)要特别注意各种原因造成的假象, 如肥大的结肠袋囊, 肠管扩张不够等; (3)尽管本研究得出结肠充气CT对大检测肠癌100%的敏感性, 但是95%可信区间的下限(75%)不够理想.

临床上对直径1 cm以上大肠息肉的检测有重要的意义, 因为直径1 cm以下的息肉, 其恶变率较低(大约1%)<sup>[22-25]</sup>. 本研究表明, 结肠充气CT对息肉的检出率随其直径的增大而有意义地增高. 我们采用准直8 mm, 螺距1.5 mm, 重建间隔4 mm, 既有效地降低了放射线剂量, 又获得对直径大于或等于10 mm息肉及大肠癌92%的敏感性, 这一数值近似于以往学者采用更小准直和重建间隔及三维重建的研究结果(敏感性93%)<sup>[26-27]</sup>. 然而也有学者报道CT对直径10 mm以上息肉的检出率低, Rex et al<sup>[28]</sup>采用二维和三维CT结肠造影术研究了46例患者, 并对其中17例息肉患者进行了乙状结肠镜检查, 结果表明二维和三维CT结肠造影术对直径1 cm以上息肉的敏感性分别是29%和50%. Spinzi et al<sup>[29]</sup>采用准直5 mm, 螺距2 mm CT结肠造影术研究, 结果显示对直径1 cm以上息肉的敏感性为58%. 因此根据我们的结果可以推测, 结肠充气CT对10 mm以上息肉的检测可能优于CT结肠造影术.

结肠充气CT对直径10 mm以上息肉也有少部分漏诊, 可能是位置邻近直肠内Foley管、结肠内过多的粪渣和结肠未得到充分扩张. 因此检查前良好的肠道准备、采用更细的直肠Foley管和力求使结肠各段充分扩张可提高对10 mm以上大肠息肉的检出率. 必要时可进一步注气扩张肠管, 并重新定位后对部分结肠段进行二次扫描, 降结肠常常是未能扩张的肠段, 可采用仰卧位加俯卧位扫描, 尽管这些措施增加了放射线剂量, 但十分必要. 另外三维CT重建也许有助于进一步评价二维轴位扫描相上难以定性的病变<sup>[26-28]</sup>. 结肠CT极少有发现结肠外其他病变的报道, 我们采用腹部CT检查的标准毫安, 可成功地检测结肠及结肠外其他部位的病变, 因此改变了部分患者的治疗计划. 另外我们检出的所有大肠息肉中, 80%位于距离肛缘60 cm的大肠内, 是可曲性乙状结肠镜可以到达的范围<sup>[30-32]</sup>, 可以推测将结肠充气CT与乙状结肠镜联合应用可检出大部分大肠息肉.

总之, 结肠充气CT对检测大肠癌和直径10 mm以上息肉有很高的敏感性和特异性, 但对直径10 mm以下大肠息肉的检出率低. 另外, 结肠充气CT还能够提供结肠镜不能发现的关于大肠癌分期和大肠外其他病变等信息, 具有重要的临床意义.

### 4 参考文献

- 1 Wan J, Zhang ZQ, Zhu C, Wang MW, Zhao DH, Fu YH, Zhang JP, Wang YH, Wu BY. Colonoscopic screening and follow-up

- for colorectal cancer in the elderly. *World J Gastroenterol* 2002; 8:267-269
- 2 Makin GB, Breen DJ, Monson JR. The impact of new technology on surgery for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2001; 7:612-621
  - 3 Han Y, Uno Y, Munakata A. Does flexible small-diameter colonoscope reduce insertion pain during colonoscopy? *World J Gastroenterol* 2000;6:659-663
  - 4 吴云林, 刘建安, 孙蕴伟, 马天乐, 孙波, 诸琦. 诺仕帕控制结肠镜检查腹痛的临床研究. *世界华人消化杂志* 1999;7:880
  - 5 苏鲁, 潘洪珍, 翁敬飏, 徐艺华, 陈芳, 洪梅燕. 美蓝染色放大电子结肠镜观察结肠息肉与组织病理学的关系. *世界华人消化杂志* 2003;11:1227-1229
  - 6 王燕斌, 杨昭徐. 大肠癌的常规诊断. *世界华人消化杂志* 2001;9: 792-793
  - 7 韩英. 大肠癌早期内镜的治疗. *世界华人消化杂志* 2001;9:790-792
  - 8 李世荣. 大肠癌早期诊断的策略. *世界华人消化杂志* 2001;9:780-782
  - 9 于皆平, 董卫国. 大肠癌早期诊断的现状. *世界华人消化杂志* 1999;7:553-554
  - 10 张亚历, 周殿元. 肠镜检查在早期大肠癌诊断中的重要作用. *世界华人消化杂志* 2003;11:640-642
  - 11 Sung JJ, Chan FK, Leung WK, Wu JC, Lau JY, Ching J, To KF, Lee YT, Luk YW, Kung NN, Kwok SP, Li MK, Chung SC. Screening for colorectal cancer in Chinese: comparison of fecal occult blood test, flexible sigmoidoscopy, and colonoscopy. *Gastroenterology* 2003;124:608-614
  - 12 Jung M, Beilenhoff U, Pietsch M, Kraft B, Rippin G. Standardized reprocessing of reusable colonoscopy biopsy forceps is effective: results of a German multicenter study. *Endoscopy* 2003;35:197-202
  - 13 Liangpunsakul S, Rex DK. Colon tumors and colonoscopy. *Endoscopy* 2002;34:875-881
  - 14 Lewis JD, Ng K, Hung KE, Bilker WB, Berlin JA, Brensinger C, Rustgi AK. Detection of proximal adenomatous polyps with screening sigmoidoscopy: a systematic review and meta-analysis of screening colonoscopy. *Arch Intern Med* 2003;163:413-420
  - 15 杜渭清, 宦怡, 张劲松, 黄海东. 螺旋CT诊断结肠癌30例. *世界华人消化杂志* 1999;7:1009-1010
  - 16 郑凯尔, 陈峰, 居胜红, 徐秋贞. CT仿真内窥镜在消化系统临床应用的初步研究. *世界华人消化杂志* 1999;7:629-631
  - 17 春艾, 郝敬明, 钱作宾. 螺旋CT仿真内窥镜诊断大肠息肉初探. *中华放射学杂志* 2000;34:313-315
  - 18 Miao YM, Amin Z, Healy J, Burn P, Murugan N, Westaby D, Allen-Mersh TG. A prospective single centre study comparing computed tomography pneumocolon against colonoscopy in the detection of colorectal neoplasms. *Gut* 2000;47:832-837
  - 19 Sosna J, Morrin MM, Kruskal JB, Farrell RJ, Nasser I, Raptopoulos V. Colorectal neoplasms: role of intravenous contrast-enhanced CT colonography. *Radiology* 2003;228:152-156
  - 20 Harvey CJ, Renfrew I, Taylor S, Gillams AR, Lees WR. Spiral CT pneumocolon: applications, status and limitations. *Eur Radiol* 2001;11:1612-1625
  - 21 Yong AA, Harris JE, Shorvon PJ. The value of prone imaging in CT pneumocolon. *Clin Radiol* 2000;55:959-963
  - 22 Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2002;137:603-612
  - 23 Anwar S, White J, Hall C, Farrell WE, Deakin M, Elder JB. Sporadic colorectal polyps: management options and guidelines. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:4-11
  - 24 Deen KI, de-Silva HJ. Colorectal polyps. *Ceylon Med J* 1999; 44:6-10
  - 25 Bond JH. Polyp guideline: diagnosis, treatment, and surveillance for patients with colorectal polyps. Practice parameters committee of the american college of gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3053-3063
  - 26 Yee J, Kumar NN, Hung RK, Akerkar GA, Kumar PR, Wall SD. Comparison of supine and prone scanning separately and in combination at CT colonography. *Radiology* 2003;226:653-661
  - 27 罗明月, 周康荣. CT结肠造影术四种后处理方法检查结肠癌的比较研究. *中华放射学杂志* 2001;35:785-788
  - 28 Rex DK, Vining D, Kopecky KK. An initial experience with screening for colon polyps using spiral CT with and without CT colography (virtual colonoscopy). *Gastrointest Endosc* 1999; 50:309-313
  - 29 Spinzi G, Belloni G, Martegani A, Sangiovanni A, Del Favero C, Minoli G. Computed tomographic colonography and conventional colonoscopy for colon diseases: a prospective, blinded study. *Am J Gastroenterol* 2001;96:394-400
  - 30 O'Brien K, Sweeney BF Jr, Conger N, Fischer JR, Lang KA. Prevalence of proximal adenomas after an adenoma is found on flexible sigmoidoscopy. *Cancer Detect Prev* 2003;27:259-265
  - 31 Patel K, Hoffman NE. The anatomical distribution of colorectal polyps at colonoscopy. *J Clin Gastroenterol* 2001;33:222-225
  - 32 Farraye FA, Wallace M. Clinical significance of small polyps found during screening with flexible sigmoidoscopy. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2002;12:41-51

## World Journal of Gastroenterology 发行

《World Journal of Gastroenterology, WJG》2003年印刷版共发行973份, 其中国内邮局征订168份, 分布在27个省市自治区; 国外发行105份, 分布在56个国家和地区; 向承担国家973和863及国家自然科学基金项目负责人赠送700份. 让更多的国际胃肠病学和肝病专家阅读和使用WJG发表的具有我国特色及国际先进水平的学术论文, WJG向美国胃肠病学会会员, 美国肝病学会会员, 美国癌症研究会会员免费提供每期的全文电子版, 目前每期电子版的发行量已达21200份.

# 胃溃疡大鼠胃泌素、生长抑素和 G/D 细胞的变化

孙凤蓬, 宋于刚, 覃汉荣

孙凤蓬, 宋于刚, 中国人民解放军第一军医大学南方医院消化科  
广东省广州市 510515  
覃汉荣, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院消化科  
广东省广州市 510282  
孙凤蓬, 男, 1965-04-21 生, 山东省青岛市人, 汉族, 1989 年第二军医大学  
本科毕业, 2000 年第一军医大学消化内科学硕士毕业, 2003 年第一军医大学  
消化内科学博士毕业, 主治医师, 主要从事胃黏膜细胞及胃肠激素的研究,  
已发表论文 32 篇, 参编专著 3 部。  
广东省自然科学基金资助课题, No. 010578  
广东省社会发展攻关计划资助课题, No. 2002C31210  
广州市科技攻关计划资助课题, No. 2002Z3-E0131  
项目负责人: 孙凤蓬, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大  
学南方医院消化科。sci@china.com  
电话: 020-61641114-87101  
收稿日期: 2002-03-30 接受日期: 2002-05-31

## Alterations of gastrin, somatostatin, G and D cells in rat gastric ulcer

Feng-Peng Sun, Yu-Gang Song, Han-Rong Qin

Feng-Peng Sun, Yu-Gang Song, Department of Gastroenterology,  
Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515,  
Guangdong Province, China  
Han-Rong Qin, Department of Gastroenterology, Zhujiang Hospital,  
First Military Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong  
Province, China  
Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province,  
China, No. 010578 and Important Technological Issue of Guangdong  
Province, No.2002c13210  
Correspondence to: Feng-Peng Sun, Department of Gastroenterology,  
Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515,  
Guangdong Province, China. sci@china.com  
Received: 2002-03-30 Accepted: 2002-05-31

## Abstract

AIM: To investigate the alterations of gastrin secretion of G cells, somatostatin secretion of D cells and the change of G (D) cells in rat gastric ulcer.

METHODS: An acetic-acid-induced rat gastric ulcer model was established. The histological structure of rat antral mucosa and the ultrastructure of mucosal cells were observed generally, through microscope and through electron microscope. The content of gastrin or somatostatin in serum or in antral tissue was measured via radioimmunoassay. The shape, number, size of G (D) cells, and the ratio of number and size of G/D cells were viewed and analyzed with immunohistochemical technique and image analysis system. G (D) cells and the secretive gastrin (somatostatin) granules in G (D) cells were observed through immunoelectron microscope and analyzed in image analysis system.

RESULTS: G (D) cells and the secretive gastrin (somatostatin) granules in G (D) cells were observed through immunoelectron microscope successfully. In gastric ulcer rat the secretive gastrin in G cells increased, the secretive somatostatin in D cells declined, the number of G cells increases and the size of G cells declined; both the number and the size of D

cells declined, both the ratio of the number and size of G/D cells increased, both the content of gastrin in serum and in antral tissue increased, and both the content of somatostatin in serum and in antral tissue declined.

CONCLUSION: The rat gastric ulcer induces the changes of G cells and D cells, secretive gastrin in G cells and secretive somatostatin in D cells, as well as the contents of gastrin and somatostatin.

Sun FP, Song YG, Qin HR. Alterations of gastrin, somatostatin, G and D cells in rat gastric ulcer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):363-366

## 摘要

目的: 研究胃溃疡对大鼠G细胞分泌胃泌素(D细胞分泌生长抑素)和对G(D)细胞变化的影响。

方法: 建立冰乙酸性大鼠胃溃疡模型, 采用大体、光镜、透射电镜观察胃窦黏膜组织学表现和胃窦黏膜细胞超微结构表现, 采用放射免疫法检测血清和胃窦组织中的胃泌素、生长抑素含量, 采用免疫组化及定量分析检测 G (D)细胞形态、数目、面积、和 G/D 细胞数目、面积比值, 采用免疫电镜及定量分析观察与检测 G(D)细胞及 G (D)细胞中的胃泌素(生长抑素)分泌颗粒。

结果: 免疫电镜观察到了G(D)细胞和G(D)细胞中的胃泌素(生长抑素)分泌颗粒。大鼠胃溃疡后, G细胞内胃泌素分泌量增加, D细胞内生长抑素分泌量减少, G细胞数目增加、面积减少, D细胞数目减少、面积减少, G/D细胞数目比值和 G/D 细胞面积比值增加, 并且血清、胃窦组织中胃泌素含量增加, 生长抑素含量减少。

结论: 大鼠胃溃疡可引起 G、D 细胞的变化, 引起 G、D 细胞分泌胃泌素、生长抑素的变化, 和引起胃泌素、生长抑素含量的变化。

孙凤蓬, 宋于刚, 覃汉荣. 胃溃疡大鼠胃泌素、生长抑素和 GD 细胞的变化. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):363-366

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/363.asp>

## 0 引言

胃肠激素调控着消化道的分泌、运动、吸收、血流和细胞营养等功能。就溃疡过程与胃肠激素的关系方面来说, 仍有相当多的问题需要加以研究<sup>[1-13]</sup>。我们循同步研究的思路, 应用冰乙酸性大鼠胃溃疡模型, 采用大体、光镜、透射电镜、放射免疫、免疫组化、免疫电镜等方法与技术, 检测分析了胃溃疡大鼠血清、胃窦组织

中胃泌素、生长抑素含量的变化,和胃窦组织中胃泌素分泌细胞(G细胞)、生长抑素分泌细胞(D细胞)在形态、数量、超微结构等方面的变化,旨在探讨胃溃疡对胃泌素、生长抑素和G、D细胞变化的影响。

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康成年♂ Wistar大鼠14只,体质量 $240 \pm 10$ g,购于中山医科大学实验动物中心,合格证号98A018。大鼠随机分为溃疡组和正常组各7只。胃泌素放免试剂盒购自天津千叶公司,生长抑素放免试剂盒购自第二军医大学神经生物学教研室。牛血清白蛋白、兔抗胃泌素抗体购自美国Sigma公司,兔抗生长抑素抗体购自美国Zymed Laboratories公司,免疫组化SABC试剂盒、10 nm葡萄球菌A蛋白胶体金购自武汉博士德公司。

1.2 方法 溃疡组大鼠以戊巴比妥钠腹腔内麻醉,仰卧固定、常规消毒皮肤,上腹部皮肤正中切口、打开腹腔找到鼠胃,以1 mL注射器在胃窦前壁注入冰乙酸0.05 mL,达胃壁肌层与浆膜层之间,将大网膜组织与注射部位胃窦壁浆膜组织缝合一针,缝合腹膜、腹壁、皮肤,术后单笼饲养,于4 d处死取材。正常组大鼠不做任何处理,饲养4 d后处死取材。处死取材日的前1 d午餐起,大鼠禁食,但不禁水。于取材日将各组大鼠麻醉后开腹、开胸,直视下心室内取血4 mL,置于含 $40 \mu\text{L}$  500 u抑肽酶、 $60 \mu\text{L}$  100 g/L EDTA的塑料管中混匀, $4^\circ\text{C}$ 离心,取上清液分装冻存于 $-20^\circ\text{C}$ 冰箱备检。分离并解剖鼠胃,迅速在胃窦溃疡边缘部分剪取数块约 $0.5 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$ 组织,分别置于30 g/L戊二醛液、30 g/L多聚甲醛-1 g/L戊二醛液中固定。剪取约 $1 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 含溃疡胃窦组织,置40 g/L多聚甲醛液中固定。剪取约0.1 g胃窦溃疡边缘部分组织,迅速用电子分析天平称重,加热煮沸后放入盛有0.5 mol/L乙酸1 mL的组织匀浆器中匀浆,再用1 mol/L NaOH 1 mL中和,将组织匀浆液于 $4^\circ\text{C}$ 离心,取上清液分装冻存于 $-20^\circ\text{C}$ 冰箱备检。按常规方法大体观察胃窦。4%多聚甲醛液固定的胃窦组织于24 h后,常规HE染色,光镜观察。30 g/L戊二醛液固定的胃窦组织于24 h后,按常规方法10 g/L锇酸后固定、梯度丙酮脱水、纵向Spurr树脂包埋、超薄切片、铀铅染色,CM10(荷兰PHILIPS公司)透射电镜观察。

1.2.1 胃泌素和生长抑素检测 采用放射免疫法(RIA)测定大鼠血清、胃窦组织匀浆液中胃泌素、生长抑素含量,加样步骤按照药盒说明书进行,结果经换算后,表达为血清标本单位ng/L,胃窦组织标本单位pg/g。

1.2.2 免疫组化染色及定量分析 分别采用兔抗胃泌素抗体、兔抗生长抑素抗体,检测胃窦膜中的G细胞和D细胞。按免疫组化SABC法进行常规染色,不使用胰蛋白酶消化,用微波处理法。采用Quantimet 500图像分析系统(德国Leica公司)对结果进行图像分析。在标记G细胞的每张切片上随机选取5个视野,测量G细胞的平

均数目、面积。取与G细胞相邻的标记D细胞的切片,用上述方法测量D细胞平均数目、面积。将标记GD细胞的相邻切片中的G细胞平均数目、面积分别除以D细胞平均数目、面积,得G/D细胞数目比值和G/D细胞面积比值。

1.2.3 免疫电镜观察及定量分析 30 g/L多聚甲醛-1 g/L戊二醛液固定的胃窦组织标本于2 h后,经10 g/L锇酸后固定1 h,梯度丙酮脱水,纵向Spurr树脂包埋, $40^\circ\text{C}$ 聚合72 h, $70\text{-}80 \text{ nm}$ 超薄切片,贴附于镍网上,将溃疡组切片和对照组切片再分别分为胃泌素切片组、生长抑素切片组、对照切片组3个组。随后切片置30 mL/L过氧化氢蚀刻10 min,双蒸水冲洗3次,10 g/L过碘酸钠5 min,0.05 mol/L pH7.4 TBS漂洗3次,15 g/L牛血清白蛋白非特异性阻断黏附30 min。胃泌素切片组加入1:80兔抗胃泌素抗体、生长抑素切片组加入1:80兔抗生长抑素抗体、对照切片组加入蒸馏水以代替胃泌素抗体或生长抑素抗体,温盒中 $4^\circ\text{C}$  24 h、 $37^\circ\text{C}$  1 h孵育,0.02 mol/L pH7.4 TBS漂洗1次,15 g/L牛血清白蛋白再次非特异性阻断黏附30 min,1:60葡萄球菌A蛋白胶体金 $37^\circ\text{C}$ 孵育1 h,0.02 mol/L pH7.4 TBS漂洗1次、0.05 mol/L pH7.4 TBS漂洗3次、双蒸水冲洗3次,铀铅复染,CM10透射电镜观察。分别自胃泌素切片组切片中和生长抑素切片组切片中随机拍摄含有金颗粒聚集体的50个任意细胞,照片输入Quantimet 500图像分析系统,测量G细胞内金颗粒聚集体的平均金颗粒数目和D细胞内金颗粒聚集体的平均金颗粒数目。

统计学处理 采用SPSS软件8.0版本进行数据统计处理,计量资料描述方法采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,对两个变量之间计量资料的比较进行t检验。

## 2 结果

溃疡组胃内容物明显增多,胃窦前壁膜面有一处溃疡,直径0.5-0.7 cm,溃疡呈圆形,中心颜色苍白,表面覆以灰白色苔膜,底部平坦,边界清楚,周围黏膜充血、水肿。正常组胃内容物贮存量适中,胃膜皱襞明显,膜色淡红,表面无溃疡,无充血、水肿。光镜观察见溃疡组胃窦溃疡部位膜腺体正常结构消失,表层为坏死组织,其下肉芽组织增生,并可见中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等炎性细胞。溃疡边缘膜腺体间质充血水肿、可见新生毛细血管和增生的纤维结缔组织。正常组胃窦膜结构完整,膜腺体排列整齐,未见明显的炎性细胞浸润。透射电镜观察见溃疡组溃疡边缘胃窦膜黏液细胞胞膜结构模糊不清,线粒体肿胀、嵴断裂。壁细胞胞膜破裂、微绒毛消失,线粒体肿胀,内质网扩张、互相离散,细胞内的分泌小管系统发育不良。主细胞粗面内质网减少、扩张,酶原颗粒增大且有融和。见有数种类型的内分泌细胞。还见有细胞质浓缩、细胞核碎裂的坏死细胞,和核染色质

颗粒状聚集、核质比例降低、出现凋亡小体的凋亡细胞, 以及中性粒细胞、嗜酸粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞等炎性细胞. 正常组胃窦膜黏液细胞、壁细胞、主细胞的膜结构、线粒体、内质网、分泌颗粒等细胞器未见明显异常, 也见有数种类型的内分泌细胞, 未见坏死细胞、凋亡细胞和各种炎性细胞.

2.1 胃泌素和生长抑素 溃疡组和正常组血清胃泌素含量、胃窦组织胃泌素含量、血清生长抑素含量、胃窦组织生长抑素含量之间的差异皆具有非常显著意义( $P < 0.01$ , 表 1).

表 1 胃泌素和生长抑素, GD 细胞数目、面积, 金颗粒聚集体中的金颗粒数目( $n = 7$ , mean $\pm$ SD)

参数	溃疡组	正常组
血清胃泌素(ng/L)	396.65 $\pm$ 130.09 <sup>a</sup>	146.94 $\pm$ 40.68
胃窦胃泌素(pg/g)	6 734.71 $\pm$ 2 286.92 <sup>a</sup>	3 713.52 $\pm$ 1 133.27
血清生长抑素(ng/L)	13.48 $\pm$ 4.93 <sup>a</sup>	45.28 $\pm$ 12.14
胃窦生长抑素(pg/g)	374.05 $\pm$ 149.80 <sup>a</sup>	1 358.24 $\pm$ 406.82
G 细胞数目	50.14 $\pm$ 6.67 <sup>a</sup>	33.42 $\pm$ 5.50
G 细胞面积( $\times 10^{-6}m^2$ )	86.51 $\pm$ 6.64 <sup>a</sup>	98.77 $\pm$ 7.18
D 细胞数目	10.29 $\pm$ 1.60 <sup>a</sup>	14.57 $\pm$ 1.72
D 细胞面积( $\times 10^{-6}m^2$ )	5.62 $\pm$ 8.02 <sup>a</sup>	70.38 $\pm$ 11.04
G/D 细胞数目比值	4.89 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	2.28 $\pm$ 0.12
G/D 细胞面积比值	1.57 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	1.42 $\pm$ 0.13
G 细胞中金颗粒数目	121.60 $\pm$ 22.79 <sup>a</sup>	107.04 $\pm$ 19.68
D 细胞中金颗粒数目	72.92 $\pm$ 15.30 <sup>a</sup>	83.36 $\pm$ 17.58

<sup>a</sup> $P < 0.01$ , vs 正常组.

2.2 免疫组化染色 G 细胞主要分布于胃窦膜的中、下 1/3, 偶见于膜上部, 其形态呈圆形、椭圆形、梭形、三角形或不规则形, 有的 G 细胞发出细长突起, 末端呈棒状, 伸向邻近细胞, 有的细胞顶部可达腺腔. D 细胞主要分布于胃窦膜的下 1/3, 偶见于膜中、上部, 其形态与 G 细胞相似. 溃疡组和正常组的 GD 细胞数目、面积差异皆具有非常显著意义( $P < 0.01$ , 表 1).

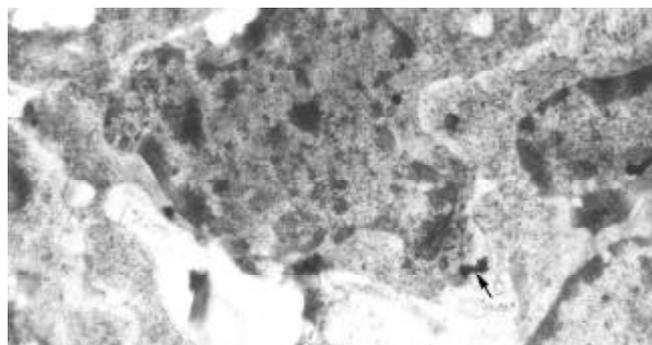


图 1 溃疡组大鼠胃窦黏膜 G 细胞和其胞中的胃泌素颗粒免疫电镜  $\times 8 900$ .

2.3 免疫电镜观察 胃泌素分布在 G 细胞的胞质中, 常位于基底膜附近, 一般可见到呈分叶状的金颗粒聚集

体(图 1). 生长抑素分布在 D 细胞的胞质中, 也常位于基底膜附近, 亦一般可见到呈分叶状的金颗粒聚集体(图 2). 对照切片组中未见到含有金颗粒的细胞. 溃疡组和正常组的 G 细胞中金颗粒数目和 D 细胞中金颗粒数目之间的差异皆具有非常显著意义( $P < 0.01$ , 表 1).

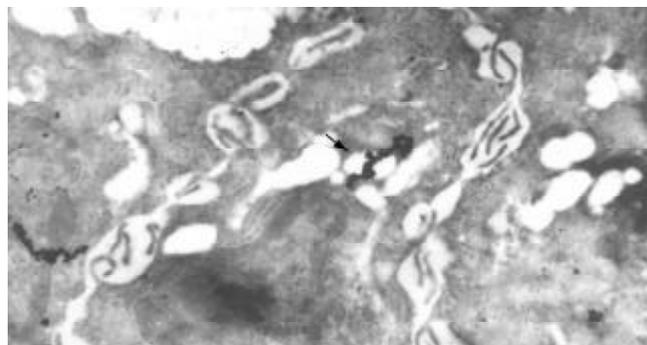


图 2 溃疡组大鼠胃窦黏膜 D 细胞和其胞中的生长抑素颗粒免疫电镜  $\times 6 610$ .

### 3 讨论

胃泌素主要由胃窦及小肠上部黏膜的 G 细胞分泌, 中枢神经系统的延髓迷走神经背核也含有胃泌素. 胃泌素是胃酸分泌的主要调节激素, 在壁细胞、ECL 细胞中有胃泌素受体, 胃泌素通过直接刺激壁细胞的胃泌素受体而刺激壁细胞分泌胃酸, 也间接通过 ECL 细胞的胃泌素受体刺激 ECL 细胞释放组胺, 组胺再以旁分泌方式激活壁细胞  $H_2$  受体而使之泌酸. 胃泌素还促进胃肠道内胃蛋白酶、促胰液素、胰液、胆汁中水和盐的分泌, 促进胰岛素和降钙素的释放. 胃泌素对胃黏膜具有营养和促增生作用, 并具有生长因子样功能, 其水平增高会增加壁细胞和 ECL 细胞数目, 并且与类癌瘤的发生相关. 胃泌素也增加胃肠道的运动, 使胃、肠、胆囊的收缩作用加强. 此外, G 细胞是主细胞、ECL 细胞、肠神经丛神经纤维之外的第 4 个胃内组胺来源. 胃内 pH 升高、进食、胃内压上升、迷走神经及黏膜神经丛介导的兴奋可使 G 细胞分泌胃泌素增加, 胃内酸度增高、生长抑素等其他胃肠激素刺激、交感神经兴奋则可抑制胃泌素的分泌<sup>[14-20]</sup>. 生长抑素在体内分布十分广泛, 存在于下丘脑、脑的其他部位、外周神经、胃肠道等处. 在消化系统, 生长抑素由 D 细胞分泌, 主要分布于肠壁神经丛、胃、胰腺. 生长抑素对消化系统的生物学作用主要是抑制, 他可抑制胃、肠、胆囊的蠕动, 抑制黏膜细胞的增生, 减少胃肠道壁血流量, 抑制胃酸、胃蛋白酶、肝胆汁、小肠液的分泌, 抑制胃泌素等各种胃肠激素的分泌, 减少小肠对水、电解质、葡萄糖、氨基酸、甘油三酯的吸收. 交感神经兴奋和迷走神经兴奋分别抑制和刺激 D 细胞对生长抑素的分泌. 胃泌素对胃内生长抑素分泌具有独特的区域性调节作用, 胃泌素可直接作用于 D 细胞而刺激生长抑素分泌, 在一些物种的胃 D 细胞中检出了胃泌素受体. 有研究发现内源性组胺通过对  $H_2$  受

体的旁分泌作用抑制生长抑素的分泌, 还有研究发现内皮素通过与其受体作用而抑制生长抑素的分泌<sup>[21-26]</sup>.

消化道中内分泌细胞种类繁多, 尽管以常规透射电镜观察到的不同种类内分泌细胞可按其超微结构, 以及按其细胞中内分泌颗粒的数目、位置、大小、形态、致密度等特征加以判别定性, 然而就确切标明特定内分泌细胞的内分泌颗粒中具体分泌的胃肠激素来说, 免疫电镜技术以胶体金探针具有的特异性强、分辨率高、定位准确、定量精确而具有更为重要的意义<sup>[27-28]</sup>. 本实验采用免疫电镜观察到了G(D)细胞和G(D)细胞中的胃泌素(生长抑素)分泌颗粒, 相应地明确判定了G(D)细胞. 本实验结果表明大鼠胃溃疡后, G细胞内胃泌素分泌量增加, D细胞内生长抑素分泌量减少, G细胞数目增加、面积减少, D细胞数目减少、面积减少, G/D细胞数目比值和G/D细胞面积比值增加, 并且血清、胃窦组织中胃泌素含量增加, 生长抑素含量减少. 我们认为溃疡大鼠的血清、胃窦组织胃泌素含量增加应是G细胞数目增加和G细胞中胃泌素分泌量增加的结果, 生长抑素含量减少应是D细胞数目减少和D细胞中生长抑素分泌量减少的结果. G(D)细胞面积减少则有可能是G(D)细胞分泌胃泌素(生长抑素)后, G(D)细胞体积相应缩小的表现, 也有可能是胃溃疡对G(D)细胞的影响所致其体积相应缩小的表现, 这有待于进一步研究加以探讨. G/D细胞比值可作为了解这两种细胞功能相对变化的指标, 正常大鼠胃黏膜中G/D细胞数目和面积的比值是相对稳定的. 本结果表明, 溃疡组大鼠G/D细胞数目和G/D细胞面积比值都较正常组增大, 这一方面进一步表明溃疡引起了G、D细胞的变化, 另一方面也印证了胃溃疡后胃泌素分泌的增加和生长抑素分泌的减少.

#### 4 参考文献

- Sun FP, Song YG, Cheng W, Zhao T, Yao YL. Gastrin, somatostatin, G and D cells of gastric ulcer in rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:375-378
- MacIntosh CG, Horowitz M, Verhagen MA, Smout AJ, Wishart J, Morris H, Goble E, Morley JE, Chapman IM. Effect of small intestinal nutrient infusion on appetite, gastrointestinal hormone release, and gastric myoelectrical activity in young and older men. *Am J Gastroenterol* 2001;96:997-1007
- Chen D, Zhao CM, Al-Haider W, Hakanson R, Rehfeld JF, Kopin AS. Differentiation of gastric ECL cells is altered in CCK (2) receptor-deficient mice. *Gastroenterology* 2002;123:577-585
- Arebi N, Healey ZV, Bliss PW, Ghatei M, Van Noorden S, Playford RJ, Calam J. Nitric oxide regulates the release of somatostatin from cultured gastric rabbit primary D-cells. *Gastroenterology* 2002;123:566-576
- Cobb S, Wood T, Tessarollo L, Velasco M, Given R, Varro A, Tarasova N, Singh P. Deletion of functional gastrin gene markedly increases colon carcinogenesis in response to azoxymethane in mice. *Gastroenterology* 2002;123:516-530
- Peghini PL, Annibale B, Azzoni C, Milione M, Corleto VD, Gibril F, Venzon DJ, Delle Fave G, Bordi C, Jensen RT. Effect of chronic hypergastrinemia on human enterochromaffin-like cells: insights from patients with sporadic gastrinomas. *Gastroenterology* 2002;123:68-85
- Silva JC, Santos JL, Barbosa AJ. Gastrinaemia, tissue gastrin concentration and g cell density in the antral mucosa of Swine with and without gastric ulcer of the pars oesophagea. *J Comp Pathol* 2002;126:235-237
- Wang X, Wang BR, Zhang XJ, Xu Z, Ding YQ, Ju G. Evidences for vagus nerve in maintenance of immune balance and transmission of immune information from gut to brain in STM-infected rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:540-545
- Xia L, Yuan YZ, Xu CD, Zhang YP, Qiao MM, Xu JX. Effects of epidermal growth factor on the growth of human gastric cancer cell and the implanted tumor of nude mice. *World J Gastroenterol* 2002;8:455-458
- Liu CY, Chen LB, Liu PY, Xie DP, Wang PS. Effects of progesterone on gastric emptying and intestinal transit in male rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:338-341
- Wang X, Zhong YX, Zhang ZY, Lu J, Lan M, Miao JY, Guo XG, Shi YQ, Zhao YQ, Ding J, Wu KC, Pan BR, Fan DM. Effect of L-NAME on nitric oxide and gastrointestinal motility alterations in cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:328-332
- Wang H, Zhang YQ, Ding YQ, Zhang JS. Localization of neurokinin B receptor in mouse gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 2002;8:172-175
- Wang X, Zhong YX, Lan M, Zhang ZY, Shi YQ, Lu J, Ding J, Wu KC, Jin JP, Pan BR, Fan DM. Screening and identification of proteins mediating senna induced gastrointestinal motility enhancement in mouse colon. *World J Gastroenterol* 2002;8:162-167
- Bjorkqvist M, Dornonville de la Cour C, Zhao C, Gagnemo-Persson R, Hakanson R, Norlen P. Role of gastrin in the development of gastric mucosa, ECL cells and A-like cells in newborn and young rats. *Regul Pept* 2002;108:73
- Sipponen P, Ranta P, Helske T, Kaariainen I, Maki T, Linnala A, Suovaniemi O, Alanko A, Harkonen M. Serum levels of amidated gastrin-17 and pepsinogen I in atrophic gastritis: an observational case-control study. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:785-791
- Kirton CM, Wang T, Dockray GJ. Regulation of parietal cell migration by gastrin in the mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G787-793
- Pagliocca A, Wroblewski LE, Ashcroft FJ, Noble PJ, Dockray GJ, Varro A. Stimulation of the gastrin-cholecystokinin(B) receptor promotes branching morphogenesis in gastric AGS cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G292-299
- Schmassmann A, Reubi JC. Cholecystokinin-B/gastrin receptors enhance wound healing in the rat gastric mucosa. *J Clin Invest* 2000;106:1021-1029
- Tuo BG, Yan YH, Ge ZL, Ou GW, Zhao K. Ascorbic acid secretion in the human stomach and the effect of gastrin. *World J Gastroenterol* 2000;6:704-708
- Du YP, Zhang YP, Wang SC, Shi J, Wu SH. Function and regulation of cholecystokinin octapeptide, beta-endorphin and gastrin in anorexic infantile rats treated with ErBao Granules. *World J Gastroenterol* 2001;7:275-280
- Abdu F, Hicks GA, Hennig G, Allen JP, Grundy D. Somatostatin sst(2) receptors inhibit peristalsis in the rat and mouse jejunum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G624-633
- Larsson LI. Developmental biology of gastrin and somatostatin cells in the antropyloric mucosa of the stomach. *Microsc Res Tech* 2000;48:272-281
- Lu SJ, Liu YQ, Lin JS, Wu HJ, Sun YH, Tan YB. VIP immunoreactive nerves and somatostatin and serotonin containing cells in Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 1999;5:541-543
- Zhang QX, Dou YL, Shi XY, Ding Y. Expression of somatostatin mRNA in various differentiated types of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 1998;4:48-51
- He SW, Shen KQ, He YJ, Xie B, Zhao YM. Regulatory effect and mechanism of gastrin and its antagonists on colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 1999;5:408-416
- Zhu JY, Leng XS, Wang D, Du RY. Effects of somatostatin on splanchnic hemodynamics in cirrhotic patients with portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2000;6:143-144
- Li QF, Ou Yang GL, Li CY, Hong SG. Effects of tachypleisin on the morphology and ultrastructure of human gastric carcinoma cell line BGC-823. *World J Gastroenterol* 2000;6:676-680
- Ding SP, Li JC, Xu J, Mao LG. Study on the mechanism of regulation on the peritoneal lymphatic stomata with Chinese herbal medicine. *World J Gastroenterol* 2002;8:188-192

# 当归多糖对大鼠乙酸性结肠炎的保护作用

刘少平, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平, 吴东方

刘少平, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平, 武汉大学人民医院消化内科  
湖北省武汉市 430060  
吴东方, 武汉大学人民医院药理学部 湖北省武汉市 430060  
刘少平, 男, 1973-11-08 生, 湖北黄石市人, 汉族, 武汉大学人民医院消化  
内科硕士研究生, 主要从事炎症性肠病的防治研究。  
湖北省科技攻关项目, No. 2001AA308B  
项目负责人: 董卫国, 430060, 湖北省武汉市解放路 238 号, 武汉大学人民  
医院消化内科. dongwg@public.wh.hb.cn  
电话: 027-88074434  
收稿日期: 2003-05-14 接受日期: 2003-06-02

## Protective effects of *Angelica sinensis* polysaccharides on acetic acid-induced rat colitis

Shao-Ping Liu, Wei-Guo Dong, Bao-Ping Yu, He-Sheng Luo,  
Jie-Ping Yu, Dong-Fang Wu

Shao-Ping Liu, Wei-Guo Dong, Bao-Ping Yu, He-Sheng Luo, Jie-Ping Yu,  
Department of Gastroenterology, Wuhan University Renmin Hospital,  
Wuhan 430060, Hubei Province, China  
Dong-Fang Wu, Department of Pharmacy, Wuhan University Renmin  
Hospital, 238 Jiefang Road, Wuhan 430060, Hubei Province, China  
Supported by Science and Technology Committee of Hubei Province,  
No. 2001AA308B  
Correspondence to: Wei-Guo Dong, Wuhan University Renmin Hospital,  
238 Jiefang Road, Wuhan 430060, Hubei Province, China.  
dongwg@public.wh.hb.cn  
Received: 2003-05-14 Accepted: 2003-06-02

## Abstract

**AIM:** To study the protective effects of *Angelica sinensis* polysaccharides (ASP) on colon injury in acetic acid-induced rat colitis and its mechanism.

**METHODS:** The colitis model of rats was produced by intracolonic enema with acetic acid. The experimental animals were divided into 6 groups: normal, model, 5-ASA (100 mg/kg), and ASP (250, 500, 1 000 mg/kg), and treated intracolonicly with saline, 5-ASA, and ASP respectively once a day for 7 days. The colon mucosa damage index (CMDI) and occult blood test (OBT) were evaluated. The activities of MPO and SOD, the contents of MDA and NO, the expression levels of TGF- $\beta$  and EGF in the colon tissue were detected. H-E stained section was also observed.

**RESULTS:** Intracolonic enema with ASP decreased the significantly elevated extents of CMDI, OBT and levels of MPO, MDA, and NO in the model group (CMDI:  $2.1 \pm 0.8$ ,  $1.8 \pm 0.6$ ,  $1.4 \pm 0.7$  vs  $2.9 \pm 0.6$ ; OBT:  $3.1 \pm 1.3$ ,  $2.7 \pm 1.1$ ,  $2.2 \pm 1.2$  vs  $3.8 \pm 0.8$ ; MPO:  $77.2 \pm 23.6$ ,  $72.5 \pm 16.8$ ,  $61.3 \pm 19.2$  vs  $98.1 \pm 26.9$ ; MDA:  $44.26 \pm 10.25$ ,  $38.72 \pm 14.84$ ,  $31.59 \pm 12.68$  vs  $31.59 \pm 12.68$ ; NO:  $0.252 \pm 0.041$ ,  $0.223 \pm 0.037$ ,  $0.217 \pm 0.032$  vs  $0.331 \pm 0.092$ ,  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), increased the significantly reduced level of expression of TGF- $\beta$  and the activity of SOD in the model group (SOD:  $30.16 \pm 2.88$ ,  $31.27 \pm 2.73$ ,  $33.52 \pm$

$2.81$  vs  $28.33 \pm 1.17$ ; TGF- $\beta$ :  $0.136 \pm 0.031$ ,  $0.153 \pm 0.036$ ,  $0.169 \pm 0.029$  vs  $0.105 \pm 0.021$ ,  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and also increased significantly the expression of EGF (EGF:  $0.178 \pm 0.021$ ,  $0.195 \pm 0.031$ ,  $0.191 \pm 0.022$  vs  $0.151 \pm 0.026$ ,  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The histological changes were also alleviated with ASP treatment.

**CONCLUSION:** Enteroclysis with ASP markedly relieve the colon injury in acetic acid-induced rats colitis, which is related with promoting growth factors, decreasing oxygen free radicals and some anti-inflammation effects.

Liu SP, Dong WG, Yu BP, Luo HS, Yu JP, Wu DF. Protective effects of *Angelica sinensis* polysaccharides on acetic acid-induced rat colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):367-370

## 摘要

**目的:** 研究当归多糖对大鼠乙酸性结肠炎损伤的保护作用及其初步机制。

**方法:** 建立大鼠乙酸性结肠炎模型。实验设正常对照组, 模型对照组; 阳性药物对照组(5氨基水杨酸100 mg/kg); 当归多糖给药组(250, 500, 1 000 mg/kg), 每天灌肠给药一次, 用药 7 d。评价大鼠结肠黏膜损伤指数(CMDI)及粪便隐血实验(OBT), 检测结肠组织髓过氧化物酶(MPO), SOD 活性, MDA、NO 含量和 TGF- $\beta$ 、EGF 表达水平, 并作病理组织学观察。

**结果:** ASP 灌肠明显降低模型组大鼠结肠显著升高的 CMDI、OBT 评分, MPO 活性、MDA、NO 含量(CMDI:  $2.1 \pm 0.8$ ,  $1.8 \pm 0.6$ ,  $1.4 \pm 0.7$  vs  $2.9 \pm 0.6$ ; OBT:  $3.1 \pm 1.3$ ,  $2.7 \pm 1.1$ ,  $2.2 \pm 1.2$  vs  $3.8 \pm 0.8$ ; MPO:  $77.2 \pm 23.6$ ,  $72.5 \pm 16.8$ ,  $61.3 \pm 19.2$  vs  $98.1 \pm 26.9$ ; MDA:  $44.26 \pm 10.25$ ,  $38.72 \pm 14.84$ ,  $31.59 \pm 12.68$  vs  $31.59 \pm 12.68$ ; NO:  $0.252 \pm 0.041$ ,  $0.223 \pm 0.037$ ,  $0.217 \pm 0.032$  vs  $0.331 \pm 0.092$ ,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 明显升高模型组大鼠结肠显著降低的 SOD 活性与 TGF- $\beta$  表达水平 (SOD:  $30.16 \pm 2.88$ ,  $31.27 \pm 2.73$ ,  $33.52 \pm 2.81$  vs  $28.33 \pm 1.17$ ; TGF- $\beta$ :  $0.136 \pm 0.031$ ,  $0.153 \pm 0.036$ ,  $0.169 \pm 0.029$  vs  $0.105 \pm 0.021$ ,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 亦显著上调 EGF 表达(EGF:  $0.178 \pm 0.021$ ,  $0.195 \pm 0.031$ ,  $0.191 \pm 0.022$  vs  $0.151 \pm 0.026$ ,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。ASP 用药呈一定量效关系。SF 灌肠亦改善模型组大鼠结肠病理组织学表现。

**结论:** ASP 灌肠明显缓解乙酸性结肠炎大鼠结肠损伤, 机制与促生长因子、抗氧化和一定的抗炎作用相关。

刘少平, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平, 吴东方. 当归多糖对大鼠乙酸性结肠炎的保护作用. 世界华人消化杂志 2004;12(2):367-370

http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/367.asp

## 0 引言

当归多糖(angelica sinensis polysaccharides, ASP)具有调节免疫、抗肿瘤、抗感染、促进造血等广泛药理作用<sup>[1]</sup>. 近年研究发现, ASP 体外通过促生长因子合成, 上调 c-myc 蛋白表达、升高鸟氨酸脱羧酶活性等作用, 促进大鼠胃上皮细胞增生与迁移, 加速其损伤模型的修复; ASP 灌胃明显缓解大鼠实验性胃溃疡损伤, 促进溃疡愈合; ASP 可拮抗大鼠胃肠道大量中性粒细胞浸润引起的炎症损伤; ASP 亦能抑制 MDA, NO 生成, 减少谷胱甘肽的清除, 表现出抗氧化特性, 拮抗 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠氧化性肝损伤<sup>[2-7]</sup>. 为探讨 ASP 对 IBD 肠组织损伤是否亦具有缓解保护作用机制, 我们建立大鼠乙酸性结肠炎模型, 首次观察 ASP 灌肠给药对其结肠损伤程度及氧自由基、生长因子水平的影响.

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康 Sprague-Dawley 大鼠, 雌雄兼用, 体质量 250 ± 30 g, 由湖北预防医学科学院实验动物中心提供; ASP 由武汉大学人民医院药理学部参照文献<sup>[5]</sup>方法提取、纯化, 所用当归产于甘肃岷县, 使用前溶于生理盐水, 高压消毒; 5-ASA 原料药, 国怡药业有限公司提供, 批号 0209477; 分析纯乙酸, 上海生化试剂厂产品; MPO, SOD, MDA, NO 检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所; OB 试纸, Tonyar Biotech 公司产品; TGF-β, EGF 多抗分别购自美国 Santa Cruz 和 Zymed 公司; SP 试剂盒由北京中山生物技术有限公司提供; 其余试剂均为国产分析纯.

1.2 方法 参照文献<sup>[Gut 1996;39:407-415]</sup>制备动物模型, 乙醚麻醉固定大鼠, 橡胶输液管由肛门轻柔插入结肠内约 8 cm, 推入 80 mL/L 乙酸 2 mL, 作用 20 s 后, 立即注入 5 mL 生理盐水, 冲洗 2 次. 实验设正常对照组、模型对照组、阳性药物对照组、ASP 给药组 (250, 500, 1 000 mg/kg), 每组 8 只, 均灌肠给药, 1 次/d, 给药时间从制备模型后 24 h 开始, 用药 7 d. 正常对照组及模型对照组均给予等量生理盐水灌肠. 实验完成后用 OB 试纸检测粪便隐血实验(OBT), 显色评分标准按 OB 试纸说明进行. 处死动物, 参照文献<sup>[8]</sup>评价 CMDI, 评分标准为: 0 = 无损伤; 1 = 轻度充血、水肿, 表面光滑, 无糜烂或溃疡; 2 = 充血水肿, 黏膜粗糙呈颗粒状, 有糜烂或肠粘连; 3 = 高度充血水肿, 黏膜表面有坏死及溃疡形成, 溃疡最大纵径小于 1 cm, 肠壁增厚或表面有坏死及炎症; 4 = 在 3 分基础上溃疡最大纵径大于 1 cm, 或全肠壁坏死. 在距肛门 7-9 cm 处取适量结肠新鲜标本, 快速置于液氮中速冻, 待测 SOD, MDA, NO, MPO, 检测操作按相应试剂盒说明进行;

用 40 mL/L 多聚甲醛溶液固定结肠组织标本, 常规石蜡包埋、切片, HE 染色并光镜观察. TGF-β、EGF 免疫组化检测步骤严格按试剂盒说明进行, 均以非免疫性山羊血清封闭非特异性抗原, 一抗分别为 1:100, 1:150 的 TGF-β 与 EGF 兔 IgG 多抗, 二抗均为生物素化羊抗兔 IgG 工作液, 以 PBS 代替一抗做阴性对照, 以细胞核蓝色为阴性, 胞质内或核膜上呈棕黄色为阳性. 每张切片选取 10 个 400 倍视野, 采用全自动图像分析仪与 HPIAS-2000 图像分析软件, 分别扫描记录阳性细胞的吸光度 A 值, 取其平均值, 作为此切片 TGF-β, EGF 的相对含量.

统计学处理 数据以 mean±SD 表示, 采用 SPSS 医学统计软件处理, 两组间均数差异的比较采用 t 检验.

## 2 结果

2.1 结肠损伤程度和炎症反应 模型组大鼠 CMDI, OBT 与 MPO 活性较正常对照显著升高(P < 0.01), 不同剂量 ASP 灌肠显著降低 CMDI, 中、大剂量 ASP 亦使 OBT 评分, MPO 活性明显降低(P < 0.05 或 P < 0.001). 大剂量 ASP 改善 CMDI, OBT 作用与 100 mg/kg 5-ASA 相当(表 1). 结肠标本 HE 染色亦显示, 模型组黏膜高度充血水肿, 上皮溃疡形成, 局部见坏死, 大量炎性细胞浸润, 腺体中杯状细胞显著减少而大剂量 ASP 用药组黏膜充血水肿, 上皮溃疡坏死明显减轻, 炎性细胞浸润亦有所缓解.

表 1 ASP 对结肠炎大鼠 CMDI, OBT 的影响 (mean±SD, n = 8)

分组	剂量(mg/kg)	CMDI(分)	OBT(分)	MPO(nkat/g)
正常对照	0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	413 ± 192
模型对照	0	2.9 ± 0.6 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.8 <sup>b</sup>	1 635 ± 448 <sup>b</sup>
5-ASA	100	1.6 ± 0.9 <sup>d</sup>	2.6 ± 1.1 <sup>c</sup>	493 ± 180 <sup>d</sup>
ASP	250	2.1 ± 0.8 <sup>c</sup>	3.1 ± 1.3	1 287 ± 393
ASP	500	1.8 ± 0.6 <sup>d</sup>	2.7 ± 1.1 <sup>c</sup>	1 209 ± 280 <sup>c</sup>
ASP	1 000	1.4 ± 0.7 <sup>d</sup>	2.2 ± 1.2 <sup>d</sup>	1 022 ± 320 <sup>d</sup>

<sup>b</sup>P < 0.01, vs 正常对照组; <sup>c</sup>P < 0.05, <sup>d</sup>P < 0.01, vs 模型对照组.

表 2 ASP 对结肠炎大鼠结肠氧自由基与生长因子的影响(mean±SD, n = 8)

分别	剂量(mg/kg)	SOD (ukat/g)	MDA (umol/g)	NO (mmol/g)	TGF-β (A × 10 <sup>-3</sup> )	EGF (A × 10 <sup>-3</sup> )
正常对照	0	602 ± 32	9.2 ± 3.8	176 ± 45	146 ± 25	162 ± 23
模型对照	0	472 ± 20 <sup>b</sup>	57.5 ± 12.4 <sup>b</sup>	331 ± 92 <sup>b</sup>	105 ± 21 <sup>b</sup>	151 ± 26
5-ASA	100	548 ± 49 <sup>d</sup>	34.7 ± 9.4 <sup>d</sup>	194 ± 35 <sup>d</sup>	97 ± 27	159 ± 28
ASP	250	503 ± 48	44.3 ± 10.2 <sup>c</sup>	252 ± 41 <sup>c</sup>	136 ± 31 <sup>c</sup>	178 ± 21 <sup>c</sup>
ASP	500	521 ± 46 <sup>c</sup>	38.7 ± 14.8 <sup>c</sup>	223 ± 37 <sup>d</sup>	153 ± 36 <sup>d</sup>	195 ± 31 <sup>d</sup>
ASP	1000	559 ± 47 <sup>d</sup>	31.6 ± 12.7 <sup>d</sup>	217 ± 32 <sup>d</sup>	169 ± 29 <sup>d</sup>	191 ± 22 <sup>d</sup>

<sup>b</sup>P < 0.01, vs 正常对照组; <sup>c</sup>P < 0.05, <sup>d</sup>P < 0.01, vs 模型对照组.

2.2 结肠氧自由基和生长因子 模型组大鼠 MDA, NO 含量显著升高, TGF-β 表达、SOD 活性显著降低(P < 0.01),

EGF 表达无明显变化, ASP 灌肠显著降低 MDA, NO 含量, 升高 TGF- $\beta$ , EGF 表达水平, SOD 活性( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 而 100 mg/kg 5-ASA 对模型组 TGF- $\beta$ , EGF 表达水平无明显影响. ASP 用药呈一定量效关系(表 2, 图 1-4).

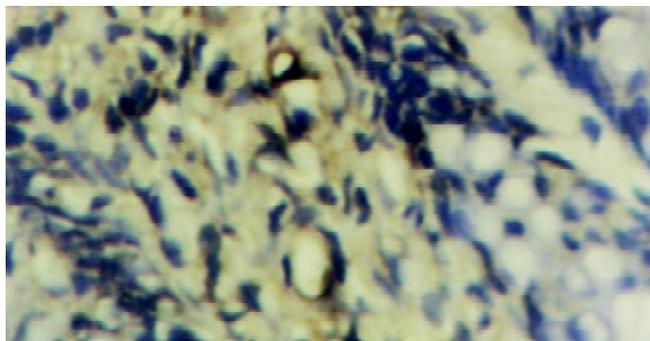


图 1 TGF- $\beta$  在模型组大鼠结肠组中的表达 SP  $\times$  400.

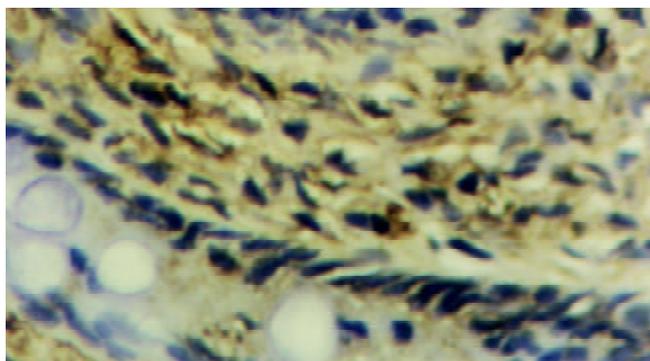


图 2 TGF- $\beta$  在 ASP 大剂量用药组大鼠结肠组中的表达 SP  $\times$  400.



图 3 EGF 在模型组大鼠结肠组中的表达 SP  $\times$  400.

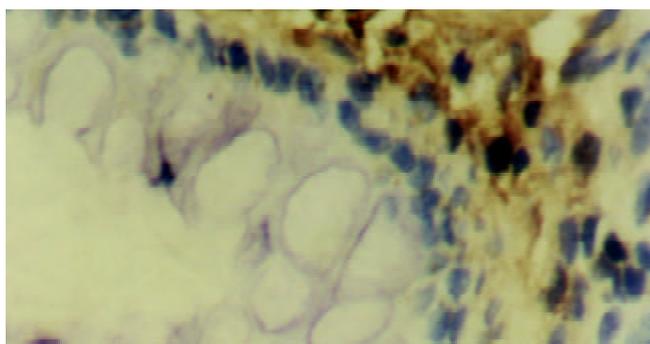


图 4 EGF 在 ASP 大剂量用药组大鼠结肠组中的表达 SP  $\times$  400.

### 3 讨论

乙酸诱导的大鼠实验性结肠炎是成熟经典的 IBD 模型, 因其发病机制、病理表现与人类 IBD 相似, 常用于 IBD 治疗药物的筛选与评价<sup>[8-9]</sup>. 本研究显示, ASP 灌肠显著减轻模型组大鼠结肠黏膜损伤程度, 明显缓解便血症状, 表现出明显的结肠损伤保护作用. MPO 活性是间接反映 IBD 炎症程度的重要指标<sup>[10]</sup>, 本研究亦显示中、大剂量 ASP 明显降低模型组 MPO 活性, 显示出一定的抗炎效果, 但其作用仍明显弱于 100 mg/kg 5-ASA ( $P < 0.01$ ). ASP 抗炎机制之一可能为其含有药理特性类似于肝素的成分, 可通过与一系列炎症前化学激动反应相互作用, 产生拮抗炎症效应<sup>[4]</sup>. IBD 肠黏膜中 OFR 水平明显升高, 抗氧化系统存在缺陷, 大量 OFR 对自身组织产生攻击作用, 充当或激活炎症递质, 使结肠炎症损伤进一步加重<sup>[11-14]</sup>. 过量的弱氧自由基 NO 不仅趋化中性粒细胞和单核细胞, 还使血管扩张, 通透性增加, 有助于炎症的始动与发展, 且可与超氧阴离子反应生成具有高度细胞毒性的过氧亚硝酸盐, 损伤结肠上皮细胞的功能和结构, 破坏肠道黏膜屏障的完整性<sup>[15-18]</sup>. 抗氧化剂与抑制 NO 生成, 可有效缓解 IBD 结肠损伤<sup>[8, 18-19]</sup>. 本研究显示模型组大鼠 OFR 与 NO 大量生成, ASP 灌肠明显降低 MDA、NO 含量, 升高 SOD 活性, 表现出较强抗 OFR 作用, 从而缓解结肠氧化损伤与炎症反应. IBD 肠黏膜中 iNOS 活性显著升高是 NO 大量病理性生成的主要原因<sup>[20]</sup>. 研究证实 ASP 可剂量依赖性抑制 iNOS 活性<sup>[5-6]</sup>, 这可能是其减少炎症结肠组织 NO 含量的机制. ASP 通过抗氧化、清除氧自由基作用, 从而抑制氧自由基对 IBD 重要炎症调控因子 NF- $\kappa$ B 的激活, 亦可能是其抗炎效应的机制<sup>[5, 21-22]</sup>. TGF- $\beta$ , EGF 是对多种组织损伤修复和再生具有重要意义的细胞生长因子, 具有相互协同促进作用<sup>[23-28]</sup>, 且均可阻止氧化剂诱导的肠黏膜屏障损伤与功能低下, 对肠道黏膜屏障的完整性及功能维持具有重要意义<sup>[29-32]</sup>. 研究证实 TGF- $\beta$  不足可加重 IBD 肠道损伤, 外源性给予 TGF- $\beta$ , EGF 均可明显缓解 IBD 肠道损伤<sup>[33-37]</sup>. 本研究显示模型组大鼠结肠 TGF- $\beta$  水平显著降低, EGF 无明显改变; ASP 灌肠显著升高二者表达水平, 表明其明显促进 TGF- $\beta$ 、EGF 的合成分泌, 其促生长因子作用与新近研究报道相似<sup>[2-3]</sup>, 而 5-ASA 对二者表达无明显影响. 结肠组织中显著增加的 TGF- $\beta$ 、EGF 可通过促多种组织细胞增生、分化、迁移作用, 直接加速结肠上皮细胞、黏膜屏障及血管损伤的修复与再生, 并发挥细胞保护作用, 这可能是 ASP 缓解模型组大鼠结肠损伤及肠道出血的主要机制.

### 4 参考文献

- Xie L, Yang LH, Li XH. Research on the pharmacologic effects of *Angelica sinensis*. *Res Tradi Chin Med* 2000;16:56-58
- Ye YN, Koo MW, Li Y, Matsui H, Cho CH. *Angelica sinensis* modulates migration and proliferation of gastric epithelial cells. *Life Sci* 2001;68:961-968

- 3 Ye YN, Liu ES, Shin VY, Koo MW, Li Y, Wei EQ, Matsui H, Cho CH. A mechanistic study of proliferation induced by *Angelica sinensis* in a normal gastric epithelial cell line. *Biochem Pharmacol* 2001;61:1439-1448
- 4 Cho CH, Mei QB, Shang P, Lee SS, So HL, Guo X, Li Y. Study of the gastrointestinal protective effects of polysaccharides from *Angelica sinensis* in rats. *Plant Med* 2000;66:348-351
- 5 Ye YN, Liu ES, Li Y, So HL, Cho CC, Sheng HP, Lee SS, Cho CH. Protective effect of polysaccharides-enriched fraction from *Angelica sinensis* on hepatic injury. *Life Sci* 2001;69:637-646
- 6 Ding H, Peng R, Yu J. Modulation of *Angelica sinensis* polysaccharides on the expression of nitric oxide synthase and Bax, Bcl-2 in liver of immunological liver-injured mice. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001;9(Suppl):50-52
- 7 Ye YN, So HL, Liu ES, Shin VY, Cho CH. Effect of polysaccharides from *Angelica sinensis* on gastric ulcer healing. *Life Sci* 2003;72:925-932
- 8 Millar AD, Rampton DS, Chander CL, Claxson AW, Blades S, Coumbe A, Panetta J, Morris CJ, Blake DR. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. *Gut* 1996;39:93-99
- 9 Li L, Wang ZL, Ke JT, Zhang M, Shao JF, Zhong CN. Select animal models for experimental colitis model. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:584-585
- 10 Li JH, Yu JP, He XF, Xu XM. Expression of NF- $\kappa$ B in rats with TNBS-induced ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:214-218
- 11 Kriegelstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Salter JW, Russell JM, Schuermann G, Grisham MB, Ross CR, Granger DN. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J Exp Med* 2001;194:1207-1218
- 12 Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001;7:175-184
- 13 Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, Grisham MB. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 2002;33:311-322
- 14 Huycke MM, Abrams V, Moore DR. Enterococcus faecalis produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis* 2002;23:529-536
- 15 Feng ZJ, Yao XX. Regulating effect of NO-PGE<sub>2</sub> on visceral angiectasis in portal hypertension. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1154-1156
- 16 Le QL, Wen XD. The role of nitric oxide in stress-induced gastric ulcers in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:815-816
- 17 Wang QG, He LY, Chen YW, Hu LS. Enzymohistochemical study on burn effect on rat intestinal NOS. *World J Gastroenterol* 2000;6:421-423
- 18 Bai AP, Shen ZX, Yu JP, Yu BP, Luo Y. Nitric oxide and the acute injury in colitis model. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:900-901
- 19 Yavuz Y, Yuksel M, Yegen BC, Alican I. The effect of antioxidant therapy on colonic inflammation in the rat. *Res Exp Med (Berl)* 1999;199:101-110
- 20 Zhang K, Deng CS, Zhu YQ, Yang YP, Zhang YM. Significance of nuclear factor- $\kappa$ B, cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human ulcerative colitis tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:575-578
- 21 Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2001;107:135-142
- 22 Liu SQ, Yu JP, Luo HS, Ran ZX. Effects of Ginkgo biloba extract on expression of NF- $\kappa$ B in rat liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:922-926
- 23 Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol* 1992;199:1017-1021
- 24 Higashiyama S, Abraham JA, Miller J, Fiddes JC, Klagsbrun M. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 1991;251:932-943
- 25 Fu XB, Yang YH, Sun TZ, Gu XM, Jiang LX, Sun XQ, Sheng ZY. Effect of intestinal ischemia-reperfusion on expressions of endogenous basic fibroblast growth factor and transforming growth factor  $\beta$  in lung and its relation with lung repair. *World J Gastroenterol* 2000;6:353-355
- 26 Yuan YZ, Lou KX, Gong ZH, Tu SP, Zhai ZK, Xu JY. Effects and mechanisms of emodin on pancreatic tissue EGF expression in acute pancreatitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:127-130
- 27 Wan SM, Sun SH, Den MD, Ge QL, Yang YJ. TGF- $\beta$ <sub>1</sub> and PDGF-A expression in gastric cancer tissue and prognosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:36-39
- 28 Zhuang ZH, Chen YL, Wang CD, Chen YG. Expression of TGF- $\beta$ <sub>1</sub> and TGF- $\beta$  receptor in gastric carcinoma and precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:507-509
- 29 Banan A, Fields JZ, Talmage DA, Zhang L, Keshavarzian A. PKC-zeta is required in EGF protection of microtubules and intestinal barrier integrity against oxidant injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G794-808
- 30 Banan A, Fields JZ, Zhang Y, Keshavarzian A. Phospholipase C-gamma inhibition prevents EGF protection of intestinal cytoskeleton and barrier against oxidants. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G412-423
- 31 Banan A, Zhang Y, Losurdo J, Keshavarzian A. Carbonylation and disassembly of the F-actin cytoskeleton in oxidant induced barrier dysfunction and its prevention by epidermal growth factor and transforming growth factor alpha in a human colonic cell line. *Gut* 2000;46:830-837
- 32 Banan A, Fields JZ, Talmage DA, Zhang Y, Keshavarzian A. PKC-beta1 mediates EGF protection of microtubules and barrier of intestinal monolayers against oxidants. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G833-847
- 33 Hahm KB, Im YH, Parks TW, Park SH, Markowitz S, Jung HY, Green J, Kim SJ. Loss of transforming growth factor beta signalling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;49:190-198
- 34 Beck PL, Podolsky DK. Growth factors in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:44-60
- 35 Sandborn WJ, Targan SR. Biologic therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:1592-1608
- 36 Wiercinska-Drapalo A, Flisiak R, Prokopowicz D. The role of transforming growth factors beta in pathogenesis of ulcerative colitis. *Pol Merkuriusz Lek* 2001;10:177-179
- 37 Whiting CV, Williams AM, Claesson MH, Bregenholt S, Reimann J, Bland PW. Transforming growth factor-beta messenger RNA and protein in murine colitis. *J Histochem Cytochem* 2001;49:727-738

# 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响

周燕红, 于皆平, 何小飞, 余细球

周燕红, 于皆平, 余细球, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060  
何小飞, 咸宁医学院附属医院消化内科 湖北省咸宁市 437100  
周燕红, 女, 1971-04-10 生, 湖北省咸宁市人, 汉族, 武汉大学人民医院消化内科硕士研究生, 主要从事溃疡性结肠炎的基础与临床研究。  
项目负责人: 何小飞, 437100, 湖北省咸宁市, 咸宁医学院附属医院消化内科. doctorhe120@hotmail.com  
电话: 0715-8255334-2201  
收稿日期: 2003-09-09 接受日期: 2003-11-06

## Effects of Ginkgo biloba extract on cytokines in rats with TNBS-induced ulcerative colitis

Yan-Hong Zhou, Jie-Ping Yu, Xiao-Fei He, Xi-Qiu Yu

Yan-Hong Zhou, Jie-Ping Yu, Xi-Qiu Yu, Department of Gastroenterology, Wuhan University Renmin Hospital, Wuhan 430060, Hubei Province, China  
Xiao-Fei He, Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital, Xianning Medical College, Xianning 437100, Hubei Province, China  
Correspondence to: Dr. Xiao-Fei He, Department of Gastroenterology, Xianning Medical College, Xianning 437100, Hubei Province, China. doctorhe120@hotmail.com  
Received: 2003-09-09 Accepted: 2003-11-06

### Abstract

**AIM:** To investigate the effects of Ginkgo biloba extract (Egb) on cytokine profile produced by splenocytes, colonic mucosa and serum and to study the main mechanism of EGb in protection of TNBS-induced ulcerative colitis in rats.

**METHODS:** A rat ulcerative colitis model was induced by 2.4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). All rats were divided into four groups: normal, TNBS, TNBS+NS, and TNBS+EGb. The macroscopical and histological changes of the colon were evaluated. The IL-12, IFN- $\gamma$  and IL-4 produced by splenocytes, colonic mucosal and serum were analyzed with ELISA.

**RESULTS:** In TNBS+EGb group, the macroscopical and histological scores were significantly lower than those of TNBS group ( $2.83 \pm 0.94$  vs  $5.33 \pm 1.50$ ,  $P < 0.01$ ,  $1.92 \pm 0.67$  vs  $4.33 \pm 0.98$ ,  $P < 0.01$ ). In the TNBS+EGb group, a lower level of IFN- $\gamma$  production in splenocytes ( $60 \pm 21.5$  vs  $125.6 \pm 14.6$ ,  $P < 0.01$ ); colonic mucosa ( $202.8 \pm 49.6$  vs  $431.8 \pm 57.6$ ,  $P < 0.01$ ) and serum ( $8.6 \pm 1.4$  vs  $13.5 \pm 1.7$ ,  $P < 0.01$ ) was noticed as compared with TNBS group. In comparison with TNBS group, significantly increased IL-4 was noticed (splenocytes:  $11.2 \pm 1.3$  vs  $6.05 \pm 1.5$ ,  $P < 0.01$ ; colonic mucosa:  $10.2 \pm 1.9$  vs  $6.9 \pm 1.4$ ,  $P < 0.01$ ; serum:  $7.9 \pm 1.8$  vs  $4.2 \pm 1.1$ ,  $P < 0.01$ ) in TNBS+EGb group. IL-12 production by serum in TNBS+EGb group was lower than that of TNBS group ( $8.2 \pm 2.2$  vs  $25.8 \pm 4.8$ ,  $P < 0.01$ ). The ratio of IL-12/IL-4 was lower in TNBS+EGb group compared with TNBS group (serum:  $1.13 \pm 0.49$  vs  $6.4 \pm 1.8$ ,  $P < 0.01$ ). The ratio of IL-12/IL-4 was lower than that in TNBS+EGb group compared with TNBS group (splenocytes:  $5.2 \pm 2.0$

vs  $21.9 \pm 4.9$ ,  $P < 0.01$ ; colonic mucosa:  $20.9 \pm 7.97$  vs  $65.9 \pm 18$ ,  $P < 0.01$ ; serum:  $1.1 \pm 0.3$  vs  $3.4 \pm 0.8$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** TNBS-induced ulcerative colitis is a Th1 type dominant (IL-12 overproduction) murine model; EGb has protective effects on ulcerative colitis of rat by suppresses of increased IL-12 and IFN- $\gamma$  and maintains the balance of helper T cell 1 with helper T cell 2.

Zhou YH, Yu JP, He XF, Yu XQ. Effects of Ginkgo biloba extract on cytokines in rats with TNBS-induced ulcerative colitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(2):371-375

### 摘要

**目的:** 观察大鼠实验性溃疡性结肠炎脾淋巴细胞, 肠组织和血清中, 细胞因子的表达及达纳康对其的影响, 探讨达纳康对溃疡性结肠炎的保护作用及其机制。

**方法:** 用三硝基苯磺酸(TNBS)建立大鼠溃疡性结肠炎模型。将动物随机分为空白对照组、三硝基苯磺酸、三硝基苯磺酸+生理盐水组、三硝基苯磺酸+达纳康组四组观察肠道大体形态和组织学改变。采用ELISA法测定脾细胞、大肠黏膜及血清中的白介素-12(IL-12)、干扰素 $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )和白介素4(IL-4)。

**结果:** 与三硝基苯磺酸组比较三硝基苯磺酸+达纳康损伤指数明显下降( $2.83 \pm 0.94$  vs  $5.33 \pm 1.50$ ,  $P < 0.01$ ,  $1.92 \pm 0.67$  vs  $4.33 \pm 0.98$ ,  $P < 0.01$ )。IFN- $\gamma$ 浓度明显下降。脾细胞:  $60 \pm 21.5$  vs  $125.6 \pm 14.6$ ,  $P < 0.01$ 。大肠黏膜:  $202.8 \pm 49.6$  vs  $431.8 \pm 57.6$ ,  $P < 0.01$ 。血清:  $8.6 \pm 1.4$  vs  $13.5 \pm 1.7$ ,  $P < 0.01$ 。与模型组比较TNBS组+EGb组IL-4浓度明显升高(脾细胞:  $11.2 \pm 1.3$  vs  $6.05 \pm 1.5$ ,  $P < 0.01$ 。大肠黏膜:  $10.2 \pm 1.9$  vs  $6.9 \pm 1.4$ ,  $P < 0.01$ 。血清:  $7.9 \pm 1.8$  vs  $4.2 \pm 1.1$ ,  $P < 0.01$ )。血清IL-12浓度明显下降( $8.2 \pm 2.2$  vs  $25.8 \pm 4.8$ ,  $P < 0.01$ )。血清IL-12/IL-4比值下降( $1.13 \pm 0.49$  vs  $6.4 \pm 1.8$ ,  $P < 0.01$ )。IFN- $\gamma$ /IL-4比值明显下降(脾细胞:  $5.2 \pm 2.0$  vs  $21.9 \pm 4.9$ ,  $P < 0.01$ , 大肠黏膜:  $20.9 \pm 7.97$  vs  $65.9 \pm 18$ ,  $P < 0.01$ ; 血清:  $1.1 \pm 0.3$  vs  $3.4 \pm 0.8$ ,  $P < 0.01$ )。

**结论:** TNBS诱导的大鼠UC模型是Th1(IL-12)亚型为主的免疫应答反应, EGb通过抑制IL-12, IFN- $\gamma$ 生成, 恢复Th1/Th2细胞因子的平衡, 发挥对溃疡性结肠炎的保护作用。

周燕红, 于皆平, 何小飞, 余细球. 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(2):371-375

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/371.asp>

## 0 引言

炎症性肠病 (IBD)包括溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩病(CD). 是病因和发病机制未确定的慢性非特异性胃肠道炎症性疾病<sup>[1-3]</sup>. 发病机制复杂, 与遗传易感性, 免疫调节紊乱, 环境等多因素有关<sup>[4]</sup>. 越来越多的研究表明免疫因素是其最基本的发病机制<sup>[5]</sup>. 近来对细胞因子的研究对探讨 UC 的病因, 发病机制, 治疗具有重要的现实意义<sup>[6-11]</sup>. 如促炎性细胞因子与抗炎细胞因子间的平衡失调被视为 IBD 的一个重要发病机制<sup>[12-13]</sup>.

达纳康是银杏叶标准化萃取物, 具有消除氧自由基, 增强抗氧化活性, 抑制脂质过氧化, 减轻氧自由基对 ATP 酶的攻击, 解除红细胞聚集作用和拮抗血小板聚集活化因子, 改善微循环等作用<sup>[14]</sup>. 有可能对大鼠 UC 细胞因子有一定影响. 我们用达纳康灌胃来治疗溃疡性结肠炎, 观察其对大鼠 UC 中细胞因子的影响, 探讨达纳康的免疫药理作用.

## 1 材料和方法

1.1 材料 SPF 级健康 ♂ SD 大鼠 48 只(180 ± 20 g). 购于武汉大学医学院动物中心; 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS) (Sigma); EGb 为贵州信邦制药股份有限公司生产. SOD、MDA 试剂盒购于南京建成生物工程公司. 大鼠 IL-4 和 IFN- $\gamma$  检测试剂盒由晶美生物工程有限公司提供, 大鼠 IL-12 检测试剂盒, 购自法国 IMMUNDTECH 公司. 其他试剂为进口或国产分析纯.

1.2 方法 将 48 只动物随机分为空白对照组(Normal group), 三硝基苯磺酸组(TNBS group), 三硝基苯磺酸+生理盐水组(TNBS+NS group)三硝基苯磺酸+达纳康组(TNBS+EGb group) 4 组, 空白对照组 12 只不作任何处理. 实验组大鼠术前禁食 24 h, 自由饮水, 造模时乙醚麻醉大鼠后用一直径 2.0 mm, 长约 12 cm 的硅胶管由肛门轻缓插入深约 8 cm, 三硝基苯磺酸组以含 150 mg/kg TNBS 的 50% 乙醇溶液缓慢推入结肠, 诱导 UC 形成<sup>[15]</sup>. 为确保注入之 TNBS 能够在大肠内弥散分布, 注入后将大鼠尾巴提起, 持续倒置 30 s. 三硝基苯磺酸+生理盐水组 12 只, TNBS 处理同上, 同时以 2 mL/ 只的 0.9% 生理盐水溶液灌胃, 1 次/d. 三硝基苯磺酸+达纳康组 12 只, TNBS 处理同上, 同时给予 EGb, 用生理盐水配成 1.0 g/kg 灌胃, 1 次/d. 三硝基苯磺酸组建立 3 wk 后处死动物, 三硝基苯磺酸+生理盐水组和三硝基苯磺酸+达纳康组 6 wk 后处死动物, 取肛门至盲肠段结肠(约 8 cm)沿肠结膜纵轴剪开, 冷生理盐水冲洗干净, 肉眼进行大体形态评分. 取肠组织一部分以 4.0% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 连续切片, HE 染色镜下评价炎症和溃疡, 结肠组织损伤大体形态和组织学形态评分方法<sup>[16-17]</sup>: 大体形态损伤评分指标包括粘连局部充血, 溃疡形成及炎症, 按有无、轻、重分别计 0、1、2 分, 溃疡或/和炎症大于 2 cm, 病变范围每增加 1 cm, 计分加 1 分. 组织学损伤评分指标包括溃疡炎症肉芽肿, 纤维化按有无及

轻重计为 0、1、2 分, 病变深度(达黏膜下层 1 分、肌层 2 分、浆膜层 3 分), 各项相加得总分.

1.2.1 麻醉大鼠后, 腹腔静脉采血 4 ml 左右, 置无菌试管中, 室温静置自然凝固收缩后, 于 37 °C 水浴中, 孵育 20 min, 以 4 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 保存于 -20 °C 冰箱, 进行 ELISA 检测.

1.2.2 处死大鼠后迅即取出脾脏, 置于 40  $\mu$ m 网目的细胞筛上用试管将脾脏磨碎, 冷 PBS 冲洗, 取 100 目尼龙网过滤, 至 50 ml 离心管中, 3 000 r/min 离心 5 min 后, 用含 10% FBS 的 RPMI1640 营养液, 重复洗涤 3 次, 3 000 r/min 离心, 用含 10% FBS 的 RPMI1640 营养液 6 ml 重悬, 用台盼蓝测细胞活性大于 95%, 调整细胞计数,  $1 \times 10^6$ /ml 的浓度, 于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48 h, 取上清液 -70 °C 冻存待用.

1.2.3 大鼠处死后即取炎症改变最明显处的结肠组织 (1 g 左右)在 2-5 ml 冰冷的 PBS 液中除去血液, 滤纸拭干, 称湿重. 再以 PBS 液清洗 3 次后以含 10% FBS(灭活小牛血清)青链霉素(各 100 u/ml)的 RPMI1640 组织培养液清洗 3 次接种入 48 孔培养板中, 每孔加入 400  $\mu$ l 培养液浸没组织块在 5% CO<sub>2</sub> 37 °C 条件下无菌培养 48 h, 收集上清液分装 4 个 EP 管于 -70 °C 保存待用. 采用 ELISA 试剂盒检测培养上清液中的 IL-4、IFN- $\gamma$  的含量, 按照说明书进行操作, 用酶标仪(BIO-TCK/USA)进行检测.

结果判断: 根据标准品不同浓度 A 值绘制标准曲线, 通过标本的 A 值在标准曲线上查出其浓度, 除以组织湿重, 即为该样品的局部细胞因子水平<sup>[18-19]</sup>

统计学处理 实验数据以 mean $\pm$ SD 表示, 采用单因素方差分析处理, 以 P < 0.01 为有统计学意义.

## 2 结果

2.1 肠组织大体形态组织学损伤评分结果 对照组无腹泻, 黏膜光滑无溃疡, 腺体排列整齐. 各用药组大鼠在灌肠后 24 h 见懒动、厌食, 腹泻, 多为不成形稀便, 可持续 3 wk 以上. 3 wk 后处死动物, 三硝基苯磺酸组和三硝基苯磺酸+生理盐水组, 可见结肠与周围组织粘连伴近端肠腔扩张, 黏膜充血水肿, 溃疡形成, 肠道于病变部位出现狭窄, 光镜下可见溃疡及炎性渗出物, 主要表现为中性粒细胞浸润, 可见数量不等的单个核细胞和嗜酸性粒细胞, 也可见增生的纤维母细胞, 且出现黏膜腺体排列变形. 大体形态评分和组织学评分明显增高(P < 0.01)见表 1、图 1. 三硝基苯磺酸+达纳康组, 可见黏膜充血水肿较轻, 可见正在愈合的溃疡, 结肠结构基本正常, 大体形态评分和组织学损伤评分减低(P < 0.01)见表 1、图 2.

表 1 各组大鼠大体形态组织学损伤评分(mean $\pm$ SD)

分组	大体形态评分	组织学评分
Normal 组	0.58 $\pm$ 0.51	0.67 $\pm$ 0.49
TNBS 组	5.33 $\pm$ 1.50 <sup>b</sup>	4.33 $\pm$ 0.98 <sup>b</sup>
TNBS + NS 组	4.58 $\pm$ 1.16 <sup>b</sup>	3.67 $\pm$ 0.78 <sup>b</sup>
TNBS + EGb 组	2.83 $\pm$ 0.94 <sup>df</sup>	1.92 $\pm$ 0.67 <sup>df</sup>

<sup>b</sup>P < 0.01, vs Normal; <sup>d</sup>P < 0.01, vs TNBS 组; <sup>f</sup>P < 0.01, vs TNBS+NS 组.

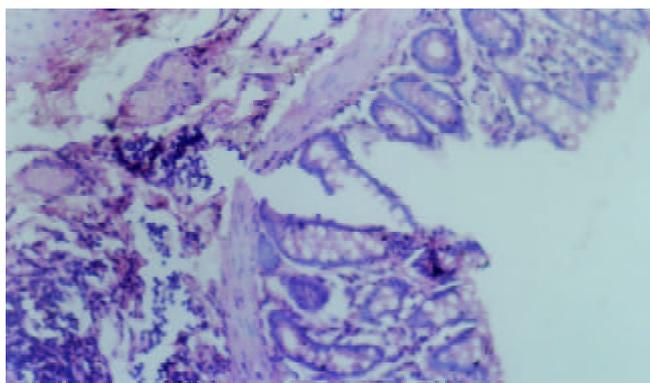


图1 大鼠UC肠组织炎性浸润, 溃疡形成(HE染色200×).

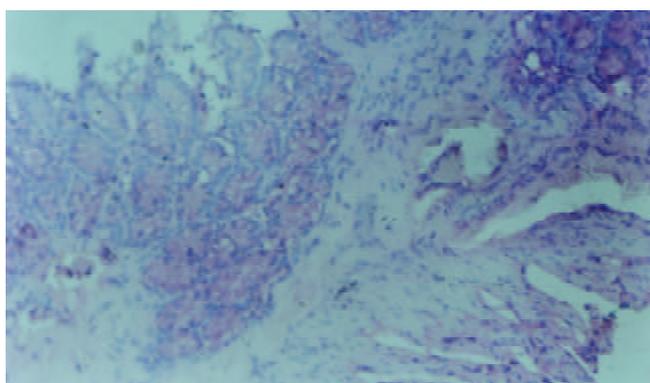


图2 大鼠达纳康组溃疡愈合(HE染色200×).

2.2 IFN- $\gamma$ 浓度 三硝基苯磺酸组和三硝基苯磺酸+生理盐水组较空白对照组, 脾细胞, 血清和大肠黏膜, IFN- $\gamma$ 浓度显著升高( $P < 0.01$ , 表2). 而三硝基苯磺酸+达纳康组较三硝基苯磺酸组与三硝基苯磺酸+生理盐水组血清、脾细胞、大肠黏膜生成IFN- $\gamma$ 量明显下降( $P < 0.01$ , 表2). 三硝基苯磺酸组与三硝基苯磺酸+生理盐水组中脾细胞, 大肠黏膜, 血清IFN- $\gamma$ 浓度无明显改变.

表2 大鼠IFN- $\gamma$ 浓度(pg/ml)的比较(mean $\pm$ SD)

	脾淋巴细胞	血清	大肠黏膜
Normal	78.7 $\pm$ 9	6.08 $\pm$ 1.9	195.2 $\pm$ 46.5
TNBS	125.6 $\pm$ 14.6 <sup>b</sup>	13.5 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	431.8 $\pm$ 57.6 <sup>b</sup>
TNBS+NS	107.8 $\pm$ 15.9 <sup>b</sup>	10.9 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	385.2 $\pm$ 58.4 <sup>b</sup>
TNBS+EGb	60 $\pm$ 21.5 <sup>df</sup>	8.6 $\pm$ 1.4 <sup>df</sup>	202.8 $\pm$ 49.6 <sup>df</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs Normal; <sup>d</sup> $P < 0.01$ , vs TNBS组; <sup>f</sup> $P < 0.01$ , vs TNBS+NS组.

2.3 IL-4浓度 三硝基苯磺酸组和三硝基苯磺酸+生理盐水组较空白对照组, 脾细胞, 血清和大肠黏膜中较空白对照组脾细胞, 血清和大肠黏膜中IL-4生成呈明显下降( $P < 0.01$ , 表3). 而三硝基苯磺酸+达纳康组较三硝基苯磺酸组和三硝基苯磺酸+生理盐水组中脾细胞, 血清和大肠黏膜中IL-4生成呈明显升高( $P < 0.01$ , 表3). 三硝基苯磺酸组和三硝基苯磺酸+生理盐水组中脾细

胞、大肠黏膜、血清生成IL-4无明显改变.

表3 大鼠IL-4浓度(pg/ml)的比较(mean $\pm$ SD)

	脾淋巴细胞	血清	大肠黏膜
Normal	14.3 $\pm$ 1.6	8.0 $\pm$ 1.3	12.6 $\pm$ 1.0
TNBS	6.0 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	4.2 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	6.9 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>
TNBS+NS	6.8 $\pm$ 1.54 <sup>b</sup>	5.8 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	8.0 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>
TNBS+EGb	11.2 $\pm$ 1.3 <sup>df</sup>	7.9 $\pm$ 1.8 <sup>df</sup>	10.2 $\pm$ 1.9 <sup>df</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs Normal; <sup>d</sup> $P < 0.01$ , vs TNBS组; <sup>f</sup> $P < 0.01$ , vs TNBS+NS组.

2.4 血清中IL-12的浓度及血清IL-12/IL-4比值 三硝基苯磺酸组和三硝基苯磺酸+生理盐水组较空白对照组中血清中IL-12浓度及IL-12/IL-4比值增高( $P < 0.01$ , 表4)而三硝基苯磺酸+达纳康组较三硝基苯磺酸组与三硝基苯磺酸+生理盐水组血清中IL-12浓度及IL-12/IL-4比值明显下降( $P < 0.01$ , 表4). 三硝基苯磺酸组与三硝基苯磺酸+生理盐水组血清中IL-12浓度及IL-12/IL-4比值无明显改变.

表4 大鼠血清白介素-12浓度(mean $\pm$ SD)及IL-12/IL-4比值(mean $\pm$ SD)

分组	血清IL-12	IL-12/IL-4
Normal	4.6 $\pm$ 0.8	0.6 $\pm$ 0.1
TNBS	25.8 $\pm$ 4.8 <sup>b</sup>	6.4 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>
TNBS+NS	22.9 $\pm$ 4.1 <sup>b</sup>	3.97 $\pm$ 0.77 <sup>b</sup>
TNBS+EGb	8.2 $\pm$ 2.2 <sup>df</sup>	1.13 $\pm$ 0.49 <sup>df</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs Normal; <sup>d</sup> $P < 0.01$ , vs TNBS组; <sup>f</sup> $P < 0.01$ , vs TNBS+NS组.

2.5 IFN- $\gamma$ /IL-4比值 三硝基苯磺酸组和三硝基苯磺酸+生理盐水组较空白对照组, 脾细胞, 血清和大肠黏膜中较空白对照组脾细胞, 血清和大肠黏膜中IFN- $\gamma$ /IL-4比值明显升高( $P < 0.01$ , 表5). 而三硝基苯磺酸+达纳康组较三硝基苯磺酸组和三硝基苯磺酸+生理盐水组中脾细胞, 血清和大肠黏膜中IFN- $\gamma$ /IL-4比值明显下降( $P < 0.01$ , 表5). 三硝基苯磺酸组和三硝基苯磺酸+生理盐水组无明显改变.

表5 IFN- $\gamma$ /IL-4比值(mean $\pm$ SD)

	脾淋巴细胞	大肠黏膜	血清
Normal	5.6 $\pm$ 0.8	15.6 $\pm$ 3.9	0.76 $\pm$ 0.2
TNBS	21.9 $\pm$ 4.9 <sup>b</sup>	65.9 $\pm$ 18 <sup>b</sup>	3.4 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>
TNBS+NS	16.6 $\pm$ 4.9 <sup>b</sup>	49.2 $\pm$ 10.6 <sup>b</sup>	1.9 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
TNBS+EGb	5.5 $\pm$ 2.0 <sup>df</sup>	20.9 $\pm$ 7.97 <sup>df</sup>	1.1 $\pm$ 0.3 <sup>df</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs Normal; <sup>d</sup> $P < 0.01$ , vs TNBS组; <sup>f</sup> $P < 0.01$ , vs TNBS+NS组.

### 3 讨论

达纳康(EGb)具有很强的抗氧化自由基, 增强抗氧化酶, 活性的作用. 对心、脑、肾、血管缺血性损伤有明显的防护作用. 可增强中枢神经系统功能. 可拮抗血小板活性因子(PAF)(platelet activating factor)达到保肝效果<sup>[20-23]</sup>. 但有关 EGb 对炎症性肠病疗效的报道较少.

炎症性肠病的病因和发病机制尚不明确. 随着分子生物学技术以及基础研究的不断进展, 对于T细胞各种细胞因子的作用, 特别是促炎因子与抗炎细胞因子的研究大大推动了 IBD 的发病机制的研究和机应治疗的进展<sup>[24-25]</sup>. Th1/Th2的细胞因子水平已为解释一些自身免疫性疾病提供了很好的模型. 辅助性T细胞根据CD<sub>4</sub><sup>+</sup>细胞分泌的两类不同细胞因子, 分为Th1和Th2细胞, Th1细胞主要分泌 IL-2、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$  等, 而 Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-6、IL-10 等, Th1/Th2 细胞具有相互拮抗作用, 通过阻止另一类细胞的产生成效应功能的实现来影响 Th1/Th2 细胞间的平衡, IL-12 可通过 NK 细胞诱导 IFN- $\gamma$  的复制, 可刺激原初 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T 细胞分化为 Th1 亚群, 相应的 IL-12 和 IFN- $\gamma$  的产生可控制 Th1 及 Th2 优势的 T 细胞的发展. 这样有助于 Th1 分化优势及对 IL-4 和 IL-10 的控制并提高 Th2 的分化. IFN- $\gamma$  能促进 Th2 细胞分化为 Th1 细胞, 影响 Th1/Th2 比率, 而 IL-4 能促进 Th0 细胞分化为 Th1 细胞, 并抑制 Th1 细胞, 分泌其系列因子, 促进体液免疫应答. Th1 细胞主要介导与细胞和局部炎症有关的免疫应答, 参与细胞免疫而 Th2 细胞的主要功能为刺激及细胞增生并产生抗体与体液免疫有关. 机体要处于良好的免疫状态, 应保持 Th1/Th 平衡, 才能使机体不处于免疫抑制状态. 研究表明 Th1/Th2 细胞因子在 IBD 的发病中有重要的作用, 如何调理 Th 细胞的分化, 对临床疾病的治疗有重大意义<sup>[26-32]</sup>.

炎症性肠病(IBD)是一类主要累及结、直肠的自身免疫性疾病, TNBS 诱导的大鼠结肠炎组织学改变的许多特点与人类 IBD 相似, TNBS 诱发结肠炎的确切机制尚未阐明, 可能为 TNBS 与结肠炎上皮细胞的赖氨酸共价结合, 从而改变表面蛋白质, 形成自身抗原, 导致一系列免疫反应所致. TNBS 诱导的结肠炎以 IL-12 驱动的 Th1 反应为主. 以 IFN- $\gamma$  升高为标志<sup>[33-34]</sup>. 抗 IL-12 治疗可改善其炎症<sup>[35]</sup>. 表现为全结肠全层性炎症和溃疡偶见肉芽肿, 炎症持续时间长, 便于观察药物疗效等. TNBS 模型广泛用于筛选有治疗 IBD 潜力的疗法及研究其作用机制. 该模型持续时间较长, 体现急性炎症向慢性转化的动态过程并伴以溃疡形成, 该模型 TNBS 价格有限, 实验花费不大, 简单易行, 易于复制, 是一种较为理想的结肠炎动物模型. 故本实验采用三硝基苯磺酸灌肠建立大鼠溃疡性结肠炎模型, 探讨达纳康对溃疡性结肠炎的保护作用.

我们应用达纳康治疗部分溃疡性结肠炎, 取得较好的临床疗效. 本实验通过在建立大鼠 UC 模型的用达

纳康灌胃治疗后, 结果 TNBS+EGb 组大鼠肠黏膜组织大体形态和组织学评分明显低于单纯 TNBS 组和 TNBS+NS 组. 本研究结果表明, TNBS 诱导的实验性大鼠结肠炎模型的血清病变局部的大肠黏膜, 以及脾细胞产生的 IFN- $\gamma$  升高, IL-12 升高, 提示 Th1 细胞功能加强, 而 IL-4 降低, 提示 Th2 细胞功能下降, IFN- $\gamma$ /IL-4 比值升高, IL-12/IL-4 比值升高, 机体 Th1/Th2 细胞平衡紊乱, 提示 TNBS 诱导的实验性大鼠结肠炎模型, 是以 Th1 亚型为主的免疫应答反应<sup>[36]</sup>. Th1/Th2 平衡遭受破坏是 UC 的发病机制之一.

本研究表明达纳康既可抑制 IL-12、IFN- $\gamma$  (Th1) 生成, 又可提高 IL-4 生成, 由此可以推测, 达纳康治疗 UC 的机制可能与其抑制 IL-12, IFN- $\gamma$  (Th1) 生成, 恢复 Th1/Th2 的细胞因子的平衡有关. 达纳康作为抗 UC 的药物具有良好的临床应用前景.

### 4 参考文献

- 1 Gui HF, Jiang XL. Treatment of corticosteroid-resistant ulcerative colitis with oral low molecular weight heprin. *World J Gastroenterol* 1999;5:448-450
- 2 何青雯, 陈耀明, 贾友兰, 李晓燕, 蒋海燕. 免疫复合物对溃疡性结肠炎的致病作用. *华人消化杂志* 1998;6:87
- 3 Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:158-161
- 4 Lehmann FS. Pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Ther Umsch* 2003;60:127-132
- 5 Sartor RB. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical consideration. *Gastroenterology* 1994;106:533-539
- 6 Stevceva L. Cytokines and their antagonists as therapeutic agents. *Curr Med Chem* 2002;9:2201-2207
- 7 Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003;3:521-533
- 8 Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998;22:382-389
- 9 Ogata H, Hibi T. Cytokine and anti-cytokine therapies for inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* 2003;9:1107-1113
- 10 Ardizzone S, Porro GB. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med* 2002;252:475-496
- 11 Wu HG, Zhou LB, Pan YY, Huang C, Chen HP, Shi Z, Hua XG. Study of the mechanisms of acupuncture and moxibustion treatment for ulcerative colitis rats in view of the gene expression of cytokines. *World J Gastroenterol* 1999;5:515-517
- 12 陈刚, 韩英, 宋迎新, 村田有志, 伊东重豪, 栋方昭博. 雷公藤多甙对尼古丁预处理的小鼠结肠炎模型脾淋巴细胞因子的影响机制. *世界华人消化杂志* 2002;10:418-421
- 13 李军华, 于皆平, 何小飞, 徐细明. 核因子- $\kappa$ B 在大鼠实验性溃疡性结肠炎组织的表达及其意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:214-218
- 14 刘诗权, 于皆平, 罗和生, 冉宗学. 银杏叶萃取物对大鼠纤维化肝脏 NF- $\kappa$ B 的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:922-926
- 15 Zheng L, Gao ZQ, Wang SX. A chronic ulcerative colitis model in rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:150-152
- 16 Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium(DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998;114:385-391
- 17 Zhu F, Qian J, Pan G. The establishment of TNBS-induced experimental colitis. *Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao* 1998;20:271-278
- 18 Crabtree JE, Shallcross TM, Heatley RV, Wyatt JJ. Mucosal tumour necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-6 in patients with

- 19 *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Gut* 1991;32:1473-1477  
付峻林, 郑天荣, 潘秀珍, 彭孝纬, 毛雪华. 大肠肿瘤 p53 蛋白过表达  
对原位 Th1/Th2 平衡的影响. *中国癌症杂志* 2001;11:493-499
- 20 Bridi R, Crossetti FP, Steffen VM, Henriques AT. The antioxidant activity of standardized extract of Ginkgo biloba (EGb 761) in rats. *Phytother Res* 2001;15:449-451
- 21 Shen J, Wang J, Zhao B, Hou J, Gao T, Xin W. Effects of EGb 761 on nitric oxide and oxygen free radicals, myocardial damage and arrhythmia in ischemia-reperfusion injury in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1998;1406:228-236
- 22 Lee EJ, Chen HY, Wu TS, Chen TY, Ayoub IA, Maynard KI. Acute administration of Ginkgo biloba extract (EGb 761) affords neuroprotection against permanent and transient focal cerebral ischemia in: Sprague-Dawley Rats. *J Neurosci Res* 2002;68:636-645
- 23 Itil TM, Eralp E, Tsambis E, Itil KZ, Stein U. Central nervous system effects of ginkgo biloba, a plant extract. *Am J Ther* 1996;3:63-73
- 24 Monteleone G, MacDonald TT. Manipulation of cytokines in the management of patients with inflammatory bowel disease. *Ann Med* 2000;32:552-560
- 25 Anand AC, Adya CM. Cytokines and inflammatory bowel disease. *Trop Gastroenterol* 1999;20:97-106
- 26 Dohi T, Fujihashi K, Kiyono H, Elson CO, McGhee JR. Mice deficient in Th1- and Th2-type cytokines develop distinct forms of hapten-induced colitis. *Gastroenterology* 2000;119:724-733
- 27 Romagnani S. Th1/Th2 Cells. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:285-294
- 28 Blumberg RS, Saubermann LJ, Strober W. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr Opin Immunol* 1999;11:648-656
- 29 Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Beccchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F, Romagnani S. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 1997;150:823-832
- 30 Klein W, Tromm A, Griga T, Fricke H, Folwaczny C, Hocke M, Eitner K, Marx M, Duerig N, Epplen JT. Interleukin-4 and interleukin-4 receptor gene polymorphisms in inflammatory bowel diseases. *Genes Immun* 2001;2:287-289
- 31 Fort M, Lesley R, Davidson N, Menon S, Brombacher F, Leach M, Rennick D. IL-4 exacerbates disease in a Th1 cell transfer model of colitis. *J Immunol* 2001;166:2793-2800
- 32 Camoglio L, Te Velde AA, Tigges AJ, Das PK, Van Deventer SJ. Altered expression of interferon-gamma and interleukin-4 in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 1998;4:285-290
- 33 Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W. Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 Colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* 1998;188:1929-1939
- 34 Tozawa K, Hanai H, Sugimoto K, Baba S, Sugimura H, Aoshi T, Uchijima M, Nagata T, Koide Y. Evidence for the critical role of interleukin-12 but not interferon-gamma in the pathogenesis of experimental colitis in mice. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:578-587
- 35 Schmidt C, Marth T, Wittig BM, Hombach A, Abken H, Stallmach A. Interleukin-12 antagonists as new therapeutic agents in inflammatory bowel disease. *Pathobiology* 2002;70:177-183
- 36 Spencer DM, Veldman GM, Banerjee S, Willis J, Levine AD. Distinct inflammatory mechanisms mediate early versus late colitis in mice. *Gastroenterology* 2002;122:94-105

## 《肝纤维化的基础与临床》出版

《肝纤维化的基础与临床》一书为著名消化系病、肝病学家姚希贤和徐克成两位教授及其同道根据中医基础理论和丰富的临床经验, 运用中医药和中西医结合治疗肝纤维化的经验和研究成果, 参考有关文献编辑而成。

本书对肝纤维化的病因、发病机制、中医对该病的辨证论治、中西医结合经验以及肝纤维化的实验研究和有效治疗方法作了详细介绍。既有肝纤维化新近研究进展、新颖学术观点; 也有针对治疗难点创造性运用中西医结合治疗肝纤维化的临床治疗经验, 反映了我国对肝纤维化的一些研究成果。全书共分三部分, 20 万字, 插图与照片 80 幅, 本书对从事肝病研究的科技工作者和临床医师具有重要参考价值。该书已于 2002 年 7 月由上海科技教育出版社出版, 新华书店发行。

# 恶性腹水基质金属蛋白酶活性分析

孙晓敏, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平

孙晓敏, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平, 武汉大学人民医院消化内科湖北省武汉市 430060  
孙晓敏, 女, 1971 年生, 河南省洛阳市人, 汉族. 武汉大学人民医院硕士研究生, 主治医师. 主要从事消化道肿瘤的研究.  
湖北省自然科学基金资助项目, No. 99J163  
项目负责人: 董卫国, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科. dongwg@public.wh.hb.cn  
电话: 027-88041911 传真: 027-88042292  
收稿日期: 2003-05-14 接受日期: 2003-06-02

## Matrix metalloproteinase activity in malignant ascites

Xiao-Min Sun, Wei-Guo Dong, Bao-Ping Yu, He-Sheng Luo, Jie-Ping Yu

Xiao-Min Sun, Wei-Guo Dong, Bao-Ping Yu, He-Sheng Luo, Jie-Ping Yu, Department of Gastroenterology, Wuhan University Renmin Hospital, Wuhan 430060, Hubei Province, China  
Supported by Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 99J163  
Correspondence to: Dr. Wei-Guo Dong, Department of Gastroenterology, Wuhan University Renmin Hospital, Wuhan 430060, Hubei Province China. dongwg@public.wh.hb.cn  
Received: 2003-05-14 Accepted: 2003-06-02

### Abstract

AIM: To explore the relationship between matrix metalloproteinase and malignant ascites.

METHODS: A total of 67 patients, 38 male and 29 female, including cirrhotic ascites (36 cases), tuberculous ascites (8 cases) and malignant ascites (23 cases) were collected and studied in the following experiment. The matrix metalloproteinase activity was detected by gelatin zymography.

RESULTS: The activity of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase -9 could not be detected in ascites of hepatic cirrhosis and tuberculous peritonitis but could be detected in 87.0% and 78.3% of malignant ascites ( $n=23$ ) respectively. Furthermore, the activity of MMP-2 was higher than that of MMP-9 ( $0.01 < P = 0.022 < 0.05$ ).

CONCLUSION: The detection of matrix metalloproteinase activity is useful in differential diagnosis between benign and malignant ascites. Matrix metalloproteinase may be related to the formation of malignant ascites.

Sun XM, Dong WG, Yu BP, Luo HS, Yu JP. Matrix metalloproteinase activity in malignant ascites. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):376-378

### 摘要

目的: 初步探讨基质金属蛋白酶与恶性腹水的关系。

方法: 收集腹水患者 67 例, 男 38 例, 女 29 例. 肝硬化腹水 36 例, 结核性腹水 8 例, 恶性腹水 23 例. 用明胶酶谱

法测定基质金属蛋白酶活性。

结果: 肝硬化腹水、结核性腹水不能检出基质金属蛋白酶-2, -9(MMP-2, -9)活性, 而恶性腹水 MMP-2 检出率为 87.0%, MMP-9 检出率为 78.3%, 且 MMP-2 活性高于 MMP-9 活性( $0.01 < P = 0.022 < 0.05$ ).

结论: 基质金属蛋白酶活性检测对于良、恶性腹水的鉴别诊断有重要价值, 他可能与恶性腹水形成有关。

孙晓敏, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平. 恶性腹水基质金属蛋白酶活性分析. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):376-378

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/376.asp>

### 0 引言

腹水是一种常见的临床表现, 可由多种疾病引起. 不同疾病引起的腹水, 其治疗和预后迥然不同, 故良、恶性腹水的鉴别诊断一直是学者们关注的主要课题. 腹水中找到肿瘤细胞乃是确诊恶性腹水的一种迅速、可靠、经济的方法, 但由于其受经验、技术条件及细胞数量的限制, 对相当数量恶性腹水难以做出定性诊断. 近年来, 越来越多的研究表明, 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP), 尤其是基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 和基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 与多种肿瘤生长、浸润、转移密切相关<sup>[1-5]</sup>. 我们通过明胶酶谱法测定各种类型腹水中 MMP 活性, 旨在探讨其与恶性腹水的关系, 以期为临床腹水鉴别诊断及恶性腹水的治疗提供重要参考。

### 1 材料和方法

1.1 材料 2002-07/2003-3 武汉大学人民医院、中南医院、湖北省肿瘤医院住院腹水患者 67 例, 男 38 例, 平均年龄 51 岁; 女 29 例, 平均年龄 49 岁. 肝硬化腹水 36 例, 结核性腹水 8 例, 恶性腹水 23 例(卵巢癌 8 例, 胃癌 6 例, 结肠癌 5 例, 肝癌 2 例, 胰腺癌 1 例, 原发性腹膜癌 1 例). 以上病例均经细胞学检查、病理活检、B 超及 CT 等确诊. 普通试剂由武汉大学医学院生化教研室提供. MMP 标准品 IV 型胶原酶为 Invitrogen 公司产品. MMP 特异性抑制剂邻菲罗林(1, 10-Phenanthroline)购于上海生物工程技术有限公司. 主要仪器: BIO-RAD 垂直电泳槽, 国产(上海)恒温孵育箱.

1.2 方法 常规腹腔穿刺抽取腹水 10 mL, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 按每次用量分装后立即置 -70°C 冰箱冻存待测, 同时测蛋白浓度. 明胶酶谱法测定

MMP 活性<sup>[6]</sup>: 将标本自 -70 °C 冰箱取出后置室温下解冻, 按每泳道 70 μg 蛋白量处理标本(NS 稀释). 取处理后的标本 40 μL 加蛋白处理液(100 mmol/L Tris-HCL pH 25 g/L SDS, 400 g/L 蔗糖, 0.5 g/L 溴酚兰)20 μL, 置 37 °C 恒温水浴箱孵育 40 min. 制备 80g/L 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)为分离胶(含 1 g/L 明胶), 上覆 50 g/L 浓缩胶, 取孵育后的标本 20 μL 上样, 20 mA 恒流电泳, 溴酚兰刚好逸出时停止电泳. 电泳结束后, 将凝胶依次置于洗脱液(25 g/L TritonX-100, 50 mmol/L Tris-HCL, 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 μmol/L ZnCl<sub>2</sub>, pH 8.3)中振荡洗脱 2 次, 45 min/ 次; 漂洗液(不含 TritonX-100 的洗脱液)中振荡漂洗 2 次, 20 min/ 次, 以上操作均在 4 °C 进行. 接着, 将凝胶置于孵育液(0.1 mol/L glycine, 50 mmol/L Tris-HCL, 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 μmol/L ZnCl<sub>2</sub>, 0.5 mol/L NaCl, pH 8.3) 37 °C 恒温低速振荡孵育 60 h. 然后经染色液(750 mg/L 考马斯亮兰, 300 mL/L 甲醇, 100 mL/L 乙酸)染色 3 h, 用脱色液 A, B, C (浓度分别为甲醇 300、200、100 mL/L, 乙酸 100、100、50 mL/L)分别脱色 30 min, 1 h, 2 h, 直至显示 MMP 的蓝色背景上的负染带透亮清晰. 为证实所检出的负染带为具有活性的 MMP, 采用邻菲罗林(1, 10-phenanthroline)抑制试验<sup>[7]</sup>. 取各组标本, 加 2.5 mmol/L 1, 10-phenanthroline 观察结果, 以鉴定 MMP 的存在.

乳酸脱氢酶、腹水细胞学检查、血清综合指标 (AFP, CEA, CA 系列)由本院检验科及病理科检测.

统计学处理 用 $\chi^2$ 检验及确切概率法进行统计学分析.

## 2 结果

同一份阳性标本加入 1, 10-phenanthroline 后, 电泳结果为阴性, 说明本实验所检测到的均为 MMP (图 1, 2). 用任意等级积分法对恶性腹水 MMP 活性进行半定量分析. 等级积分 ±: 条带弱但可检测到, 宽度小于 1.0 mm; 1+: 条带清晰可见, 宽度 1.0-1.5 mm; 2+: 条带清晰且亮, 宽度 1.5-3.0 mm. 肝硬化腹水、结核性腹水均未检出 MMP-2、MMP-9 (表 1, 图 1A). 恶性腹水 MMP-2 检出率为 87.0%, 活性积分为 1+ 以上占 80.0%; MMP-9 检出率为 78.3%, 活性积分为 1+ 以上占 44.4%; MMP-2 活性高于 MMP-9 活性(0.01<P=0.022<0.05); MMP-2 和 MMP-9 活性积分为 2+ 各有 3 例, 均为原发性腹膜癌 1 例, 卵巢癌 2 例(表 1, 图 2A). 电泳结果还发现, 在 36 例肝硬化腹水中有 6 例检出 M<sub>r</sub><72 000 的 MMP, 而在 23 例恶性腹水中则检测出 7 例, 而且在有 MMP-2 表达的腹水中, 若同时有 M<sub>r</sub><72 000 的 MMP 表达时, 则该例腹水 MMP-2 活性明显增强(表 1, 图 2A). 在 23 例恶性腹水中, MMP-2 阳性 20 例, 阳性率为 87.0%, 显著高于腹水常规检查(乳酸脱氢酶、腹水细胞学、血清综合指标)(P<0.01); MMP-9 阳性 18 例, 阳性率为

78.3%, 高于乳酸脱氢酶、腹水细胞学检查(P<0.05), 但与血清综合指标相比, 差异无显著性(P>0.05)(表 2).

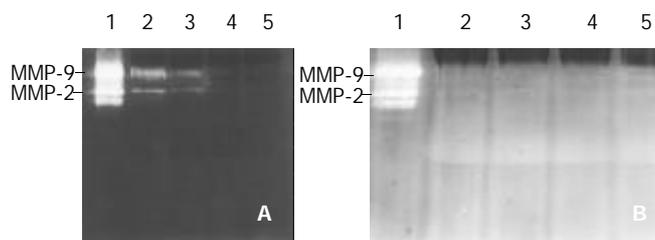


图 1 腹水 MMP 活性定性 SDS-PAGE 电泳图. A: 1: Marker; 2, 3: 恶性腹水; 4: 肝硬化腹水; 5: 结核性腹水. B: 加入 MMP 抑制剂后, 阳性标本电泳结果为阴性.

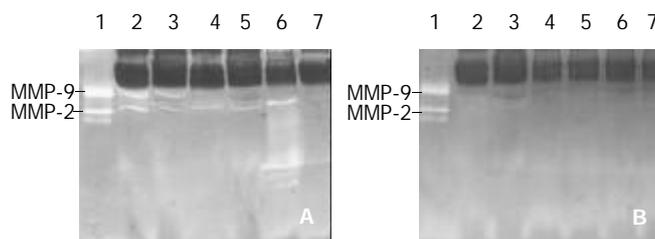


图 2 恶性腹水 MMP 活性定性 SDS-PAGE 电泳图. A: 1: Marker; 2-7: 恶性腹水(2, 3 可见 92 000、72 000 二条透亮带; 4, 5 仅见 72 000 一条透亮带; 6 除见 72 000 一条透亮带外, 尚可见<72 000 的一条透亮带; 7 仅见一条<72 000 的透亮带). B: 加入 MMP 抑制剂后, 电泳结果为阴性.

表 1 不同类型腹水 MMP 活性检测结果

组别	n	MMP-2 活性			MMP-9 活性			M <sub>r</sub> <72 000
		±	1+	2+	±	1+	2+	
肝硬化腹水	36	0	0	0	0	0	0	6
结核性腹水	8	0	0	0	0	0	0	0
恶性腹水	23	4	13	3	10	5	3	7
胃癌	6	1	4	0	3	2	0	2
结肠癌	5	1	2	0	4	1	0	2
肝癌	2	1	1	0	0	1	0	1
胰腺癌	1	0	1	0	0	0	0	0
卵巢癌	8	1	5	2	3	1	2	2
原发性腹膜癌	1	0	0	1	0	0	1	0

表 2 MMP-2, MMP-9 与其他检测指标对恶性腹水的检出比较

	MMP-2	MMP-9	LDH 腹水/LDH 血清 (>1 为阳性)	腹水细胞学	血清综合指标 (AFP, CEA, CA)
阳性(n)	20	18	10	11	13
阳性率	87.0%	78.3%	43.4%	47.8%	56.5%

## 3 讨论

肿瘤细胞在侵袭转移过程中必须破坏由细胞间基质和基底膜组成的细胞外基质(extracellular maxtrix, ECM). 在参与破坏 ECM 的酶类中 MMP 是主要的直接作用者, 而其中 MMP-2(M<sub>r</sub>, 72 000)和 MMP-9(M<sub>r</sub>, 92 000), 又称 IV 型胶原酶或明胶酶 A 和明胶酶 B, 与肿瘤侵袭转移的关系最为密切. 因为, IV 型胶原酶不但可以酶

解细胞间基质成分,还能酶解基底膜主要成分IV型胶原.许多肿瘤组织、转移灶及肿瘤转移患者血清中IV型胶原酶表达明显增强<sup>[8-12]</sup>.然而,IV型胶原酶与恶性腹水的关系,目前国内外研究的还较少<sup>[13-14]</sup>.近期,有研究发现转移性乳腺癌患者尿液中<sup>[15-16]</sup>、脑肿瘤患者脑脊液中<sup>[17]</sup>MMP活性增高.但是,少见腹水中MMP活性检测的报道.

恶性腹水是恶性肿瘤腹膜侵袭和转移的结果,鉴于MMP与肿瘤浸润、转移的关联性,可推测恶性腹水中有望检测到MMP.本结果显示,肝硬化腹水、结核性腹水均未检测到MMP-2和MMP-9;恶性腹水MMP-2检出率为87.0%,显著高于腹水常规检查( $P < 0.01$ );MMP-9检出率为78.3%,高于乳酸脱氢酶、腹水细胞学检查( $P < 0.05$ ),这表明IV型胶原酶可作为良、恶性腹水的鉴别诊断指标.同时我们发现,恶性腹水MMP-2活性高于MMP-9活性( $P < 0.01$ ),这可能与不同组织来源恶性肿瘤MMP-2和MMP-9表达上的差异有关.另外,在我们的实验研究中4例原因不明腹水2例经腹膜活检确诊,1例为卵巢癌腹腔转移,1例为原发性腹膜癌,而这2例MMP-2、MMP-9活性检测均阳性,且活性积分均在1+以上;另2例通过胃镜及结肠镜分别确诊为胃癌和结肠癌腹腔转移,其MMP-2、MMP-9活性检测也均阳性,但活性较弱.以上实验结果提示腹水MMP-2、MMP-9活性在很大程度上反映肿瘤生物学行为,他的检测对于良、恶性腹水的定性诊断有重要价值,并有助于判断导致恶性腹水的肿瘤组织来源.

我们还发现,36例肝硬化腹水中6例检出 $M_r < 72\ 000$ 的MMP,而在23例恶性腹水中则检测出7例.而且,在有MMP-2表达的腹水中,若同时有 $M_r < 72\ 000$ 的MMP表达时,则该MMP-2活性明显增强.不排除该MMP为I型膜型MMP的可能性.有资料表明I型膜型MMP不仅本身具有降解ECM能力,而且能结合并激活MMP-2<sup>[18-19]</sup>,该实验结果支持“MT1-MMP结合并激活MMP-2”的观点.但其在不同性质腹水中表达的作用有待深入研究.

国外文献报道MMP-2在卵巢癌细胞腹膜内入侵中起明显作用<sup>[13]</sup>.另有研究发现基质金属蛋白酶抑制剂可消退恶性胸腹水<sup>[20-22]</sup>.我们发现肝硬化腹水、结核性腹水均不表达MMP-2和MMP-9;相反,大部分恶性腹水有MMP-2、MMP-9较高水平的表达,这些可推测MMP尤其是MMP-2、MMP-9与恶性腹水形成密切相关,从而为MMP抑制剂在恶性腹水中的应用提供了临床依据.

#### 4 参考文献

- 1 Waas ET, Lomme RM, DeGroot J, Wobbes T, Hendriks T. Tissue levels of active matrix metalloproteinase-2 and -9 in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002;86:1876-1883
- 2 Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and

- 3 metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;43(Suppl):S42-51
- 4 Ji F, Wang WL, Yang ZL, Li YM, Huang HD, Chen WD. Study on the expression of matrix metalloproteinase-2 mRNA in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 1999;5:455-457
- 5 蒋泽生,高毅.基质金属蛋白酶的生物学特性及其在肝癌浸润转移中的作用. *世界华人消化杂志* 2000;8:1403-1404
- 6 Ellenrieder V, Alber B, Lacher U, Hendler SF, Menke A, Boeck W, Wagner M, Wilda M, Friess H, Buchler M, Adler G, Gress TM. Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. *In J Cancer* 2000;85:14-20
- 7 Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994;218:325-329
- 8 Young TN, Rodriguze GC, Rinehart AR, Bast RC Jr, Pizzo SV, Stack MS. Characterization of gelatinases linked to extracellular matrix invasion in ovarian adenocarcinoma: purification of matrix metalloproteinase 2. *Gynecol Oncol* 1996;62: 89-99
- 9 Wang ZN, Xu HM. Relationship between collagen IV expression and biological behavior of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2000;6:438-439
- 10 郝远瑞,赵跃武,孔令非,银平章.人肝细胞癌组织中MMP-2酶活性的变化. *世界华人消化杂志* 2000;8:952-953
- 11 Ylisirnio S, Hoyhtya M, Turpeenniemi-Hujanen T. Serum matrix metalloproteinase -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2 in lung cancer-TIMP-1 as a prognostic marker. *Anticancer Res* 2000;20:1311-1316
- 12 Gohji K, Fujimoto N, Hara I, Fujii A, Gotoh A, Okada H, Arakawa S, Kitazawa S, Miyake H, Kamidono S, Nakajima M. Serum matrix metalloproteinase-2 and its density in men with prostate cancer as a new predictor of disease extension. *Int J Cancer* 1998;78:392-393
- 13 Torii A, Kodera Y, Uesaka K, Hirai T, Yasui K, Morimoto T, Yamamura Y, Kato T, Hayakawa T, Fujimoto N, Kito T. Plasma concentration of matrix metalloproteinase 9 in gastric cancer. *Br J Surg* 1997;84:133-136
- 14 Fishman DA, Bafetti LM, Banionis S, Kearns AS, Chilukuri K, Stack MS. Production of extracellular matrix-degrading proteinases by primary cultures of human epithelial ovarian carcinoma cells. *Cancer* 1997;80:1457-1463
- 15 Aslam N, Marino CR. Malignant ascites: new concepts in pathophysiology, diagnosis, and management. *Arch Intern Med* 2001;161:2733-2737
- 16 Moses MA, Wiederschain D, Loughlin KR, Zurakowski D, Lamb CC, Freeman MR. Increased incidence of matrix metalloproteinases in urine of cancer patient. *Cancer Res* 1998; 58:1395-1399
- 17 张群,陈龙邦,藏静,褚晓源.用酶谱电泳技术检测乳腺癌患者尿液基质金属蛋白酶. *南京大学学报* 2002;38:192-195
- 18 高芸,李新娜,李少一,宗志宏,王学荣,于秉治.肿瘤患者脑脊液中基质金属蛋白酶活性表达的研究. *中国医科大学学报* 2000; 29:10-12
- 19 Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Bio Chem* 1997;272:2446-2451
- 20 Kinoshita T, Sato H, Takino T, Itoh M, Akizawa T, Seiki M. Processing of a precursor of 72-kilodalton type IV collagenase/gelatinase A by a recombinant membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 1996;36:2535-2538
- 21 Beattie GJ, Smyth JF. Phase I study of intraperitoneal metalloproteinase inhibitor BB94 in patients with malignant ascites. *Clin Cancer Res* 1998;4:1899-1902
- 22 Parsons SL, Watson SA, Steele RJ. Phase I/II trial of batimastat, a matrix metalloproteinase inhibitor, in patients with malignant ascites. *Eur J Surg Oncol* 1997;23:526-531
- 23 Macaulay VM, O'Byrne KJ, Saunders MP, Braybrooke JP, Long L, Gleeson F, Mason CS, Harris AL, Brown P, Talbot DC. Phase I study of intrapleural batimastat (BB-94), a matrix metalloproteinase inhibitor, in the treatment of malignant pleural effusions. *Clin Cancer Res* 1999;5:513-520

# 慢性浅表性胃炎脾胃湿热证与水通道蛋白4蛋白表达的关系

周正, 劳绍贤, 黄志新, 张向菊, 黄烈平, 匡忠生

周正, 劳绍贤, 黄志新, 黄烈平, 广州中医药大学第一附属医院 广东省广州市 510405  
张向菊, 广州中医药大学第二临床医学院 广东省广州市 510405  
匡忠生, 广州中医药大学第一附属医院病理科 广东省广州市 510405  
周正, 男, 1972-10-08 生, 湖北浠水县人, 汉族, 1995 年第一军医大学本科毕业, 1997 年湖北中医学院获中西医结合基础硕士学位, 2003 年广州中医药大学获中医临床博士学位, 医师, 主要从事脾胃虚实证候和肝病的研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30271572  
项目负责人: 劳绍贤, 510405, 广东省广州市机场路 12 号, 广州中医药大学第一附属医院. laoshaoxian@163.com  
电话: 020-36591314 传真: 020-36591148  
收稿日期: 2003-06-30 接受日期: 2003-08-25

## Relationship between piwei damp-heat syndrome of chronic superficial gastritis and aquaporin 4 protein expression

Zheng Zhou, Shao-Xian Lao, Zhi-Xin Huang, Xiang-Ju Zhang, Lie-Ping Huang, Zhong-Sheng Kuang

Zheng Zhou, Shao-Xian Lao, Zhi-Xin Huang, Lie-Ping Huang, First Affiliated Hospital, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China  
Xiang-Ju Zhang, Second Clinical College, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China  
Zhong-Sheng Kuang, Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30271572  
Correspondence to: Shao-Xian Lao, Piwei Institute, Guangzhou University of TCM, 12 Jichang Road, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China. laoshaoxian@163.com  
Received: 2003-06-30 Accepted: 2003-08-25

## Abstract

**AIM:** To study the relationship between piwei damp-heat syndrome and aquaporin 4 (AQP4) from fluid metabolism in patients with chronic superficial gastritis.

**METHODS:** A total of 32 patients with chronic superficial gastritis were composed of 20 cases of piwei damp-heat syndrome and 12 of pi-qi deficiency syndrome, while 10 cases of healthy people were taken as control. The mucosa of upper stomach was obtained by gastroscopic biopsy. The mucosal inflammation was observed and the protein expression of AQP4 was semiquantitated by the immunohistochemistry and image assay system.

**RESULTS:** The mucosal inflammation of piwei damp-heat syndrome group was more severe than that of the other two groups significantly (moderate or severe rate 17/20 vs 6/12, 0/10,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , respectively), and the protein expression of AQP4 in piwei damp-heat syndrome group was also higher than that of the other two groups

significantly ( $209 \pm 59$  vs  $127 \pm 61$  and  $164 \pm 32$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ , respectively).

**CONCLUSION:** AQP has a close connection with water metabolism. The abnormal expression of AQP may be one of the pathogenesis of piwei damp-heat syndrome.

Zhou Z, Lao SX, Huang ZX, Zhang XJ, Huang LP, Kuang ZS. Relationship between piwei damp-heat syndrome of chronic superficial gastritis and aquaporin 4 protein expression. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12(2):379-381

## 摘要

**目的:** 从水液代谢来研究慢性浅表性胃炎脾胃湿热证与 AQP4 表达的关系。

**方法:** 慢性浅表性胃炎患者 32 例, 其中脾胃湿热证 20 例, 脾气虚证 12 例; 另 10 例正常人为对照。胃镜下取胃体上部黏膜, 观察黏膜炎症情况, 免疫组化法、图像分析系统半定量 AQP4 的蛋白表达量。

**结果:** 脾胃湿热证胃黏膜的炎症明显要重于脾虚证和正常人组(中重度比 17/20 vs 6/12, 0/10,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 脾胃湿热证 AQP4 蛋白表达量强于脾虚证组( $209 \pm 59$  vs  $127 \pm 61$ ,  $P < 0.01$ )和正常人组(vs  $164 \pm 32$ ,  $P < 0.05$ ); 脾虚证蛋白表达量低于正常人组, 但两组无显著性差异( $127 \pm 61$  vs  $164 \pm 32$ ,  $P > 0.05$ )。

**结论:** AQP 与水液代谢密切相关, AQP 的异常表达可能是脾胃湿热证的发生机制之一。

周正, 劳绍贤, 黄志新, 张向菊, 黄烈平, 匡忠生. 慢性浅表性胃炎脾胃湿热证与水通道蛋白 4 蛋白表达的关系. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):379-381  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/379.asp>

## 0 引言

中医的脾(胃)是以消化系统为主的多系统的功能综合单位, 包括了消化、水电解质代谢、能量代谢、神经内分泌等多系统的功能; 近年关于脾实质的研究, 证型上集中在脾虚证的研究, 功能上集中在“脾主运化、尤其脾主运化水谷”的研究, 而关于脾胃实证和“脾主运化水液”的研究较少<sup>[1-3]</sup>。现代医学认为<sup>[4-11]</sup>, 水通道蛋白(aquaporin, AQP)是生物膜上特异性转运水的整合蛋白质, 是水通过生物膜的主要方式, 其作用是参与调节水平衡; AQP 目前已成功分离出 10 个亚型, 在胃黏膜中

主要是 AQP4 的表达. 我们以水液代谢为切入点, 研究脾胃湿热证与 AQP4 之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 慢性浅表性胃炎的诊断标准参照中华医学会消化病学分会2000年井冈山会议制定的标准(中华消化杂志 2000;20:199-201), 中医辨证脾胃湿热证和脾气虚证的诊断标准参照 2002 年国家药品监督管理局颁布的《中药新药临床研究指导原则》<sup>[12]</sup>, 10 例正常人为本校学生志愿者, 诊断标准为无心、肝、脾、肺、肾等系疾病、常规实验室检查正常、胃黏膜内镜征象和病理组织学基本正常、舌脉正常. 结合症状、体征、胃镜检查

和病理组织学结果, 参照上述慢性浅表性胃炎的诊断标准, 所有患者均确诊为慢性浅表性胃炎, 病例来源于广州中医药大学第一附属医院, 其中辨证脾胃湿热证者20例, 脾气虚证者 12 例. 所有受试对象均签订知情同意书. 1.2 方法 日本 Olympus GIF-240XQ 型电子胃镜检查, 胃体距 EG 线 2 cm 的大、小弯处分别钳取胃黏膜组织 4 块, 每块 0.5×0.5 cm 大小, 组织放入 40g/L 多聚甲醛中固定组织、常规包埋切片、HE 染色, 3 位病理专科医师在未知诊断、同一设定条件下分析胃黏膜的炎症程度(轻度、中度、重度)(炎症分级标准参考中华消化杂志 2000;20:199-201). 组织经包埋切片后, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭, 微波法热修复抗原, 血清封闭液封闭, 分别滴加羊抗人 AQP4 的多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)、生物化兔抗羊二抗(武汉博士德公司)和 SABC, DAB 显色, 苏木素衬染, 透明封片. 显微境下观察, 北航图像分析系统 3 000 进行病理图像分析, 以阳染光密度值×阳染面积比值(%)作为观察指标.

统计学处理 等级资料用 Ridit 分析和 K independent sample test, 计量资料用方差分析.

2 结果

2.1 胃黏膜病变 慢性浅表性胃炎患者胃镜下胃黏膜不同程度的充血水肿, 黏液附着, 甚至有少许浅糜烂灶, 显微镜下示炎性细胞和淋巴细胞浸润. 和脾虚证相比, 脾胃湿热证患者胃镜下胃黏膜充血水肿明显, 黏液增多, 显微镜下也发现炎性细胞浸润的面积和深度要严重(P <0.05, 表 1).

表 1 慢性浅表性胃炎胃黏膜炎症的比较(n)

分组	胃黏膜炎症分级			
	无	轻度	中度	重度
脾胃湿热证 <sup>ab</sup>	0	3	12	5
脾虚证 <sup>b</sup>	0	6	5	1
正常人	9	1	0	0

<sup>a</sup>P <0.05, vs 脾虚证; <sup>b</sup>P <0.01, vs 正常人.

2.2 AQP4 蛋白的表达 显微下观察, AQP4 主要表达

在黏膜固有层中, 分布在胃腺主细胞膜和壁细胞膜的基侧面. 脾胃湿热证组阳染呈深棕黄色, 阳染面积比例大(图 1). 脾虚证组阳染色呈浅棕色, 阳染面积小, 或无阳染(图 2、图 3). 正常人组阳染强度中等, 阳染面积也较广(图 4). 阳染结果经全自动图像分析后: 脾胃湿热证 AQP4 蛋白表达量强于脾虚证组(209 ± 59 vs 127 ± 61, P <0.01)和正常人组(vs 164 ± 32, P <0.05); 脾虚证蛋白表达量虽低于正常人组, 但两组无显著性差异(127 ± 61 vs 164 ± 32, P >0.05).

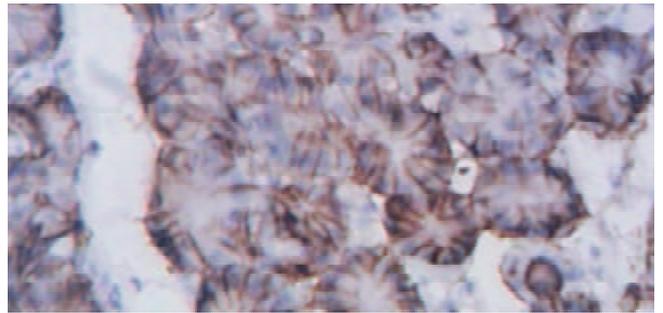


图 1 脾胃湿热证组 AQP4 高表达×400.

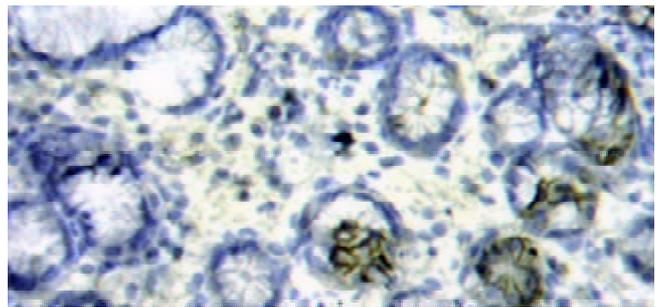


图 2 脾虚证组 AQP4 低表达×400.

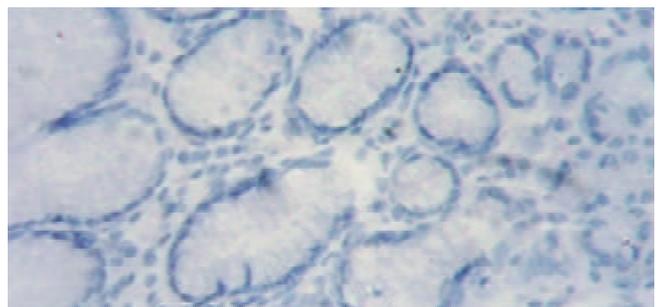


图 3 脾虚证组 AQP4 阴性表达×400.

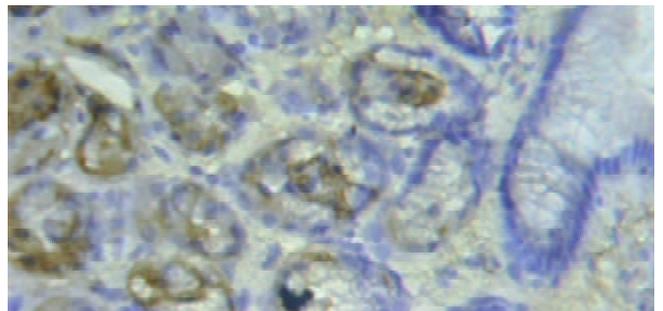


图 4 正常人组 AQP4 的表达×400.

### 3 讨论

脾主运化, 运化水液, 在水液代谢中起着重要作用, 可用“化”和“运”来概括: 通过“脾的化”, 能够把水谷物的液态成分转化成水液, 能够把水液化生唾、汗、尿、消化液及其他生理性液体; 通过“脾的运”, 能够把津液和多余的水液转输至肺、肾和全身. 脾主运化水液的功能健旺, 可防止体内水液不正常的停滞, 起到维持体内津液平衡的作用. 如脾(胃)运化水液失常, 易湿浊内生, 湿聚化热, 这也是脾胃湿热证的基本病机. 可见, 脾胃湿热证与“脾主运化水液”、水液代谢密切相关. 近年研究发现, 在多种器官组织的细胞膜上存在着一种整合蛋白质, 即水通道蛋白, 他能特异性地介导水转运, 是水通过生物膜的主要方式<sup>[4-6]</sup>. 1988年首次从哺乳动物红细胞膜上分离 AQP1 (J Biol Chem 1988;263:15634), 目前已成功分离出 10 个亚型<sup>[5, 13-17]</sup>, AQP 家族成员具有基因序列同源性, 有 4 个外显子和 3 个内含子, 一个大的外显子编码氨基端分子, 三个小的外显子编码羧基端分子, 编码的 AQP 蛋白分子是 4 个单体组成的四聚体结构, 每一单体结构相似, 具有独立功能. 在消化道已发现有 7 种 AQP 亚型<sup>[18-27]</sup>; 在人胃体主要是 AQP4 表达, 且只表达胃底腺主细胞和壁细胞的膜上, 功能是参与胃液的分泌, 和 / 或维持壁细胞的正常容积<sup>[9]</sup>. AQP4 的作用强度可能与以下因素有关: 蛋白表达量、细胞膜上的排列方式、单位膜面积的分布强度等. 胃黏膜 AQP4 表达在主细胞和壁细胞膜的基侧面, 在细胞膜的顶部及黏液上皮细胞未见表达. 脾胃湿热证组 AQP4 的蛋白表达要高于正常人组和脾虚证组 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), 而脾虚证组则低于正常人组 ( $P > 0.05$ ); 同时还发现脾胃湿热证组胃黏膜的炎症程度要重于其他两组 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ).

脾胃湿热证与水液代谢失衡密切相关. 脾胃湿热证的炎性介质增加(如组胺、5-羟色胺), 细胞代谢呈代偿性亢进状态, 胃泌素升高, 这些会引起胃黏膜炎症、胃液分泌增加; 我们发现, 脾胃湿热证胃黏膜的 AQP4 升高, 可能会引起组织间隙和微血管的水进入胃腺细胞或其他细胞, 引起局部水平衡紊乱, 参与炎症反应. 而脾虚证则有线粒体能量传递低下, 胃黏膜分泌功能障碍, 这可能是脾虚证 AQP4 表达低于脾胃湿热证和正常人的原因. 脾胃湿热证和脾虚证一实一虚, 与水液代谢失衡都相关, AQP 表达也不同, 这提示 AQP 可以用来研究中医“脾主运化水液”的发生机制.

### 4 参考文献

- 1 劳绍贤. 加强脾胃实证的研究. 中国中西医结合脾胃杂志 1997; 5:65-66
- 2 王建华. 脾气虚证本质研究的途径及方向. 中医杂志 1998;39:50-52
- 3 刘良, 王汝俊, 卞兆祥. 王建华论文选. 第1版. 广州: 羊城晚报出版社, 2000:251-258
- 4 Reuss L, Hirst BH. Water transport controversies - an overview. *J Physiol* 2002;542(Pt 1):1-2
- 5 Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S. Aquaporin water channels-from atomic

- 6 structure to clinical medicine. *J Physiol* 2002;542(Pt 1):3-16
- 7 Pequeux C, Brilot F, Martens H, Geenen V, Legros JJ. New players in the physiopathology of water metabolism: the aquaporins. *Rev Med Liege* 1999;54:867-874
- 8 Verkman AS, Yang B, Song Y, Manley GT, Ma T. Role of water channels in fluid transport studied by phenotype analysis of aquaporin knockout mice. *Exp Physiol* 2000;85:233S-241S
- 9 Verkman AS. Physiological importance of aquaporins: lessons from knockout mice. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000;9:517-522
- 10 Misaka T, Abe K, Iwabuchi K, Kusakabe Y, Ichinose M, Miki K, Emori Y, Arai S. A water channel closely related to rat brain aquaporin 4 is expressed in acid- and pepsinogen-secretory cells of human stomach. *FEBS Lett* 1996;381:208-212
- 11 Ma T, Verkman AS. Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology. *J Physiol* 1999;517(Pt 2):317-326
- 12 Koyama Y, Yamamoto T, Tani T, Nihei K, Kondo D, Funaki H, Yaoita E, Kawasaki K, Sato N, Hatakeyama K, Kihara I. Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 1999;276(3 Pt 1):C621-627
- 13 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行). 北京: 中国医药科技出版社, 2002:362-371
- 14 Verkman AS, Mitra AK. Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278:F13-F28
- 15 Moshelion M, Becker D, Biela A, Uehlein N, Hedrich R, Otto B, Levi H, Moran N, Kaldenhoff R. Plasma membrane aquaporins in the motor cells of samanea saman: Diurnal and circadian regulation. *Plant Cell* 2002;14:727-739
- 16 Hurley PT, Ferguson CJ, Kwon TH, Andersen ML, Norman AG, Steward MC, Nielsen S, Case RM. Expression and immunolocalization of aquaporin water channels in rat exocrine pancreas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G701-709
- 17 Kreda SM, Gynn MC, Fenstermacher DA, Boucher RC, Gabriel SE. Expression and localization of epithelial aquaporins in the adult human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:224-234
- 18 Verkman AS, Matthay MA, Song Y. Aquaporin water channels and lung physiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278:L867-879
- 19 王俊平, 王大骏. 消化系统水通道蛋白研究进展. 中华消化杂志 2001;21:111-112
- 20 Talbot NC, Garrett WM, Caperna TJ. Analysis of the expression of aquaporin-1 and aquaporin-9 in pig liver tissue: comparison with rat liver tissue. *Cells Tissues Organs* 2003;174:117-128
- 21 Tsujikawa T, Itoh A, Fukunaga T, Satoh J, Yasuoka T, Fujiyama Y. Alteration of aquaporin mRNA expression after small bowel resection in the rat residual ileum and colon. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:803-808
- 22 Mennone A, Verkman AS, Boyer JL. Unimpaired osmotic water permeability and fluid secretion in bile duct epithelia of AQP1 null mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G739-746
- 23 Nicchia GP, Frigeri A, Nico B, Ribatti D, Svelto M. Tissue distribution and membrane localization of aquaporin-9 water channel: evidence for sex-linked differences in liver. *J Histochem Cytochem* 2001;49:1547-1556
- 24 Aoki M, Kaneko T, Katoh F, Hasegawa S, Tsutsui N, Aida K. Intestinal water absorption through aquaporin 1 expressed in the apical membrane of mucosal epithelial cells in seawater-adapted Japanese eel. *Exp Biol* 2003;206(Pt 19):3495-3505
- 25 Gresz V, Kwon TH, Hurley PT, Varga G, Zelles T, Nielsen S, Case RM, Steward MC. Identification and localization of aquaporin water channels in human salivary glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G247-254
- 26 Hurley PT, Ferguson CJ, Kwon TH, Andersen ML, Norman AG, Steward MC, Nielsen S, Case RM. Expression and immunolocalization of aquaporin water channels in rat exocrine pancreas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G701-709
- 27 Wang KS, Ma T, Filiz F, Verkman AS, Bastidas JA. Colon water transport in transgenic mice lacking aquaporin-4 water channels. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G463-470
- 28 Lignot JH, Cutler CP, Hazon N, Cramb G. Immunolocalisation of aquaporin 3 in the gill and the gastrointestinal tract of the European eel *Anguilla anguilla*. *J Exp Biol* 2002;205(Pt 17):2653-2663

# 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞的变化

王 静, 梁列新, 张志雄, 李国华, 钱 伟, 侯晓华

王静, 梁列新, 钱伟, 侯晓华, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化科 湖北省武汉市 430022  
张志雄, 广西壮族自治区人民医院消化科 广西壮族自治区南宁市 530021  
李国华, 江西医学院第一附属医院消化科 江西省南昌市 330006  
王静, 女, 1969-07-20 生, 新疆塔城市人, 汉族. 1991 年新疆石河子大学医学院本科毕业, 现攻读华中科技大学同济医学院博士学位, 主要从事胃肠动力障碍性疾病研究.  
项目负责人: 侯晓华, 430022, 湖北省武汉市解放大道 1277 号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化科. houhx@public.wh.hb.cn  
电话: 027-85726930  
收稿日期: 2003-06-17 接受日期: 2003-09-24

## Alterations of enteric mucosal mast cells in patients with irritable bowel syndrome

Jing Wang, Lie-Xing Liang, Zhi-Xiong Zhang, Guo-Hua Li, Wei Qian, Xiao-Hua Hou

Jing Wang, Lie-Xing Liang, Wei Qian, Xiao-Hua Hou, Department of Gastroenterology of Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China  
Zhi-Xiong Zhang, Department of Gastroenterology, the People's Hospital, Nanning 530021, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region, China  
Guo-Hua Li, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital, Jiangxi Medical College, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China  
Correspondence to: Dr. Xiao-Hua Hou, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Road, Wuhan 430022, Hubei Province, China. houhx@public.wh.hb.cn  
Received: 2003-06-17 Accepted: 2003-09-24

## Abstract

**AIM:** To study alterations of mast cells in colon mucosa of patients with irritable bowel syndrome.

**METHODS:** Ten healthy volunteers and 20 patients with irritable bowel syndrome entered in this study. By colonoscopy biopsies, the mast cells (MC) in mucosa of cecal colon, transverse colon and rectum were stained by immunohistochemistry and the number of mast cells and percentage of degranulated mast cells were counted.

**RESULTS:** MC number increased significantly in the cecum and transverse colon of diarrhea IBS patients, compared with controls ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). MC number increased significantly in the cecum of constipation IBS patients compared with controls ( $P < 0.05$ ). MC number was significantly increased in the caecum of diarrhea IBS patients than constipation IBS patients ( $P < 0.05$ ). The percentages of degranulated mast cells in cecal colon, transverse colon and rectum mucosa of diarrhea IBS patients were significantly higher than those in constipation IBS patients and controls ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The mast cells play an important role in the pathogenesis of irritable bowel syndrome.

Wang J, Liang LX, Zhang ZX, Li GH, Qian W, Hou XH. Alterations of enteric mucosal mast cells in patients with irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):382-384

## 摘要

**目的:** 探讨肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)与肠黏膜肥大细胞(mast cell, MC)及脱颗粒之间的关系。

**方法:** 正常人 10 例和 IBS 患者 20 例(腹泻 11 例, 便秘 9 例)。每例于结肠镜下取盲肠、横结肠和直肠各 2 块, 用免疫组化方法进行 MC 染色, 计算每高倍视野下 MC 的数量及脱颗粒 MC 所占 MC 总数的比例。

**结果:** 腹泻组 IBS 患者盲肠、横结肠黏膜 MC 数量显著高于正常对照组( $P < 0.01$  及  $P < 0.05$ ); 直肠黏膜 MC 数量与正常对照组无显著差异( $P > 0.05$ )。便秘组 IBS 患者在盲肠黏膜 MC 数量显著高于正常对照组( $P < 0.05$ ), 而横结肠、直肠黏膜 MC 数量与正常对照组无显著差异( $P > 0.05$ )。盲肠腹泻组 IBS 患者盲肠 MC 数量显著高于便秘组( $P < 0.05$ ), 而在横结肠及直肠两组之间无显著差异。腹泻型 IBS 患者盲肠、横结肠、直肠黏膜脱颗粒 MC 比率显著高于正常对照组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 便秘组 IBS 患者盲肠、直肠黏膜脱颗粒 MC 比率亦高于正常对照组( $P < 0.05$ ), 而在横结肠与正常对照组无显著差异( $P > 0.05$ ); 各部位肠黏膜腹泻组 IBS 患者脱颗粒 MC 比率显著高于便秘组。

**结论:** 肠黏膜肥大细胞可能参与 IBS 的发病。

王静, 梁列新, 张志雄, 李国华, 钱伟, 侯晓华. 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞的变化. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):382-384  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/382.asp>

## 0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是消化内科常见的临床症候群<sup>[1-4]</sup>, 其发病机制与精神心理、肠道运动、内脏感觉等多种因素有关<sup>[5-11]</sup>。肥大细胞(mast cell, MC)与胃肠运动、胃肠感觉密切相关<sup>[12]</sup>, IBS 患者 MC 数量有改变, 提示 MC 与 IBS 有密切的关系<sup>[13]</sup>。然而大多数 IBS 患者回肠末端黏膜 MC 数量显著增多<sup>[13-14]</sup>, 但对其脱颗粒的情况报道甚少。我们对 IBS 患者不同部位的肠黏膜 MC 数量及脱颗粒 MC 比率进行了观察, 旨在探讨 IBS 患者肠黏膜 MC 在 IBS 发病机制中的作用。

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康志愿者肠黏膜活检标本 10 例, 男 5 例,

女5例, 年龄21-48 ( $30 \pm 6$ )岁. 无消化病史, 体检、肠镜、B超等各项检查均正常. 近期无用药史. IBS组20例, 男9例, 女11例, 年龄17-56 ( $33 \pm 7$ )岁. 其中腹泻型11例, 便秘型9例. 诊断参考功能性胃肠疾病罗马II诊断标准<sup>[15]</sup>. 以上受检者, 每例在结肠镜下取盲肠、横结肠、直肠黏膜各2块.

1.2 方法 肠黏膜组织用10%甲醛固定, 梯度酒精脱水, 常规石蜡切片厚6  $\mu\text{m}$ . MC染色采用SABC法, 鼠抗人MC类胰蛋白酶抗体(美国Neomarkers公司), SABC试剂盒购自武汉博士德公司. 采用免疫组织化学染色, 光镜下观察MC脱颗粒者胞膜破裂, 有颗粒涌出, 细胞不规则; 未脱颗粒者胞膜完整, 胞质均匀. 每张切片随机选5个高倍视野( $\times 400$ ), 计数MC总数及脱颗粒MC数, MC计数以平均每高倍视野的MC个数表示, 脱颗粒MC比率则以脱颗粒MC数占总MC数的比值表示.

统计学处理 实验数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用方差分析One-Way ANOVA, 所有统计均用SPSS 10.0统计软件包完成,  $P < 0.05$ 为差异有显著意义.

## 2 结果

所有标本的MC均染色成功, 细胞主要分布于固有层内, 光镜下呈卵圆形或椭圆形, 胞质着色呈棕褐色(图1), 部分MC胞膜破裂, 周围可见脱落的颗粒(图2).

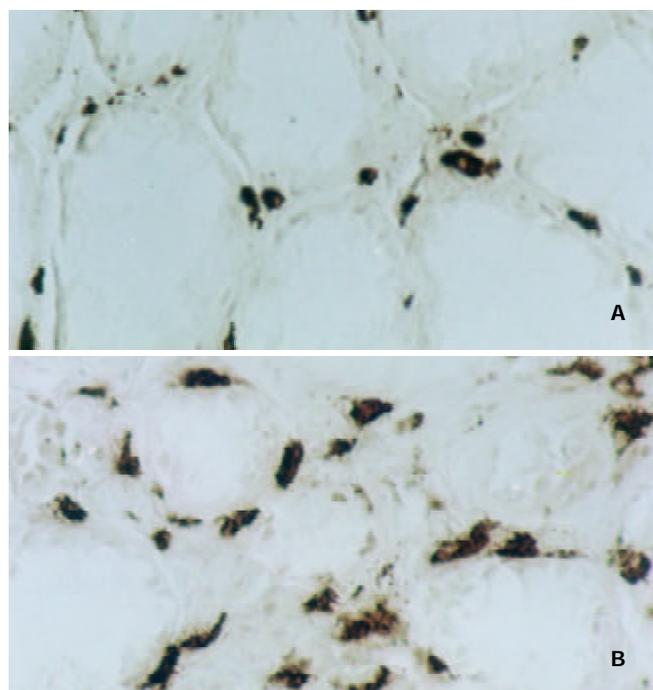


图1 肠黏膜肥大细胞阳性染色 SABC  $\times 200$ . A: 正常人; B: IBS.

2.1 肠黏膜MC计数 正常组盲肠黏膜MC数高于横结肠和直肠( $P < 0.05$ ); 而横结肠和直肠黏膜MC数无显著差异. 腹泻组IBS患者盲肠和横结肠黏膜MC数量显著高于正常对照组( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ); 直肠黏膜MC数量与正常对照组无显著差异. 便秘组IBS患者在盲肠黏膜

MC数量显著高于正常对照组( $P < 0.05$ ), 而横结肠和直肠黏膜MC计数与正常对照组无显著差异. 在盲肠黏膜腹泻组IBS患者MC数量显著高于便秘组( $P < 0.05$ ), 但在横结肠及直肠黏膜MC数量无显著性差异(表1).

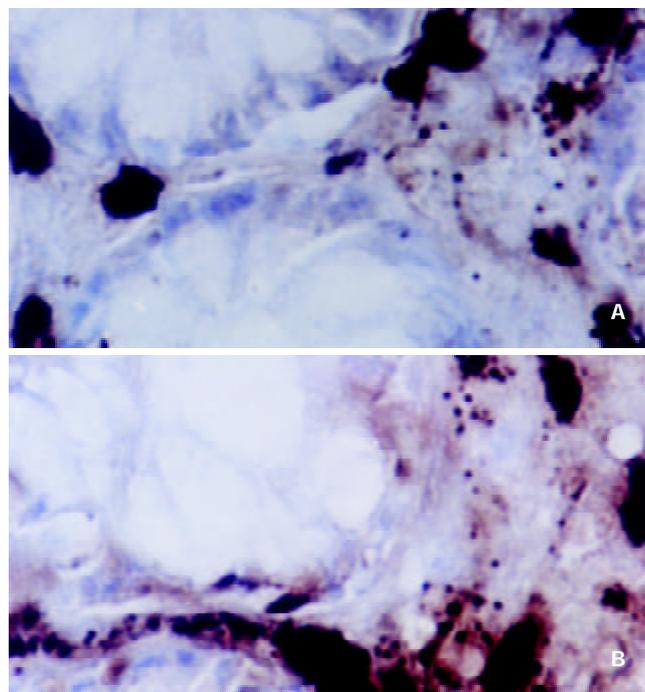


图2 肠黏膜肥大细胞脱颗粒阳性染色 SABC  $\times 400$ . A: 正常人; B: IBS.

2.2 肠黏膜脱颗粒MC比率 正常组脱颗粒MC比率在盲肠、横结肠和直肠黏膜之间无显著性差异. 腹泻型IBS患者盲肠、横结肠和直肠黏膜脱颗粒MC比率显著高于正常对照组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ); 便秘组IBS患者盲肠和直肠黏膜脱颗粒MC比率亦高于正常对照组( $P < 0.05$ ), 而在横结肠与正常对照组无显著差异; 各部位肠黏膜腹泻组脱颗粒MC比率显著高于便秘组(表1).

表1 IBS患者大肠黏膜MC和MC脱颗粒计数( $\text{mean} \pm \text{SD}$ )

MC	分组	n	盲肠	横结肠	直肠
计数/5HP	正常组	10	$48.0 \pm 6.1$	$41.2 \pm 11.6^a$	$42.0 \pm 7.6^a$
	IBS 腹泻组	11	$65.6 \pm 10.8^d$	$55.7 \pm 7.3^c$	$45.2 \pm 8.8$
	IBS 便秘组	9	$54.5 \pm 5.5^{ce}$	$48.7 \pm 6.7$	$44.3 \pm 10.0$
脱颗粒/%	正常组	10	$13.6 \pm 6.5$	$9.5 \pm 3.2$	$10.4 \pm 5.5$
	IBS 腹泻组	11	$28.0 \pm 7.2^d$	$21.9 \pm 6.5^c$	$23.7 \pm 6.7^c$
	IBS 便秘组	9	$20.8 \pm 5.9^{ce}$	$13.9 \pm 4.2^e$	$17.7 \pm 4.5^{ce}$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 盲肠; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 正常组; <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs 腹泻组.

## 3 讨论

IBS是一组肠功能紊乱综合征, 无任何器质性或异常的生化指标, 其病因和发病机制至今还不完全清楚. 可能与精神心理压力、既往肠道感染、食物过敏症、消化道运动及内脏感觉异常等因素有关<sup>[1-11]</sup>. 近年来发现MC

与IBS有密切的关系,但不同部位肠黏膜肥大细胞数的变化还存在争议。O'Sullivan et al<sup>[13]</sup>发现IBS患者盲肠的MC数目明显高于对照组,但升结肠、降结肠及直肠的MC数无显著变化。李兆申 et al<sup>[14]</sup>报道IBS患者回肠末端、回盲部及升结肠MC密度较对照组明显增多,在同一部位腹泻型IBS患者MC密度较便秘型IBS患者高。尽管对IBS患者肠黏膜MC数量研究不少,然而,对IBS患者肠黏膜MC脱颗粒的情况报道甚少。

我们发现IBS患者盲肠黏膜MC数量显著高于正常对照组( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ),且腹泻组高于便秘组( $P < 0.05$ );腹泻组IBS患者横结肠黏膜MC数量显著高于便秘组及正常对照组( $P < 0.05$ ),而便秘组与正常对照组无显著性差异;IBS患者直肠黏膜MC数量与正常对照组无显著性差异。我们的结果与以往的研究基本一致,但我们观察到的MC数量多于以往报道,这可能是由于采用了不同的染色方法和计数方法有关。以往多采用阿利新兰、甲苯胺蓝等阳离子染色剂,其对黏膜型MC染色效果欠佳,我们采用鼠抗人MC类胰蛋白酶单克隆抗体进行免疫组化染色,具有更高的敏感性和特异性。此外,我们还发现IBS患者盲肠、横结肠、直肠黏膜固有层脱颗粒MC比率显著高于正常对照组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );且在同一结肠部位腹泻组高于便秘组IBS患者,进一步说明MC参与IBS的发病。以往研究主要是IBS患者或腹泻型IBS患者肠黏膜MC数变化,而对腹泻组与便秘组MC数或脱颗粒MC比率的比较甚少,本研究发现同一结肠部位腹泻组与便秘组IBS患者脱颗粒MC比率存在差异,可能与以往肠道感染、食物过敏或不耐受及神经机制等因素有关;不同部位MC也有差异,机制不明,可能与IBS患者肠道吸收、分泌及动力失调的病理生理机制和神经机制以及MC分布异质性的生理功能差异有关,还有待于深入研究。

IBS患者肠黏膜MC数量及脱颗粒比率增多,原因不明,可能与以下因素有关:(1)某些感染因素<sup>[15-17]</sup>:导致IBS患者消化道运动及感觉的异常;(2)食物过敏、不耐受:Locke et al<sup>[18]</sup>报道,约25%的被调查者诉有食物过敏史,其患IBS的危险性增加;(3)精神心理因素:心理压力能诱导消化道的MC脱颗粒。在IBS患者常见的束缚应激引起的结肠动力紊乱可能通过CRF依赖性机制和/或神经紧张素介导MC脱颗粒来实现的。MC脱颗粒释放的各种递质能引起肠动力异常和内脏感觉阈值下降。总之,IBS的发病与患者大肠黏膜的MC有关,尤其是MC

脱颗粒,在IBS的病理生理机制中可能起重要作用。

#### 4 参考文献

- Wood JD. Neuropathophysiology of irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2002;35(1 Suppl):S11-22
- Camilleri M, Heading RC, Thompson WG. Clinical perspectives, mechanisms, diagnosis and management of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1407-1430
- Hasler WL. The irritable bowel syndrome. *Med Clin North Am* 2002;86:1525-1551
- Bodemar G, Ragnarsson G. Irritable bowel syndrome. Survey of definitions, differential diagnosis and pathogenesis. *Lakartidningen* 2001;98:666-671
- 张卫卫,李岩.精神、心理因素与功能性胃肠病.世界华人消化杂志 2002;10:1324-1328
- Elsenbruch S, Orr WC. Diarrhea- and constipation-predominant IBS patients differ in postprandial autonomic and cortisol responses. *Am J Gastroenterol* 2001;96:460-466
- Hebden JM, Blackshaw E, D'Amato M, Perkins AC, Spiller RC. Abnormalities of GI transit in bloated irritable bowel syndrome: effect of bran on transit and symptoms. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2315-2320
- Chey WY, Jin HO, Lee MH, Sun SW, Lee KY. Colonic motility abnormality in patients with irritable bowel syndrome exhibiting abdominal pain and diarrhea. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1499-1506
- Pimentel M, Chow EJ, Lin HC. Eradication of small intestinal bacterial overgrowth reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3503-3506
- 王伟岸,潘国宗,钱家鸣.精神因素对肠易激综合征患者内脏敏感性的影响.中华医学杂志 2002;81:1-4
- Bouin M, Delvaux M, Blanc C, Lagier E, Delisle MB, Fioramonti J, Bueno L, Frexinos J. Intrarectal injection of glycerol induces hypersensitivity to rectal distension in healthy subjects without modifying rectal compliance. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:573-580
- Zar S, Kumar D, Kumar D. Role of food hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *Minerva Med* 2002;93:403-412
- O'Sullivan M, Clayton N, Breslin NP, Harman I, Bountra C, McLaren A, O'Morain CA. Increased mast cells in the irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2000;12:449-457
- 李兆申,董文珠,邹多武,邹晓平,张文俊.肠易激综合征肠黏膜肥大细胞的实验研究.解放军医学杂志 2002;27:628-630
- Neal KR, Barker L, Spiller RC. Prognosis in post-infective irritable bowel syndrome: a six year follow up study. *Gut* 2002;51:410-413
- 潘国宗,鲁素彩,柯美云,韩少梅,郭慧平,方秀才.北京地区肠易激综合征的流行病学研究:一个整群、分层、随机的调查.中华流行病学杂志 2000;21:26-29
- Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M, Neal KR. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute Campylobacter enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 2000;47:804-811
- Locke GR 3rd, Zinmeister AR, Talley NJ, Fett SL, Melton LJ. Risk factors for irritable bowel syndrome: role of analgesics and food sensitivities. *Am J Gastroenterol* 2000;95:157-165

# MRI 评估肝硬化再生结节和退变结节

徐海波, 孔祥泉, 熊茵, 冯敢生

徐海波, 孔祥泉, 熊茵, 冯敢生, 华中科技大学同济医学院协和医院放射科 湖北省武汉市 430022

徐海波, 男, 1963-11-20 生, 浙江省宁波市人, 汉族. 1986 年同济医科大学学士, 1991 年同济医科大学影像系硕士, 2000 年同济医科大学博士. 1995-1997 年美国路易斯安那州大学博士后, 副教授. 主要从事磁共振诊断和应用研究.

项目负责人: 徐海波, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院协和医院放射科. xuhb@public.wh.hb.cn

电话: 027-85726392

收稿日期: 2003-06-21 接受日期: 2003-09-18

## MRI features of regenerative and dysplastic nodules in cirrhotic liver

Hai-Bo Xu, Xiang-Quan Kong, Ying Xiong, Gan-Sheng Feng

Hai-Bo Xu, Xiang-Quan Kong, Ying Xiong, Gan-Sheng Feng, Department of Radiology, Affiliated Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province China

Correspondence to: Dr. Hai-Bo Xu, Department of Radiology, Affiliated Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang DaBig Road, Wuhan 430022, Hubei Province, China. xuhb@public.wh.hb.cn

Received: 2003-06-21 Accepted: 2003-09-18

### Abstract

**AIM:** To study MR features of the regenerative nodule (RN) and dysplastic nodule (DN) in the cirrhotic liver.

**METHODS:** MRI was performed in 26 cases of suspected cirrhotic liver with RN and DN. Additional enhanced MRI with administration of Gd-DTPA on T<sub>1</sub>WI was performed in 18 of 26 cases. Meanwhile in 10 of 18 both Gd-DTPA and SPIO (Feridex) enhancement were underwent one day apart. All patients were confirmed by aspiration biopsy or histopathology. MRI was compared to the pathological findings.

**RESULTS:** In 26 cases, there were 12 cases of regenerative nodules measuring 0.3-1cm in size, and 14 dysplastic nodules including 8 nodules measuring  $\geq 1$  cm and  $< 3$  cm in size, and 6 nodules measuring  $\geq 3$  cm. Their MR appearances were as followings: nodules with  $< 1$  cm in size showed isointensity on T<sub>1</sub>WI and hypointensity on T<sub>2</sub>WI, of which the intensity was as isointense as the surrounding hepatic parenchyma on enhanced MRI with administration of Gd-DTPA or SPIO. In 8 cases with nodules measuring 1-3 cm in size, 5 cases appeared hyperintense on T<sub>1</sub>WI and hypointense on T<sub>2</sub>WI as well as the enhancement as that of nodules with  $< 1$  cm in size; the other 3 cases appeared hypointense on T<sub>1</sub>WI and hyperintense on T<sub>2</sub>WI, and were enhanced after administration of Gd-DTPA but hyperintense on SPIO enhancing MRI, which indicated malignant transformation of dysplastic nodule into hepatocellular carcinoma (HCC) arising from hepatic nodule on histopathology. In 6 cases of nodules measuring  $> 3$  cm in size, 2 cases appeared hyperintense compared to the surrounding hepatic parenchyma on T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>WI and enhanced

MRI, one of which was documented "nodule within a nodule" on T<sub>2</sub>WI. The 2 cases were demonstrated well-differentiated HCC. The other 4 cases showed hyperintense on T<sub>1</sub>WI, and hypointense on T<sub>2</sub>WI and enhanced MRI. Sometimes, normal vessels were seen to pass through the surface of macroregenerative nodule. Additionally, RN and DN had the same pattern of the time-signal intensity course as the normal surrounding hepatic parenchyma, but malignant transformation of DN appeared fast wash-in and wash-out.

**CONCLUSION:** RN of cirrhosis has features on MRI that usually allow distinction from HCC but not always from DN. A helpful distinction between HCC and DN is that the latter is almost never hyperintense on T<sub>2</sub>WI. Additionally, the followings indicate malignant transformation of DN when DN appears a ring like enhancement after injection of Gd-DTPA, and fast wash-in and wash-out as well as hyperintensity on SPIO enhanced MRI.

Xu HB, Kong XQ, Xiong Y, Feng GS. MRI features of regenerative and dysplastic nodules in cirrhotic liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12(2):385-389

### 摘要

**目的:** 研究肝硬化再生结节和退变结节的MRI特点并以此鉴别二者及肝细胞癌(HCC).

**方法:** 前瞻性地研究了26例肝硬化再生结节和退变结节的MRI表现. 对26例临床疑为肝硬化的患者做了平扫MRI, 其中18例还做了Gd-DTPA增强MRI, 10例同时做了超顺磁性氧化铁(菲立磁, Feridex)增强MRI. 所有患者经穿刺或手术病理及临床影像追踪观察证实. 并将MRI表现与病理对照分析.

**结果:** 26例中再生结节(RN)12例, 病灶直径在0.3-1 cm; 退变结节(DN)14例, 其中8例病灶在1-3 cm, 6例病灶大于3 cm. MRI表现: 12例RN均在T<sub>1</sub>WI呈等稍高信号和T<sub>2</sub>WI等低信号, Gd-DTPA和菲立磁增强与正常肝实质呈同步强化. 14例DN的MRI表现: 5例1-3 cm结节在T<sub>1</sub>WI呈高信号和T<sub>2</sub>WI低信号, Gd-DTPA和菲立磁增强与正常肝实质呈同步强化; 另3例1-3 cm结节病灶在T<sub>1</sub>WI呈等信号, T<sub>2</sub>WI呈高信号, 在Gd-DTPA增强MRI上, 早期呈明显强化, 延迟扫描可见环形强化带, 在菲立磁增强呈高信号提示恶变, 病理上可见肝癌细胞. 6例大于3 cm的结节中2例在T<sub>1</sub>WI、T<sub>2</sub>WI均呈等高信号, 菲立磁增强MRI呈高信号, Gd-DTPA增强MRI示巨大结节较周邻正常肝组织信号高, 其中1例还可见“结中结”征, 病理上呈分化较好的HCC; 另4例大于3 cm的结节在T<sub>1</sub>WI呈高

信号,  $T_2WI$  呈低信号, 菲立磁强化呈低信号, Gd-DTPA 增强巨大结节无强化, 较周邻正常肝组织信号低, 有时可见血管经过巨大结节表面. 此外, Gd-DTPA 增强的时间信号强度曲线显示: RN 和良性 DN 与周邻正常肝组织表型近似, 呈缓缓出; DN 恶变时, 呈快进快出表型, 与正常肝组织不同.

结论: 肝硬化再生结节(RN)在 MRI 上能较好地与 HCC 鉴别, 但较难区别于良性退变结节(DN). 良性退变结节在  $T_2WI$  不呈高信号, 以此区别 HCC. 此外, 退变结节在 Gd-DTPA 增强上出现环形包膜强化, 时间信号强度曲线呈快进快出表型, 菲立磁增强上  $T_2WI$  呈高信号, 提示有恶变.

徐海波, 孔祥泉, 熊茵, 冯敢生. MRI 评估肝硬化再生结节和退变结节. 世界华人消化杂志 2004;12(2):385-389

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/385.asp>

## 0 引言

肝硬化结节可由良性再生结节(regenerative nodule, RN)到癌前病变的退变结节(dysplastic nodule, DN)以及进一步演变成肝细胞癌<sup>[1-2]</sup>. 因而对上述结节的早期发现, 早期诊断以及追踪评估无疑对治疗方案的制订和预后的改善、评估具有重要意义. 有关肝硬化结节的影像学表现已有国内外报道<sup>[3-12]</sup>, 但认为超声对肝硬化内的小结节灶定性不可靠, 同时认为尽管 CT 和 MR 有利于肝硬化患者肝内局灶结节的检测和定性诊断, 但所用的 CT 和 MR 成像技术对这些肝内结节灶仍不敏感或鉴别癌前病变与肝细胞癌仍有疑问<sup>[13-16]</sup>, 且未对 RN 和癌前病变的 DN 在 MRI 上的表现进行描述和鉴别. 目前, MR 无疑是对慢性肝病检测最有效的影像方法, 信号强度和形态变化有利于 MRI 对慢性肝病的诊断和不同病因的鉴别及病变程度分级或分期, 并且现有的快速 MRI 扫描序列能提供动态增强评估有利于提高局灶病变的定性诊断, 包括对 RN、癌前病变的 DN 和小的肝细胞癌的鉴别成为可能<sup>[17-18]</sup>. 我们通过不同的磁共振成像序列结合使用不同的磁共振对比剂寻找二者 MRI 的特点以此鉴别二者及 HCC.

## 1 材料和方法

1.1 材料 前瞻性地研究了 26 例肝硬化再生结节和退变结节的 MRI 表现. 对 26 例临床疑为肝硬化的患者做了平扫 MRI, 其中 18 例还做了 Gd-DTPA 增强 MRI, 10 例同时做了超顺磁性氧化铁(菲立磁, Feridex)增强 MRI. 所有患者经穿刺或手术病理及临床影像追踪观察证实.

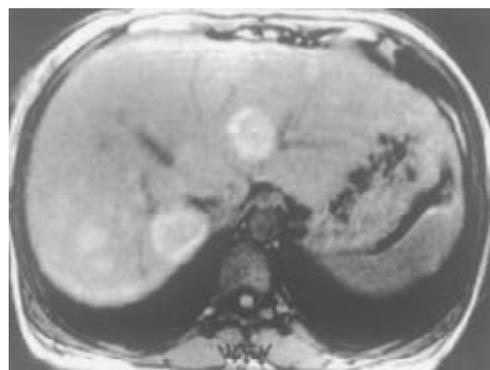
1.2 方法 所有患者均用德国西门子超导 1.5T MR 仪(magnetom-vision, siemens, erlangen, germany)和体部相控阵(phase-array)线圈进行肝脏扫描.  $T_1WI$  采用梯度回波同反相位序列,  $T_2WI$  采用 HASTE 和  $T_2^*$  EPI 及  $T_2^*$  FLASH 小角度小于  $45^\circ$  序列. 层厚 6-8 mm, 间距 1-2 mm. 进行超顺磁性氧化铁(菲立磁, Feridex)增强 MRI 的方法为: 剂量 0.56 mg Fe/kg, 相当于 0.05 mL/kg 菲立磁, 50 g/L 葡

萄糖稀释后经过特制  $5\ \mu\text{m}$  孔径的过滤器静脉滴注, 2-4 mL/min, 全程不少于 30 min, 注射菲立磁后 30 min, 1 h, 3 h, 6 h 重复  $T_2WI$  及  $T_2^*$  序列扫描. Gd-DTPA 动态增强 MRI 的方法为: 剂量 0.2 mmol/kg, 经肘前静脉以 3 mL/s 速度团注连续 MRI 扫描延至 5 min; 然后取同层面肝硬化结节、正常肝组织、腹主动脉和脾组织兴趣区(ROI)作 Gd-DTPA 动态增强的时间信号强度曲线. 图像分析由 2 名有经验高年资医师执行并与病理结果对照分析.

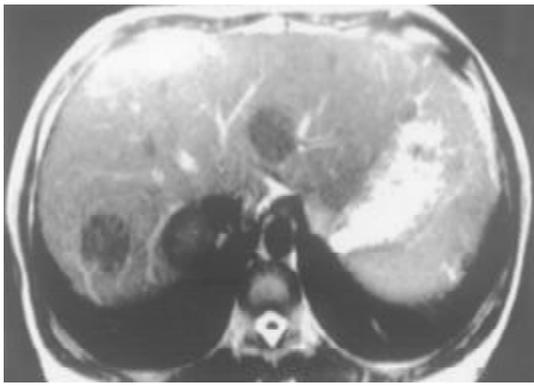
## 2 结果

2.1 影像和病理表现 26 例中再生结节(RN)12 例, 病灶直径在 0.3-1 cm, 病理上呈局灶性增生的肝实质小岛; 退变结节(DN)14 例, 其中 8 例病灶在 1-3 cm, 6 例病灶大于 3 cm. 病理上, 低度(low grade)DN 含有肝细胞, 轻度异常, 无结节或细胞异型性, 但含有大量细胞发育不良; 高度(high grade)DN 含有局灶或广泛结构异常或细胞异型性. MRI 表现: 12 例 RN 病灶均在  $T_1WI$  呈等稍高信号和  $T_2WI$  等低信号, Gd-DTPA 和菲立磁增强与正常肝实质呈同步强化. 14 例 DN 的 MRI 表现: 5 例 1-3 cm 结节在  $T_1WI$  呈高信号和  $T_2WI$  低信号(图 1), Gd-DTPA 和菲立磁增强与正常肝实质呈同步强化; 另 3 例 1-3 cm 结节病灶在  $T_1WI$  呈等信号, 在  $T_2WI$  呈高信号, 在 Gd-DTPA 增强 MRI 上, 早期呈明显强化, 延迟扫描可见环形强化带(图 2), 其时间信号强度曲线亦与正常肝组织曲线表现不同, 此外在菲立磁增强  $T_2WI$  中呈高信号提示恶变, 病理显示为产生于肝结节灶上的肝细胞癌. 6 例大于 3cm 的结节中 2 例在  $T_1WI$ 、 $T_2WI$  均呈等高信号, 菲立磁增强 MRI 呈高信号, Gd-DTPA 增强 MRI 示巨大结节较周邻正常肝组织信号高, 其中 1 例还可见“结中结”征(图 3), 病理上呈分化较好的 HCC; 另 4 例大于 3 cm 的结节在  $T_1WI$  呈高信号, 在  $T_2WI$  呈低信号, 菲立磁强化呈低信号, Gd-DTPA 增强巨大结节无强化, 较周邻正常肝组织信号低, 有时可见血管经过巨大结节表面(图 4).

2.2 Gd-DTPA 增强的时间信号强度曲线表型 RN 和良性 DN 与周邻正常肝组织曲线表型近似, 呈缓缓出; DN 恶变时, 其时间信号强度曲线呈快进快出表现, 与正常肝组织曲线表型不同(图 5).



A

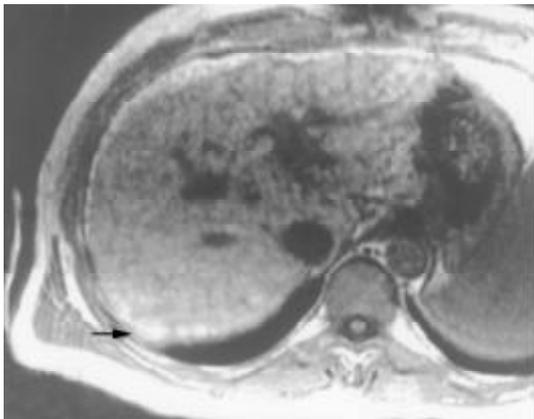


B

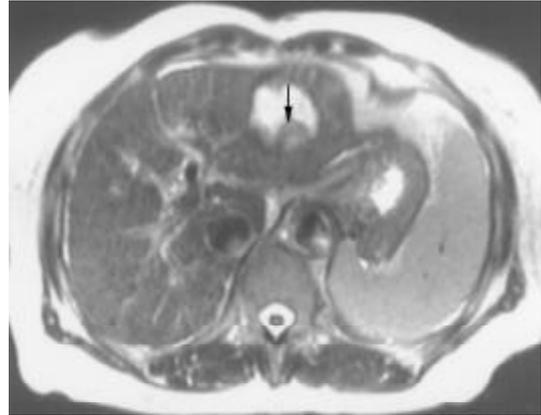


A

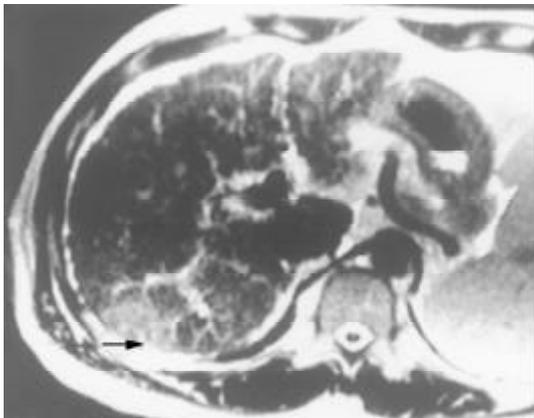
图1 女, 25岁肝内多个巨大退变结节. A: T<sub>1</sub>WI肝左右叶多个高信号巨大结节影. B: T<sub>2</sub>WI低信号.



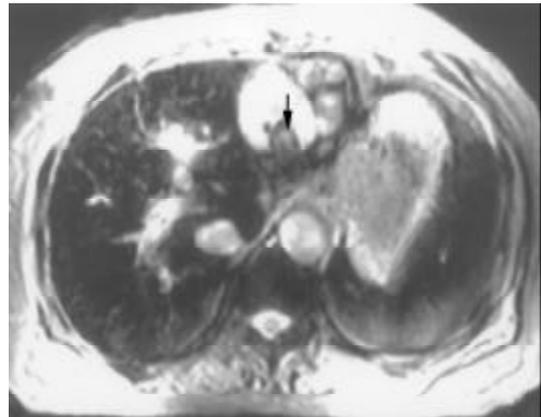
A



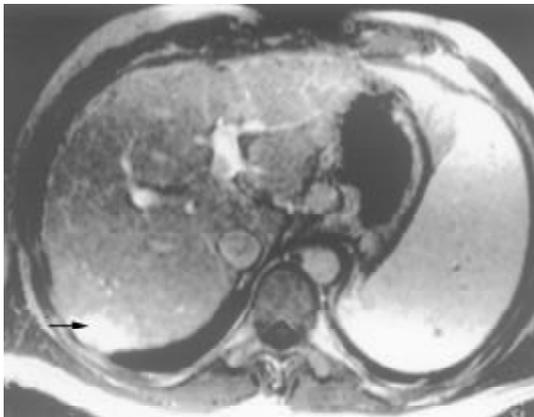
B



B

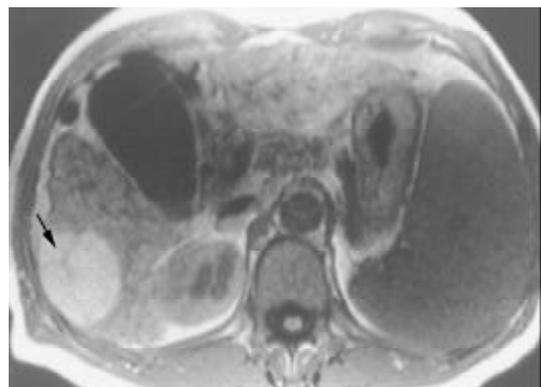


C



C

图2 男, 50岁肝硬化患者, 肝右叶后上段(VII段)一退变结节(>1 cm)恶变. A: T<sub>1</sub>WI肝右叶后上段(VII段)一大于1 cm等信号结节影(箭), 突向肝外. B: T<sub>2</sub>WI此结节呈高信号影, 约2 cm × 2.8 cm. C: Gd-DTPA增强T<sub>1</sub>WI显示此结节较周围其他结节及肝组织明显强化(箭), 结节周边可见环状高信号强化带.



A

图3 女, 69岁肝硬化患者, 肝左外叶一4 cm × 3.2 cm退变结节呈“结中结”征. A: T<sub>1</sub>WI显示肝左外叶II/III段一4 cm × 3.2 cm高低混杂信号大结节影, 其内还可见一1 cm × 1 cm低信号小结节影. 此外, 在肝右叶前下段(V段)还可见一1.8 cm × 1.5 cm稍高信号退变结节影. B: T<sub>2</sub>WI显示大结节呈高信号, 其内小结节呈低信号, 小结节内还可见点状高信号影(箭), 形成“结中结”征. 而肝右叶前下段(V段)的结节与周围肝组织信号相近. C: 菲立磁增强T<sub>2</sub>\*WI显示大结节仍呈“结中结”征(箭), 而肝右叶前下段(V段)的结节与周围肝组织均呈低信号.

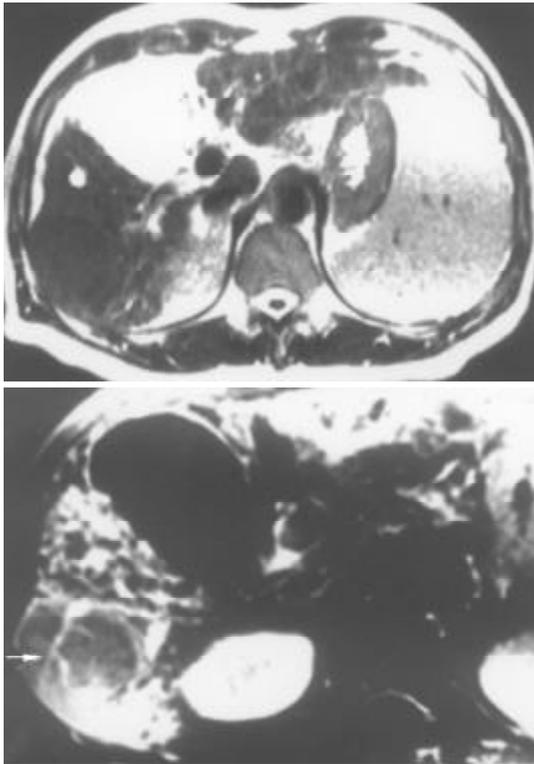


图4 男, 62岁, 肝右叶后下段(VI段)一3 cm × 4 cm 巨大退变结节. A: T<sub>1</sub>WI 显示肝右叶后下段一高信号结节影, 其内可见条状低信号血管通过. B: 轴位 T<sub>2</sub>WI 显示此结节呈低信号. C: Gd-DTPA 增强 MRI 示此结节无明显强化, 其信号与周围肝组织呈等信号. 其内可见条状高信号的强化血管影, 与平扫 T<sub>1</sub>WI 所见对应一致.

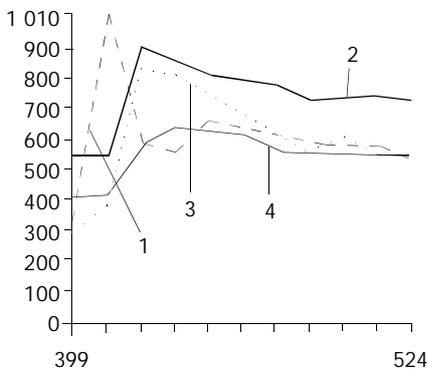
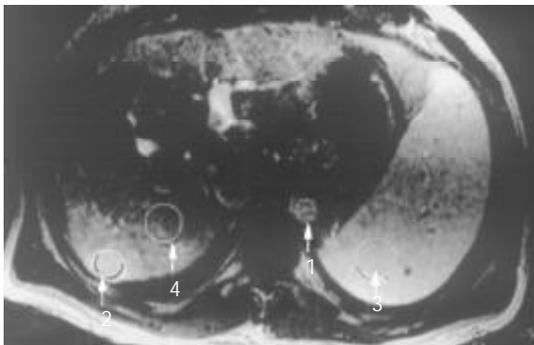


图5 患者同图2. 取同层面腹主动脉(1) 肝硬化结节; (2) 脾组织; 和(3) 正常肝组织; (4) 兴趣区(ROI)作时间信号强度曲线. 显示其时间信号强度曲线呈快进快出表现, 与正常肝组织曲线表现不一样, 提示有恶变.

### 3 讨论

HCC 影像诊断较复杂, 其主要原因是影像表现多样化并常与再生结节(RN)和退变结节(DN)共存. 目前对 HCC

有效治疗方法有手术切除、肝移植、局部抑制切除治疗(focal ablation therapy), 但这取决于 HCC 的早期诊断<sup>[14]</sup>. 对影像学而言关键任务是首先能早期发现可疑病变, 然后是能鉴别良性结节、良恶性临界结节和恶性结节. 对有高风险癌变的肝硬化患者采用超声和甲胎蛋白(AFP)检查筛选是有益的, 但对小 HCC 与良性或退变结节的鉴别却不可靠<sup>[17]</sup>.

本研究显示再生结节(RN)在 T<sub>1</sub>WI 呈等高信号, 在 T<sub>2</sub>WI 呈等低信号, 与 Koslow et al<sup>[19]</sup>报道不完全一致, 即 RN 常在 T<sub>1</sub>WI 和 T<sub>2</sub>WI 呈等高信号, 较少在 T<sub>1</sub>WI 呈稍高信号和 T<sub>2</sub>WI 呈低信号. 这可能与本研究显示的小于 0.3 cm RN 病例少有关. RN 之所以在 T<sub>2</sub>WI 上呈低信号, 可能与含铁血黄素沉着或其周围的纤维间隔有关<sup>[20]</sup>. 含铁血黄素能有效缩短 T<sub>2</sub>, 降低 T<sub>2</sub> 信号, 纤维间隔则由于炎性反应或扩张的血管使含水量增加而形成小环形或网状高信号影, 从而使 RN 呈相对低信号<sup>[21]</sup>. 退变结节(DN)可分为低度(low-grade)和高度(high-grade)两型, 后者被认为是一种癌前或临界病变<sup>[22-24]</sup>, 在 15-25% 的肝硬化患者中发现此结节<sup>[22]</sup>. DN 在显微镜下呈嗜碱胞质增多, 核和核仁增大, 有时可见微腺泡形成和纤维间隔内肝细胞增生, 但这些变化不足以诊断 HCC<sup>[25]</sup>. 当 DN 中含有 HCC 结节灶时, 其倍增时间小于 3 mo, 并且癌灶仅在显微镜下可见时, 无论在活体或离体组织标本上 MRI 常难以检测到<sup>[26]</sup>. DN 在 MRI T<sub>1</sub>WI 呈高或等信号, 在 T<sub>2</sub>WI 呈等或低信号, 这两种信号结合考虑可作为 DN 的特征性表现. 但此信号特征与小 HCC(小于 2 cm) 有重叠或相似<sup>[27]</sup>. 二者常表现出 T<sub>1</sub>WI 上呈高信号, T<sub>2</sub>WI 呈低信号. 而肝细胞癌在 T<sub>2</sub>WI 呈稍高信号为其特征性表现, 故 HCC 与 DN 区别在于: DN 几乎在 T<sub>2</sub>WI 不呈高信号, 也不含有真正包膜. DN 未恶变时, 本研究显示与 RN 在平扫和 Gd-DTPA 或菲立磁增强 MRI 上信号强度变化一致, 亦与周围正常肝组织一致, 并且铁质沉着的 RN (siderotic regenerative nodule) 与铁质沉着的 DN (siderotic dysplastic nodule) 亦难以鉴别<sup>[28]</sup>. 但通过 Gd-DTPA 或菲立磁增强可帮助区别 DN 与小 HCC, 并且 Gd-DTPA 增强 MRI 在显示恶性肿瘤病优于菲立磁增强, 尤其是肝硬化患者<sup>[29-34]</sup>. 本研究中有 2 例大于 3 cm 的结节在 T<sub>1</sub>WI、T<sub>2</sub>WI 均呈等高信号, 常被认为胶样囊肿或退变结节囊变, 经菲立磁增强 MRI 呈高信号, Gd-DTPA 增强 MRI 示巨大结节较周围正常肝组织信号高, 病检显示为分化较好的 HCC. 同样另 3 例 1-3 cm DN 提示有恶变, 最后得到病理证实, 也显示在 Gd-DTPA 增强 MRI 上, DN 呈明显强化, 并有环形强化带提示有包膜形成, 其时间信号强度曲线亦呈快进快出表现, 提示 DN 的动脉血供发生变化, 与 Krinsky et al<sup>[35]</sup>报道的病理结果一致, 即低度铁质沉着的 DN 不成对的动脉明显较铁质沉着的 RN 多. 另一方面, 当癌灶增大时, 出现典型的 MRI “结中结” 征象, 即在 T<sub>2</sub>WI 上显示低信号结节中出现高

信号灶. 此时即使血液检查(甲胎蛋白)或细胞学穿刺检查呈阴性, 也应采取及时治疗或追踪观察. Kaji et al 报道即使对高度 DN 切除后, 对这些患者随访观察发现其 HCC 发生的危险性仍较高. 这提示对高度 DN 积极治疗的患者还应注意随访观察. 此外, 最近 Shimizu et al 对 208 例肝硬化或慢性肝炎患者小于 2 cm 的肝结节病灶进行系列动态增强 MRI 检查, 发现首次检查时结节灶在动脉期有强化, 但间隔至少 12 mo 后动态增强 MRI 复查显示这些病灶无间隔生长, 有的反而消失, 并认为尽管这些病灶呈圆形或卵圆形, 但常为假病灶(pseudolesion)而不是 HCC. 由此说明, 对肝硬化内结节病变, 尤其是 RN 和 DN 一定要随访动态观察.

#### 4 参考文献

- Krinsky GA, Lee VS, Theise ND. Focal lesions in the cirrhotic liver: high resolution ex vivo MRI with pathologic correlation. *J Comput Assist Tomogr* 2000;24:189-196
- Efremidis SC, Hytiroglou P. The multistep process of hepatocarcinogenesis in cirrhosis with imaging correlation. *Eur Radiol* 2002;12:753-764
- Mortele KJ, Ros PR. MR imaging in chronic hepatitis and cirrhosis. *Semin Ultrasound CT MR* 2002;23:79-100
- De-Ledinghen V, Laharie D, Lecesne R, Le-Bail B, Winnock M, Bernard PH, Saric J, Couzigou P, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Drouillard J. Detection of nodules in liver cirrhosis: spiral computed tomography or magnetic resonance imaging? A prospective study of 88 nodules in 34 patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:159-165
- Mikami S, Kubo S, Hirohashi K, Shuto T, Kinoshita H, Nakamura K, Yamada R. Computed tomography during arteriography and arterial portography in small hepatocellular carcinoma and dysplastic nodule: a prospective study. *Jpn J Cancer Res* 2000;91:859-863
- 叶慧义, 高元贵, 董宝玮, 梁燕, 于国, 纪小龙. 肝脏不典型腺瘤样增生结节的综合影像诊断. *中华放射学杂志* 2000;34:187-190
- Fracanzani AL, Burdick L, Borzio M, Roncalli M, Bonelli N, Borzio F, Maraschi A, Fiorelli G, Fargion S. Contrast-enhanced Doppler ultrasonography in the diagnosis of hepatocellular carcinoma and premalignant lesions in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2001;34:1109-1112
- Coakley FV, Schwartz LH. Imaging of hepatocellular carcinoma: a practical approach. *Semin Oncol* 2001;28:460-473
- Sahani DV, O' Malley ME, Bhat S, Hahn PF, Saini S. Contrast-enhanced MRI of the liver with mangafodipir trisodium: imaging technique and results. *J Comput Assist Tomogr* 2002;26:216-222
- Murakami T, Mochizuki K, Nakamura H. Imaging evaluation of the cirrhotic liver. *Semin Liver Dis* 2001;21:213-224
- Bartolozzi C, Donati F, Cioni D, Crocetti L, Lencioni R. MnDPDP-enhanced MRI vs dual-phase spiral CT in the detection of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Eur Radiol* 2000;10:1697-702
- Kim CK, Lim JH, Lee WJ. Detection of hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules in cirrhotic liver: accuracy of ultrasonography in transplant patients. *J Ultrasound Med* 2001;20:99-104
- Kanematsu M, Hoshi H, Yamada T, Murakami T, Kim T, Kato M, Yokoyama R, Nakamura H. Small hepatic nodules in cirrhosis: ultrasonographic, CT, and MR imaging findings. *Abdom Imag* 1999;24:47-55
- Martin J, Puig J, Darnell A, Donoso L. Magnetic resonance of focal liver lesions in hepatic cirrhosis and chronic hepatitis. *Semin Ultrasound CT MR* 2002;23:62-78
- Rode A, Bancel B, Douek P, Chevallerier M, Vilgrain V, Picaud G, Henry L, Berger F, Bizollon T, Gaudin JL, Ducerf C. Small nodule detection in cirrhotic livers: evaluation with US, spiral CT, and MRI and correlation with pathologic examination of explanted liver. *J Comput Assist Tomogr* 2001;25:327-336
- Freeny PC, Grossholz M, Kaakaji K, Schmiedl UP. Significance of hyperattenuating and contrast-enhancing hepatic nodules detected in the cirrhotic liver during arterial phase helical CT in pre-liver transplant patients: radiologic-histopathologic correlation of explanted livers. *Abdom Imag* 2003;28:333-346
- Ward J, Robinson PJ. How to detect hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Eur Radiol* 2002;12:2258-2272
- Hussain SM, Zondervan PE, Ijzermans JN, Schalm SW, de Man RA, Krestin GP. Benign versus malignant hepatic nodules: MR imaging findings with pathologic correlation. *Radiographics* 2002;22:1023-1039
- Koslow SA, Davis PL, DeMarino GB, Peel RL, Baron RL, Van Thiel DH. Hyperintense cirrhotic nodules on MRI. *Gastrointest Radio* 1991;16:339-341
- Murakami T, Kuroda C, Marukawa T, Harada K, Wakasa K, Sakurai M, Monden M, Kasahara A, Kawata S, Kozuka T. Regenerating nodules in hepatic cirrhosis: MR findings with pathologic correlation. *Am J Roentgenol* 1990;155:1227-1231
- Murakami T, Kim T, Nakamura H. Hepatitis, cirrhosis, and hepatoma. *J Magn Reson Imag* 1998;8:346-358
- Hytiroglou P, Theise ND. Differential diagnosis of hepatocellular nodular lesions. *Semin Diagn Pathol* 1998;15:285-299
- Borzio M, Fargion S, Borzio F, Fracanzani AL, Croce AM, Strofolini T, Oldani S, Cotichini R, Roncalli M. Impact of large regenerative, low grade and high grade dysplastic nodules in hepatocellular carcinoma development. *J Hepatol* 2003;39:208-214
- An HJ, Illei P, Diflo T, John D, Morgan G, Teperman L, Theise N. Scirrhouous changes in dysplastic nodules do not indicate high-grade status. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:660-665
- Wada K, Kondo F, Kondo Y. Large regenerative nodules and dysplastic nodules in cirrhotic livers: a histopathologic study. *Hepatology* 1988;8:1684-1688
- Ito K, Mitchell DG, Gabata T, Hann HL, Kim PN, Fujita T, Awaya H, Honjo K, Matsunaga N. Hepatocellular carcinoma association with increased iron deposition in the cirrhotic liver at MR imaging. *Radiology* 1999;212:235-240
- Sadek AG, Mitchell DG, Siegelman ES, Outwater EK, Matteucci T, Hann HW. Early hepatocellular carcinoma that develops with in macroregenerative nodules: growth rate depicted at serial MR imaging. *Radiology* 1995;195:753-756
- Krinsky GA, Lee VS, Nguyen MT, Rofsky NM, Theise ND, Morgan GR, Teperman LW, Weinreb JC. Siderotic nodules at MR imaging: regenerative or dysplastic? *J Comput Assist Tomogr* 2000;24:773-776
- Matsuo M, Kanematsu M, Itoh K, Ito K, Maetani Y, Kondo H, Kako N, Matsunaga N, Hoshi H, Shiraishi J. Detection of malignant hepatic tumors: comparison of gadolinium- and ferumoxide-enhanced MR imaging. *Am J Roentgenol* 2001;177:637-643
- Sugihara S, Suto Y, Kamba M, Ogawa T. Comparison of various techniques of iron oxide-enhanced breath-hold MR imaging of hepatocellular carcinoma. *Clin Imaging* 2001;25:104-109
- Fujita T, Ito K, Honjo K, Okazaki H, Matsumoto T, Matsunaga N. Hepatic parenchymal enhancement in the cirrhotic liver: evaluation by triple-phase dynamic MRI. *Abdom Imag* 2002;27:29-33
- Ward J, Guthrie JA, Scott DJ, Atchley J, Wilson D, Davies MH, Wyatt JI, Robinson PJ. Hepatocellular carcinoma in the cirrhotic liver: double-contrast MR imaging for diagnosis. *Radiology* 2000;216:154-162
- Takeshita K, Nagashima I, Frui S, Takada K, Yamauchi T, Harasawa A, Oba H, Kohtake H, Tanaka H, Suzuki S. Effect of superparamagnetic iron oxide-enhanced MRI of the liver with hepatocellular carcinoma and hyperplastic nodule. *J Comput Assist Tomogr* 2002;26:451-455
- Zheng WW, Zhou KR, Chen ZW, Shen JZ, Chen CZ, Zhang SJ. Characterization of focal hepatic lesions with SPIO-enhanced MRI. *World J Gastroenterol* 2002;8:82-86
- Krinsky GA, Zivin SB, Thorner KM, Lee VS, Theise ND, Weinreb JC. Low-grade siderotic dysplastic nodules: determination of premalignant lesions on the basis of vasculature phenotype. *Acad Radiol* 2002;9:336-341

# 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对肝细胞信号转导的影响

成 军

成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
国家自然科学基金项目, No. C39970674, No. C03011402, No. C39900130, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目 No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室.  
cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

编者按 乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)感染肝细胞之后, 肝炎病毒蛋白的表达对与肝细胞中正常的信号转导通路产生显著的影响. 肝炎病毒蛋白对于肝细胞信号转导的影响, 势必影响肝细胞的细胞周期、细胞凋亡、细胞生长以及细胞的恶性转化等环节. 因为这些细胞的基本的生命活动现象, 都与细胞正常的信号转导有关. 肝炎病毒蛋白对肝细胞信号调节的影响, 一方面通过蛋白-蛋白之间的相互作用而实现, 另一方面也通过对肝细胞基因表达谱的影响而实现. 因此, 利用现代分子生物学技术, 对肝炎病毒蛋白结合的蛋白基因进行研究, 利用基因差异表达技术对肝炎病毒蛋白反式调节的靶基因进行筛选, 阐明肝炎病毒蛋白表达时, 能够上调和下调的靶基因类型, 对于深入研究肝细胞获得肝炎病毒基因表达之后信号转导途径具有十分重要的意义.

中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 在内科传染病学专业博士生导师、生物化学与分子生物学专业博士生导师成军博士、教授、主任医师的领导下, 建立了筛选肝炎病毒调节基因结合蛋白的酵母单杂交技术, 筛选肝炎病毒蛋白、肝细胞蛋白的结合蛋白的酵母双杂交技术, 筛选肝炎病毒蛋白反式调节肝细胞基因的抑制性消减杂交和表达谱基因芯片研究技术等, 系统研究肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制, 并有新的发现. 本专题研究中所发表的这些重要文章, 对于进一步深入探索和研究肝炎病毒对肝细胞正常信号转导的影响, 将产生重要推动作用.

1	乙型肝炎病毒DNA聚合酶末端蛋白研究进展 .....	391
2	乙型肝炎病毒DNA多聚酶P结构域研究进展 .....	393
3	乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对转录因子ATF-1的调节 .....	397
4	乙型和丙型肝炎病毒与胱冬肽酶3的关系 .....	401
5	乙型和丙型肝炎病毒对转录因子Nur77的调节 .....	403
6	乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对层粘连蛋白表达的调节 .....	406
7	转录因子C/EBP $\beta$ 的生物学功能 .....	408
8	活性氧簇与肝炎病毒的关系 .....	412
9	趋化因子与病毒性肝炎的关系 .....	414
10	病毒性肝炎发病机制中环氧合酶的作用 .....	417

## 乙型肝炎病毒DNA聚合酶末端蛋白研究进展

陈国凤, 成军, 张玲霞, 李莉

陈国凤, 成军, 张玲霞, 李莉, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039 国家自然科学基金项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目 No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

陈国凤, 成军, 张玲霞, 李莉. 乙型肝炎病毒DNA聚合酶末端蛋白研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12(2):391-393

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/391.asp>

### 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是嗜肝DNA病毒的一种, HBV DNA的长度为3.2 kb, 具有4个开放读码框架(ORF), 分别编码HBV的表面抗原蛋白, 核心/e抗原蛋白、X蛋白以及HBV DNA聚合酶(HBV DNA P)<sup>[1]</sup>. HBV DNA P基因在ORF中最长, 并且与C、S、X基因区有重叠, 其编码的P蛋白含有3个功能域和1个无意义的隔离片(spacer, SP), 排列顺序为N-末端蛋白(TP), 隔离片, RT/DNA聚合酶和RNase H. 由于受到不能从病毒体直接纯化和在不同的系统中表达有活性酶的限制, 目前对聚合酶及其所编码的各个功能区域蛋白质的功能的认识还不是很清楚.

### 1 末端蛋白的结构和功能

HBV DNA P基因编码TP、RT、RNase H和隔离片, 各区段分别在2 307-2 840 nt、133-1 128 nt、1 129-1 621 nt和2 841-0-132 nt<sup>[2]</sup>. Li et al 在T7噬菌体启动子的调控下构建HBV聚合酶cDNA并在兔的网状细胞裂解液中表达, 组成一对转录翻译系统. 在指定位点的突变中进一步证实重组聚合酶cDNA产生3种产物: 全长蛋白(约94 kD), 内在的始动蛋白(约81 kD), N-TP(约40 kD). 体外表达的聚合酶具有蛋白引物的活性, 由体外<sup>32</sup>P标记的-dGTP全长聚合酶和TP引导的检测可得到证实<sup>[3]</sup>. Kim et al<sup>[4]</sup>对人HBV聚合酶的N-末端或C-末端和DNA聚合酶的结构域同时删除, 并在大肠杆菌中表达, 经直链淀粉柱层析法纯化后, 其纯化蛋白的DNA依赖性DNA聚合酶活性与野毒株进行比较, 证明TP和SP删除分别可以使酶活性减少到70%, 而RNase H删除对聚合酶活性的影响要大于前二者. 单纯RT或将RT的N末端删除后仍能保持聚合酶活性. 将人的HBV聚合酶在兔网状细胞裂解系统中表达, 表达蛋白显示出DNA依赖性的DNA聚合酶活性, 在体外转录

和翻译产生分子量大约100 kD的大蛋白. HBV DNA聚合酶可以被阿菲迪霉素(抗病毒抗生素)和NEM抑制, 在pH7.5和温度37 °C时聚合反应最佳, 同时, 聚合酶活性需要有MnCl<sub>2</sub>或MgCl<sub>2</sub>(在MnCl<sub>2</sub>时更佳). 在75 mm NaCl或100 mm KCl存在时活性较好(75 mm NaCl时活性更佳). 对聚合酶蛋白删除后的聚合活性研究显示, TP对于完整的聚合酶功能是必要的, 隔离片删除可能降低P蛋白的稳定性<sup>[5]</sup>. Miriam et al<sup>[6]</sup>对澳大利亚鸭乙型肝炎病毒(AusDHBV)进行克隆和测序, 并与其他嗜肝病毒进行比较. 在澳大利亚DHBV及其他鸟类嗜肝病毒中包括3个与病毒复制有关的重要特征: (1)69个nt粘端重叠区, 保持染色体组环状结构, 包含1对12 nt顺式重叠序列DR1(2 541-2 552 nt)和DR2(2 483-2 494 nt). (2)多聚腺苷酰信号序列(2 778-2 783 nt), 对终止病毒mRNA转录是必须的. (3)在聚合酶的TP内第96位酪氨酸残基, 是RNA衣壳体信号序列(称为ε)的结合位点, 在前基因组RNA内用于负链DNA合成. 20条已发表的鸟类嗜肝病毒比较发现, 在第500 nt部位(编码隔离片区)替代或删除突变最常见, 前-S/S基因(1 290-1 793 nt)S段和前-C段(2 524-2 652 nt), 编码RT区域, 替代和缺失很罕见, 是迄今为止所有DHBV病毒中最保守的. 嗜肝病毒RT含有的4个区域中, TP和隔离片对嗜肝病毒聚合酶是独特的, TP内的第96位酪氨酸残基可引导DNA合成, 并使聚合酶与病毒DNA共价结合, 隔离片无已知的功能, 只是将TP和其他分子连接起来, RT和RNase H包含两个已知的酶活性位点, 后者与其他相关的逆转录病毒和聚合酶是一致的<sup>[7-18]</sup>.

### 2 末端蛋白与HBV复制

HBV含3.2 kb碱基部分双链DNA基因组, 是由3.5 kb前基因组病毒转录的逆转录核壳包裹形成的. 病毒复制的第一步是HBV聚合酶识别5'-末端的前基因组RNA的核壳包裹信号ε. 利用ε的茎-环(stem-loop)结构域为模板, 聚合酶的TP域的酪氨酸残基为引物, 使聚合酶与前基因组RNA结合, 在RT作用下, 病毒RNA转化为DNA<sup>[19]</sup>. Beck et al<sup>[20]</sup>利用在兔的网状细胞裂解液(RRL)中, 产生DHBV DNA P蛋白的翻译复合物, 并且为克服该系统翻译能力有限, 影响对复合物进一步分析的缺点. 先在大肠杆菌内表达产生大量DHBV DNA P蛋白, 然后在RRL中的进行核蛋白复合物的重构. 因为以往在细菌中产生全长P蛋白的尝试没有成功, 于是单独在大肠杆菌中表达TP和RT-RNase H(RT-RH). 结果, TP和C-末端经微小修改后的RT-RH, 也能有相当量的表达, 当加入到RRL时, 能进行ε-依赖性DNA引物合成, 证明翻译后的活化. Yao et al<sup>[21]</sup>发现75% DHBV RT在转染LMH细胞中不是按已知的途径, 而是在细胞中与核心蛋白或核壳体分开存在. 在感染的鸭肝中, 未被核壳包裹的RT也是大量存在的, 他们作为亚型的序列联合体, 最易在转译后修正产生. 仅有极少的亚型

被核壳包裹成病毒核心颗粒, 没有被核壳包裹的RT大量存在于感染的鸭肝内, 以复合物的形式存在于细胞质中. RT在结构上仅有部分与核心蛋白重叠, 这种结构不受封闭的壳体的影响. 这提出了RT可能的代谢作用是转译后被调节, RT在复制周期中的作用可能比已知的要多.

嗜肝病毒(HBV)RT与前基因组RNA模板上的RNA信号 $\varepsilon$ 的特异结合, 并且靠RT自身引导(蛋白引导). 蛋白引导不仅需要病毒RT和 $\varepsilon$  RNA模板, 也需要特异的宿主细胞因子(细胞蛋白), 包括热休克蛋白Hsp90, 多种分子伴侣(cochaperone)蛋白, 还有一些不清楚的成分共同组成的核蛋白复合物. 有功能的复合物催化合成短链DNA引物, 该引物又作为 $\varepsilon$ 与TP共价结合的模板. Cho et al认为HSP90及其相关产物在DHBV感染通过RNA信号 $\varepsilon$ 与DHBV聚合酶结合对DHBV复制起重要作用. 同理, 用兔网状细胞裂解液中合成人HBV聚合酶蛋白在体外与HSP90形成联合体, HSP90用MBP共纯化, 聚合酶蛋白在HepG2细胞中表达, 提示在体内人的HBV聚合酶与HSP90相关. 为了对HSP90的作用位点进行定位, HBV聚合酶翻译的几个删除突变与抗HSP90抗体在体外共沉淀, 结果提示TP的C末端和RT单独与HSP90发生作用<sup>[22]</sup>. Cho et al<sup>[23]</sup>研究显示HBV聚合酶单独与Hsp90的N末端和C末端相互作用, Hsp90的N末端片段(1-302 aa)与HBV聚合酶的TP和RP都有相互作用, 而C末端片段(438-723 aa)仅与RT相互作用, 其中间片段(327-438 aa)则与HBV聚合酶无相互作用. Hu et al<sup>[24]</sup>研究证明DHBV RT需要宿主细胞因子的辅助进行RT与 $\varepsilon$ 的特异结合和蛋白引导功能. RT与 $\varepsilon$ 交互作用和蛋白引导需要Hsp90. Hsp90的几个辅因子在体外足以保持重组RT活性, 与 $\varepsilon$ 结合和蛋白引导. Hsp90、Hsp70、Hsp40、Hop/p60和p23均为细胞因子, Hsp90和Hsp70是ATP酶, 在ATP结合和水解时易于折叠, Hsp40能刺激Hsp70的ATP酶活性和调节Hsp70的陪伴功能. P60能与Hsp90和Hsp70结合, p23, 为小的、酸性磷蛋白质, 与Hsp90结合, 进一步提高重组动力学. RT被分子伴侣蛋白活化后是一个动力学过程, 依赖ATP水解和Hsp90 ATP酶活性. 两个截短的迷你型DHBV RT融合蛋白GST-mini-RT1和GST-miniRT2在大肠杆菌中表达并纯化, 另外还构建了不能与 $\varepsilon$  RNA结合的RT突变型Mini-RT2/CA29, 无活性的RT Mini-RT1/YMHA. 经过对蛋白引导反应和RNA结合试验, 结果, Hsp90、Hsp70、Hop、Ydj1(Hsp40)在一起能重新组成蛋白引导反应, 单独或任何两个或三个蛋白组合是无效的, 偶尔Hsp70加Ydj1能微弱刺激蛋白引导反应, 但比4种相加效力小得多. 同时, 这种蛋白引导反应与陪伴蛋白浓度呈正相关. 与RT的催化活性有关, 对失去了活性位点的突变RT完全没有蛋白引导的作用. Gyoo et al证明Hsp90可以被抗-Hsp90抗体抑制; 在体外Hsp90被含有1% NP-40的

1 M氯化钠解吸后几乎完全失去了对在昆虫细胞内表达的HBV聚合酶的引导活性. Hsp90不仅维持人HBV聚合酶与前基因组RNA结合的联合体, 而且使HBV聚合酶能胜任在体外引导作用. Hsp70是Hsp90联合体组成成分, 但Hsp70可能直接与HBV聚合酶结合不需要Hsp90参与<sup>[25]</sup>.

Park et al<sup>[26]</sup>构建了杆状病毒载体pFPolE, 编码人HBV聚合酶开放读码框架(ORF)和3'-非翻译区(NTR)含有DR2、DR1和 $\varepsilon$ 环,  $\varepsilon$ 环对引导HBV复制起模板作用. 构建的含HBV聚合酶的重组质粒经M2琼脂珠纯化, SDS-PAGE电泳及考马斯亮蓝染色后, 可得一条约60 kD蛋白带, 经N末端氨基酸测序并经BLAST程序进行同源性分析, 然后进行免疫斑点分析和体外引导试验, 结果提示分子伴侣蛋白Hsp60与HBV Pol之间有特异性的相互作用关系. Hsp60与HBV聚合酶相互作用, 是使HBV聚合酶变成活性状态的重要阶段. Hsp60在体外强烈影响HBV聚合酶活性: (1)通过蛋白特异性抗体封闭Hsp60, 可降低HBV聚合酶活性; (2)通过增加ATP中的Hsp60, 可提高聚合酶活性; (3)ATP与Hsp60共同激活HBV聚合酶. 体外试验显示, 通过C $\Delta$ 540(变异的Hsp60)可抑制细胞内的Hsp60, 可导致HBV聚合酶活性的降低. 因此, Hsp60与HBV聚合酶相互作用对激活HBV聚合酶有明显意义. 进一步在昆虫细胞中使用重组杆状病毒表达聚合酶的几个缺失突变的蛋白质, 然后用M2免疫共沉淀, 显示Hsp60结合到HBV P需要两个最小位点: TP(1-199 aa)和RH(680-842 aa). 在人的HBV宿主细胞HepG2中显示HBV P也可以与Hsp60结合; Hsp60通过与TP和RH位点结合激活HBV P, 而HBV P与Hsp60结合不需要前基因组RNA<sup>[27]</sup>.

Wang et al将C末端切断后的Mini-RT2中去掉N末端和隔离片后形成RT变异体, 观察其结合dATP的情况, 结果, RT变异体能够完成与dGTP的结合, 但不能与dATP结合. TP和RT之间相互作用与其他病毒的蛋白引物和独立的DNA聚合酶残基有着重要差异. TP、RT和 $\varepsilon$  RNA之间特殊的相互作用对嗜肝病毒的pgRNA包装是非常重要的, 同时需要C末端RNase H域. 蛋白-蛋白, 蛋白-RNA之间相互作用需要RNA包装可能强调TP-RT- $\varepsilon$  RNA之间相互制约<sup>[18]</sup>.

### 3 TP与单克隆抗体

Jasper et al用重组的人HBV聚合酶(HBV P)在感染了杆状病毒的昆虫细胞内表达并纯化产生了6个对HBV P蛋白的单克隆抗体(单抗). 单抗1B4、7C3和10B9识别聚合酶TP的20-30 aa抗原决定基, 单抗2C8识别TP的8-20氨基酸抗原决定基, 单抗8D5识别隔离片的225-250 aa抗原决定基, 单抗9F9识别RNase H的800-832 aa抗原决定基. 鼠的B细胞HBV P抗原决定基显示被定位在N-和C-末端蛋白和隔离片区域. Western blot和免疫沉淀法示: 已知单抗与聚合酶的N末端结

合, 阳性对照 M2 识别全长的聚合酶和含有 N 末端的降解产物, 1B4、2C8、7C3 识别聚合酶 N 末端抗原决定基, 8D5 识别隔离片区, 9F9 识别聚合酶 C-末端的抗原决定基. 能够免疫沉淀聚合酶的所有聚合酶单克隆抗体均经体外引导抑制试验, 了解他们在体外抑制引导酶活性的作用. 考马斯亮蓝蛋白胶显示在不同的单抗中聚合酶沉淀的量. M2 单抗作为免疫沉淀和体外引导的阳性对照. C7-57 为阴性对照. 结果, 单抗 9F9 无引导活性抑制, 2C8 的 86% 体外引导活性被抑制. 8D5 的 14% 被抑制, 等量的 1B4 和 7C3 分别有 98% 和 81% 被抑制. 提示 TP 特异的单抗能抑制聚合酶的体外引导活性. 在体外引导测试中, 只有对 TP 特异的单抗, 显示对聚合酶功能有抑制作用. 提示, 抗体介导的对 TP 的干扰可能用于检测 HBV 复制. 进一步研究出能干扰聚合酶功能的单抗, 对研究抗 HBV 复制的制剂可能有意义<sup>[17]</sup>.

#### 4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版, 北京: 人民军医出版社, 1997:83-103
- 2 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第 2 版, 北京: 人民卫生出版社, 2001:27-28
- 3 Li Z, Tyrrell DL. Expression of an enzymatically active polymerase of human hepatitis B virus in an coupled transcription-translation system. *Biochem Cell Biol* 1999;77:119-126
- 4 Kim Y, Hong YB, Jung G. Hepatitis B virus: DNA polymerase activity of deletion mutants. *Biochem Mol Biol Int* 1999;47:301-308
- 5 Kim Y, Jung G. Active human hepatitis B viral polymerase expressed in rabbit reticulocyte lysate system. *Virus Genes* 1999;19:123-130
- 6 Miriam T, Peter LE, Thien T, Marc LM, Ming Q, Christopher JB, Allison RJ. Animal: DNA viruses: sequence comparison of an Australian duck hepatitis B virus strain with other avian hepadnaviruses. *J Gen Virol* 2001;82:373-378
- 7 刘妍, 成军, 董菁, 李克, 夏小兵, 王刚, 杨继珍, 王琳. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. *肝脏* 2001;6:8-10
- 8 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:217-219
- 9 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:426-429
- 10 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王琳, 王刚, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及对其反式激活功能的影响. *解放军医学杂志* 2002;27:125-127
- 11 刘妍, 董菁, 成军, 钟彦伟, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟. 乙型肝炎病毒 X 蛋白及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. *解放军医学杂志* 2001;26:404-406
- 12 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列准种个体化特征的研究. *解放军医学杂志* 2002;27:119-121
- 13 董菁, 刘妍, 皇甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原一级结构多态性的初步研究. *胃肠病学和肝病学杂志* 2002;11:130-135
- 14 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:472-474
- 15 Wang XT, Grammatikakis N, Hu JM. Role of p50/CDC37 in Hepadnavirus assembly and replication. *J Biol Chem* 2002;277:24361-24367
- 16 Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33:751-757
- 17 zu Putlitz J, Lanford RE, Carlson RI, Notvall L, de la Monte SM, Wands JR. Properties of monoclonal antibodies directed against hepatitis B virus polymerase protein. *J Virol* 1999;73:4188-4196
- 18 Wang XT, Hu JM. Distinct requirement for two stages of protein-primed Initiation of reverse transcription in hepadnaviruses. *J Virol* 2002;76:5857-5865
- 19 Tang H, McLachlan A. A pregenomic RNA sequence adjacent to DR1 and complementary to epsilon influences hepatitis B virus replication efficiency. *Virology* 2002;303:199-210
- 20 Beck J, Nassal M. Reconstitution of a functional duck hepatitis B virus replication initiation complex from separate reverse transcriptase domains expressed in *Escherichia coli*. *J Virol* 2001;75:7410-7419
- 21 Yao E, Gong YH, Chen N, Tavis JE. The majority of duck hepatitis B virus reverse transcriptase in cells is nonencapsidated and is bound to a cytoplasmic structure. *J Virol* 2000;74:8648-8657
- 22 Cho G, Park SG, Jung G. Localization of HSP90 binding sites in the human hepatitis B virus polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:191-196
- 23 Cho G, Suh SW, Jung G. HBV polymerase interacts independently with N-terminal and C-terminal fragments of Hsp90beta. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:203-211
- 24 Hu JM, David T, Dana A, Wang XT. In vitro reconstitution of functional hepadnavirus reverse transcriptase with cellular chaperone proteins. *J Virol* 2002;76:269-279
- 25 Gyoo Park S, Kyung Rho J, Jung G. Hsp90 makes the human HBV Pol competent for in vitro priming rather than maintaining the human HBV Pol/pregenomic RNA complex. *Arch Biochem Biophys* 2002;401:99-107
- 26 Park SG, Jung G, Human Hepatitis B virus polymerase interacts with the molecular chaperonin Hsp60. *J Virol* 2001;75:6962-6968
- 27 Park SG, Lim SO, Jung G. Binding site analysis of human HBV pol for molecular chaperonin, hsp60. *Virology* 2002;298:116-123

## 乙型肝炎病毒 DNA 多聚酶 P 结构域研究进展

陈国凤, 成军, 王琳, 张玲霞, 李莉

陈国凤, 成军, 王琳, 张玲霞, 李莉, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039 国家自然科学基金项目, No. C39970674, No. C03011402, No. C39900130, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目 No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135 项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

陈国凤, 成军, 王琳, 张玲霞, 李莉. 乙型肝炎病毒 DNA 多聚酶 P 结构域研究进展. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):393-397

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/393.asp>

### 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)属嗜肝 DNA 病毒属, 是一组以侵袭肝脏为主的病毒, 主要感染哺乳动物和鸟类. HBV DNA 的长度为 3.2 kb, 具有 4 个开放读码框架(ORF), 分别编码 HBV 的表面抗原蛋白, 核心/e 抗原蛋白, X 蛋白以及 HBV DNA 多聚酶(HBV DNA P)<sup>[1]</sup>. HBV DNA P 基因在 ORF 中最长, 并且与 C、S、X 基因区有重叠,

其编码的P蛋白含有N-末端蛋白(TP)、逆转录酶(RT)/DNA多聚酶、RNase H和隔离片(spacer, SP)等4个结构域,各结构域分别位于2307-2840 nt、133-1128 nt、1129-1621 nt和2841-0-132 nt<sup>[2]</sup>。目前对多聚酶及其所编码的各个结构域的研究取得了一定的进展。

### 1 多聚酶结构域的结构和功能

嗜肝病毒逆转录酶(多聚酶)含有的4个区域中,末端蛋白和隔离片对嗜肝病毒多聚酶是独特的,末端蛋白内的第96位酪氨酸残基可引导DNA合成,并使多聚酶与病毒DNA共价结合,隔离片无已知的功能,只是将末端蛋白和其他分子连接起来,逆转录酶和RNase H包含2个已知的酶活性位点,后二者与其他相关的逆转录病毒和逆转录因子的多聚酶是一致的<sup>[3-6]</sup>。Lott et al用昆虫细胞同时感染独立表达核心蛋白和多聚酶的杆状病毒,结果发现核心蛋白与多聚酶相互作用的几个特征:(1)核心蛋白与表达全长的多聚酶及多聚酶的TP、RT、RNase H每个区域共同沉淀;(2)核心蛋白的共同沉淀不依赖 $\epsilon$ 凸出环序列;(3)核心蛋白-多聚酶复合物在蔗糖梯度分析中作为完整的衣壳体移动。为分辨核心蛋白识别多聚酶的必备的结构和序列,用突变的核心蛋白,如2-4个氨基酸插入或羧基端缺失突变,观察与多聚酶的相互作用。结果提示核壳体构成是必需的,但对于同多聚酶相互作用是不够的,多聚酶的TP和RT与核心蛋白的相互作用有不同需要。为了解核心蛋白在多聚酶上的结合位点,对一组多聚酶的TP和RT结构域的N-末端和C-末端缺失突变体与核心蛋白的相互作用进行观察,至少检出多聚酶上的3个独立的核心蛋白结合位点<sup>[7]</sup>。Lin et al研究两个自然发生的HBV颗粒56和2-18,核酸序列有98.7%的同源性,但是复制效率不同。转染到HepG2细胞后,从56转染细胞的细胞内病毒核心颗粒分离出的HBV DNA明显高于2-18。用功能域基因替代法研究二者复制效率差异的结构基础。将2-18中的完整P基因和TP、SP、RT和RNase H分别用56相应区域替代形成长嵌合基因组。细胞转染分析提示,2-18的全部P基因组用56的P基因替代使病毒复制轻度增强。惟一获得像56颗粒体的高复制效率的嵌合基因组是用56的RT替代2-18的RT的基因组。在RT区域内,2-18与56的氨基酸差异在617位(蛋氨酸对亮氨酸)、652位(丝氨酸对脯氨酸)、682位(缬氨酸对亮氨酸)。652位氨基酸上的点突变是这种复制效率差异的原因。HBV RT结构域的同源性模型研究提示652位氨基酸残基从脯氨酸到丝氨酸突变可能影响对模板-引物相互作用的HBV RT的构造,导致多聚酶活性减弱<sup>[8]</sup>。Li et al在T7噬菌体启动子的调控下构建HBV多聚酶cDNA并在兔的网状细胞裂解液中表达,组成一对转录翻译系统。在指定位点的突变中进一步证实重组多聚酶cDNA产生3种产物:全长蛋白(约94 kD),内在的始动蛋白(约81 kD),N-末端蛋白(约40 kD)。体

外表达的多聚酶具有蛋白引物的活性,由体外<sup>32</sup>P标记的-dGTP全长多聚酶和TP引导的检测可得到证实<sup>[9]</sup>。Kim et al对人HBV多聚酶的N-末端或C-末端和DNA多聚酶的结构域同时缺失形成变异株,并在大肠杆菌中表达,经直链淀粉柱层析法纯化后,其纯化蛋白的DNA依赖性DNA多聚酶活性与野毒株进行比较,结果TP与SP缺失分别可以使酶活性减少到70%,而RNase H缺失对多聚酶活性的影响要大于前二者。单个RT或将其N-末端缺失仍能保持酶活性<sup>[10]</sup>。将人的HBV多聚酶在兔网状细胞裂解系统中表达。表达蛋白显示出DNA依赖性的DNA多聚酶活性,在体外转录和翻译产生分子量大约100 kD的大蛋白。HBV DNA多聚酶pH 7.5和温度37℃时聚合反应最佳,同时,多聚酶活性需要有MnCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>(最好是MnCl<sub>2</sub>)。在75 mM NaCl或100 mM KCl存在时活性较好(以75 mM NaCl时更好)<sup>[11]</sup>。Miriam et al对澳大利亚鸭乙型肝炎病毒(AusDHBV)进行克隆和测序,并与其他嗜肝病毒进行比较。在澳大利亚DHBV及其他鸟类嗜肝病毒中包括3个与病毒复制有关的重要特征:(1)69个nt粘端重叠区,保持染色体组环状结构,包含1对12 nt顺式重叠序列DR1(2 541-2 552 nt)和DR2(2 483-2 494 nt);(2)多聚腺苷酰信号序列(2 778-2 783 nt),对终止病毒mRNA转录是必须的;(3)在多聚酶的TP内第96位酪氨酸残基,是RNA衣壳体信号序列(称为 $\epsilon$ )的结合位点,在前基因组RNA内用于负链DNA合成。20条已发表的鸟类嗜肝病毒比较发现,在第500 nt部位(编码隔离片区)替代或缺失突变最常见,前-S/S基因(1 290-1 793 nt)S段和前-C段(2 524-2 652 nt),编码逆转录酶区域,替代和缺失很罕见,是迄今为止所有DHBV病毒中最保守的<sup>[12]</sup>。

### 2 多聚酶与细胞因子

Hu et al认为HBV逆转录的过程通过独特的蛋白引导机制开始的。病毒逆转录酶首先以他的RNA模板装配成核蛋白(RNP)复合物,然后逆转录酶本身作为蛋白质引物开始DNA的合成。RNP形成和蛋白引导需要宿主细胞因子的辅助,包括分子伴侣热休克蛋白90(HSP90)。研究发现:(1)通过构建两个迷你RT(miniRT)表达片段,pcDNA-miniRT1(miniRT1)将改建后的DHBV RT多肽的N-末端(1-17 aa),C-末端(734-786 aa),隔离片(245-352 aa)切除;pcDNA-miniRT2(miniRT2)在miniRT1基础上将C-末端进一步截短(575-786 aa)。MiniRT1含564个残基(野毒株786残基),MiniRT2含394残基。MiniRT1与野毒株RT一样具有蛋白引导功能,MiniRT2具有完整的 $\epsilon$ 结合的活性,但是仅有极少的蛋白引导活性(为野毒株的1-5%)。这两个mini-RT蛋白含有与HSP90和p23相关的结合域。再者,同全长RT一样,他们需要陪护蛋白进行 $\epsilon$ 结合和蛋白引导。HSP90能识别TP和RT域上的两个特异区域,含有两个陪护蛋白结合区域的截短逆转录酶(mini-RT)蛋白保留了全部的 $\epsilon$ 结合活性,

对RNP形成和蛋白引导是必要的; (2)在体外用高浓度的盐和非离子洗涤液使逆转录酶和细胞因子(HSP90)解离,单独表达逆转录酶,纯化的逆转录酶失去了 $\epsilon$ 结合和蛋白引导的功能.但含有HSP90和ATP的网状细胞裂解液能恢复这种功能.一种特殊的HSP90抑制剂,在 $\epsilon$ 结合前加入,能降低MiniRT1的蛋白引导活性.然而,如果 $\epsilon$ 已经与mini-RT结合(在翻译反应时)后再加入,则对蛋白引导无作用.说明药物特异性的阻滞 $\epsilon$  RNA与mini-RT相互作用,对DNA合成本身无作用.HSP90对RT与RNA的结合,不仅起到建立的功能,而且还有维护的功能;(3)在RT合成过程中不需要HSP90,但HSP90可激活转译后的RT.在细菌中成功表达两个mini-RT蛋白并且用亲和素标记纯化.用真核细胞提取液重构时,纯化的RT蛋白具有特异的 $\epsilon$ 结合和蛋白引导活性.RT活性的重构是依赖ATP的过程和需要HSP90功能.细菌没有功能性的真核细胞HSP90陪伴系统,提示RT合成不需要HSP90,只不过在转译后能激活RT<sup>[13]</sup>.进一步研究证明HSP90的几个辅因子(cochaperone)在体外足以保持重组DHBV逆转录酶的 $\epsilon$ 结合和蛋白引导活性,维护重组逆转录酶活性需要HSP90、HSP70、HSP40、Hop/p60等4种蛋白,逆转录酶被陪伴蛋白激活是一个动力学过程,需要ATP水解和HSP90 ATP酶活性.HSP90和HSP70是ATP酶,在ATP结合和水解时易于折叠,HSP40能刺激HSP70的ATP酶活性和调节HSP70的陪护功能.p60能与HSP90和HSP70结合,p23为小的酸性磷蛋白质,与HSP90结合,进一步提高重组动力学.2个截短的迷你型DHBV RT与谷胱甘肽S-转移酶(GST)形成融合蛋白GST-miniRT1和GST-miniRT2,在大肠杆菌中表达并纯化,另外还构建了有两个氨基酸替换而不能与 $\epsilon$  RNA结合的突变型MiniRT2/CA29和在RT的活性位点两个氨基酸替换(YMDD变成YMHA),使RT失去活性的MiniRT1/YMHA.在重构蛋白引导反应中,显示在兔的网状细胞裂解液中,依靠HSP90的存在,GST-miniRT1在体外有强烈的蛋白引导活性.用已知的HSP90陪伴联合体的组成成分代替兔的网状细胞裂解液,刺激蛋白引导,结果,HSP90、HSP70、Hop,和Ydj1(HSP40),在一起能重新组成蛋白引导反应,单独或任何2个或3个蛋白组合几乎是无效的,偶尔HSP70加Ydj1能微弱刺激蛋白引导反应,但比4种相加效力小得多.同时,这种蛋白引导反应与陪伴蛋白浓度呈正相关.4种纯化的陪伴蛋白重新组成的蛋白引导活性较网状细胞裂解液要低,可能是二者动力学差异所致.适当延长作用时间,可以使陪伴蛋白的引导活性提高.蛋白引导与RT的催化活性有关,miniRT1/YMHA因失去了活性位点的突变RT完全没有蛋白引导的作用<sup>[14]</sup>.Wang et al构建了在逆转录酶的C-末端截短的DHBV RT(DHBV mini-RT蛋白)具有全部的蛋白引导活性,即第一个核苷共价结合到蛋白质(RT的脱氧核苷酸).但没有任何DNA聚合作

用.另一个RT区域的短小序列特点是对逆转录酶的脱氧核苷酸是无关紧要的,但对于DNA的聚合作用却是必不可少的.这些结果揭示了蛋白引导的2个不同阶段,即第1个核苷与RT(RT脱氧核苷酸或蛋白引导的起点)的首次接触,和随后的DNA合成(聚合)成完整的蛋白引物.用两个模型观察在蛋白引导反应中2个不同阶段对不同序列片段的要求.体外蛋白引导反应时用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 标记核苷前体. MiniRT2的蛋白引导活性与MiniRT1相近. MiniRT2能与GTAA DNA寡聚体的第1个核苷(dGMP)共价结合,说明能进行引导反应的第1步(dGMP与RT结合,形成RT脱氧核苷酸),但是不能与第2、第3个核苷dAMP结合,也不能与第2个核苷TMP结合.而MiniRT1的降解产物与MiniRT2分子量大小相似者能与 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$ 结合,但与 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 或 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{TTP}$ 仅有微量结合.相反,MiniRT1的稍长一点的降解产物(介于MiniRT1和MiniRT2之间),则可以完整的MiniRT1一样,能够与上述3种核苷结合.用哺乳动物细胞纯化的MiniRT2与上述从细菌中纯化的MiniRT2在蛋白引导和反应条件方面相似.构建另一条C-末端截短的RT片段,其位置选在MiniRT1(734位aa)和MiniRT2(575位aa),以便找出在蛋白引导反应中对DNA聚合是重要的(而对开始是无关紧要的)序列.切断位点选在PmlI酶切位点(661位aa),仍能保证相当量的dGTP和dATP结合,提示RT的C-末端125个氨基酸(661-786 aa)对蛋白引导反应无影响,而557-661的81个氨基酸序列可能为蛋白引导的开始阶段向聚合阶段转变所必需.TP、RT和 $\epsilon$ RNA之间特殊的相互作用对嗜肝病毒的pgRNA包装是非常重要的,同时需要C-末端RNase H域.蛋白-蛋白、蛋白-RNA之间相互作用需要RNA包装可能强调TP-RT-RNA之间相互制约<sup>[6]</sup>.Cho et al认为HSP90及其相关产物在DHBV感染通过RNA信号 $\epsilon$ 与DHBV多聚酶结合对DHBV复制起重要作用.同理,用兔网状细胞裂解液中合成人HBV多聚酶蛋白在体外与HSP90形成联合体,HSP90用MBP共纯化,多聚酶蛋白在HepG2细胞中表达,提示在体内人的HBV多聚酶与HSP90相关.为了对HSP90的作用位点进行定位,HBV多聚酶翻译的几个缺失突变与抗HSP90抗体在体外共沉淀,结果提示TP的C-末端和RT单独与HSP90发生作用<sup>[15]</sup>.Cho et al研究显示HBV多聚酶单独与HSP90的N-末端和C-末端相互作用,HSP90的N-末端片段(1-302 aa)与HBV多聚酶的TP和RP都有相互作用,而C-末端片段(438-723 aa)仅与RT相互作用,其中间片段(327-438 aa)则与HBV多聚酶无相互作用<sup>[16]</sup>.Gyoo et al证明HSP90可以被抗-HSP90抗体抑制;在体外HSP90被含有1%NP-40的1M NaCl解吸后几乎完全失去了对在昆虫细胞内表达的HBV多聚酶的引导活性.人HBV多聚酶与前基因组RNA结合与鸭HBV多聚酶不同,HSP90不仅维持人HBV多聚酶与前基因组RNA结合的联合体,而

且使HBV多聚酶能胜任在体外引导作用。HSP70是HSP90联合体组成成分,但HSP70可能直接与HBV多聚酶结合不需要HSP90参与<sup>[17]</sup>。Park et al 构建了杆状病毒载体pFPoIE,编码人HBV多聚酶开放读码框架(ORF)和3'-非翻译区(NTR)含有DR2、DR1和 $\epsilon$ 凸出环, $\epsilon$ 凸出环对引导HBV复制起模板作用。构建的含HBV多聚酶的重组质粒经M2琼脂珠纯化,SDS-PAGE电泳及考马斯亮蓝染色后,可得一条约60 kD的蛋白质带,经N-末端氨基酸测序并经BLAST程序进行同源性分析,然后进行免疫斑点分析和体外引导试验,结果提示陪伴蛋白(chaperonin)HSP60与HBV P之间有特异性的相互作用关系。HSP60与HBV多聚酶相互作用,是使HBV多聚酶变成活性状态的重要阶段。HSP60在体外强烈影响HBV多聚酶活性:(1)通过蛋白特异性抗体封闭HSP60,可降低HBV多聚酶活性;(2)在ATP存在的情况下增加HSP60,可提高多聚酶活性;(3)ATP与HSP60共同激活HBV多聚酶。体内试验显示,通过C $\Delta$ 540(变异的HSP60)抑制细胞内的HSP60,可导致HBV多聚酶活性的降低。因此,HSP60与HBV多聚酶相互作用对激活HBV多聚酶是有明显意义的<sup>[18]</sup>。进一步在昆虫细胞中使用重组杆状病毒表达多聚酶的几个缺失突变的蛋白质,然后用M2免疫共沉淀,显示HSP60结合到HBV P需要两个在P上的最小位点:TP(aa1-199)和RH(680-842 aa)。在人的HBV宿主细胞HepG2中显示HBV P也可以与HSP60结合;HSP60通过与TP和RH位点结合激活HBV P,而P与HSP60结合不需要前基因组RNA<sup>[19]</sup>。Wang et al 发现HSP90的靶蛋白从类固醇受体和蛋白激酶到逆转录酶,这些蛋白之间从结构到功能均无相似之处。用PropSearch软件分析,发现RT与丝氨酸/苏氨酸的蛋白激酶c-Raf在氨基酸组成上高度相似。丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸-蛋白激酶(CDK4和v-Src)是HSP90的靶蛋白,p50(CDC37)是HSP90的辅因子,p50能与这些激酶和HSP90特异结合。发现p50/CDC37能在体内及体外与RT特异性相互作用。其意义在于p50/CDC37能调节RT的体外蛋白引导活性和在转染细胞中RNA包装和DNA合成活性。证明p50/CDC37是宿主细胞进行嗜肝病毒复制时的辅因子。在细菌中表达并纯化的GST-MiniRT蛋白用结合到单抗M2珠上的纯化的p50 孵化,结果,GST-MiniRT1和GST-MiniRT2能直接与p50和p50 $\delta$ C(变异的p50)结合,提示,DHBV RT能在体外直接与p50结合,不需要HSP90或其他细胞因子参与。细胞内试验也提示,mini-RT蛋白和TP在没有HSP90的情况下直接与p50结合<sup>[3]</sup>。

### 3 多聚酶结构域与抗病毒治疗

全球有3亿以上人口成为HBV的慢性携带者,HBV感染是一个严重的公共健康问题。慢性HBV携带的最大危害是发展为肝硬化和肝癌<sup>[13, 20-25]</sup>。核苷类似物如拉米夫定等是目前效果较好的抗病毒治疗制剂,但长期抗病

毒治疗(大于6 mo)可引起病毒变异,病情反复,甚至病情急剧加重,导致死亡<sup>[26-29]</sup>。最常见的病毒变异为多聚酶结构域的(YMDD)的第204位蛋氨酸被异亮氨酸取代(M204I)(ATG $\rightarrow$ ATT)成为YIDD,或蛋氨酸被缬氨酸取代(M204V)成为YVDD<sup>[4, 26-27]</sup>,其他病毒变异还有426位亮氨酸被异亮氨酸取代(L426I)和550位蛋氨酸被异亮氨酸取代(M550I),以及L528M, M552V, M552I<sup>[28]</sup>变异, L526M、M550V、M550I<sup>[29]</sup>等。因此,掌握抗病毒治疗和停药的正确时机,克服病毒变异是提高治疗成功率的关键。

### 4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1997:83-103
- 2 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:27-28
- 3 Wang X, Grammatikakis N, Hu J. Role of p50/CDC37 in hepadnavirus assembly and replication. *J Biol Chem* 2002; 277:24361-24367
- 4 Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33:751-757
- 5 zu Putlitz J, Lanford RE, Carlson RI, Notvall L, de la Monte SM, Wands JR. Properties of monoclonal antibodies directed against hepatitis B virus polymerase protein. *J Virol* 1999;73:4188-4196
- 6 Wang X, Hu J. Distinct requirement for two stages of protein-primed initiation of reverse transcription in hepadnaviruses. *J Virol* 2002;76:5857-5865
- 7 Lott L, Beames B, Notvall L, Lanford RE. Interaction between hepatitis B virus core protein and reverse transcriptase. *J Virol* 2000;74:11479-11489
- 8 Lin X, Yuan ZH, Wu L, Ding JP, Wen YM. A single amino acid in the reverse transcriptase domain of hepatitis B virus affects virus replication efficiency. *J Virol* 2001;75:11827-11833
- 9 Li Z, Tyrrell DL. Expression of an enzymatically active polymerase of human hepatitis B virus in a coupled transcription-translation system. *Biochem Cell Biol* 1999;77:119-126
- 10 Kim Y, Hong YB, Jung G. Hepatitis B virus: DNA polymerase activity of deletion mutants. *Biochem Mol Biol Int* 1999;47:301-308
- 11 Kim Y, Jung G. Active human hepatitis B viral polymerase expressed in rabbit reticulocyte lysate system. *Virus Genes* 1999;19:123-130
- 12 Triyatni M, Ey P, Tran T, Le Mire M, Qiao M, Burrell C, Jilbert A. Sequence comparison of an Australian duck hepatitis B virus strain with other avian hepadnaviruses. *J Gen Virol* 2001; 82(Pt 2):373-378
- 13 Hu JM, Anselmo D. In Vitro reconstitution of a functional duck hepatitis B virus reverse transcriptase: posttranslational activation by HSP90. *J Virol* 2000;74:11447-11455
- 14 Hu J, David T, Dana A, Wang XT. In vitro reconstitution of functional hepadnavirus reverse transcriptase with cellular chaperone proteins. *J Virol* 2002;76:269-279
- 15 Cho G, Park SG, Jung G. Localization of HSP90 binding sites in the human hepatitis B virus polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:191-196
- 16 Cho G, Suh SW, Jung G. HBV polymerase interacts independently with N-terminal and C-terminal fragments of HSP90beta. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 274: 203-211
- 17 Gyoo Park S, Kyung Rho J, Jung G. HSP90 makes the human HBV Pol competent for in vitro priming rather than maintaining the human HBV Pol/pregenomic RNA complex. *Arch Biochem Biophys* 2002;401:99-107
- 18 Park SG, Jung G. Human Hepatitis B virus polymerase interacts with the molecular chaperonin Hsp60. *J Virol* 2001;75: 6962-6968

- 19 Park SG, Lim SO, Jung G. Binding site analysis of human HBV pol for molecular chaperonin, HSP60. *Virology* 2002; 298:116-123
- 19 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:472-474
- 20 刘妍, 成军. HBV 截短的表面抗原蛋白 MHBs<sup>s</sup> 的反式激活作用. *国外医学病毒学分册* 2000;27:10-13
- 21 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:217-219
- 22 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:426-429
- 23 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王琳, 王刚, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及对其反式激活功能的影响. *解放军医学杂志* 2002; 27:125-127
- 24 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列准种个体化特征的研究. *解放军医学杂志* 2002;27: 119-121
- 25 董菁, 刘妍, 皇甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原一级结构多态性的初步研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2002;11:130-135
- 26 Ben-Ari Z, Mor E, Tur-Kaspa R. Experience with lamivudine therapy for hepatitis B virus infection before and after liver transplantation, and review of the literature. *J Intern Med* 2003;253:544-552
- 27 Ogata N, Ichida T, Aoyagi Y, Kitajima I. Development of peptide nucleic acid mediated polymerase chain reaction clamping (PMPC)-direct sequencing method for detecting lamivudine-resistant hepatitis B virus (HBV) variants with high sensitivity and specificity. *Rinsho Byori* 2003;51:313-319
- 28 Wang JH, Lu SN, Lee CM, Lee JF, Chou YP. Fatal hepatic failure after emergence of the hepatitis B virus mutant during lamivudine therapy in a patient with liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:366-369
- 29 Ben-Ari Z, Daudi N, Klein A, Sulkes J, Papo O, Mor E, Samra Z, Gadba R, Shouval D, Tur-Kaspa R. Genotypic and phenotypic resistance: longitudinal and sequential analysis of hepatitis B virus polymerase mutations in patients with lamivudine resistance after liver transplantation. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:151-159

## 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对转录因子 ATF - 1 的调节

王春花, 成军, 郎振为, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕

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

郎振为, 首都医科大学佑安医院病理科 北京市 100054  
国家自然科学基金项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目 No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

王春花, 成军, 郎振为, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对转录因子 ATF - 1 的调节. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):397-400

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/397.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)的感染, 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌(HCC)的发生密切相关. 虽然HBV和HCV感染与HCC之间的关系已经得到确定, 但是具体的分子生物学机制还不十分清楚. 由于肝炎病毒可以影响肝细胞信号转导, 引起细胞的病变及恶性转化<sup>[1]</sup>, 而激活转录因子 - 1 (activating transcription factor - 1, ATF - 1)是重要的细胞信号转导途径中的转录因子, 因此深入研究二者的相互关系对肝炎病毒的发病机制研究有进一步的帮助.

### 1 激活转录因子 - 1 的结构和功能特点

激活转录因子 - 1 是一种具有碱性 - 亮氨酸拉链结构 (basic leucine zipper, bZIP) 的 cAMP 应答元件结合的蛋白质 (cAMP - responsive element binding protein, CREB) 家族中的转录因子, 具有广泛的转录调节作用.

1.1 CREB 家族 碱性 - 亮氨酸拉链家族结构的特点是蛋白质分子的肽链上每隔 6 个氨基酸就有一个亮氨酸残基, 结果就导致这些亮氨酸残基都在  $\alpha$  螺旋的同一个方向出现. 两个相同结构的链排亮氨酸残基就能以疏水键结合成二聚体, 该二聚体的另一端的肽段富含碱性氨基酸残基, 借其正电荷与 DNA 双螺旋链上带负电荷的磷酸基团结合. 若不形成二聚体则对 DNA 的亲合力明显降低. 亮氨酸拉链是最简单的二聚作用界面之一. 它能够介导有高度选择性的, 非常重要的蛋白质结合作用. 他最早是作为 C/EBP 和 GCN4 蛋白中序列以及许多转录因子相互作用的界面而被鉴定和认识的. 这些蛋白质可以识别两类 DNA 元件: AP - 1/TRE 和 ATF/CRE 序列. AP - 1/TRE 元件有保守的 TGACTCA, 他是一个拟二元对称. 与这个位点结合的蛋白质包括 Fos 和 Jun 家族, 他们可以被促进有丝分裂的、诱导分化的和神经原专一的刺激所诱导. 但是, 来自与 CREB 家族的转录因子虽然也有亮氨酸拉链, 他们却不与 DNA 中的 AP - 1 结合位点相互作用, 而去与 DNA 序列中的 ATF/CRE 元件结合, 其含有 TGACGTCA 保守序列, 他是一个二元对称. 与这个位点结合的蛋白质基因的表达与 cAMP、钙和病毒所诱导的反应有关

通过利用 cAMP 应答元件 (CRE) 寡核苷酸探针筛选细菌  $\lambda$  gt11 表达文库<sup>[2]</sup>和参照纯化的 CREB 蛋白的氨基酸序列而设计的寡核苷酸引物进行的多聚酶链反应 (PCR) 扩增<sup>[3]</sup>得到了 CREB 的 cDNAs. 随后陆续鉴定出 CREB 家族的另两个成员: ATF - 1 和 cAMP 反应元件调节器 (cAMP response element modulator, CREM)<sup>[4]</sup>. CREB 家族的这 3 个成员 (CREB、CREM、ATF - 1) 都包含一致的蛋白激酶 A (PKA) 磷酸化位点在体内都可被 cAMP 调节. 经由羧基端的碱性 - 亮氨酸拉链基序<sup>[5]</sup>, 这也是另外几个核内因子 ATF - 2、jun、fos、myc<sup>[6]</sup>的保守序列, CREB, ATF - 1、CREM 以二聚体形式结合到 DNA 上. 尽管亮氨酸拉链的二聚化作用结构域被认为能

促进与其他 bZIP 家族成员的异二聚体形成, 但 CREB 蛋白家族主要倾向于以同型二聚体形式结合到靶位点<sup>[5]</sup>. CREB 家族成员在将细胞外刺激所诱发的细胞内信号传入细胞核的过程中起着重要的作用. 细胞外的信号(配体)与细胞表面的信号接受装置 - 受体相互作用, 激活了 AMP 环化酶, 使细胞内 cAMP 的量大为增加. cAMP 与 PKA 的调节亚基结合, PKA 的催化亚基则将向细胞核移行的 CREB 蛋白磷酸化. 这时, CREB 的第 133 位丝氨酸残基被磷酸化, CREB 也因而活化, 并促使其靶基因表达<sup>[7-10]</sup>. CREM 是一种与 CREB 高度同源的蛋白, 与 CREB 均一表达于几种细胞类型不同, 其表达具有细胞特异性<sup>[4]</sup>. CREM 具有显著不同的结构, 是由于在终止密码子的下游存在一个额外的 DNA 结合域. 通过 PCR 和 RNA 酶保护分析鉴定出 3 种 mRNA 亚型, 猜测是由于不同的细胞特异性的拼接, 亚型的序列分析表明对于两个 DNA 结合域存在选择性. CREM 同 CREB 一样能高效特异性结合到 CRE 元件上, 但相反的是其下调 cAMP 诱导的转录.

1.2 ATF-1 功能特点 ATF-1 和 CREB 整体上大约有 70% 的同源性, 而在他们的 DNA 结合域、二聚化作用域和激酶诱导域同源性达到 90%<sup>[11]</sup>. 在激酶可诱导区域中包含许多不同激酶的磷酸化位点<sup>[11-21]</sup>. 在这一结构域中, 特异性的 ATF-1 第 63 位丝氨酸或 CREB 第 133 位丝氨酸的磷酸化, 能诱导出其与共激活因子 p300 和 CREB 结合蛋白的稳定作用<sup>[22-25]</sup>. Masson et al<sup>[17]</sup> 对 ATF-1 保守序列在体外磷酸化的研究中发现一个或更多关键性丝氨酸残基对于磷酸化诱导的 ATF-1 的构象改变是必需的. 这些重要的丝氨酸定位于假定的转录激活域, 并且影响 ATF-1 与 DNA 结合的稳定性. 有趣的是 ATF-1 的同型二聚体化和 ATF-1 与 DNA 的结合能调节磷酸化. 并且其中一个关键的对于磷酸化必需的丝氨酸残基并不存在于 CREB 和 CREM 的保守区域中, 这暗示着其很可能与 ATF-1 的某些特殊功能有关.

ATF-1 与 MAPK 信号传导途径密切相关. Gupta et al<sup>[18]</sup> 发现表皮生长因子(EGF)诱导 c-jun 的表达需要 ATF-1 和 c-jun 启动子上 MEF2 位点. c-jun 启动子激活需要 ATF1 第 63 位丝氨酸的磷酸化. ATF1 第 63 位由丝氨酸到丙氨酸的突变能阻断 EGF 对转染的 c-jun 基因的诱导. ATF-1 能被丝裂原和应急激活蛋白激酶 1(mitogen- and stress-activated protein kinase 1, MSK1)磷酸化, 而 MSK1 能被 EGF 和 ERK1/2 激活. MEK1 抑制剂 U0126 和显负性 MEK1 进一步表明 MSK1 的激活和 c-jun 的诱导需要 ERK 途径. 相反 JNK 抑制剂能阻断 EGF 诱导的 c-jun 的表达而不能阻止 ATF1 的磷酸化. 由此认为 MAPK 的两条途径, ERK 和 JNK 对于 EGF 诱导的 c-jun 的表达都是必须的, 但 ERK 途径承接于 ATF-1 磷酸化下游. Wiggin et al<sup>[19]</sup> 利用鼠 MSK1 和 MSK2 敲除实验发现在原代胚胎纤维细胞中这些激酶对于应激诱导的转录因子 CREB 和 ATF-1 磷酸化是必需的, 相反有丝分裂

原诱导的这二者的磷酸化明显减少, 但没完全消失. MAPK/p38 信号传导途径也参与了 ATF-1 的磷酸化. Tang et al<sup>[20]</sup> 在利用人类角化细胞研究 cAMP 反应元件对于 UVB 诱导环氧合酶(cyclooxygenase-2, COX-2)转录作用时也证实了此观点. 电泳迁移率分析表明 CREB 和 ATF-1 经 UVB 治疗后都可磷酸化, SB202190 是 MAPK/P38 抑制剂, 能减少 CREB/ATF-1 磷酸化抑制 COX-2 启动子活性. 相反, 叉头蛋白(forskolin)作为腺苷酸环化酶激活剂可导致 CREB/ATF-1 磷酸化, 进而激活 COX-2 启动子. 于是经 UVB 诱导后可观察到磷酸化的 CREB/ATF-1 与 COX-2 CRE 的结合增强. 这样 UVB 诱导的人类 COX-2 表达的一条信号途径为 MAPK/P38 激活, 随后 CREB/ATF-1 磷酸化表现出与 DNA 结合增强, 从而激活 COX-2 表达.

ATF-1 与多种肿瘤的致癌机制密切相关. BRCA1 是一种肺癌和卵巢癌的易感基因, 其氨基端包含环指(ring finger)结构, 能介导蛋白和蛋白间的相互作用, 羧基端能激活转录和 RNA 聚合酶相互作用. Houvras et al<sup>[21]</sup> 利用酵母双杂交系统证实 BRCA1 环指和 ATF-1 间存在相互作用. 在体外, 酵母和人细胞内都能发生生理上的结合. BRCA1 不但能促进瞬时转染的包含 cAMP 反应元件的报告基因的转录, 也能促进自然普通的启动子例如肿瘤坏死因子  $\alpha$  的转录, 但这种方式必须依赖 cAMP 反应元件的完整性. 这些结果表明 BRCA1 在 ATF-1 转录激活过程中的作用是通过 ATF-1 定位于某些靶基因, 这些基因参与了对 DNA 损伤的转录反应.

与软组织透明细胞肉瘤发生有关的常见染色体 t(12;22)(q13; q12)的置换移位导致 EWS-ATF-1 嵌合蛋白形成, 其可作为一种基本转录激活因子. Araya et al<sup>[22]</sup> 认为 ATF-1 能通过染色体上的置换移位与 EWS 基因融合而有利于 Ewing 肉瘤和其他恶性肿瘤的发生. CBP/p300 作为转录共激活因子, 能将各种转录因子连接传递到基本转录单位上, 参与了转录激活、细胞生长分化和细胞周期调控. Fujimura et al<sup>[23]</sup> 在此基础上发现 EWS-ATF-1 结构上无论在体内体外均能与 CBP 结合. EWS 和 ATF-1 的融合结构域对于这种相互作用是必需的, 并且 EWS-ATF-1 可抑制 p53/CBP 介导的反式激活功能, 而 CBP 的过表达能抵消 EWS-ATF-1 这种抑制作用. 作者认为 EWS-ATF-1 致癌机制之一就是作用于 CBP/p300, 进而导致 p53 功能丧失. 该新型致癌机制可能也是其他相关实体瘤的发生原因.

Jean et al<sup>[24]</sup> 发现在转移性黑色素瘤细胞中 ATF-1 和 CREB 的表达是上调的. 并且鉴定出两种可以解释 CREB/ATF-1 促进转移性显型的作用机制. 其一是通过调节 CRE 依赖的金属硫蛋白酶 MMP-2 和黏附分子 MCAM/MUC18 基因的表达在肿瘤侵袭过程中发挥重要作用; 在第二条机制中, CREB/ATF-1 可作为人类黑色素瘤细胞的生存因子而发挥作用. 通过借助抑制性的抗 -ATF-1 单链抗体片段(ScFv)在细胞内的表达研究 ATF-1 活性被

破坏的后果, 可见 CRE 依赖启动子活性明显降低, 在裸鼠中致癌性和转移性显型受到抑制. 抗 -ATF-1 的 ScFv 可提高黑色素瘤细胞体外发生凋亡的敏感性, 并能导致裸鼠皮下种植瘤大量死亡, 确证了 CREB/ATF-1 可作为人类黑色素瘤细胞的生存因子. 该研究结果为抗 -ATF-1 ScFv 提供了一种可能用途, 即可作为体内肿瘤生长和转移的抑制剂.

## 2 肝炎病毒与 ATF-1 的关系研究现状

### 2.1 乙型肝炎病毒与 ATF-1 的关系

乙型肝炎病毒的慢性感染是引发肝细胞癌的主要危险因子. 自从 1987 年 Aufiero et al<sup>[25]</sup> 报告了 HBxAg 的表达能反式激活劳氏肉瘤病毒(RSV)和 SV40 中的氯霉素乙酰转移酶(CAT)报告基因以来, 很多实验室很快证实了 HBxAg 对多种同源或异源病毒或细胞的基因转录调节区有反式激活作用, 如 HBV 增强子/核心启动子、S 基因启动子, SV40 的增强子及早期启动子, 单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶(HSV-TK)启动子; 人 T 淋巴细胞 I 型病毒(HTLV-1)的长末端重复序列(LTR)、人免疫缺陷病毒 I 型(HIV-1)、RSV 及  $\beta$ -干扰素等的启动子. HBxAg 也可反式激活聚合酶(pol)I、II、III 启动子<sup>[26-27]</sup>, 很多顺式作用元件也随之被报道与 X 蛋白有相互作用, 被定义为 X 应答元件(XRE), 包括 AP-1、AP-2、c/E NF- $\kappa$ B、SRF、BP、Ets、ATF1 及 CREB. HBxAg 可以作为转录的反式激活因子, 也可以与其他反式激活因子相互作用而起效<sup>[28-30]</sup>. bZip 家族、Egr1 的反式激活因子都被报道与 HBxAg 有结合作用.

HBxAg 虽然没有对基本转录起作用, 但他能激活转录; 但其对启动子的选择机制也不清楚, pX 不能独立结合到核酸分子上, HBxAg 可能需要一系列的转录激活因子才能发挥其协同转录激活因子的作用. Williams et al<sup>[31]</sup> 提出一种可能的解释, HBxAg 一旦加入转录作用就可与一些反式激活因子如 bZip 家族相互作用.

Maguire et al<sup>[32]</sup> 等证实了这种猜测, 通过设计体外重组蛋白和 DNA 结合试验探讨了 CREB/ATF 与 pX 蛋白-蛋白相互作用的机制, 报道发现 pX 能与 CREB/ATF 家族的碱性亮氨酸拉链区域相结合而非酵母反式激活蛋白 Gal4 的 DNA 结合域, 并且虽然这种结合不能改变 CREB/ATF 形成二聚体的速率, 但能增加 CREB/ATF 与 CRE 元件的亲合性, 在经 pX 转染 PC12 细胞系时, 受叉头蛋白刺激后生长抑素启动子的转录活性增加 15 倍, 这个结果有力支持了 X-CREB/ATF 蛋白-蛋白相互作用具有重要意义.

### 2.2 丙型肝炎病毒与 ATF-1 的关系

丙型肝炎病毒核心蛋白是一种结构蛋白, 具有多种生物学调节作用, 与 MAPK 信号转导的调节有密切关系. MAPK 信号转导系统在细胞的增生、恶性转化和应激应答的调节中具有重要作用. HCV 核心蛋白具有潜在的致癌作用, 但机制目前不十分清楚. MAPK 细胞外信号调节激酶(ERK)的

激酶(MEK)-ERK 信号转导途径以及其下游的靶基因, 即血清应答元件(SRE), 在 BALB/3T3 表达 HCV 核心蛋白时被激活. 为了阐明 HCV 核心蛋白激活 MEK-ERK 途径的机制, Huang et al<sup>[33]</sup> 以 HCV 核心蛋白瞬时转染几种不同的细胞系, 并应用 Gal4-EIk1 萤虫素酶报告基因表达载体、体外 MAPK 的 Western blot 杂交分析对其信号转导途径进行了研究. 发现存在有丝分裂原刺激时, HCV 核心蛋白可增强 MEK 下游的 EIk1 的激活, 而对 ERK 活性及 EIk1 的磷酸化没有影响. 研究结果表明 HCV 核心蛋白可通过经典的磷酸化修饰链激活 EIk1. 说明 HCV 感染引起肝细胞发生恶性转化的可能机制之一.

HCV 感染与 HCC 有关, 而 HCC 的发生与 MAPK/ERK 信号转导途径有关, 因此, Pileri et al<sup>[34]</sup> 研究了 HCV 核心蛋白对 MAPK/ERK 级联反应的影响. HCV 核心蛋白可显著激活 MAPK/ERK 的级联反应, 包括 EIk1. HCV 核心蛋白单独情况下就可以激活 MAPK/ERK. 有趣的是, EIk1 的活性在受到促癌因子 12-O-四萜酸佛波乙酯(12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate, TPA)的作用下进一步升高, 但表达 HCV 核心蛋白的 NIH 3T3 和 HepG2 细胞受到 EGF 和肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TGF $\alpha$ ) 的刺激后, 没有进一步的升高. HCV 核心蛋白对 MAPK/ERK 的激活作用, 当受到 MEK1 特异性抑制剂 PD98059 时则被阻断. 这些研究结果表明, HCV 核心蛋白激活 ERK 是肝细胞有丝分裂原介导的信号非依赖性的, 但与 TPA 有协同作用. HCV 核心蛋白可能存在对 MEK1 的调节作用, 或者对更为上游的信号转导环节产生影响.

## 3 肝炎病毒与 ATF-1 的关系研究

由于所有的细胞内外的信号最终都传递到细胞核内, 而在细胞核内, 一个非常重要的事件, 或者可以说是信号转导的一个最终的直接结果造就了一批调节基因表达的转录因子. 他们与各种基因的调控元件结合, 调节基因的表达和功能蛋白质的产生. 因此, 转录因子的异常表达也会导致疾病发生. 肝炎病毒作为一种生物学信号可以影响细胞信号转导, 引起细胞的病变及恶性转化<sup>[1]</sup>, 而作为一种重要的基本转录因子 ATF-1, 越来越多的研究表明其是肝炎病毒信号转导通路中的关键一环, 例如: 如前所述 ATF-1 与 MAPK 信号传导途径密切相关, 在细胞内外各种刺激激活 MAPK 信号途径后其作为一种转录激活因子承接了下游的信号转导任务, 而作为 MAPK 上游的刺激因子的肝炎病毒是否通过 MAPK 信号途径介导与 ATF-1 构成连贯的信号转导路径, 这方面的研究未见报道.

目前关于肝炎病毒与 ATF-1 信号转导通路上的系统有序, 明确的级联反应过程还不清楚, 因为信号转导通路是很复杂和多向的, 深入认识信号转导通路的过程及其中激酶活性的调节机制还有许多工作要做, 但通过研究肝炎病毒与 ATF-1 的关系启发了我们通过调节控制信号转导通路来治疗疾病的设想. 因为信号转导

通路上的各个反应相互衔接,有序地依次进行,直至完成.其间,任何步骤的中断或者出错,都将给细胞,乃至机体带来重大的灾难性后果;并且随着对肿瘤的细胞生物学和分子生物学的研究深入,尤其是认识到许多癌基因的产物就是转录因子,他们对细胞的增生、分化、死亡和转化起到非常重要的调节作用,因此完全有可能设计出以信号转导通路中起调节介导作用的信号分子为靶的药物,一些专门针对信号转导通路中激酶的药物和针对配基或者受体的药物,当然这方面的设想还很初步,大量艰苦复杂的研究工作有待完成.

#### 4 参考文献

- 1 成军. 肿瘤相关基因. 第1版. 北京: 北京医科大学出版社, 1999: 29-60
- 2 Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL, Habener JF. Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science* 1988;242:1430-1433
- 3 Gonzalez GA, Yamamoto KK, Fischer WH, Karr D, Menzel P, Biggs W, Vale WW, Montminy MR. A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature* 1989;337:749-752
- 4 Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P. CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* 1991;64:739-749
- 5 Dwarki VJ, Montminy M, Verma IM. Both the basic region and the 'leucine zipper' domain of the cyclic AMP response element binding (CREB) protein are essential for transcriptional activation. *EMBO J* 1990;9:225-232
- 6 Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 1988;240:1759-1764
- 7 Gonzalez GA, Yamamoto KK, Fischer WH, Karr D, Menzel P, Biggs W, Vale WW, Montminy MR. A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature* 1989;337:749-752
- 8 Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL, Habener JF. Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science* 1988;242:1430-1433
- 9 Montminy MR, Bilezikjian LM. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 1987;328:175-178
- 10 Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH, Montminy MR. Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* 1988;334:494-498
- 11 Lee KA, Masson N. Transcriptional regulation by CREB and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1993;1174:221-233
- 12 Lee KA, Masson N. Transcriptional regulation by CREB and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1993;1174:221-233
- 13 Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 1993;365:855-859
- 14 Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, Goodman RH. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 1994;370:223-226
- 15 Lee JS, Zhang X, Shi Y. Differential interactions of the CREB/ATF family of transcription factors with p300 and adenovirus E1A. *J Biol Chem* 1996;271:17666-17674
- 16 Shimomura A, Ogawa Y, Kitani T, Fujisawa H, Hagiwara M. Calmodulin-dependent protein kinase II potentiates transcriptional activation through activating transcription factor 1 but not cAMP response element-binding protein. *J Biol Chem* 1996;271:17957-17960
- 17 Masson N, John J, Lee KA. *In vitro* phosphorylation studies of a conserved region of the transcription factor ATF1. *Nucleic Acids Res* 1993;21:4166-4173
- 18 Gupta P, Prywes R. ATF1 phosphorylation by the ERK MAPK pathway is required for epidermal growth factor-induced c-jun expression. *J Biol Chem* 2002;277:50550-50556
- 19 Wiggin GR, Soloaga A, Foster JM, Murray-Tait V, Cohen P, Arthur JS. MSK1 and MSK2 are required for the mitogen- and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 2002;22:2871-2881
- 20 Tang Q, Chen W, Gonzales MS, Finch J, Inoue H, Bowden GT. Role of cyclic AMP responsive element in the UVB induction of cyclooxygenase-2 transcription in human keratinocytes. *Oncogene* 2001;20:5164-5172
- 21 Houvras Y, Benezra M, Zhang H, Manfredi JJ, Weber BL, Licht JD. BRCA1 physically and functionally interacts with ATF1. *J Biol Chem* 2000;275:36230-36237
- 22 Araya N, Hirota K, Shimamoto Y, Miyagishi M, Yoshida E, Ishida J, Kaneko S, Kaneko M, Nakajima T, Fukamizu A. Cooperative interaction of EWS with CREB-binding protein selectively activates hepatocyte nuclear factor 4-mediated transcription. *J Biol Chem* 2003;278:5427-5432
- 23 Fujimura Y, Siddique H, Lee L, Rao VN, Reddy ES. EWS-ATF-1 chimeric protein in soft tissue clear cell sarcoma associates with CREB-binding protein and interferes with p53-mediated trans-activation function. *Oncogene* 2001;20:6653-6659
- 24 Jean D, Bar-Eli M. Targeting the ATF-1/CREB transcription factors by single chain Fv fragment in human melanoma: potential modality for cancer therapy. *Crit Rev Immunol* 2001;21:275-286
- 25 Aufiero B, Schneider RJ. The hepatitis B virus X-gene product transactivates both RNA polymerase II and III promoters. *EMBO J* 1990;9:497-504
- 26 Twu JS, Robinson WS. Hepatitis B virus X gene can transactivate heterologous viral sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2046-2052
- 27 Seto E, Mitchell PJ, Yen TS. Transactivation by the hepatitis B virus X protein depends on AP-2 and other transcription factors. *Nature* 1990;344:72-74
- 28 Faktor O, Budlovsky S, Ben-Levy R, Shaul Y. A single element within the hepatitis B virus enhancer binds multiple proteins and responds to multiple stimuli. *J Virol* 1990;64:1861-1863
- 29 Wang HD, Trixedi A, Johnson DL. Regulation of RNA polymerase I-dependent promoters by the hepatitis B virus X protein via activated Ras and TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* 1998;18:7086-7094
- 30 Haviv I, Shamay M, Doitsh G, Shaul Y. Hepatitis B virus pX targets TFIIB in transcription coactivation. *Mol Cell Biol* 1998;18:1562-1569
- 31 Williams JS, Andrisani OM. The hepatitis B virus X protein targets the basic region-leucine zipper domain of CREB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3819-3823
- 32 Maguire HF, Hoeffler JP, Siddiqui A. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science* 1991;252:842-844
- 33 Huang JM, Huang TH, Qiu HY, Fang XW, Zhuang TG, Qiu JW. Studies on the integration of hepatitis B virus DNA sequence in human sperm chromosomes. *Asian J Androl* 2002;4:209-212
- 34 Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938-941

## 乙型和丙型肝炎病毒与胱冬肽酶3的关系

纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花

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

国家自然科学基金项目, No. C39970674, No. C30070689, 军队“九五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目 No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花. 乙型和丙型肝炎病毒与胱冬肽酶3的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(2):401-403

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/401.asp>

### 0 引言

凋亡(apoptosis)又称为程序化细胞死亡(programmed cell death, PCD), 是多细胞有机体为调控机体发育, 维护内环境稳定, 由基因控制的细胞主动死亡过程<sup>[1]</sup>, 他的发生是一系列称为胱冬肽酶(cysteinyI aspartate-specific protease, caspase)蛋白酶家族成员的作用, 由活性中心的半胱氨酸上的巯基发挥活性, 所以属于半胱氨酸酶类. 胱冬肽酶蛋白酶家族也称为 ICE/Ced-3 家族, 是一组与细胞因子成熟和细胞凋亡有关的蛋白酶, 是美丽线虫(Caenorhabditis elegans)死亡基因 Ced-3 的同源物, 这个家族的蛋白酶具有特异性地在特定的氨基酸序列中将肽链从天门冬氨酸(Asp)之后切断的活性. 经过近几年的工作, 目前已经从人和动物细胞中克隆到十几种这样的蛋白酶, 1996年 Alnemri et al<sup>[2]</sup>提出将人源性的 ICE/Ced-3 蛋白酶统一命名为“胱冬肽酶”, 并将已经克隆出来的人白介素 1 $\beta$  转化酶(Interleukin-1 $\beta$  converting enzyme, ICE)蛋白酶等依次命名为胱冬肽酶 1-10, 如 ICE 为胱冬肽酶 1, TCH 1 为胱冬肽酶 2, 半胱氨酸蛋白 32 (CPP32) 为胱冬肽酶 3 等, 他们在转染宿主细胞后均能引发细胞凋亡并都被牛痘病毒 Crm A 蛋白或一种四肽化合物(YVAD)抑制<sup>[3]</sup>. 其中胱冬肽酶 3 是胱冬肽酶家族中最重要的凋亡执行者之一, 在凋亡的执行阶段, 负责对全部或部分关键性蛋白的酶切(激活或灭活). 在慢性肝炎病毒致病(癌)过程中, 凋亡起着重要的作用, 通过病毒蛋白或识别病毒抗原的细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)可使病毒感染细胞发生凋亡, 是宿主清除病毒的机制<sup>[4]</sup>. 慢性肝炎病毒与凋亡过程中的许多酶都存在着互相作用, 胱冬肽酶 3 是肝炎病毒作用的重要靶位, 了解肝炎病毒对胱冬肽酶 3 的影响, 对于肝炎病毒慢性感染的形成, 甚至是肝炎病毒相关性肝癌(HCC)的发生机制的研究具有重要意义.

### 1 胱冬肽酶 3 与凋亡

1994年 Fernandes-Alnemri et al<sup>[5]</sup>在 BenBank 中的表达序列标记(expression sequence tag, EST)数据库中找到一段 ICE/Ced-3 活性中心同源的序列, 用他合成探针后, 筛选人 Jurkat T 淋巴细胞 cDNA 文库, 从中克隆到一种新基因, 因其编码分子量为 32 kD 的半胱氨酸蛋白酶而称之为半胱氨酸蛋白酶 (cysteine protease protein, CPP32), 1996年命名为胱冬肽酶 3. 胱冬肽酶 3 cDNA 编码 277 个氨基酸, 其中 30% 与 ICE 同源, 35% 与 Ced-3 同源, 是迄今为止发现的所有 ICE 家庭成员中与 Ced-3 同源性最高的. 因此, 有人提出胱冬肽酶 3 可能是哺乳动物中 Ced-3 相对应物. 现在一般认为胱冬肽酶 3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶, 也是 CTL 细胞杀伤机制的重要组成部分. 他广泛分布于各种不同类型的细胞中, 前胱冬肽酶 3 在活化过程中从 Asp28-Ser29 和 Asp175-Ser176 两处被剪切, 形成 P17(29-175) 和 P10(182-277) 两个片段, 两种亚基再组成活性形式的 17 kD 的胱冬肽酶 3. 前胱冬肽酶 3 本身并没有催化活性, 在活化时首先由颗粒酶 B 或胱冬肽酶 10 在 D175 剪切下小片段后他才被部分活化, 随后则可进行下一步的自我催化. 已知颗粒酶 B 是丝氨酸蛋白酶, 能引起靶细胞 DNA 裂解、凋亡, 是 CTL 介导的凋亡的途径之一, (另一途径是 Fas/FasL 介导的), 目前认为颗粒酶 B 所致凋亡是通过裂解活化胱冬肽酶 3 而得以进行的<sup>[6]</sup>.

凋亡在生物界是一种普遍现象, 他是多细胞生物进化过程中形成的、生命中必须的细胞死亡方式, 主要作用是清除无用的、多余的、不正常的、已完成任务的或有害的细胞, 维持机体内环境稳定. 胱冬肽酶 3 在细胞凋亡中起着不可替代的作用, 胱冬肽酶 3 基因转染昆虫 Sf9 细胞后引起细胞凋亡, 这个过程可以被 Bcl-2 阻断; 在发生凋亡的细胞提取液中去除胱冬肽酶 3 后, 这些提取液就失去了诱导细胞凋亡的能力; 再加入纯化的胱冬肽酶 3 他就又恢复了致凋亡的功能.

胱冬肽酶 3 识别序列为 DEVD, 可以与众多的底物作用, 从而引起细胞凋亡. 多聚 ADP-核糖聚合酶 (PARP) 是一种核蛋白, 其功能与 DNA 修复、基因组的维护和整合性, 及对环境刺激应力变化反应有关. 在细胞凋亡启动时, 116 kD 的 PARP 在 Asp216-Gly217 之间被胱冬肽酶 3 剪切成 31 kD 和 85 kD 两个片段, 使 PARP 中与 DNA 结合的两个锌指结构与羧基端的催化区域分离, 不能发挥正常功能, 结果使受 PARP 负调控影响的 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> 依赖性核酸内切酶的活性增高, 裂解核小体间的 DNA, 引起细胞凋亡. 这种裂解过程可被胱冬肽酶 3 的特异性抑制剂 Ac-DEVD-CHO 所抑制, 但不能被 CrmA 抑制. 在很多形成凋亡的细胞中, 均可发现 PARP 这一片段, 因而, PARP 是凋亡蛋白酶底物之一<sup>[7]</sup>. 胱冬肽酶 3 还可以剪切 U1-70K、DNA-PK、PKCd 和 PKCq. PKCd 和 PKCq 都属于新型 PKC, 当被胱冬肽酶 3 剪切后, 可以切除调节区域, 而成为活性形式的 PKC, 另外实验还证明, 过量表达

PKCd 和 PKCq 均可以引起细胞凋亡, 说明他们都参与了细胞凋亡的诱导. 胱冬肽酶 3 可以切开与 DNA 酶相连的抑制酶, 使前者激活, 入核后水解 DNA<sup>[8]</sup>, 产生电泳梯形. 胱冬肽酶 3 还可以切断肌凝蛋白, 后者是一种在正常情况下结合肌动蛋白丝, 保持细胞形状的蛋白, 将胱冬肽酶 3 切断的肌凝蛋白片段注入细胞, 细胞就会失去形状, 发生细胞凋亡样变化<sup>[9]</sup>, 切断的肌凝蛋白可能是细胞凋亡发生期间形态变化的生理效应物.

## 2 慢性乙型肝炎病毒与胱冬肽酶 3

近年来细胞凋亡在肝脏疾病发病机制中的作用越来越受到人们的重视, 重新认识了细胞凋亡在病毒性肝炎慢性化和肝细胞癌中的地位. 病毒感染时肝细胞的死亡可以是病毒直接作用或宿主免疫应答所致. 许多病毒感染所致的细胞凋亡与细胞毒作用有关, 如腺病毒、EB 病毒和人免疫缺陷病毒(HIV)等. 事实上, 病毒感染引起的细胞凋亡可能就是宿主通过细胞主动死亡来阻止(或延缓)受感染细胞内病毒复制和扩散, 而病毒也通过某种方式来阻止或延缓凋亡的发生使其成功地复制繁殖. 病毒产物抗凋亡机制可能有: (1)诱导 p53 失活; (2)使 bcl-2 和类 bcl-2 基因过度表达; (3)使胱冬肽酶家族成员失活.

慢性乙型肝炎病毒(HBV)为嗜肝 DNA 病毒属, 基因组全长约 3.2 kb, 主要感染宿主肝细胞并导致一系列病理过程, 包括隐性感染到后期的 HCC<sup>[10-12]</sup>. HBV 在感染肝细胞早期抑制凋亡, 之后再激活凋亡以便自身的复制及传播, 这样, 对于凋亡的抑制或激活都可以使细胞发生恶性突变. 在使用抗 Fas 抗体刺激并且在 HBx 的存在下, 胱冬肽酶 3 的活性以及线粒体释放细胞色素 C 受到了抑制<sup>[13]</sup>. Yano et al<sup>[14]</sup>研究了 HBV 相关性肝癌细胞中胱冬肽酶 3 的定量, 并运用免疫组化方法对胱冬肽酶 3 的活性进行了分析, 他们发现在肿瘤细胞中胱冬肽酶 3 的活性相对于正常细胞明显下降, 说明了 HBV 对于胱冬肽酶 3 活性有明显的抑制作用.

运用磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)药理学抑制剂渥曼青霉素抑制 PI3K 活性可以介导细胞凋亡, 并且可以使生长因子抗凋亡效应丧失<sup>[15-17]</sup>. Gottlob et al<sup>[18]</sup>通过不同的细胞系来研究 HBx 蛋白与胱冬肽酶 3 的关系, 说明 HBx 蛋白可以抑制胱冬肽酶 3 的活性, 通过对氨基端和羧基端截短型 HBx 分子的研究说明其抗凋亡活性与已知的两个反式激活结构域有重叠. Lee et al<sup>[19]</sup>研究证实了 PI3K 的激活以及后来的 Akt 和 Bad 的激活在 CHL 细胞中产生了抗凋亡作用, 并且可以激活胱冬肽酶 3 的活性, 表明 HBV 通过 HBx-PI3K-Akt-Bad 途径来抑制胱冬肽酶 3 的活性, 从而抑制凋亡的产生. 表达 HBx 蛋白的 CHL 细胞可以对血清撤除介导的凋亡有明显的抑制作用, 转染了 p53 后, 这个效应仍然存在, 说明了 HBx 介导的抗凋亡作用至少是部分不依赖于 p53 的.

## 3 慢性丙型肝炎病毒与胱冬肽酶 3

慢性丙型肝炎病毒(HCV)是导致以肝细胞炎症、损伤、

纤维化为特征的肝脏疾病的主要因素之一<sup>[20-26]</sup>. 尽管目前尚不清楚胱冬肽酶家族在 HCV 致病过程中起什么样的作用, 但凋亡肯定涉及了其致病机制. Otsuka et al<sup>[27]</sup>研究了 HCV 核心蛋白对细胞凋亡的效应机制, 使用抗 -Fas 抗体刺激后, 核心蛋白抑制了凋亡的级联, 从下游的胱冬肽酶 8 到上游胱冬肽酶 3, 从而说明了核心蛋白在线粒体水平抑制凋亡, 通过加强 Bcl-x 的表达而抑制了胱冬肽酶 3 的激活. 还有许多研究都报道了在 HCV 相关 HCC 患者的尸检中, 肿瘤细胞内胱冬肽酶 3 的活性都相当低, 这也可能是 HCV 致癌原因之一.

在 HCV 感染患者体内, CTL 和辅助性 T 细胞是防止病毒持续存在的关键所在, 而 HCV 感染患者体内外周血中 HCV 特异性 CTL 的数量却非常少<sup>[28-29]</sup>, Hahn et al<sup>[30]</sup>研究了 HCV 核心蛋白对 T 淋巴细胞的影响, 在人 T 细胞系 Jurkat 细胞中瞬时或稳定表达核心蛋白可以增加细胞对 Fas 介导的凋亡的敏感性, 并且观察到了核心蛋白可以与 Fas 胞内区结合, 而此结构域可以增加 Fas 介导凋亡的下游信号途径. 核心蛋白的表达并没有改变细胞表面 Fas 的表达, 说明了表达核心蛋白的细胞对于 Fas 配体的敏感性的增加并不依赖于 Fas 的下调, 进一步, 他们还观察到了在表达核心蛋白细胞内胱冬肽酶 3 的活性增加. 这些结果都说明在 HCV 感染阶段, 核心蛋白通过 Fas 信号途径激活了免疫细胞内胱冬肽酶 3, 促进了免疫细胞的凋亡, 从而使其自身得以存活.

## 4 参考文献

- 1 刘丽娜. 细胞凋亡的分子机制. 世界华人消化杂志 2002;10:422-423
- 2 Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87:171
- 3 Golstein P. Controlling cell death. *Science* 1997;275:1081-1082
- 4 Schlosser SF, Schuler M, Berg CP, Lauber K, Schulze-Osthoff K, Schmahl FW, Wesselborg S. Ribavirin and alpha interferon enhance death receptor-mediated apoptosis and caspase activation in human hepatoma cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1912-1921
- 5 Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem* 1994;269:30761-30764
- 6 余玉红, 夏冰. Fas/FasL 表达与大肠癌的免疫逃逸. 世界华人消化杂志 2002;10:816-819
- 7 Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995;376:37-43
- 8 Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:43-50
- 9 Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Koths K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997;278:294-298
- 10 成军, 董菁, 刘妍, 李莉, 斯崇文, 王勤环, 张玲露, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒准种研究的临床意义. 世界华人消化杂志 2002;10:209-211
- 11 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:472-474
- 12 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 肿瘤抑制因子 p21/waf1 与肝炎病毒复制与表达的调节研究. 世界华人消化杂志 2003;11:469-471
- 13 Diao J, Khine AA, Sarangi F, Hsu E, Iorio C, Tibbles LA, Woodgett JR, Penninger J, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol*

- Chem* 2001;276:8328-8340
- 14 Yano Y, Hayashi Y, Nakaji M, Nagano H, Seo Y, Ninomiya T, Yoon S, Wada A, Hirai M, Kim SR, Yokozaki H, Kasuga M. Different apoptotic regulation of TRAIL-caspase pathway in HBV- and HCV-related hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med* 2003;11:499-504
  - 15 Crowder RJ, Freeman RS. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J Neurosci* 1998;18:2933-2943
  - 16 Kulik G, Weber MJ. Akt-dependent and -independent survival signaling pathways utilized by insulin-like growth factor I. *Mol Cell Biol* 1998;18:6711-6718
  - 17 Ryu BR, Ko HW, Jou I, Noh JS, Gwag BJ. Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated regulation of neuronal apoptosis and necrosis by insulin and IGF-I. *J Neurobiol* 1999;39:536-546
  - 18 Gottlob K, Fulco M, Levero M, Graessmann A. The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. *J Biol Chem* 1998;273:33347-33353
  - 19 Lee YI, Kang-Park S, Do SI, Lee YI. The hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2001;276:16969-16977
  - 20 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因区结合蛋白的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:223-225
  - 21 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:125-128
  - 22 成军. 慢性丙型肝炎肝脏脂肪变的机制及其意义. *世界华人消化杂志* 2002;10:999-1003
  - 23 成军, 任进余, 李莉, 陆志檬, 李克, 洪源, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. *世界华人消化杂志* 2002;10:1022-1026
  - 24 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因和蛋白的生物信息学分析. *世界华人消化杂志* 2003;11:378-384
  - 25 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 丙型肝炎病毒与 MAPK 信号转导系统. *世界华人消化杂志* 2003;11:466-469
  - 26 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 丙型肝炎病毒与 JAK-STAT 信号转导系统. *世界华人消化杂志* 2003;11:464-466
  - 27 Otsuka M, Kato N, Taniguchi H, Yoshida H, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression. *Virology* 2002;296:84-93
  - 28 Rehmann B, Chang KM, McHutchinson J, Kokka R, Houghton M, Rice CM, Chisari FV. Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. *J Virol* 1996;70:7092-7102
  - 29 Rehmann B, Chang KM, McHutchinson JG, Kokka R, Houghton M, Chisari FV. Quantitative analysis of the peripheral blood cytotoxic T lymphocyte response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 1996;98:1432-1440
  - 30 Hahn CS, Cho YG, Kang BS, Lester IM, Hahn YS. The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. *Virology* 2000;276:127-137

成军. 乙型和丙型肝炎病毒对转录因子 Nur77 的调节. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):403-406

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/403.asp>

## 0 引言

nur77 又称为神经生长因子诱导的基因 B (nerve growth factor-induced gene B, NGFI-B), 是一种细胞核孤儿受体(orphan nuclear receptor) 转录因子蛋白, 在多种细胞的信号转导、细胞周期、细胞凋亡的调节中具有十分重要的作用. 乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)感染引起的各种类型的慢性肝脏疾病, 其发病机制主要是通过肝炎病毒蛋白对于细胞内正常的信号转导通路进行干扰, Nur77是肝炎病毒蛋白作用的靶分子之一. 肝炎病毒蛋白对于 Nur77 转录因子蛋白正常调节功能的干扰, 与慢性病毒性肝炎、肝纤维化(LF)、肝细胞癌(HCC)发生发展有密切关系<sup>[1-4]</sup>.

Nur77转录因子蛋白属于一个结构序列具有高度同源性的蛋白家族. NGFI-B/Nur77、Nurr1、NOR1等孤儿核受体家族成员, 或者以同二聚体形式, 或者以家族内部成员之间结合形成的异二聚体形式, 与NGFI-B的应答元件(responsive element, NBRE)调节元件结合, 发挥转录调节作用. Xing et al<sup>[5]</sup>在脑皮质cDNA文库中筛选得到大鼠的孤儿核受体cDNA. 这一cDNA长度为2 154 bp, 开放读码框架1 794 bp, 编码产物由598 aa组成, 分子量为65 kD. 氨基酸序列分析表明这一蛋白与小鼠的nurr1和人的NOT1孤儿核受体NGFI-B/nur77/NAK1家组成员具有很高的同源性. 将这一基因命名为大鼠的r-nurr1. Northern blot分析结果表明r-nurr1 mRNA在脑组织中的表达水平最高, 肺组织中的表达水平中等, 大小皆为4.0 kb. 在睾丸组织中存在较小的mRNA, 大小为2.5 kb. r-nurr1在心脏、骨骼肌、肝脏、肾脏和脾脏中的表达水平很低. 原位杂交技术研究结果表明, r-nurr1 mRNA在CNS的各个部位都有持续表达, 在深层组织(IV-VI层)中更是如此.

Scearce et al<sup>[6]</sup>肝脏部分切除以后触发的肝脏再生过程, 是研究发育完成之后, 动物器官有丝分裂的有限的几个模型之一. 即刻早期生长因子基因的表达, 无论是在蛋白合成之前还是蛋白合成之后, 都发挥着十分重要的调节作用. 对肝脏再生的差减文库的筛选, 发现了1种甲状腺/类固醇受体超家族(thyroid/steroid receptor superfamily)的一个新成员, 称为再生肝脏核受体-1 (RNR-1, regenerating liver nuclear receptor). 这一基因在静止的肝脏中没有表达活性, 但在肝脏部分切除之后可以快速诱导, 这一基因的表达也是肝脏再生特异性的, 因为肝脏在受到有丝分裂原的刺激之后也没有表达活性. RNR-1在脑组织中也有一定的表达活性. RNR-1蛋白分子量为66 kD, 由597 aa组成, 体外转录和翻译系统的研究结果也证实了这一点. RNR-1与r-NGFI-B/m-Nur77具有很高的同源性, 特别是在其DNA结构域更是如此, 达到94%, 在推测的配体结

## 乙型和丙型肝炎病毒对转录因子 Nur77 的调节

成军

成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
国家自然科学基金项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目 No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. [cj@genetherapy.com.cn](mailto:cj@genetherapy.com.cn)  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

合域同源性达到59%。应用凝胶阻滞实验证实RNR-1与NGFI-B DNA可特异性结合,形成的复合物大小类似于Nur77复合物,表明RNR-1单体形式就具有结合能力。r-NGFI-B/m-Nur77的A盒式结构区(A box region)的同源性达到100%,是其分子结构中的高度保守区。RNR-1和Nur77对于r-NGFI-B/Nur77结合位点的DNA结构具有显著的反式调节作用,而且二者之间具有相加作用。在肝再生过程中,RNR-1和r-NGFI/m-nur77基因表达受到诱导,说明RNR-1可能与r-NGFI/m-Nur77一起在肝脏再生早期阶段的晚期发挥调节作用。

Nakai et al<sup>[7]</sup>利用人甲状腺激素受体 $\alpha 2$ 的cDNA片段作为探针,对人胎儿肌肉组织cDNA文库进行筛选,在低严谨度杂交条件下发现了一种微弱的杂交信号,对于这一cDNA片段进行序列分析,长度为2 498 bp,含有一个1 794 bp的开放读码框架(ORF),编码一条由598个氨基酸残基组成的多肽,预测分子量为64 kD。其中的DNA结合域和配体结合域与类固醇和甲状腺激素的受体具有一定的同源性。这一新基因序列与转录因子nur77、NGFI-B的基因具有高度的同源性,这些转录因子基因都属于神经生长因子和其他的血清生长因子所诱导的产物。因此命名为NAK1。对NAK1在细胞生长过程中的表达水平进行研究,结果表明当细胞受到生长因子的刺激后其mRNA的转录水平迅速升高。例如二磷酸腺苷刺激猴肾细胞(BSC-1)、PHA刺激人淋巴细胞、生长阻滞状态的成纤维细胞受到血清的刺激之后,NAK1基因的表达水平迅速升高。NAK1基因在人胚胎肌肉、肝脏、脑、甲状腺等组织中具有表达活性。对于NAK1配体分子的寻找和鉴定,以及对于其调节的靶基因的研究,都将具有十分重要的意义。

### 1 Nur77的转录调节作用

凝血酶原激活剂抑制物(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)是一种主要的纤维裂解抑制剂,如果血浆中的浓度偏高,则可能会引起血管疾病。一些炎性细胞因子通过一些未知的途径调节PAI-1的表达。Gruber et al<sup>[8]</sup>应用报告基因表达系统证实,在PAI-1基因启动子序列中存在着一段基因序列,决定其基础表达活性以及肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )诱导内皮细胞的PAI-1基因表达活性。以这一段基因序列作为诱饵,筛选DNA结合蛋白,发现Nur77(NAK-1、TR3、NR4A1)是这一段基因的结合蛋白。Nur77指导PAI-1的基因表达,通过NBRE,说明这种转录因子蛋白的单体结构具有结合活性,是一种配体非依赖性过程。Nur77的自身表达水平受到TNF $\alpha$ 的诱导时显著升高。高水平的Nur77表达,与PAI-1共同分布在动脉粥样硬化组织中,说明体内Nur77调节PAI-1的机制是存在的。

血清应答因子(SRF)是一种转录因子蛋白,可以结合启动子DNA序列中的血清应答元件(SRE),调节一系列基因的表达,包括即刻早期基因的表达,如c-fos、

fosB、junB、egr-1、egr-2,以及神经元基因nurr1、nur77,肌肉基因如肌动蛋白、肌球蛋白基因等。Chai et al<sup>[9]</sup>通过对于这些基因表达的调节研究,阐明了SRF调控细胞的生长和分化,神经细胞的信号转导,肌肉的发育的功能。许多因素可以激活转录因子SRF,包括血清、溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)、脂多糖(LPS)、12-O-四萜酰佛波-13-乙酸盐(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA)、细胞因子、TNF $\alpha$ 、提高细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度的试剂、病毒基因编码的激活蛋白,如乙型肝炎病毒X抗原(HBxAg)可以激活癌基因、原癌基因。外源刺激如紫外线(UV)刺激也产生同样的效果。SRF自身也受到细胞内信号转导的调节,与其他的转录因子如Sp1、ATF6以及成肌调节因子有关。其功能在心肌形成过程中得到了很好的反映。特异性心肌的SRF的转基因表明小鼠肥厚性心肌病中SRF过表达,出生以后6 mo死于心力衰竭。其他的转基因研究资料表明SRF在胚胎发育和形成过程中发挥重要作用。因为SRF对肌肉和神经细胞生长、分化过程中几种基因表达起调节,因此SRF在组织损伤和溃疡修复,例如为肠道溃疡修复中具有十分重要的作用。

### 2 细胞凋亡调节

即刻早期基因Nur77编码一种孤生核受体,当细胞受到各种应激刺激之后,如细胞受到TNF $\alpha$ 的刺激后,Nur77的表达立即受到诱导。Nur77的表达调节在T淋巴细胞和肿瘤细胞的细胞凋亡调节中具有十分重要的作用。Suzuki et al发现Nur77可以拮抗TNF $\alpha$ 介导的细胞凋亡信号转导。TNF $\alpha$ 对于Nur77的表达具有很强的诱导作用。与其他类型的细胞凋亡拮抗因素不同,TNF $\alpha$ 诱导Nur77的表达不依赖于NF- $\kappa$ B。异位表达Nur77可以保护野生型细胞、TRAF2(-/-)、RelA(-/-)的细胞TNF $\alpha$ 的细胞凋亡。Nur77显负性突变体(DN-Nur77)可加快TNF $\alpha$ 诱导的突变细胞凋亡。在小鼠的胚胎成纤维细胞中即使受到TNF $\alpha$ 的诱导,Nur77也保持在细胞核中的分布,没有发生向线粒体中的细胞内转位。这些研究结果表明,在TNF $\alpha$ 诱导的细胞凋亡的信号转导过程中,Nur77是促进细胞生存的因素<sup>[8]</sup>。

激活诱导的细胞死亡(activation-induced cell death, AICD)在巨噬细胞中也是存在的,但是具体机制还不清楚。AICD在很大程度上不依赖于胱冬肽酶的活性。巨噬细胞的AICD可以由胱冬肽酶通用抑制剂(benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl ketone, zVAD)来诱导。Kim et al<sup>[10]</sup>研究证实这种类型的巨噬细胞凋亡可以发生在感染性小鼠模型中,而且toll样受体(toll-like receptor, TLR)-2、TLR4的信号转导系统与此有关。推测Nur77在巨噬细胞的细胞凋亡中具有重要作用,因为Nur77缺陷性巨噬细胞不发生细胞凋亡。TLR2、TLR4下游的细胞外信号调节的激酶途径、zVAD上调的肌细胞特异性的增强子结合因子2(myocyte-specific enhancer binding factor 2,

MEF2)的转录因子活性都是Nur77诱导的巨噬细胞凋亡的必需因素. 报告基因研究结果表明Nur77基因启动子的Nap、Ets、Rce、Sp1位点受TLR4信号的调节, 而MEF2位点则受到zVAD的调节. MEF2转录因子具有持续表达的活性, 在巨噬细胞中降解, zVAD增加转录因子MEF2的活性, 主要是通过抑制MEF2转录因子蛋白的裂解和降解. 这一研究结果表明巨噬细胞的细胞凋亡是通过Nur77的2条信号途径实现的, 与胱冬肽酶的活性无关.

Dequiedt et al<sup>[11]</sup>报道CD4(+)CD8(+)双阳性的胸腺细胞具有高水平的II型组蛋白去乙酰酶HDAC7的表达, HDAC7抑制Nur77的表达, Nur77这种孤生核受体分子对转录因子MEF2D的活性在胸腺细胞的细胞凋亡和负选择过程中具有十分重要的作用. T细胞受体(TCR)激活之后, HDAC7在T细胞核中输出, 导致Nur77的表达水平升高. 3个位点(S155A、S318A、S448A)发生突变的HDAC7分子在TCR激活之后不能从细胞核中外输, 可抑制TCR诱导的细胞凋亡. HDAC7与VP16的融合蛋白可以激活Nur77的表达. 以RNA干扰技术抑制HDAC7的表达, 可促进由TCR激活而诱导的细胞凋亡. 这一结果证实HDAC7作为Nur77的调节因子, 对胸腺细胞发育过程中的细胞凋亡产生显著的调节作用.

尽管知道Nur77这种孤生核受体与某些调节基因相结合, 并调节这些基因的表达, 并进一步调节细胞周期和细胞凋亡, 但是Nur77的具体作用机制目前还不十分清楚. 特别是发现Nur77在细胞周期和细胞凋亡的调节中具有细胞类型特异性的特征的机制更是不清楚. Wu et al<sup>[12]</sup>认为Nur77调节细胞凋亡的机制, 主要是通过基因表达和细胞内转位, 而不是通过其反式激活作用. Nur77在BGC-823细胞系中持续表达, TPA不仅可以上调Nur77 mRNA的转录水平, 而且可以促进Nur77蛋白从细胞核到细胞线粒体的细胞内转位, 引起细胞内细胞色素C的释放. TPA诱导的Nur77细胞内转位伴随着细胞凋亡的发生. 尽管全反视黄酸(all-trans retinoic acid, ATRA)不能诱导BGC-823细胞发生细胞凋亡, 但是细胞核中Nur77的表达活性却是ATRA抑制作用所必需的. Nur77的反义RNA表达载体转染BGC-823细胞系, 可以获得耐受ATRA抑制作用状态. 在TPA诱导的细胞凋亡中, Nur77是通过蛋白激酶C (protein kinase C, PKC)的信号转导途径实现的. MAPK、PI3K信号转导途径与Nur77 mRNA转录表达的调节有关.

Nur77(NGFI-B)在T细胞的AICD中具有重要作用. 视黄酸(retinoic acid, RA)具有很强的免疫调节作用, 可以抑制未成熟胸腺细胞以及T细胞杂交瘤细胞的细胞凋亡. 对于这一抑制作用的机制进行研究, Kang et al<sup>[13]</sup>发现视黄酸对于Nur77的表达和功能具有显著的反式调节作用. 全反视黄酸显著抑制Nur77的DNA结合和转录调节作用. 对于2种潜在调节Nur77基因转录活性的转录因子AP-1、相关的血清应答因子(related serum response

factor, RSRF)进行研究发现, 全反视黄酸抑制AP-1的DNA结合活性, 但对于RSRF则没有影响, 表明这种抑制作用可能是AP-1介导的. Nur77转录后调节机制的研究结果表明, Nur77与RAR $\alpha$ 、RXR $\alpha$ 进行共转染时其活性受到显著的抑制. 酵母细胞或哺乳动物细胞双杂交技术证实Nur77结合RAR $\alpha$ 、RXR $\alpha$ , 表明这些受体蛋白之间存在着直接的蛋白-蛋白相互作用, 可能与其抑制作用有关. RA对于Nur77功能的抑制是通过多个途径实现的.

### 3 肝炎病毒蛋白对于Nur77的调节

HBxAg在HBV相关的HCC的发生发展过程中具有十分重要的作用. 最近Lee et al<sup>[14]</sup>发现HBxAg诱导FasL的表达, 可能是HBxAg帮助HCC逃避机体的免疫监视功能的重要机制之一. 对于HBxAg诱导Nur77表达以及在调节FasL表达中的作用进行研究, 发现Chang X-34细胞表达HBxAg时, 可显著诱导Nur77. 应用反义技术或者显负性突变体阻断HBxAg对于Nur77的诱导, 则可以显著抑制FasL的表达, 表明Nur77在调节FasL表达的过程中具有十分重要的作用. 在HCC细胞中表达HBxAg时, 不仅能够提高Nur77的表达水平, 而且还可以显著提高这种转录因子蛋白与靶DNA序列之间的结合. 这些研究结果表明转录因子蛋白Nur77在HBxAg诱导的Fas/FasL信号转导系统, 以及帮助肝癌细胞逃避表达Fas的淋巴细胞的免疫监视中具有十分重要的作用<sup>[15-21]</sup>.

Nur相关因子1(Nur-related factor 1, Nurr1)在部分肝切除后的肝再生过程中具有十分重要的作用. Ohkubo et al<sup>[22]</sup>推测NGFI-B家族成员在肝脏的缺血再灌注损伤中具有高水平的表达. 利用半定量的逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术对大鼠和人肝脏中NGFI-B家族成员的表达水平进行研究. 利用原位杂交技术对于NGFI-B基因在肝脏中的表达位置进行研究. 因为NGFI-B家族成员的启动子序列中含有CRE序列, 应用Western blot杂交和凝胶阻滞实验对于磷-Ser-133-特异性的环腺苷-3':5'-单磷酸盐应答元件结合蛋白进行了研究. 大鼠肝脏缺血损伤30 min后出现NGFI-B家族基因的表达活性, 注射环磷酸胺之后这些基因的表达水平进一步升高. 在人的肝脏标本中, NGFI-B家族基因的表达水平较缺血损伤之前表达水平也明显升高. 在灌注之后的15 min出现pCREB蛋白的表达. 凝胶阻滞实验结果表明CREB可与大鼠肝细胞的神经元衍生的孤生受体相结合. 因此认为NGFI-B家族基因在缺血灌注损伤的早期阶段就有显著的诱导, 而且这一诱导过程与CREB的调节作用有关.

在成熟的B淋巴细胞中, 锌指转录因子早期生长应答1(early growth response 1, Egr-1)属于B细胞抗原受体受到刺激之后许多即刻早期基因之一. 但是其在淋巴系统发育早期阶段的作用目前还不十分清楚. 对骨髓中

B 细胞亚群进行分析, Katagiri et al [23]发现 Egr-1 在原/前-B 细胞和未成熟的B 淋巴细胞中有转录表达活性. 在基质细胞瘤细胞作为饲养细胞, 含有白介素-7(IL-7)的细胞培养基中生长的原/前-B-I 细胞中有 Egr-1 蛋白. 在重组酶激活基因-2(recombinase-activating gene 2, RAG-2)缺陷、Egr-1 过表达的小鼠的 B 淋巴细胞系原/前-B-I 细胞可以通过 B220(low)BP-1(-)发育阶段而继续发育, 一直到 B220(low)BP-1(+)期的前-B-I 细胞阶段, 但是不能继续发育到前-B-II 细胞的 B220(low)BP-1(+)CD25(+)阶段. 因此, 在 B 淋巴细胞的早期发育阶段, 从 B220(low)BP-1(-)IL-2R- 原/前-B-I 阶段发育到 B220(low)BP-1(+)IL-2R+ 前-B-II 阶段, 至少包括 2 个不同的步骤. 第 1 步 B220 (low)BP-1(+)前-B-I 细胞如果受到 Egr-1 过表达的刺激就能完成. Egr-1 转基因小鼠分泌成熟的免疫球蛋白的 B 淋巴细胞(IgM+ B220 (high)的比率上升, 未成熟型的 IgM+ B220(low)的骨髓 B 淋巴细胞的比率降低. 因为转基因小鼠和正常的小鼠祖 B 细胞的生长状态、Egr-1 的表达水平相当, 而且进入到成熟的 B 细胞阶段. 对于 Egr-1 潜在的调节基因进行研究, 发现 Egr-1 可以提高前-B 细胞和未成熟 B 细胞中的氨基肽酶(aminopeptidase) BP-1/6C3 的表达, 而且可以上调 IgM+ B 淋巴细胞中的 nur77 的表达.

#### 4 参考文献

- Dinkel A, Warnatz K, Ledermann B, Rolink A, Zipfel PF, Burki K, Eibel H. The transcription factor early growth response 1 (Egr-1) advances differentiation of pre-B and immature B cells. *J Exp Med* 1998;188:2215-2224
- Maira M, Martens C, Batsche E, Gauthier Y, Drouin J. Dimer-specific potentiation of NGFI-B (Nur77) transcriptional activity by the protein kinase A pathway and AF-1-dependent coactivator recruitment. *Mol Cell Biol* 2003;23:763-776
- Kovalovsky D, Refojo D, Liberman AC, Hochbaum D, Pereda MP, Coso OA, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E. Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol Endocrinol* 2002;16:1638-1651
- Wansa KD, Harris JM, Muscat GE. The activation function-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity, and coactivator recruitment. *J Biol Chem* 2002; 277:33001-33011
- Xing G, Zhang L, Zhang L, Heynen T, Li XL, Smith MA, Weiss SR, Feldman AN, Detera-Wadleigh S, Chuang DM, Post RM. Rat nurr1 is prominently expressed in perirhinal cortex, and differentially induced in the hippocampal dentate gyrus by electroconvulsive vs. kindled seizures. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;47:251-261
- Scarce LM, Laz TM, Hazel TG, Lau LF, Taub R. RNR-1, a nuclear receptor in the NGFI-B/Nur77 family that is rapidly induced in regenerating liver. *J Biol Chem* 1993;268:8855-8861
- Nakai A, Kartha S, Sakurai A, Toback FG, DeGroot LJ. A human early response gene homologous to murine nur77 and rat NGFI-B, and related to the nuclear receptor superfamily. *Mol Endocrinol* 1990;4:1438-1443
- Gruber F, Hufnagl P, Hofer-Warbinek R, Schmid JA, Breuss JM, Huber-Beckmann R, Lucerna M, Papac N, Harant H, Lindley I, de Martin R, Binder BR. Direct binding of Nur77/NAK-1 to the plasminogen activator inhibitor 1(PAI-1) promoter regulates TNF alpha-induced PAI-1 expression. *Blood* 2003;101:3042-3048
- Chai J, Tarnawski AS. Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol* 2002;53:147-157
- Kim SO, Ono K, Tobias PS, Han J. Orphan nuclear receptor Nur77 is involved in caspase-independent macrophage cell death. *J Exp Med* 2003;197:1441-1452
- Dequiedt F, Kasler H, Fischle W, Kiermer V, Weinstein M, Herndier BG, Verdin E. HDAC7, a thymus-specific class II histone deacetylase, regulates Nur77 transcription and TCR-mediated apoptosis. *Immunity* 2003;18:687-698
- Wu Q, Liu S, Ye XF, Huang ZW, Su WJ. Dual roles of Nur77 in selective regulation of apoptosis and cell cycle by TPA and ATRA in gastric cancer cells. *Carcinogenesis* 2002;23:1583-1592
- Kang HJ, Song MR, Lee SK, Shin EC, Choi YH, Kim SJ, Lee JW, Lee MO. Retinoic acid and its receptors repress the expression and transactivation functions of Nur77: a possible mechanism for the inhibition of apoptosis by retinoic acid. *Exp Cell Res* 2000;256:545-554
- Lee MO, Kang HJ, Cho H, Shin EC, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of the Nur77 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:1162-1168
- Lee JM, Lee KH, Weidner M, Osborne BA, Hayward SD. Epstein-Barr virus EBNA2 blocks Nur77-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:11878-11883
- Song KH, Lee K, Choi HS. Endocrine disrupter bisphenol A induces orphan nuclear receptor Nur77 gene expression and steroidogenesis in mouse testicular Leydig cells. *Endocrinology* 2002;143:2208-2215
- Slagsvold HH, Ostvold AC, Fallgren AB, Paulsen RE. Nuclear receptor and apoptosis initiator NGFI-B is a substrate for kinase ERK2. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:1146-1150
- Stocco CO, Lau LF, Gibori G. A calcium/calmodulin-dependent activation of ERK1/2 mediates JunD phosphorylation and induction of nur77 and 20alpha-hsd genes by prostaglandin F2alpha in ovarian cells. *J Biol Chem* 2002;277:3293-3302
- Masuyama N, Oishi K, Mori Y, Ueno T, Takahama Y, Gotoh Y. Akt inhibits the orphan nuclear receptor Nur77 and T-cell apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:32799-32805
- Pekarsky Y, Hallas C, Palamarchuk A, Koval A, Bullrich F, Hirata Y, Bichi R, Letofsky J, Croce CM. Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:3690-3694
- Stocco CO, Zhong L, Sugimoto Y, Ichikawa A, Lau LF, Gibori G. Prostaglandin F2alpha-induced expression of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase involves the transcription factor NUR77. *J Biol Chem* 2000;275:37202-37211
- Ohkubo T, Sugawara Y, Sasaki K, Maruyama K, Ohkura N, Makuuchi M. Early induction of nerve growth factor-induced genes after liver resection-reperfusion injury. *J Hepatol* 2002; 36:210-217
- Katagiri Y, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Ozato K, Guroff G. Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B. *Nat Cell Biol* 2000;2:435-440

## 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对层粘连蛋白表达的调节

王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 王春花

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

国家自然科学基金项目, No. C39970674, No. C03011402, No. C39900130, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目 No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 王春花. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对层粘连蛋白表达的调节. 世界华人消化杂志 2004;12(2):406-408  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/406.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)感染是病毒性肝炎的主要病原体, 其感染后引起慢性化的频率较高, 也是慢性病毒性肝炎的主要病原体. 在我国, HBV或HCV的感染也是肝硬化和肝细胞癌(HCC)发病的主要原因. 层粘连蛋白(LN)是以组织特异性方式表达的细胞外基质(ECM)蛋白<sup>[1]</sup>, 通过与细胞表面与整合素受体蛋白的结合, LN可以促进细胞黏附, 对细胞存活、增生和分化发挥重要的调节作用<sup>[2]</sup>. 在肝炎后肝纤维化、肝硬化、HCC患者中, LN水平可发生显著改变, 故常常在慢性肝炎后肝纤维化、肝硬化及肿瘤转移方面有重要的诊断意义.

### 1 层粘连蛋白在细胞内作用的分子生物学机制

1979年, Timpl et al<sup>[3]</sup>从鼠Engkebreth-Holm-Swarm(EHS)肉瘤中分离出了一种非胶原成分-层黏连蛋白. 随后的研究表明, LN主要由基底膜中的上皮细胞和内皮细胞合成, 以不溶的形式广泛分布于正常组织的血管基底膜透明层中, 并与IV型胶原相结合构成基底膜的骨架成分. LN是组织特异性方式表达的ECM蛋白, 通过与细胞表面整合素的结合, LN可以促进细胞黏附, 对细胞存活、增生和分化发挥重要的影响作用. LN对细胞的影响作用可能与其与细胞内信号整合并参与其信号转导活性有关<sup>[4-6]</sup>. 然而, 这种整合信号如何通过细胞膜最终影响基因表达的机制还不是很清楚.  $\alpha 6\beta 4$ 整合素是各种LN亚型的受体<sup>[7-9]</sup>, 根据其配体结合特异性,  $\alpha 6\beta 4$ 在体内富含与细胞间质LN相互作用的细胞特别是上皮细胞、内皮细胞和施旺(Schwann)细胞中表达. 近年的研究发现 $\alpha 6\beta 4$ 与细胞质的酪氨酸蛋白激酶相关, 并且通过一系列包含SH2-和SH3-的连接分子与ras信号转导途径相连<sup>[10]</sup>. 故推测LN与细胞内信号转导机制相关.

2 层粘连蛋白的表达与慢性病毒性肝炎及肝炎后肝硬化 HCV和HBV感染后常进展为慢性病毒性肝炎, 其中HCV感染后慢性化的几率更高. 慢性肝病尤其是活动性病变, 由于致病因素的持续作用和机体免疫功能失调, 以致肝细胞持续受损, 纤维组织不断增生而导致肝硬化. 肝纤维化的主要病理特点是胶原蛋白及LN等多种ECM在肝内过度沉积. LN是肝脏ECM中的一种糖蛋白, 在肝脏受损时, 肝细胞合成LN增加, 并释放入血, 使血清LN水平增加, 因而LN可作为肝脏损害及肝纤维化的指标之一. 在HBV携带者及急性肝炎患者中, 血清LN及胶原IV水平与正常人比较差异无显著性, 是因为此类患者无明显肝脏病理损害或损伤只局限于小叶内, 无纤维修复过程参与. 而慢性肝炎患者血

清LN及IV型胶原水平明显升高, 血清IV-C, LN浓度的增加表示肝纤维化形成处于活动状态, 提示肝纤维化有进行性的发展<sup>[11]</sup>, 尤以慢性中度、重度及肝硬化患者更为显著. 在慢性肝病患者的修复过程中, 位于狄氏(Disse)间隙的肝星形细胞被激活, 狄氏腔内的ECM改变, 层粘连蛋白及IV型胶原大量合成, 细胞相互紧密连接, 形成真正的基底膜, 导致肝纤维化<sup>[12]</sup>. 所以慢性肝炎及肝硬化患者LN及胶原IV合成增加, 导致其降解入血增多, 从而表现为血清LN及IV型胶原高水平. 研究还表明, LN与 $\gamma$ -球蛋白及A/G比值有明显相关性, 即 $\gamma$ -球蛋白增高时LN也增高, 而A/G比值降低时, LN却增高, 表明LN与肝功能部分指标有相关性. 肝病患者血清LN含量变化是一项较客观的肝纤维化指标, 对各型肝炎均具有较好的检测价值, 特别是对慢性肝病的诊断优于透明脂酸(HA)、P III P等其他生化指标. 对于HCV感染患者, 其诊断意义较HBV感染更大<sup>[13]</sup>.

3 层粘连蛋白的表达与病毒性肝炎相关性肝细胞癌 HBV或HCV的感染也常常是肝细胞癌发病的诱因之一. 有证据表明HBx蛋白和HCV非结构蛋白5A(NS5A)和核心蛋白等参与病毒感染后肿瘤的形成. Tarn et al<sup>[14]</sup>的结果证实HBxAg引起的肝细胞的恶性转化过程与RAS-RAF-MAPK和JNK信号转导途径有关. 在HepG2细胞中, 核心蛋白激活人c-myc基因、RSV LTR和SV40早期启动子<sup>[15]</sup>; 核心蛋白还能抑制或增强p53基因启动子功能<sup>[16]</sup>, 这些证据表明核心蛋白具有潜在的致癌作用. Ghosh et al<sup>[17]</sup>研究发现, NS5A蛋白能够抑制细胞周期调节基因p21<sup>WAF1</sup>, 激活人肝癌细胞中增生的细胞核抗原基因(PCNA), 从而调节细胞凋亡, 促进细胞增生. NS5A cDNA能够使转染的小鼠成纤维细胞NIH 3T3具有转化特性, 且转化细胞移植入裸鼠体内可形成纤维肉瘤灶, 这一证据直接证明了HCV NS5A蛋白的恶性转化潜能.

LN主要由基底膜中的上皮细胞和内皮细胞合成, 以不溶的形式广泛分布于正常组织的血管基底膜透明层中, 并与IV型胶原相结合构成基底膜的骨架成分. 所以, 人们很容易将其与肿瘤的侵袭和转移联系起来. 早先的研究表明, 癌组织基底膜中LN减少及排列紊乱是肿瘤转移的基础<sup>[18]</sup>. 对HCC癌组织中LN形态测量的研究表明, HCC转移组织中LN表达较未转移组少, 二者具有显著性差异, 提示LN减少导致基底膜不完整, 使肿瘤细胞侵袭转移过程中的屏障削弱, 确实为肿瘤转移提供了可能性. 肿瘤组织中的这种变化主要是由于IV型胶原酶的合成增加, 导致IV型胶原水解, 组织中LN随着基底膜的崩解而减少. 但是, 这种变化并不意味着组织中LN的合成减少. 部分癌细胞胞质中存在LN染色, 由于此时无肝窦结构, 所以LN系由肿瘤细胞合成<sup>[19]</sup>. 癌细胞的这种合成LN的能力可能在侵袭和转移过程中

具有意义. Fridman et al<sup>[20]</sup>将 LN 与瘤细胞一起培养时发现肿瘤细胞表现出明显的过度增生现象. 小鼠纤维肉瘤细胞表面 LN 的表达使其转移潜能大大增加. Bonkhoff et al<sup>[21]</sup>的研究发现前列腺癌转移的组织, 如淋巴结、骨、肺和肝组织中 LN 呈强阳性表达. 所以, LN 在肿瘤转移过程中可能具有双重作用: 当 LN 与 IV 型胶原构成基底膜时, 他可作为屏障阻止肿瘤细胞的转移, 而在肿瘤细胞穿越基底膜后则可介导其运动, 促进转移的形成. 另外, HCC 组织特别是有转移的组织中 LN 可排列成窦状结构, 此系肿瘤组织中新生毛细血管网络的基底膜成分. 组织中的 LN 除能够参与构成基底膜外, 还能对内皮细胞有趋化作用, 并促进其分化<sup>[22]</sup>. 他还能刺激细胞分泌血管生长因子促进肿瘤血管的生成<sup>[23]</sup>, 这些作用均能促进肿瘤细胞发生转移. 由于 LN 在肿瘤转移中的重要作用, 人们试图寻求将其作为肿瘤转移的标志物. 基质的降解以及肿瘤细胞合成 LN 均可导致机体 LN 水平增高, 所以检测血清 LN 的含量有助于了解机体的 LN 水平. 有人通过对骨及软组织肿瘤患者血清 LN 水平研究发现, 血清 LN 含量升高与肿瘤的转移密切相关, 特别是部分患者的组织中在镜下还不能找到转移灶时, 其血清 LN 已有升高<sup>[24]</sup>, 所以认为血清 LN 是早期诊断肿瘤转移的指标之一.

总之, LN 作为一种 ECM, 是肝脏 ECM 中的一种糖蛋白, 在肝脏受损时, 血清 LN 水平增加, 可作为肝脏损害及肝纤维化的指标之一, 对于早期诊断肿瘤转移也有一定的意义.

#### 4 参考文献

- Engvall E. Laminin variants: why, where and when? *Kidney Int* 1993;43:2-6
- Mercurio AM, Bachelder RE, Chung J, O' Connor KL, Rabinovitz I, Shaw LM, Tani T. Integrin laminin receptors and breast carcinoma progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; 6:299-309
- Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR. Laminin-a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 1979;254:9933-9937
- Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995;268:233-239
- Giancotti FG, Stepp MA, Suzuki S, Engvall E, Ruoslahti E. Proteolytic processing of endogenous and recombinant beta 4 integrin subunit. *J Cell Biol* 1992;118:951-959
- Schwartz MA, Ginsberg MH. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol* 2002;4:E65-E68
- Lee EC, Lotz MM, Steele GD Jr, Mercurio AM. The integrin alpha 6 beta 4 is a laminin receptor. *J Cell Biol* 1992;117:671-678
- Niessen CM, Hogervorst F, Jaspars LH, de Melker AA, Delwel GO, Hulsman EH, Kuikman I, Sonnenberg A. The alpha 6 beta 4 integrin is a receptor for both laminin and kalinin. *Exp Cell Res* 1994;211:360-367
- Spinardi L, Einheber S, Cullen T, Milner TA, Giancotti FG. A recombinant tail-less integrin beta 4 subunit disrupts hemidesmosomes, but does not suppress alpha 6 beta 4 mediated cell adhesion to laminins. *J Cell Biol* 1995;129:473-487
- Mainiero F, Pepe A, Wary KK, Spinardi L, Mohammadi M, Schlessinger J, Giancotti FG. Signal transduction by the alpha 6 beta 4 integrin: distinct beta 4 subunit sites mediate recruitment of Shc/Grb2 and association with the cytoskeleton of hemidesmosomes. *EMBO J* 1995;14:4470-4481
- Yokoya Y, Iwata K, Muragaki Y, Shiota C, Morimoto Y, Inoue

- M, Itoh H, Nishioka S, Ooshima A. Concentration of serum laminin and type IV collagen in liver diseases assayed by a sandwich enzyme-immunoassay using monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta* 1992;210:109-118
- Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:397-416
- Kozłowska J, Loch T, Jabłonska J, Cianciara J. Biochemical markers of fibrosis in chronic hepatitis and liver cirrhosis of viral origin. *Przeegl Epidemiol* 2001;55:451-458
- Tarn C, Zou L, Hullinger RL, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in dedifferentiated hepatocytes. *J Virol* 2002;76:9763-9772
- Chang J, Yang SH, Cho YG, Hwang SB, Hahn YS, Sung YC. Hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J Virol* 1998;72:3060-3065
- Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1997;272:10983-10986
- Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80(Pt 5):1179-1183
- Liotta LA. Tumor invasion and metastases-role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res* 1986;46:1-7
- Grigioni WF, Garbisa S, D'Errico A, Baccarini P, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Mancini AM. Evaluation of hepatocellular carcinoma aggressiveness by a panel of extracellular matrix antigens. *Am J Pathol* 1991;138:647-654
- Fridman R, Kibbey MC, Royce LS, Zain M, Sweeney M, Jicha DL, Yannelli JR, Martin GR, Kleinman HK. Enhanced tumor growth of both primary and established human and murine tumor cells in athymic mice after coinjection with Matrigel. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:769-774
- Bonkhoff H, Wernert N, Dhom G, Remberger K. Distribution of basement membranes in primary and metastatic carcinomas of the prostate. *Hum Pathol* 1992;23:934-939
- Kramer RH, Cheng YF, Clyman R. Human microvascular endothelial cells use beta 1 and beta 3 integrin receptor complexes to attach to laminin. *J Cell Biol* 1990;111:1233-1243
- Bonfil RD, Vinyals A, Bustuabad OD, Llorens A, Benavides FJ, Gonzalez-Garrigues M, Fabra A. Stimulation of angiogenesis as an explanation of Matrigel-enhanced tumorigenicity. *Int J Cancer* 1994;58:233-239
- Yudoh K, Matsui H, Kanamori M, Ohmori K, Tsuji H, Tatezaki S. Serum levels of laminin, type IV collagen and type III procollagen peptide as markers for detection of metastasis. *Jpn J Cancer Res* 1994;85:1263-1269

## 转录因子 C/EBP $\beta$ 的生物学功能

成军

成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
 国家自然科学基金项目, No. C39970674, No. C03011402, No. C39900130, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目 No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135  
 项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn  
 电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
 收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

成军. 转录因子 C/EBP $\beta$  的生物学功能. 世界华人消化杂志 2004;12(2):408-412  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/408.asp>

## 0 引言

转录因子 CCAAT 增强子结合蛋白(CCAAT enhancer binding protein, C/EBP)包括 C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$ 、C/EBP $\varepsilon$  等蛋白, 在体内的生物学作用各不相同<sup>[1]</sup>. C/EBP $\alpha$  在粒细胞形成中具有重要的调节作用<sup>[2]</sup>. C/EBP $\alpha$  基因缺陷可以导致早期的粒细胞分化障碍<sup>[3]</sup>. C/EBP $\alpha$  功能异常在人急性髓性白血病中十分常见, 其特点是髓细胞发育障碍<sup>[4]</sup>. Zhang et al<sup>[5]</sup> 从缺失 C/EBP $\alpha$  动物的胎肝中获得细胞, 在形态上象未成熟的髓母细胞, 早期髓细胞特异性基因如髓过氧化物酶等的 mRNA 表达缺如. 向这些细胞导入正常的 C/EBP $\alpha$  基因, 可以诱导 C/EBP 家族成员如 C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\varepsilon$  的表达, 并且有粒细胞的分化. 说明不同的 C/EBP 转录因子蛋白具有截然不同的生物学作用. 近年来的研究证实, C/EBP $\beta$  在基因表达调节和信号转导过程中具有十分重要的地位和作用.

## 1 C/EBP $\beta$ 与骨、脂肪代谢

Christakos et al<sup>[6]</sup> 观察到 1, 25(OH) $_2$ D $_3$  诱导肾脏、成骨细胞中的 C/EBP $\beta$  的表达及 24-羟化酶的转录活性. 这些研究结果将 C/EBP $\beta$  作为 1, 25(OH) $_2$ D $_3$  作用的一种新的靶基因, 提示 C/EBP $\beta$  在 24-羟化酶的基因转录调节中具有十分重要的作用. 这一研究结果表明维生素 D 受体(VDR)介导的 24-羟化酶的基因转录, 除了受转录因子 YY1、TFIIB、CBP 的调节之外, 还要受 C/EBP $\beta$  的调节. 初步观察结果表明, 1, 1, 1-三氯-2, 2-双(p-氯酚基)-乙烷, (1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis(p-chlorophenyl)-ethane, p, p'-DDT) 可诱导 3T3-L1 脂肪细胞的分化, 而且是一种剂量依赖性的过程. Moreno-Aliaga et al<sup>[7]</sup> 研究了 p, p'-DDT 诱导 3T3-L1、3T3-F442A 脂肪细胞分化的机制. 已知 3T3-L1 脂肪细胞的分化涉及到转录因子 C/EBP $\beta$ 、过氧化物酶体增生因子激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )、C/EBP $\alpha$  的作用, 因此研究 p, p'-DDT 的诱导分化作用是否与此有关. 发现 p, p'-DDT 处理的 3T3-L1 细胞系细胞核中的 PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  蛋白水平升高. p, p'-DDT 在浓度为 20  $\mu$ mol/l 时并不影响 C/EBP $\beta$  蛋白在细胞分化过程中的蛋白含量.

Antes et al<sup>[8]</sup> 在人载脂蛋白 B(apoB) 基因上游 55 kb 处鉴定出一段 315 bp 的肠道增强子(IE)序列, 可以指导人 apoB 在转基因小鼠中的表达. 同时鉴定出几种结合位点和结合蛋白, 包括肝细胞核因子(HNF)-3 $\beta$ 、C/EBP $\beta$  和 HNF-4. 对 3 种结合蛋白与 315 bp IE 的结合及其调节功能的相互影响进行研究. 利用 HNF-3 $\beta$ 、C/EBP $\beta$  和 HNF-4 表达载体的共转染实验结果表明, HNF-3 $\beta$  与位点 1 结合, C/EBP $\beta$  与位点 2 结合, HNF-4 与位点 3 结合. 这些位点在指导肠道 apoB 的表达中具

有协同作用. 对于这些结合位点进行逐一的定点突变研究, 转染肠道细胞系 CaCo-2, 发现 HNF-3 $\beta$ 、HNF-4 的结合位点对于增强子的活性更为重要, 其次是 C/EBP $\beta$  的结合位点. 这 3 种结合蛋白的共同作用, 才能使 apoB IE 的功能处于最佳状态.

## 2 C/EBP $\beta$ 与信号转导

Fas 介导的肝细胞的细胞凋亡在肝脏疾病过程中的肝细胞损伤和肝脏的再生调节中都具有重要的地位和作用. C/EBP $\beta$  作为 CCAAT 增强子结合蛋白家族的 bZIP 转录因子蛋白家族成员, 在肝脏再生和肝细胞凋亡过程中都有重要作用, 因此可能是肝细胞凋亡过程中重要的调节因素. Mukherjee et al<sup>[9]</sup> 对 C/EBP $\beta$  基因敲除小鼠的肝细胞在抗-Fas 抗体诱导的细胞凋亡中的作用进行了研究. 发现 C/EBP $\beta$ -/- 肝脏中的凋亡相对较轻, 是 C/EBP $\beta$  野生型小鼠的肝细胞凋亡的 1/20, 同时注意到胱冬肽酶 3 的表达水平降低. 抗凋亡蛋白 bcl-xL 的表达水平在 C/EBP $\beta$ -/- 小鼠模型中上升 10 倍, 部分揭示了对于 Fas 信号系统介导的肝细胞凋亡的抑制作用. 但是注意到 bcl-xL mRNA 转录水平并没有显著的改变. 这些研究结果表明, C/EBP $\beta$  在 Fas 诱导的肝细胞凋亡过程具有十分重要的作用, 主要的机制可能是通过 bcl-xL 的翻译后调节来实现的.

McNeel et al<sup>[3]</sup> 对于猪基质血管细胞分化过程中 C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\alpha$  等的表达水平的变化进行研究, 从出生到 7 周龄, C/EBP $\beta$  表达水平持续上升. 出生当日 C/EBP $\alpha$  的水平是出生第 9 d 时的 20%. 在组织中, C/EBP $\beta$  在出生时水平已经达到相当高的水平, 出生之后逐渐上升. C/EBP $\alpha$  出生时水平相对较低, 出生后的第 17 d 开始上升.

PGG-葡聚糖是一种可溶性的  $\beta$ -葡聚糖免疫调节剂, 可以提高多种白细胞的杀菌活性, 但不刺激炎症细胞因子的表达. 细胞膜上可能存在不同的可溶性的  $\beta$ -葡聚糖分子的受体, 但这种可溶性的配体分子所介导的信号转导目前还不清楚. PGG-葡聚糖处理小鼠巨噬细胞 BMC2.3 细胞系, 可以激活含有 p65(rel-A) 蛋白的 NF- $\kappa$ B 转录因子复合物. 此后, Adams et al<sup>[10]</sup> 发现 C/EBP $\beta$  相关的分子量为 48 kD 的蛋白参与 NF- $\kappa$ B 转录因子复合物的形成, 这一蛋白类型显然与先前鉴定的 C/EBP $\beta$ p34 不同. C/EBP $\beta$  是 bZIP 家族的成员之一, 其成员先前即被证实与 rel 蛋白家族的成员进行结合. PGG-葡聚糖激活的 rel/bZIP 蛋白异二聚体与脂多糖(LPS)激活的 p65/p50 rel/rel 复合物不同, 这些结果证实了 PGG-葡聚糖与 LPS 的信号转导有所不同. rel/bZIP 蛋白异二聚体还通过 PKC 和蛋白酪氨酸激酶(PTK)途径进行信号转导, 但是与丝裂原蛋白激活激酶(p38/MAPK)的信号转导通路无关. I $\kappa$ B $\alpha$  与此异二聚体有关, PGG-葡聚糖处理之后这种结合作用下降.

乙醇可以抑制肝脏的再生, 在酒精性肝病中具有

重要作用. Chen et al<sup>[11]</sup>研究了乙醇对肝细胞中 JAK-STAT 信号转导的影响. 新鲜分离的大鼠肝细胞以 10-100 mmol/l 的乙醇进行处理时, 在 3 min 之内就抑制白介素-6(IL-6)诱导的 STAT3 蛋白的激活、酪氨酸与丝氨酸的磷酸化修饰、以及 IL-6 诱导的 C/EBP $\alpha$ 、 $\beta$ mRNA 的转录表达. Western blot 分析结果表明, 体外的细胞标记表明, 这种抑制作用并不是抑制其上游的 JAK1、JAK2、Tyk2 的激活. 相反, 急性乙醇刺激, 可以显著刺激 IL-6 诱导的体内和体外的 JAK1 的自身磷酸化. 以非选择性的酪氨酸磷酸酶抑制剂钒酸钠、或 MG132、或蛋白体抑制剂进行预处理, 并不能阻断乙醇抑制 IL-6 诱导的 STAT3 激活. 表明蛋白酪氨酸磷酸酶或泛素在蛋白-蛋白酶体途径并没有涉及到. 鉴于 IL-6 信号转导在肝再生中的重要作用, 乙醇可以显著抑制 IL-6 诱导的 STAT3 的磷酸化可能是酒精性肝病发生的重要机制.

2/3 肝切除之后, 正常条件下处于静止状态的肝细胞又重新被刺激进入细胞周期的循环之中, 肝细胞的增生一直到恢复肝脏原来的大小. Bzip 转录因子蛋白 C/EBP $\beta$  在肝细胞再生过程中的表达水平上升, C/EBP 蛋白表达水平显著上升的机制目前还不十分清楚. 为了研究 C/EBP $\beta$  在肝细胞再生中的作用, Greenbaum et al<sup>[12]</sup>对 C/EBP $\beta$  基因敲除小鼠肝再生过程进行了研究. 肝脏部分切除之后, C/EBP $\beta$ -/- 小鼠的肝细胞的 DNA 合成与正常小鼠相比较下降到正常小鼠的 25%. 肝脏再生时间的延长, 与 C/EBP $\alpha$  蛋白、糖异生基因的表达无关. 在肝脏部分切除之后早期 C/EBP $\beta$ -/- 的肝脏即可出现生长调节基因表达水平下降, 包括 Egr-1 转录因子、MAPK 蛋白酪氨酸磷酸酶(MKP-1)、mRNA 剪切相关蛋白 HRS 等. 细胞周期素 B、E 基因的表达在 C/EBP $\beta$ -/- 的肝脏中也显著下降, 但细胞周期素 D1 的表达水平正常. C/EBP $\beta$ -/- 和 IL-6 -/- 小鼠肝脏中早期即刻基因表达的异常特点是不同的. 因此 C/EBP $\beta$  与正常的肝脏再生过程有关.

乙酰辅酶 A 脱羧酶(ACC)基因含有 2 个不同的基因启动子序列, 分别称为 PI、PII. PI 指导 I 型 ACC mRNA 的转录, 具有组织特异性; PII 指导 II 型 ACC mRNA 的转录, 可以持续表达. 前脂肪细胞 30A5 进行分化时, 2 种启动子活性都能激活. Tae et al<sup>[13]</sup>的研究结果表明 cAMP 的激活作用涉及到 C/EBP $\beta$  以及 PI 启动子的激活. 启动子 PI 控制的报告基因转录在 30A5 细胞受到 cAMP 的类似物刺激之后的 3 h 开始, 同时有 C/EBP $\beta$  mRNA、蛋白的表达. 蛋白激酶抑制剂 H8 存在时可以阻断这一调控, 也可以阻断 cAMP 对 PI 的激活过程. 但 TNF $\alpha$  不能阻断 cAMP 对 C/EBP $\beta$  mRNA 转录的诱导. C/EBP $\beta$  的过表达可以提高其与 DNA 的结合能力, 激活 PI 启动子. cAMP 不影响与 DNA 结合的 C/EBP $\beta$  的蛋白量, 但能促进 C/EBP $\beta$  蛋白的磷酸化和激活启动子 PI.

### 3 C/EBP $\beta$ 炎症反应

许多类型具有自身免疫倾向的小鼠其细胞因子的产生

发生异常. Liu et al<sup>[14]</sup>对于白介素-12(IL-12)产生异常小鼠的机制进行研究, 发现 Rel 家族的蛋白与 p40 基因启动子的 NF- $\kappa$ B 位点之间进行结合, 这一位点通常是 Ets、C/EBP $\beta$  的结合位点. IL-12 产生水平的升高与 NOD M(phi)小鼠 p50/c-Rel (p65)反式激活蛋白复合物水平相对于 p50/p50 同二聚体复合物激活作用升高有关. 在 IL-12 产生水平低下的 NZB/W、MRL/+ M(phi)小鼠中, 主要是由 p50/p50 调节, p50/c-Rel(p65) 结合居于次要地位.

大鼠暴露于 10 ml/l 氧气条件下 4 d 诱导肺高压, 同时诱导肺组织中的 iNOS 和 C/EBP $\beta$  的表达. Teng et al<sup>[15]</sup>的研究结果表明, 凝胶阻滞实验(EMSA)的研究结果表明, 暴露于 10 ml/l O<sub>2</sub> 的环境条件还可以引起肺微血管平滑肌细胞中 C/EBP $\beta$  的表达. 为了证实 C/EBP $\beta$  参与低氧条件下的 iNOS 调节, 对于 iNOS 基因启动子上游 910 bp 的 C/EBP 位点进行定点突变研究, 10 ml/l O<sub>2</sub> 的 24 h 条件下可以显著提高 iNOS 基因启动子的活性. 低氧条件下的上调作用由于 C/EBP 位点的突变而完全消失. 因此认为 C/EBP $\beta$  至少是部分参与了低氧条件下 iNOS 的诱导表达.

前列腺素是巨噬细胞功能激活的重要的介导因子, 可以诱导 COX-2 的表达. Caivano et al<sup>[16]</sup>以小鼠巨噬细胞系 RAW264 以及 C/EBP $\beta$  缺陷小鼠的永生细胞系研究了激活的巨噬细胞中 COX-2 的诱导. LPS 诱导 COX-2 mRNA 的表达具有双相特点. 第一相是新蛋白合成非依赖性的过程, 与 cAMP 应答元件结合蛋白(CREB)的激活有关, 可被 CREB 磷酸化因子或降低 NF- $\kappa$ B 介导的基因的表达激活因素所抑制, 而且需要有 C/EBP $\beta$  的参与. 2 个时相的 COX-2 的诱导在 C/EBP $\beta$ -/- 的巨噬细胞中都是缺陷的. C/EBP 水平同 COX-2 一样在被 LPS 刺激诱导后可以升高. 也可被 MAPK、SAPK2/p38 级联反应抑制剂所抑制. 综合上述研究结果, REB、NF- $\kappa$ B 以及 C/EBP $\beta$ 、 $\delta$  的协调调节作用决定了小鼠激活的巨噬细胞的 COX-2 启动子的转录活性.

分泌型磷脂酶 A2(PLA2)在花生四烯酸的释放过程中具有重要作用, 在软骨细胞中含量很高, 类风湿性关节炎患者的关节滑膜液中有大量 PLA2 的分泌. Massaad et al<sup>[17]</sup>的细胞转染实验研究结果表明, IL-1 $\beta$  刺激 PLA2 基因启动子区(-1614; +20 nt), 促进其转录活性达到 6-7 倍, 而位于(-210; -176 nt)区的核苷酸序列对于这一刺激起关键作用. C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$  转录因子可与此位点结合. IL-1 $\beta$  提高 C/EBP $\delta$  mRNA 的转录水平, 从刺激后的 2 h 到 24 h, 对于 C/EBP $\beta$  没有影响.

### 4 C/EBP $\beta$ 与记忆

长期记忆的形成过程包括多个阶段. 一种新的记忆是脆弱的, 容易被各种因素或事件所破坏. 新的记忆转换成永久记忆的过程称为加强. Taubenfeld et al<sup>[18]</sup>研究结果表明, 新基因的永久化需要有大脑皮层的 C/EBP $\beta$  的

表达参与, 而且这一过程不需要有新蛋白的合成. C/EBP $\beta$  的表达在新基因的永久化过程中具有重要作用. Taubenfeld et al<sup>[19]</sup> 的研究认为 CREB 是物种进化过程中高度保守的转录因子蛋白, 与长期记忆的形成有关, 但是 CREB 激活以后, 目前还不清楚下游的信号转导是否也是高度保守. CAMP 依赖性长期记忆的形成需要 C/EBP 基因表达的诱导. 在大鼠的研究中发现 C/EBP $\beta$ 、C/EBP  $\delta$  在 2 个不同的时间段内被诱导, 而且在大脑皮质中与磷酸化的 CREB 结合.

## 5 C/EBP $\beta$ 病毒感染

Hoshino et al<sup>[20]</sup> 研究结果表明, 合并肺结核时人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)在肺巨噬细胞(AM)中的复制水平显著升高, 与 C/EBP $\beta$  的转录抑制作用的丢失和 NF- $\kappa$ B 的激活作用有关. 因为 TB 引起的免疫应答过程需要淋巴细胞-巨噬细胞之间的相互作用, 因此建立了 2 种细胞相互作用的研究系统. 淋巴细胞与 AM 接触后的确降低了 C/EBP $\beta$  的抑制作用, 激活 NF- $\kappa$ B, 增强 HIV-1 的复制. 如果没有淋巴细胞与巨噬细胞之间的接触, C/EBP $\beta$  表达及其抑制作用可以维持, HIV-1 的长末端重复序列(LTR)虽然受到 NF- $\kappa$ B 的激活, 但是达不到最高水平. 应用抗体技术交联巨噬细胞膜上的 B-7 血管细胞黏附因子、CD40 等模拟淋巴细胞的接触, 只有当 3 种抗体同时进行交联时才可以抑制 C/EBP $\beta$  的表达和作用. 然而, 此时的 HIV-1 LTR 表达水平并没有达到最高, NF- $\kappa$ B 也没有被激活. HIV-1 LTR 最高水平的转录还需要淋巴细胞分泌的可溶性细胞因子的参与. 当上述分子应用抗体进行交联, 同时巨噬细胞体系中加入 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\beta$  时 HIV-1 LTR 的活性才达到最高水平. 激活的淋巴细胞与巨噬细胞之间的接触, 可以下调 C/EBP $\beta$  的抑制作用, 因此抑制 HIV-1 LTR 的表达活性. 淋巴细胞来源的细胞因子可以激活 NF- $\kappa$ B, 进一步增强 HIV-1 LTR 的活性水平.

p53 是一种转录因子, 在基因毒性应激时被激活, 介导细胞周期的阻滞和细胞凋亡. Kubicka et al<sup>[21]</sup> 以缺失 E1/E3 的重组腺病毒感染小鼠的肝细胞, 可以导致 p53 蛋白的激活, 下调白蛋白的基因表达. 体外转录实验结果表明, 白蛋白启动子的转录活性在受到腺病毒感染的感染时受到抑制. 肝细胞中白蛋白基因的持续表达受到肝细胞特异性转录因子如 C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$  等调节. 野生型 p53 以及来源于肿瘤的 p53 突变体抑制 C/EBP 介导的白蛋白基因启动子的转录激活. C/EBP $\alpha$  或  $\beta$  与白蛋白基因启动子区的结合不受 p53 蛋白的影响. 启动子序列的缺失突变研究结果表明, C/EBP $\beta$  介导的转录激活依赖于 p53 蛋白的氨基末端结构、亮氨酸拉链结构、以及 C/EBP $\beta$  的抑制性位点 II (163-191 aa). 这一结果表明 p53 蛋白介导的病毒感染后肝细胞特异性基因下调的分子生物学机制. 在未分化的肝细胞肿瘤中经常见到突变的 p53 过表达现象.

Honda et al<sup>[22]</sup> 先前的研究证实, HIV-1 在非炎症性肺脏中的复制过程是受到抑制的, 但当合并 TB 时 HIV-1 复制活性升高. 体外实验发现 THP-1 巨噬细胞中的 HIV-1 复制受到抑制, 但感染结核分支杆菌后期复制水平显著上升. 这些细胞中的 HIV-1 复制受到抑制, 可能与 HIV-1 LTR 受到抑制, 以及 ISGF-3 这种 I 型 IFN 特异性转录因子的表达有关. 对于 HIV-1 LTR 的抑制需要有完整的 C/EBP 结合位点的存在. THP-1 巨噬细胞感染结核分支杆菌以后, 以 LPS、IFN $\beta$  诱导 16 kD 具有抑制性的 C/EBP $\beta$  分子的表达, 共同抑制 HIV-1 LTR 的转录. C/EBP $\beta$  是 C/EBP 蛋白家族中的主要成员, 在 THP-1 巨噬细胞中的表达对于 HIV-1 LTR 的活性具有抑制作用. 体内非炎症性肺脏来源的肺巨噬细胞表达高水平的 16 kD C/EBP $\beta$ , 但是感染 TB 后, C/EBP $\beta$  表达基本消失, 同时诱导一种新型 C/EBP DNA 结合蛋白的表达. 因此, 体外炎症刺激产生 IFN 应答, 诱导 C/EBP $\beta$  的表达, 抑制转录活性. THP-1 巨噬细胞受 I 型 IFN 刺激后, 即象无炎症的肺脏一样. 但是活动的 TB 感染却阻断了这种天然的免疫应答, C/EBP 表达水平的消失与高水平的病毒复制有关.

洪源 et al 应用酵母单杂交技术, 从肝细胞 cDNA 文库中筛选得到了乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I (SP I) 的结合蛋白新基因, 命名为 SBP1, 序列分析结果表明, 这是 C/EBP $\beta$  转录因子蛋白家族的一个新成员. 利用报告基因表达载体构建及细胞共转染技术证实, SBP1 蛋白的表达对于 SP I 启动子的转录活性具有显著抑制作用. 为研究 SP I 的调节机制, 开辟了新的研究方向.

## 6 参考文献

- Conze D, Weiss L, Regen PS, Bhushan A, Weaver D, Johnson P, Rincon M. Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:8851-8858
- Wang CY, Lei HJ, Huang CY, Zhang Z, Mukherjee AB, Yuan CJ. Induction of cyclooxygenase-2 by staurosporine through the activation of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) and activator protein 2 (AP2) in an osteoblast-like cell line. *Biochem Pharmacol* 2002;64:177-184
- McNeel RL, Ding ST, Smith EO, Mersmann HJ. Expression of porcine adipocyte transcripts during differentiation *in vitro* and *in vivo*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2000;126:291-302
- Taubenfeld SM, Stevens KA, Pollonini G, Ruggiero J, Alberini CM. Profound molecular changes following hippocampal slice preparation: loss of AMPA receptor subunits and uncoupled mRNA/protein expression. *J Neurochem* 2002;81:1348-1360
- Zhang P, Nelson E, Radomska HS, Iwasaki-Arai J, Akashi K, Friedman AD, Tenen DG. Induction of granulocytic differentiation by 2 pathways. *Blood* 2002;99:4406-4412
- Christakos S, Barletta F, Huening M, Dhawan P, Liu Y, Porta A, Peng X. Vitamin D target proteins: Function and regulation. *J Cell Biochem* 2003;88:238-244
- Moreno-Aliaga MJ, Matsumura F. Effects of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)-ethane (p,p'-DDT) on 3T3-L1 and 3T3-F442A adipocyte differentiation. *Biochem Pharmacol* 2002;63:997-1007
- Antes TJ, Levy-Wilson B. HNF-3 beta, C/EBP beta, and HNF-4 act in synergy to enhance transcription of the human apolipoprotein B gene in intestinal cells. *DNA Cell Biol* 2001;20:67-74
- Mukherjee D, Kaestner KH, Kovalovich KK, Greenbaum LE. Fas-induced apoptosis in mouse hepatocytes is dependent on C/EBPbeta. *Hepatology* 2001;33:1166-1172
- Adams DS, Nathans R, Pero SC, Sen A, Wakshull E. Activation of a rel-A/CEBP-beta-related transcription factor

- heteromer by PGG-glucan in a murine monocytic cell line. *J Cell Bio Chem* 2000;77:221-233
- 11 Chen J, Kunos G, Gao B. Ethanol rapidly inhibits IL-6-activated STAT3 and C/EBP mRNA expression in freshly isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett* 1999;457:162-168
  - 12 Greenbaum LE, Li W, Cressman DE, Peng Y, Ciliberto G, Poli V, Taub R. CCAAT enhancer-binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest* 1998;102:996-1007
  - 13 Tae HJ, Zhang S, Kim KH. cAMP activation of CAAT enhancer-binding protein-beta gene expression and promoter I of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* 1995;270:21487-21494
  - 14 Liu J, Beller D. Aberrant production of IL-12 by macrophages from several autoimmune-prone mouse strains is characterized by intrinsic and unique patterns of NF-kappa B expression and binding to the IL-12 p40 promoter. *J Immunol* 2002; 169:581-586
  - 15 Teng X, Li D, Catravas JD, Johns RA. C/EBP-beta mediates iNOS induction by hypoxia in rat pulmonary microvascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2002;90:125-127
  - 16 Caivano M, Gorgoni B, Cohen P, Poli V. The induction of cyclooxygenase-2 mRNA in macrophages is biphasic and requires both CCAAT enhancer-binding protein beta (C/EBP beta) and C/EBP delta transcription factors. *J Biol Chem* 2001; 276:48693-48701
  - 17 Massaad C, Paradon M, Jacques C, Salvat C, Bereziat G, Berenbaum F, Olivier JL. Induction of secreted type IIA phospholipase A2 gene transcription by interleukin-1beta. Role of C/EBP factors. *J Biol Chem* 2000;275:22686-22694
  - 18 Taubenfeld SM, Wiig KA, Monti B, Dolan B, Pollonini G, Alberini CM. Fornix-dependent induction of hippocampal CCAAT enhancer-binding protein [beta] and [delta] Co-localizes with phosphorylated cAMP response element-binding protein and accompanies long-term memory consolidation. *J Neurosci* 2001;21:84-91
  - 19 Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci* 2001;4:813-818
  - 20 Hoshino Y, Nakata K, Hoshino S, Honda Y, Tse DB, Shioda T, Rom WN, Weiden M. Maximal HIV-1 replication in alveolar macrophages during tuberculosis requires both lymphocyte contact and cytokines. *J Exp Med* 2002;195:495-505
  - 21 Kubicka S, Kuhnel F, Zender L, Rudolph KL, Plumpe J, Manns M, Trautwein C. p53 represses CAAT enhancer-binding protein (C/EBP)-dependent transcription of the albumin gene. A molecular mechanism involved in viral liver infection with implications for hepatocarcinogenesis. *J Biol Chem* 1999;274: 32137-32144
  - 22 Honda Y, Rogers L, Nakata K, Zhao BY, Pine R, Nakai Y, Kurosu K, Rom WN, Weiden M. Type I interferon induces inhibitory 16-kD CCAAT/ enhancer binding protein (C/EBP) beta, repressing the HIV-1 long terminal repeat in macrophages: pulmonary tuberculosis alters C/EBP expression, enhancing HIV-1 replication. *J Exp Med* 1998;188:1255-1265

## 活性氧簇与肝炎病毒的关系

梁耀东, 成军, 吴君, 程明亮

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

吴君, 程明亮, 贵阳医学院第一附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004  
国家自然科学基金项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目 No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

梁耀东, 成军, 吴君, 程明亮. 活性氧簇与肝炎病毒的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(2):412-414

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/412.asp>

### 0 引言

细胞凋亡(apoptosis)是多细胞有机体为调控机体发育, 维护内环境稳定, 由基因控制的细胞主动死亡过程, 有多种生理病理因子如炎症递质和细胞因子等的参与, 其中, 氧应激(oxygen stress)造成大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生及其继发性细胞损伤过程在细胞凋亡过程中起重要作用. 近年来, 由于实验模型和检测方法的完善, 细胞凋亡的研究突飞猛进, 获得了重大突破. 肝炎病毒严重危害着人类的健康, 研究ROS与肝炎病毒的关系, 将了解肝炎病毒尤其是乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)的致病机制提供新的线索<sup>[1-2]</sup>.

### 1 活性氧的性质及功能

ROS是指氧的某些代谢产物和一些反应的含氧产物. 主要有超氧化物自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、单线态分子氧(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)、氢氧自由基(·OH)及过氧化脂质(LOOH)等, 其活性较大, 这种活性氧的毒害作用称为氧的毒性. 其中, 超氧化物自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)也可以HO<sub>2</sub>形式存在, 大部分以O<sub>2</sub><sup>-</sup>形成存在, O<sub>2</sub><sup>-</sup>是O<sub>2</sub>被一个电子还原生成的, O<sub>2</sub><sup>-</sup>是造成氧毒性的主要物质, O<sub>2</sub><sup>-</sup>既可起氧化作用, 也可作为还原剂, O<sub>2</sub><sup>-</sup>的消除主要经超氧化物歧化酶(SOD)催化生成O<sub>2</sub>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)可由O<sub>2</sub><sup>-</sup>的歧化反应生成, 在D-氨基酸氧化酶、L-氨基酸氧化酶、葡萄糖氧化酶及亚硫酸盐氧化酶等作用下, 把O<sub>2</sub>作为电子受体, 经两个电子还原生成H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 在线粒体中也能直接生成H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>经放射线照射, 一次生成·OH, 再生成H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>较稳定, 反应性低, 在体内浓度也比较低(大鼠肝脏中为10<sup>-9</sup> mol/L), 对机体几乎无毒性, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可与铁离子生成反应性非常高的氢氧自由基(·OH). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的消除依赖于两种酶, 一是过氧化氢酶, 催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>歧化反应; 二是谷胱甘肽(GSH)过氧化物酶. 在GSH参与下使H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分解, GSH则变成氧化型谷胱甘肽. 这2种酶可消除体内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>及过氧化物, 防止血红蛋白及肝细胞膜部分被氧化破坏的可能. 体内·OH从O<sub>2</sub>直接生成, 但反应尚不清楚, 机体可由O<sub>2</sub><sup>-</sup>生成系与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成系共同形成·OH自由基. 水经放射线照射后的一级反应产物是·OH, 由于·OH氧化能力很强, 因此对机体毒性很大. 单线态分子氧(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)是一个强的亲电子性的氧化剂, 可用化学方法生成, 也可由H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>经氧化生成, 即H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>由次氯酸氧化生成<sup>1</sup>O<sub>2</sub>. 其可与芳香族碳氢化合物进行一系列的反应. 人体内的过氧化脂类物质主要有亚油酸、亚麻酸及花生四烯酸, 多以磷脂形式存在于质膜等生物膜中. 这些不饱和脂肪酸可受<sup>1</sup>O<sub>2</sub>氧化, 也可经·OH氧化生成过氧化脂质, 生物膜上脂类既可在O<sub>2</sub><sup>-</sup>作用下生成过氧化脂质(LO·、LOO·、LOOH),

也可经放射线照射生成脂类自由基(L·), 这种在脂类中微量存在的L·, 在氧参与下进行链锁反应, 加速过氧化过程. 过氧化脂质化学性质活泼, 易进一步使脂类分解引起自由基反应, 也可使GSH氧化, 而本身变成较稳定的脂类羟基化合物(LOOH).

近来研究发现, 一氧化氮(NO)自由基在细胞凋亡中也起到相当重要的作用. NO是由一氧化氮合酶(NOS)催化L-精氨酸脱胍基而产生的, 是一种自由基气体, 带不成对电子, 化学性质非常活跃, 能迅速与氧分子、O<sub>2</sub><sup>-</sup>及铁、镁和铜离子反应.

活性氧可以通过脂质过氧化损伤、使蛋白质和酶分子失活及损伤DNA分子等途径造成对细胞的损伤. 大量研究发现, 活性氧升高或耗竭内源性抗氧化剂可导致细胞凋亡; 内源性或外源性抗氧化剂可抑制细胞凋亡; 细胞凋亡与细胞内活性氧水平增加有关; 活性氧相关生物活性递质可诱导细胞凋亡. 以上研究, 为证实氧自由基参与介导细胞凋亡提供了证据. 活性氧诱导细胞凋亡的机制尚未完全阐明, 可能与其活化细胞凋亡程序及调节凋亡相关基因的表达有关<sup>[3-6]</sup>.

NO是一种具有广泛生物学效应的小分子化合物, 有大量文献报道其能诱导细胞凋亡. 其可能通过直接损伤作用、氧化生成ONOO<sup>-</sup>途径、作用于细胞凋亡的信号通路、与细胞因子协同诱导及干扰能量代谢等环节来诱导细胞凋亡<sup>[7-9]</sup>.

ROS与ATP的生成和肿瘤的启动、进展有关<sup>[10]</sup>. 正常细胞线粒体可摄取机体90%以上的氧, 1-2%用于转化为ROS超氧化物和过氧化物等; 线粒体DNA(mtDNA)的突变可以增加ROS的产生, 而ROS的增多又加重了突变效应, 从而加剧了ROS超氧化物和过氧化物的氧化损伤作用, 影响线粒体基因组的生物发生并激活核基因组<sup>[11]</sup>. 肿瘤细胞mtDNA的转录水平(mRNA)常常增高, 而过氧化氢等ROS可以影响mtDNA的表达<sup>[12]</sup>. Wang et al<sup>[13]</sup>认为mtDNA的转录水平增高, 可以造成细胞凋亡降低, 可能与其致癌有关; 而表达降低可能与衰老更有关.

## 2 活性氧与肝炎病毒的关系

在慢性丙型肝炎病毒感染过程中有氧化应激的发生. 从衰老的吞噬细胞和活化的巨噬细胞中释放的ROS在肝脏细胞的氧化应激中起到主要作用. 然而, 单核细胞产生的ROS与丙型肝炎病毒蛋白发生应答的能力却知之甚少. 为了观察人单核细胞产生的ROS与几种丙肝病毒蛋白的作用, Bureau et al<sup>[14]</sup>将健康志愿人群血单核细胞与HCV的核心、NS3、NS4和NS5蛋白的重组蛋白进行孵育, 通过冷光法测定ROS的产量. 结果发现只有NS3蛋白可以触发单核细胞释放ROS. 产生的ROS主要是阴离子超氧化物. 通过数字显像显微技术发现NS3蛋白可以快速诱导细胞内钙离子的聚集或瞬时升高. 通过利用不同的代谢抑制剂研究发现, ROS的产生需要钙离子内流通道、酪氨酸激酶和蛋白活化应激激酶p38.

对蛋白活化应激激酶p47的磷酸化作用和易位杂交研究发现, NS3蛋白可以激活还原型辅酶II(NADPH), 从而诱导ROS的产生; 另一研究发现, NS3蛋白可以通过(12-)-十四酸佛波酯(-13-)-乙酸盐抑制氧化裂解. 以上结果显示NS3蛋白可以激活还原NADPH和调控ROS的产生, 这可能与丙型肝炎病毒的自然感染过程有关.

在慢性丙型肝炎患者中, 有肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )的增加, 这一细胞因子能通过刺激ROS的产生而激发氧化应激的发生. 细胞对ROS的防御主要有锰-超氧化物歧化酶(Mn-SOD), 其是一种可诱导线粒体的酶. 为研究丙型肝炎病毒感染的细胞防御氧化应激的机制, Larrea et al<sup>[15]</sup>从慢性丙型肝炎患者肝细胞和周围血液单核细胞的Mn-SOD mRNA进行分析, 结果发现, 周围血液单核细胞中的Mn-SOD表达显著增加, 经过治疗后, 病毒血症持续应答者Mn-SOD量较阳性者明显减低. 然而, 在慢性丙型肝炎患者肝细胞中, Mn-SOD mRNA的表达并不增高. Mn-SOD mRNA的表达与TNF $\alpha$  mRNA的表达、HCV含量及活动度无明显相关作用. Mn-SOD在慢性丙型肝炎患者周围血液单核细胞中增加, 而在肝细胞中缺如, 表明肝脏组织细胞缺乏抗氧化损伤的保护系统, 从而使氧化应激参与到HCV的致病过程中.

乙型肝炎病毒X蛋白(HBxAg)在病毒复制和肝细胞癌(HCC)的发生中扮演着重要的角色, 但是他的具体功能还不是很清楚<sup>[16-19]</sup>. 有资料显示, HBxAg可与p53形成复合体, 从而抑制其DNA共识系列的结合和转录的转式激活活性<sup>[20]</sup>. Elmore et al<sup>[21]</sup>研究发现HBxAg与p53的C-末端结合, 抑制一些重要p53介导的细胞过程, 包括DNA系列特异的结合、转录的转式激活和凋亡. HBxAg以其远侧C末端(111-154 aa)结合谷胱甘肽S-转移酶(GST), 在HBxAg与p53的相互作用中是关键. HBxAg的C末端区与p53在胞质内复杂连接, 部分防止p53进入胞核内, 抑制引起细胞凋亡的能力.

HBxAg已被证实是通过结合电压依赖阴离子通道(VDAC3)而改变线粒体的跨膜电位的. Waris et al<sup>[22]</sup>研究发现, HBxAg与线粒体相结合的结果是不断地诱导转录因子包括STAT-3和NF- $\kappa$ B因子的激活, 这种诱导激活对N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)和四氢吡咯二硫代氨基甲酸氧化剂敏感, 正如其对Mn-SOD敏感一样. 以上结果提示ROS在最终导致STAT-3和NF- $\kappa$ B因子激活的过程中起着某种作用. HBxAg诱导激活STAT-3和NF- $\kappa$ B因子的能力通过从转染了HBxAg的肝癌细胞(HepG2)裂解物的泳动试验和报告基因表达检测得以证实, 这也证实了HBxAg确能诱导ROS的产生. 当HBxAg的C-端99位发生缺失突变时, HBxAg将不能与VDAC3结合, 从而也不能激活STAT-3和NF- $\kappa$ B因子. 这一研究揭示了HBxAg与线粒体结合所致的氧化应激与HBV感染对肝脏组织损伤的致病机制有关.

肝细胞凋亡发生在肝发育时和成人肝细胞更新时, 是正常细胞现象; 但也可发生在各种病毒、免疫、肿

瘤或药物引起的肝脏疾病. 病毒清除和组织损伤, 主要有细胞毒性T细胞(CTL)或单核巨噬细胞(M)经靶细胞表面分子和细胞内转导途径, 引起细胞凋亡和坏死. 近年来, 关于肝细胞凋亡的研究较多, 但ROS与各型肝炎病毒感染时发生细胞凋亡的关系研究不多, 他们的关系值得我们进一步探索.

### 3 参考文献

- 1 成军, 黄海长. 程序性细胞死亡与疾病. 第1版. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997:145-147
- 2 姜泊, 谭小华, 许岸高, 朴英杰, 杨冬华. 细胞凋亡基础与临床. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1999:104-112
- 3 Fujimaki Y, Shimoyama T, Liu Q, Umeda T, Nakaji S, Sugawara K. Low-level laser irradiation attenuates production of reactive oxygen species by human neutrophils. *J Clin Laser Med Surg* 2003;21:165-170
- 4 Peterszegi G, Robert AM, Robert L. Protection by L-fucose and fucose-rich polysaccharides against ROS-produced cell death in presence of ascorbate. *Biomed Pharmacother* 2003;57:130-133
- 5 Tzeng HP, Yang RS, Ueng TH, Lin-Shiau SY, Liu SH. Motor-cycle exhaust particulates enhance vasoconstriction in organ culture of rat aortas involve reactive oxygen species. *Toxicol Sci* 2003;75:66-73
- 6 Alonso MM, Asumendi A, Villar J, Gil MJ, Martinez-Merino V, Encio IJ, Migliaccio M. New benzo(b)thiophenesulphonamide 1,1-dioxide derivatives induce a reactive oxygen species-mediated process of apoptosis in tumour cells. *Oncogene* 2003;22:3759-3769
- 7 Machova J, Stefek M, Kukan M, Sinsky M, Ondrias K, Rackova L, Navarova J, Bauer V. Involvement of L-Arginine-Nitric oxide system in the response of isolated trachea to reactive oxygen species. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2003;25:287-296
- 8 Venkatraman A, Shiva S, Davis AJ, Bailey SM, Brookes PS, Darley-Usmar VM. Chronic alcohol consumption increases the sensitivity of rat liver mitochondrial respiration to inhibition by nitric oxide. *Hepatology* 2003;38:141-147
- 9 Arzumani V, Stankevicius E, Laukeviciene A, Kevelaitis E. Mechanisms of nitric oxide synthesis and action in cells. *Medicina (Kaunas)* 2003;39:535-541
- 10 Toyokuni S, Sagripanti JL. Iron chelators modulate the production of DNA strand breaks and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Free Radic Res* 1999;31:123-128
- 11 Wallace DC. Mouse models for mitochondrial disease. *Am J Med Genet* 2001;106:71-93
- 12 Li JM, Cai Q, Zhou H, Xiao GX. Effects of hydrogen peroxide on mitochondrial gene expression of intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:1117-1122
- 13 Wang J, Silva JP, Gustafsson CM, Rustin P, Larsson NG. Increased *in vivo* apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4038-4043
- 14 Bureau A, Bernard J, Chaouche N, Orfila C, Beraud M, Goninard C, Alric L, Vinel JP, Pipy B. Nonstructural 3 protein of hepatitis C virus triggers an oxidative burst in human monocytes via activation of NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2001;276:23077-23083
- 15 Larrea E, Beloqui O, Munoz-Navas MA, Civeira MP, Prieto J. Superoxide dismutase in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Free Radic Biol Med* 1998;24:1235-1241
- 16 Bontron S, Lin-Marq N, Strubin M. Hepatitis B virus X protein associated with UV-DDB1 induces cell death in the nucleus and is functionally antagonized by UV-DDB2. *J Biol Chem* 2002;277:38847-38854
- 17 Forgues M, Marrogi AJ, Spillare EA, Wu CG, Yang Q, Yoshida M, Wang XW. Interaction of the hepatitis B virus X protein with the Crm1-dependent nuclear export pathway. *J Biol Chem* 2001;276:22797-22803
- 18 Weil R, Sirma H, Giannini C, Kremsdorf D, Bessia C, Dargemont C, Brechot C, Israel A. Direct association and nuclear import of the hepatitis B virus X protein with the NF-kappaB inhibitor I-kappaBalpha. *Mol Cell Biol* 1999;19:6345-6354
- 19 Becker SA, Lee TH, Butel JS, Slagle BL. Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair. *J Virol* 1998;72:266-272
- 20 Wang XW, Gibson MK, Vermeulen W, Yeh H, Forrester K, Sturzbecher HW, Hoeijmakers JH, Harris CC. Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res* 1995;55:6012-6016
- 21 Elmore LW, Hancock AR, Chang SF, Wang XW, Chang S, Callahan CP, Geller DA, Will H, Harris CC. Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:14707-14712
- 22 Waris G, Huh KW, Siddiqui A. Mitochondrially associated hepatitis B virus X protein constitutively activates transcription factors STAT-3 and NF-kappa B via oxidative stress. *Mol Cell Biol* 2001;21:7721-7730

## 趋化因子与病毒性肝炎的关系

陆荫英, 成军, 张玲霞

陆荫英, 成军, 张玲霞, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039 国家自然科学基金项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目 No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. [cj@genetherapy.com.cn](mailto:cj@genetherapy.com.cn)  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

陆荫英, 成军, 张玲霞. 趋化因子与病毒性肝炎的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(2):414-417

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/414.asp>

### 0 引言

趋化因子(Chemokines)是一类结构相似的糖蛋白, 具有较强的白细胞激活和趋化活性, 包含有70-90个氨基酸, 相对分子质量8-10 kD, 带有4个半胱氨酸残基, 根据其末端的2个半胱氨酸残基是直接相连或是被一个氨基酸分开而分为 $\alpha$ 和 $\beta$ 两大家族、19个成员, 具有趋化和激活中性粒细胞、单核细胞或某些T细胞亚群、趋化嗜酸性粒细胞、趋化嗜碱性粒细胞并刺激其释放组织胺及刺激造血细胞、成纤维细胞、角化细胞或黑色素瘤细胞的生长等作用, 近年来研究发现, Chemokines在病毒性肝炎的发病过程中也起着重要的作用<sup>[1-2]</sup>.

### 1 概述

1986年以来, 陆续发现了一类主要由免疫细胞产生的、具有趋化白细胞作用的细胞因子, 在1992年第3届国际趋化因子研讨会上, 将其定义为chemoattractant (chemotactic) cytokine 简称为chemokines, 译为趋化因子, 目前至少发现有19个成员. 他们具有以下共同的特点: (1)来自同一个祖先基因; (2)成熟分子为分子量8-10kD的小分子多肽; (3)具有可诱导性; (4)不同成员在氨

氨基酸水平上有 21-90% 的同源性, 均含有 4 个半胱氨酸残基(Cys)的保守基序, 组成特征性的两个二硫键, (5)其相应的受体属于 G 蛋白偶联受体. 根据多肽链一级结构末端的 4 个 Cys 中第 1、2 两个 Cys 排列的方式, 可将趋化因子超家族分为两个亚族: (1) C-X-C 亚族( $\alpha$  亚族), 除 NAP-4 以外, 这个亚族其余成员分子中 N 端两个 Cys 之间被另一个氨基酸残基所分隔; (2) C-C 亚族( $\beta$  亚族), 第 1、2 两个 Cys 是相连的.

趋化因子 C-X-C 和 C-C 亚族的生物学活性有明显的差别. C-X-C 亚族中, 除  $\gamma$ IP-10、Mig 和 PF-4 外, 其余成员均具有趋化和激活中性粒细胞的活性,  $\gamma$ IP-10 主要趋化单核细胞和 T 细胞. C-C 亚族主要趋化和激活单核细胞和某些 T 细胞亚群. 趋化因子能趋化和激活中性粒细胞、单核细胞或某些 T 细胞亚群, 可趋化嗜酸性粒细胞, 或趋化嗜碱性粒细胞并刺激其释放组织胺; 某些成员还具有刺激造血细胞、成纤维细胞、角化细胞或黑素瘤细胞的生长的功能. 最近研究发现, 部分趋化因子参与肝炎病毒致肝细胞损伤的过程, 下面就 C-X-C 亚族中的白介素-8(IL-8)和生长相关基因  $\alpha$ /黑素瘤生长刺激活性(GRO)以及 C-C 亚族中 MCP-1/MCAF、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-3 $\alpha$  和 RANTES 等与病毒性肝炎发病的关系作一介绍.

## 2 IL-8 与病毒性肝炎

1986 年 Kownatzki et al 首先证实了单核细胞可产生一种中性粒细胞趋化因子, 1988 年 Matsushima 基因克隆成功, 属于 C-X-C 亚族( $\alpha$  亚族)成员, 命名为白介素-8(interleukin-8, IL-8). IL-1、TNF、LPS 和 PMA 均能诱导单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞、成纤维细胞和表皮细胞等合成和分泌 IL-8, PHA 等丝裂原活化的 T 细胞也可产生 IL-8, 人类多种肿瘤细胞均可高表达 IL-8<sup>[3]</sup>. IL-8 能趋化和激活中性粒细胞, 使中性粒细胞外形改变, 促进其脱颗粒, 激活中性粒细胞并使其产生呼吸爆发(respiratory burst)、释放超氧化物(O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和溶酶体酶, 能诱导中性粒细胞上调 MHC I 抗原(CD11b/CD18)的表达, 促进中性粒细胞黏附到内皮细胞和内皮细胞下的基质蛋白. 趋化嗜碱性粒细胞, 并刺激其释放组织胺, 可能与速发型超敏反应的发生有关. 此外, 还可刺激 GM-CSF 或 IL-5 预先处理的嗜酸性粒细胞的脱颗粒作用. IL-8 还可明显趋化 IL-2 活化的 NK 细胞, 同时还是角化细胞的复合促有丝分裂原(co-mitogen), 也是黑素瘤细胞的自分泌生长因子.

在与病毒性肝炎发病关系的研究中, Mahmood et al<sup>[4]</sup> 对 35 例慢性丙型肝炎(CHC)患者的肝活检标本进行检测, 发现 IL-8 的表达水平在肝纤维化的发展和肝脏炎症活动而增高, 与 IL-2、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-15、TNF- $\alpha$  等变化平行, 推测其可能在 CHC 的病理过程中起着重要作用, 并能上调或诱导上述细胞因子的表达. Girard et al<sup>[5]</sup> 发现 HCV NS5A 在 Huh7 细胞中表达能

上调 IL-8 的表达, 且其表达的增加可抑制 IFN 的活性, 影响抗病毒治疗效果, Polyak et al 进一步研究发现 CHC 患者血中 IL-8 水平明显高于健康人, 在 IFN 治疗无效的患者血中又明显高于 IFN 治疗有效的患者. Wang et al<sup>[6]</sup> 检测了慢性乙型肝炎患者血清中的 IL-8 及其他细胞因子的水平, 结果发现在重型肝炎患者中 IL-8 的水平明显高于急性肝炎患者, 与血清胆红素水平相关, 随着病情的恶化 IL-8 水平逐渐增高, 当肝损害最严重时达到高峰, 随着病情的好转逐渐下降, 与肝脏的炎症变化呈正相关. Masumoto et al<sup>[7]</sup> 也证实慢性病毒肝炎患者血中 IL-8 水平较正常人明显增高, 其中慢性活动性肝炎患者明显高于慢性迁延性肝炎患者, 病程恶化期间水平明显高于病情恢复期, 在 10 例病毒性肝炎患者肝组织上做免疫组化染色发现 8 例肝窦状隙周围有 IL-8 的表达. Horiguchi et al<sup>[8]</sup> 用镉喂养 IL-8 转基因小鼠 18 h 后, 小鼠血浆 GOT、GPT 水平迅速增加, 外周血白细胞及单核细胞计数增高延迟, 肝脏组织学检测发现肝组织中中性粒细胞移动抑制, 肝细胞坏死增加, 转基因小鼠死亡率明显大于野生小鼠, 推测是由于 IL-8 的过表达引起趋化性缺乏、中性粒细胞表面选择素-1(I-selectin)表达下调, 导致中性粒细胞移动障碍所致. Mahe et al<sup>[9]</sup> 在 HBxAg 转染细胞中发现 IL-8 的表达明显增高, 将 IL-8 调节区域 5' 端缺失的突变子连接氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因作为报告子研究, 发现 NF- $\kappa$ B 及 IL-8 基因上游-94 到-71 间增强子结合蛋白类似物顺式作用元件是 HBxAg 诱导 IL-8 表达的重要成分, 证明 HBxAg 能诱导 IL-8 表达, 加重肝损伤.

受病毒蛋白及其他细胞因子的影响, IL-8 的表达水平增高, 加重肝损伤, 影响 IFN 的抗病毒疗效, 因此认为 IL-8 的表达水平能反映病毒性肝病的严重程度及发展阶段, 并对判断预后有一定意义, 抗 IL-8 抗体的应用有望能对病毒性肝炎的治疗起到一定的作用.

## 3 C-C 亚族趋化因子与病毒性肝炎

3.1 MCP-1 MCP-1 能促进单核细胞的移动和活化, 在慢性炎症的发病过程中起关键性作用. T 细胞介导的肝脏疾病与血中 C-C 趋化因子配体-2(CCL-2)/单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)作用紧密相关. Ajuebor et al<sup>[10]</sup> 用刀豆蛋白 A(Con-A)诱导的大鼠肝炎模型中发现, MCP-1 的中和作用显著增加肝损害, MCP-1 中和可减少肝脏 TNF- $\alpha$  及干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )水平, 增加肝脏白介素-4(IL-4)水平, 体外用重组 MCP-1 治疗可减低 IL-4 的产生和刀豆蛋白 A 刺激 CD3(+)/NK1.1(+) T 细胞 C-C 趋化因子受体-2(CCR2)的表达, 推测 MCP-1 可能通过直接刺激 CD3(+)/NK1.1(+) T 细胞特异性 CCR2 减少其产生 IL-4, 而起抗炎作用. Meng Soo et al<sup>[11]</sup> 发现全长的 HCV-S1 在 HeLa、Huh7、HepG2 中表达可在 mRNA 及蛋白水平诱导 MCP-1 的表达, 含翻译起始位点上游 128 个核苷酸的 MCP-1 启动子是 HCV 与其作用的关键

区域, HCV的 core和 NS5A能增强 MCP-1启动子的活性. Shin et al<sup>[12]</sup>报道在 HBV相关的肝肿瘤细胞中, MCP-1过表达. Marra et al<sup>[13]</sup>报道未受刺激的肝脂肪细胞能分泌 MCP-1, 用 IL-1 $\alpha$ 或 IFN- $\gamma$ 刺激后 MCP-1的水平增加 2-3倍, TNF- $\alpha$ 刺激后增加 1.6倍. 上述结果表明 MCP-1在肝脏炎症时出现过表达, 反馈引起 TNF- $\alpha$ 及 IFN- $\gamma$ 水平下降, IL-4水平增加而起抗炎和抑制肿瘤的作用, 并能间接反映肝炎的严重情况.

3.2 IP-10 Narumi et al<sup>[14-15]</sup>发现在慢性肝炎患者肝脏中, 被单核细胞浸润包围的肝细胞能受 TNF- $\alpha$ 诱导产生干扰素诱生蛋白-10(IP-10), 与慢性肝炎小叶内单核细胞浸润有关, 慢性活动性肝炎患者血中 IP-10和 MCP-1水平明显高于正常人, IFN治疗完全应答患者 IP-10水平降至正常, MCP-1水平仅轻度下降, IFN治疗无应答患者上述二者无明显变化, 血中 IP-10水平较低和 MCP-1水平较高的患者 IFN治疗效果好; 原位杂交检测发现 IP-10的 mRNA主要出现在小叶内及汇管区坏死灶周围的肝细胞中, MCP-1则在窦状隙细胞中, 结果提示 IP-10在小叶内单核细胞的聚集及肝细胞死亡中起着特殊作用, 能间接反映 IFN抗病毒治疗效果.

3.3 MIP MIP-3 $\alpha$ 是 CC趋化因子中的一员, 具有趋化未成熟树突状细胞(DC)和淋巴细胞的功能, 在炎症和肿瘤发生中起重要作用. Yamauchi et al<sup>[16]</sup>检测 40例慢性病毒性肝炎患者血中 MIP-3 $\alpha$ 含量, 发现肝炎患者 MIP-3 $\alpha$ 水平明显高于正常对照, 重度和中度肝炎患者 MIP-3 $\alpha$ 水平较轻度患者高, MIP-3 $\alpha$ 的变化与 ALT、AST水平、肝脏炎症活动度正相关, 用 IFN治疗有效的丙型肝炎患者 2 wk后 MIP-3 $\alpha$ 水平开始升高, IFN治疗无应答者无变化. Shimizu et al<sup>[17]</sup>报道, 肝脏内 MIP-3 $\alpha$ 主要由汇管区周围的 DC发生坏死性炎症反应后产生, 从而导致活化的 T淋巴细胞进入肝组织, 这一过程引起了各种肝脏疾病的局部免疫反应的扩大, 炎症加重. Flesch et al<sup>[18]</sup>也报道 MIP-1 $\alpha$ 在体外能增加 DC的存活时间, 激发对外源性 HBsAg的 CTL效应. 推测 MIP-3 $\alpha$ 可能通过介导和扩大 CTL效应而引起或/和加重肝细胞损伤, 并有助于判断 IFN抗病毒疗效.

3.4 RANTES 最初认为 RANTES只由 T细胞产生, 以后发现其与凝血酶刺激人血小板所释放的嗜酸性粒细胞趋化物质是同一种分子. 除 T细胞(CD4+和 CD8+)和血小板外, 肾小管上皮细胞、肾小球膜细胞、肾脏、肝脏等也可表达 RANTES. 人 RANTES的前体是高度碱性的蛋白, 与 MIP-1 $\alpha$ 和 MIP-1 $\beta$ 有较高同源性. RANTES对多种白细胞具有趋化或/和刺激作用: (1)趋化单核细胞; (2)趋化未刺激的 CD4+CD45RO+记忆 T细胞以及活化后的 CD4+和 CD8+T细胞; (3)趋化嗜酸性粒细胞并刺激其脱颗粒和呼吸爆发; (4)是嗜碱性粒细胞较强的趋化剂, 但刺激其组织胺等递质释放的作用较弱; (5)RANTES预处理 T细胞可增加其与 IL-1 $\alpha$ 刺激内皮细胞的黏附能力. Promrat et al<sup>[19]</sup>发现带有 RANTES-403-A基因的

HCV阳性白种人较没有该基因的人发生严重肝脏炎症的几率小, 推测 RANTES的表达对于慢性肝炎患者肝脏炎症反应的调节和 IFN应答具有重要作用. 有报道 HCV-S1的 core和 NS5A能增强 RANTES启动子的活性, 促进 RANTES在 HeLa, Huh7及 HepG2细胞中的表达. Kusano et al<sup>[20]</sup>原位杂交结果显示 RANTES-mRNA主要出现在汇管区和碎屑样坏死灶, 与 T淋巴细胞出现的位置一致, 其水平还与 ALT变化正相关, 提示 RANTES通过将 T淋巴细胞趋化到汇管区和汇管周围区而参与肝脏免疫损伤.

趋化因子家族中众多的成员各自具有相似但不完全相同的功能, 在病毒性肝炎的免疫学发病机制、IFN治疗效果、病情预后等方面起重要的作用, 进一步明确具体功能及作用机制, 并针对其间的靶点进行阻断, 有望在寻找病毒性肝炎更有效的防治手段方面取得可喜的进展.

#### 4 参考文献

- 1 Shin EC, Choi YH, Kim JS, Kim SJ, Park JHS. Expression patterns of cytokines and chemokines genes in human hepatoma cells. *Yonsei Med J* 2002;43:657-664
- 2 Promrat K, McDermott DH, Gonzalez CM, Kleiner DE, Koziol DE, Lessie M, Merrell M, Soza A, Heller T, Ghany M, Park Y, Alter HJ, Hoofnagle JH, Murphy PM, Liang TJ. Associations of chemokine system polymorphisms with clinical outcomes and treatment responses of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003;124:352-360
- 3 Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Brenner DA, Asano T, Nozawa Y, Moriwaki H, Nakashima S. Tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 production via NF-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways inhibits cell apoptosis in human hepatocytes. *Infect Immun* 2002;70:6294-6301
- 4 Mahmood S, Sho M, Yasuhara Y, Kawanaka M, Niiyama G, Togawa K, Ito T, Takahashi N, Kinoshita M, Yamada G. Clinical significance of intrahepatic interleukin-8 in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res* 2002;24:413-419
- 5 Girard S, Shalhoub P, Lescure P, Sabile A, Misek DE, Hanash S, Brechot C, Beretta L. An altered cellular response to interferon and up-regulation of interleukin-8 induced by the hepatitis C viral protein NS5A uncovered by microarray analysis. *Virology* 2002;295:272-283
- 6 Wang JY, Wang XL, Liu P. Detection of serum TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-8 in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 1999;5:38-40
- 7 Masumoto T, Ohkubo K, Yamamoto K, Ninomiya T, Abe M, Akbar SM, Michitaka K, Horiike N, Onji M. Serum IL-8 levels and localization of IL-8 in liver from patients with chronic viral hepatitis. *Hepatogastroenterology* 1998;45:1630-1634
- 8 Horiguchi H, Harada A, Oguma E, Sato M, Homma Y, Kayama F, Fukushima M, Matsushima K. Cadmium-induced acute hepatic injury is exacerbated in human interleukin-8 transgenic mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;163:231-239
- 9 Mahe Y, Mukaida N, Kuno K, Akiyama M, Ikeda N, Matsushima K, Murakami S. Hepatitis B virus X protein transactivates human interleukin-8 gene through acting on nuclear factor kB and CCAAT/enhancer-binding protein-like cis-elements. *J Biol Chem* 1991;266:13759-13763
- 10 Ajuebor MN, Hogaboam CM, Le T, Swain MG. C-C chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 directly inhibits NKT cell IL-4 production and is hepatoprotective in t cell-mediated hepatitis in the mouse. *J Immunol* 2003;170:5252-5259
- 11 Meng Soo H, Garzino-Demo A, Hong W, Hwee T Y, Joo TY, Goh PY, Gee LS, Pheng LS. Expression of a full-length hepatitis C virus cDNA up-regulates the expression of CC chemokines MCP-1 and RANTES. *Virology* 2002;303:253-277

- 12 Shin EC, Choi YH, Kim JS, Kim SJ, Park JH. Expression patterns of cytokines and chemokines genes in human hepatoma cells. *Yonsei Med J* 2002;43:657-664
- 13 Marra F, DeFranco R, Grappone C, Milani S, Pastacaldi S, Pinzani M, Romanelli RG, Laffi G, Gentilini P. Increased expression of monocyte chemotactic protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol* 1998;152:423-430
- 14 Narumi S, Tominaga Y, Tamaru M, Shimai S, Okumura H, Nishioji K, Itoh Y, Okanoue T. Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis. *J Immunol* 1997;158:5536-5544
- 15 Narumi S, Yoneyama H, Inadera H, Nishioji K, Itoh Y, Okanoue T, Matsushima K. TNF-alpha is a potent inducer for IFN-inducible protein-10 in hepatocytes and unaffected by GM-CSF in vivo, in contrast to IL-1beta and IFN-gamma. *Cytokine* 2000;12:1007-1016
- 16 Yamauchi K, Akbar SM, Horiike N, Michitaka K, Onji M. Increased serum levels of macrophage inflammatory protein-3alpha in hepatocellular carcinoma: Relationship with clinical factors and prognostic importance during therapy. *Int J Mol Med* 2003;11:601-605
- 17 Shimizu Y, Murata H, Kashii Y, Hirano K, Kunitani H, Higuchi K, Watanabe A. CC-chemokine receptor 6 and its ligand macrophage inflammatory protein 3alpha might be involved in the amplification of local necroinflammatory response in the liver. *Hepatology* 2001;34:311-319
- 18 Flesch IE, Stober D, Schirmbeck R, Reimann J. Monocyte inflammatory protein-1 alpha facilitates priming of CD8(+) T cell responses to exogenous viral antigen. *Int Immunol* 2000; 12:1365-1370
- 19 Promrat K, McDermott DH, Gonzalez CM, Kleiner DE, Koziol DE, Lessie M, Merrell M, Soza A, Heller T, Ghany M, Park Y, Alter HJ, Hoofnagle JH, Murphy PM, Liang TJ. Associations of chemokine system polymorphisms with clinical outcomes and treatment responses of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003;124:352-360
- 20 Kusano F, Tanaka Y, Marumo F, Sato C. Expression of C-C chemokines is associated with portal and periportal inflammation in the liver of patients with chronic hepatitis C. *Lab Invest* 2000;80:415-422

## 病毒性肝炎发病机制中环氧化酶的作用

刘敏, 成军, 张树林

刘敏, 成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
 张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061  
 刘敏, 西安交通大学2000年内科 陕西省西安市 710061  
 国家自然科学基金项目, No. C39970674, No. C03011402, No. C39900130, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目 No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135  
 项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn  
 电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
 收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

刘敏, 成军, 张树林. 病毒性肝炎发病机制中环氧化酶的作用. 世界华人消化杂志 2004;12(2):417-419

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/417.asp>

## 0 引言

肝细胞癌(HCC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 常是慢性肝炎和肝纤维化的终末并发症. 对于HCC的治疗仅是姑息性的, 长期存活很少. 肝内转移是肿瘤切除后复发和预后差的主要原因. 慢性HBV、HCV感染常发展成肝硬化、HCC. 环氧化酶(cyclooxygenase, COX)在维持组织内环境稳定, 促进细胞生长, 抑制凋亡等多种生命活动中发挥重要作用. 近年研究表明, COX在慢性乙型肝炎(HBV)、丙型肝炎(HCV)感染发展成肝硬化、HCC及肿瘤转移的发生中有重要作用.

## 1 COX的研究背景

COX是在前列腺素合成中起催化作用的限制性内切酶, 故又称为前列腺素H合酶(prostaglandin H synthase, PGHS). 一般认为COX有两个亚型, COX-1和COX-2, 将内质网及核膜的花生四烯酸转化成前列腺素 $H_2$ , 再进一步变形为地诺前列酮E2(PGE $_2$ ), PGF $_{2\alpha}$ , PGD $_2$ 及其他类花生酸类物质. 人体大多数细胞均可形成前列腺素. 前列腺素不是储存在机体内的, 而是当有机体创伤或特有的细胞因子、生长因子和其他刺激时合成的<sup>[1-3]</sup>. 各种前列腺素以细胞型特有方式产生, 通过信号穿透G蛋白连接膜受体诱导细胞功能, 或通过核受体过氧化物酶体增生物激活受体(PPAR)发挥作用<sup>[3]</sup>.

COX-1在许多组织是组成型表达, 在维持组织内环境稳定中有重要作用. COX-2是可诱导的同功酶, 生长因子、细胞因子和肿瘤启动子可刺激其在许多种细胞和组织表达. 在许多细胞和动物模型研究中, 诱导COX-2可促进细胞生长, 抑制凋亡, 增加细胞运动性和附着力. COX-2利用花生四烯酸扰乱细胞内游离花生四烯酸水平从而影响细胞功能. 尽管这两个亚型结构相似, 但他们的表达调节及在组织生物学、疾病中的作用有本质的不同. 非甾体抗炎药可选择性抑制COX-1、COX-2<sup>[1-5]</sup>.

2002年, Chandrasekharan et al<sup>[6]</sup>报道分离出COX-1的另一同功酶称为COX-3, 是在细胞中以可诱导的方式表达. 人类COX-3 mRNA作为约5.2 kb的转录子表达, 且大量存在于脑皮质和心脏. COX-1有10个内含子, COX-2有9个内含子. COX-1比COX-2多出内含子1. 哺乳动物COX-1的内含子1长度和序列高度保守. 这个内含子有一开放读码框, 引导插入的一个30-34 aa的疏水性信号多肽可介导COX-1进入内质网膜腔和核膜. COX-3保留有内含子1. COX-3具有糖基化依赖的环氧化酶活性. 不同的非甾体抗炎药可选择性抑制COX-3, 其中扑热息痛高度敏感. COX-3的作用还有待进一步研究和认同.

## 2 COX与病毒性肝炎的关系

Cheng et al<sup>[7]</sup>报道用免疫组化、western杂交、图像分析方法显示COX-2存在于肝细胞胞质, 进展性肝纤维化患者COX-2信号强度明显增强, COX-2与透明质酸酶有明显相关性(P<0.01). 推测COX-2与肝纤维化有关.

Cheng et al<sup>[8]</sup>报道慢性乙肝患者COX-2表达明显升高,但HBeAg阳性与阴性患者COX-2表达无明显差异,尽管后者炎性坏死明显少.12例HBeAg阳性患者接受抗病毒治疗,其中拉米夫定7例,干扰素5例,治疗前后行肝穿病理检查.成功的抗病毒治疗后COX-2仍持续高表达.12例治疗后均有血清学转化和炎性坏死明显减轻,但COX-2表达无明显变化.

Tabernero et al<sup>[9]</sup>用蛋白质印迹和免疫组化标记评估COX-2和iNOS表达、定位和体外血管反应性.20例肝移植患者,其中暴发性肝衰竭(FHF)6例,病毒性肝炎肝硬化(CH)6例,对照组原发性肝癌8例.结果FHF和CH患者动脉网膜动脉内COX-2和iNOS表达与对照比较明显上调.认为病毒性肝炎患者不但肝组织中COX-2升高,而且外周血管中COX-2也升高.

Begay et al<sup>[10]</sup>研究发现小鼠注入氯仿24 h后给予COX-2抑制剂NS-398和COX-1、COX-2抑制剂消炎痛,可阻止毒物引起的ALT升高和肝坏死,而不出细胞活跃增生.用NSAID和NS398处理HepG2细胞可提高对IFN $\alpha$ 反应性,推测COX-2表达可引起对IFN $\alpha$ 治疗的耐药<sup>[11]</sup>.这些结果表明COX抑制剂为肝细胞提供显著的抗氯仿作用,为进一步抗肝毒性治疗及提高干扰素疗效提供线索.

尽管有效的抑制COX是一种抗炎策略,但COX-1和COX-2的前列腺素产物在有些病理生理状态下仍有重要的调节功能.内源性COX衍生物在对乙酰氨基酚引起的急性肝损害鼠模型中具有保护作用.单用肝毒性药物可选择性诱导COX-2 mRNA表达,增加肝内PGD2和PGE2水平.COX-2缺如和减少的鼠对乙酰氨基酚引起的肝毒性和致死性明显增加.表达COX-2的鼠使用选择性COX-2抑制剂则出现与COX-2缺陷鼠相似的明显增加的毒性且不改变药物蛋白内结构.来源COX-2的产物具有重要的保护肝细胞功能,而COX抑制剂可能通过免疫或非免疫途径增加了药物引起的肝损害<sup>[12]</sup>.

### 3 COX在HCC中的作用机制

在过去10 a,关于COX在癌症发生发展中作用的研究取得了巨大进展.COX在HCC中的作用机制也成为研究热点.

PTEN是一种新型肿瘤抑制剂,具有细胞发育循环和凋亡调节剂的功能.恶性肿瘤包括HCC常有PTEN突变和缺失.用免疫组化法对46例HCV阳性肝硬化HCC患者的切除肝组织PTEN的表达进行分析,42例(91.3%)患者周围正常肝组织PTEN强烈表达,HCC免疫染色密度29(63.1%)例降低,17(36.9%)例升高.HCC中PTEN低表达与周围肝组织iNOS和COX-2表达增加明显相关.PTEN高表达的HCC患者存活时间明显比低表达者长.肿瘤周围肝组织iNOS和COX-2表达上调与肝癌进展有关<sup>[4]</sup>.但COX-2 mRNA表达在HCC附近非肿瘤肝组织高于HCC组织,可能与肝炎基础上的炎性坏死、肝

再生有关.COX-2对于HCC进展作用相对较少<sup>[13]</sup>.

免疫组化和免疫印迹法研究44例外科切除HCC组织及邻近的非肿瘤肝组织(NTs),其中慢性病毒性肝炎17例,肝硬化27例,对照外科切除的正常肝脏组织7例.高分化HCC与低分化HCC或NTs相比COX-2表达频繁且强烈.低分化HCC与NTs相比COX-2表达减少.正常肝组织COX-2弱阳性.COX-1表达在肝肿瘤和非实体瘤细胞比COX-2低.高分化HCC无COX-1表达增加.免疫组化也证实对于高分化HCC是COX-2上调而不是COX-1.这些研究推测COX-2在肝细胞癌的早期发挥作用而不是进展期,因此可能与HCC去分化有关<sup>[14]</sup>.

### 4 COX在HBV感染中的研究

原发性肿瘤扩散要求肿瘤细胞能够降解周围的细胞外基质并侵入淋巴管和血管.金属蛋白酶(MMPs)介导细胞外基质重构和包括肿瘤转移的一系列病理生理过程.白明胶酶(MMP-2和MMP-9)可降解基底层主要成胶原蛋白IV.MMP-2/白明胶酶A作为酶原分泌,在细胞表面由膜型1基质金属蛋白酶(MT1-MMP)活化.MT1-MMP和MMP-2可被不同刺激素诱导且与肿瘤侵入、转移相关.在肿瘤组织中MMP-2具有最高有效活性且与MT1-MMP表达和肿瘤扩散相关,纤维化肝脏存在一些激活的MMP-2,但肝肿瘤细胞中的绝大多数MMP-2是由周围基质中肝星状细胞产生并以无活性的前体分泌.MT1-MMP在强侵入性HCC超表达,MMP-2活性与HCC患者肿瘤进展、复发相关<sup>[3,15-16]</sup>.HBV感染者COX-2表达明显增加<sup>[8]</sup>,COX-2可调节MT1-MMP表达和MMP-2活性<sup>[17]</sup>,引起抗细胞凋亡能力增强<sup>[18]</sup>,与慢性HBV感染发展为HCC及肿瘤转移密切相关.

慢性HBV感染常发展成肝硬化、HCC.HBV DNA插入宿主基因组,即使在缺少其他病毒标记的肝细胞仍可见病毒蛋白HBx表达<sup>[18-19]</sup>.HBx诱导MT1-MMP表达对于HCC复发了关键作用<sup>[20]</sup>.COX-2依赖性侵入和HBx诱导的转移均由CD44介导.表达COX-2细胞通过上调不同前血管生成酶和生长因子如可诱导的一氧化氮合成酶(iNOS)、TGF- $\beta$ 和VEGF诱导新生血管生成.<sup>[21]</sup>HBx这种病毒蛋白本身也具有诱导iNOS,TGF- $\beta$ 和VEGF表达和一种血管生成素作用<sup>[22-24]</sup>.所以,COX-2与HBx之间有交互协同作用.HBx诱导COX-2表达必需有NF-AT,而HBx以钙调磷酸酶依赖方式激活NF-AT,这种方式常引起细胞内钙增加和氧化应激产生.HBx诱导COX-2表达有助于病毒逃避免疫系统,且与HBV慢性感染进展到肝硬化、HCC有关.通过调节COX-2,MT1-MMP,和CD44,HBx可能激活一种复杂的机制最终导致肿瘤细胞侵入<sup>[20]</sup>.

非甾体抗炎药(NSAIDs)对许多恶性肿瘤具有抗肿瘤活性,归功于他们能够抑制由COX-2合成的前列腺素.因此,HBx诱导COX-2表达有助于解释这种病毒蛋白的多种前致癌作用,为治疗HBV引起的HCC治疗提供一个新方向.

## 5 COX 在 HCV 感染中的研究

Rahman et al<sup>[25]</sup>报道 HCV 阳性患者 iNOS 及 COX-2 阴性表达相对于 iNOS 和 COX-2 不同程度表达者存活时间明显延长. Kondo et al 报告 HCV 阳性 HCC 患者周围肝组织 COX-2 的过表达与存活时间呈负相关. HCV 阳性 HCC 患者 COX-2 和 iNOS 表达与肿瘤大小及微血管密度(MVD)高度相关. HCV 阳性 HCC 患者肿瘤直径大于或等于 4 cm COX-2 表达较高. 推测 COX-2 和 iNOS 是 HCV 阳性 HCC 患者血管生成的重要因素. 血管生成是人类各种肿瘤生长发育的首要条件. COX-2 通过增加血管生成素多肽(血管内源性生长因子, 碱性成纤维细胞生长因子和 NO)或直接增加前列腺素产物调控血管生成, 进而辅助肿瘤生长, 侵入, 转移.

iNOS 可诱导 COX-2 表达, iNOS 和 COX-2 之间可能有交互作用, 在肿瘤发生中有协同作用. 有报道肝硬化动物模型 iNOS 表达增加. 推测肝硬化患者内毒素和/或循环中细胞因子水平增加可以诱导 iNOS 表达. iNOS 异常表达可能是肝硬化患者肿瘤形成的表现形式之一. 也可能是肿瘤本身释放一些因子诱导周围硬化肝组织 iNOS 表达增加. HCV 阳性 HCC 患者 COX-2 和 iNOS 高表达可能是 HCV 感染产生的细胞因子的继发作用或直接由 HCV core 蛋白激活. 尤其是这两个基因启动子均有 NF- $\kappa$ B 结合位点, 而 HCV 可激活 NF- $\kappa$ B.

在不同型的癌前损害和癌损害中 iNOS 和 COX-2 表达上调, 肿瘤高水平 COX-2 和 iNOS 表达的生物学意义存在争议和未知. 许多研究显示高浓度的 NO 和前列腺素既可能是致突变物又可能是致癌物, 且这些作用依赖于其浓度. COX-2 抑制剂在几种来源于 HCC 的细胞系均引起生长停止和细胞凋亡. COX-2 抑制剂可有效阻止癌症发生及 HCC 进展, 进一步阐明 iNOS 和 COX-2 在 HCC 发生中的作用, 可为寻找新的治疗策略建立理论基础.

## 6 参考文献

- Ding XZ, Hennig R, Adrian TE. Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2003;7:10
- Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001;294:1871-1875
- Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol* 2002;190:279-286
- Rahman MA, Kyriazanos ID, Ono T, Yamanoi A, Kohno H, Tsuchiya M, Nagasue N. Impact of PTEN expression on the outcome of hepatitis C virus-positive cirrhotic hepatocellular carcinoma patients: possible relationship with COX II and inducible nitric oxide synthase. *Int J Cancer* 2002;100:152-157
- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000;69:145-182
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. From the Cover: COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *PNAS* 2002;99:13926-13931
- Cheng J, Imanishi H, Iijima H, Shimomura S, Yamamoto T, Amuro Y, Kubota A, Hada T. Expression of cyclooxygenase 2 and cytosolic phospholipase A(2) in the liver tissue of patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2002;23:185-195
- Cheng AS, Chan HL, Leung NW, Liew CT, To KF, Lai PB, Sung JJ. Expression of cyclooxygenase-2 in chronic hepatitis B and the effects of anti-viral therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:251-260
- Tabernero A, Schneider F, Potenza MA, Fidi-Soa Randriamboavonjy V, Chasserot S, Wolf P, Mitolo-Chieppa D, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in omental arteries harvested from patients with severe liver diseases: immuno-localization and influence on vascular tone. *Intensive Care Med* 2003;29:262-270
- Begay CK, Gandolfi AJ. Late administration of COX-2 inhibitors minimize hepatic necrosis in chloroform induced liver injury. *Toxicology* 2003;185:79-87
- Giambartolomei S, Artini M, Almerighi C, Moavero SM, Levrero M, Balsano C. Nonsteroidal anti-inflammatory drug metabolism potentiates interferon alfa signaling by increasing STAT1 phosphorylation. *Hepatology* 1999;30:510-516
- Reilly TP, Brady JN, Marchick MR, Bourdi M, George JW, Radonovich MF, Pise-Masison CA, Pohl LR. A protective role for cyclooxygenase-2 in drug-induced liver injury in mice. *Chem Res Toxicol* 2001;14:1620-1628
- Morinaga S, Yamamoto Y, Noguchi Y, Imada T, Rino Y, Akaike M, Sugimasa Y, Takemiya S, Kameda Y, Takanashi Y. Cyclooxygenase-2 mRNA is up-regulated in cirrhotic or chronic hepatitis liver adjacent to hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1110-1116
- Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, Harada M, Kusaba T, Tanaka M, Kimura R, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M, Kurohiji T, Sata M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* 1999;29:688-696
- Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 1997;91:439-442
- Harada T, Arai S, Mise M, Imamura T, Higashitsuji H, Furutani M, Niwano M, Ishigami S, Fukumoto M, Seiki M, Sato H, Imamura M. Membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene is overexpressed in highly invasive hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1998;28:231-239
- Tsuji M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3336-3340
- Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer and development. *Oncogene* 1999;18:7908-7916
- Feitelson MA, Duan LX. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 1997;150:1141-1157
- Su Q, Schroder CH, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1998;27:1109-1120
- Lara-Pezzi E, Gomez-Gavero MV, Galvez BG, Mira E, Iniguez MA, Fresno M, Martinez-A C, Arroyo AG, Lopez-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 2002;110:1831-1838
- 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
- Majano PL, Garcia-Monzon C, Lopez-Cabrera M, Lara-Pezzi E, Fernandez-Ruiz E, Garcia-Iglesias C, Borque MJ, Moreno-Otero R. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis. *J Clin Invest* 1998;101:1343-1352
- Yoo YD, Ueda H, Park K, Flanders KC, Lee YI, Jay G, Kim SJ. Regulation of transforming growth factor- $\beta$ 1 expression by the hepatitis B virus (HBV) X transactivator. *J Clin Invest* 1996;97:388-395
- Rahman MA, Dhar DK, Yamaguchi E, Maruyama S, Sato T, Hayashi H, Ono T, Yamanoi A, Kohno H, Nagasue N. Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus-positive cases. *Clin Cancer Res* 2001;7:1325-1332

# 乙型肝炎病毒 DNA 整合的机制及后果

成 军

成军, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室, cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2003-08-16

## 摘要

乙型肝炎病毒(HBV)的感染, 与肝细胞癌(HCC)的发生发展密切相关. 关于 HBV DNA 与肝细胞基因组 DNA 之间的整合, 在 HCC 的发病过程中具有十分重要的意义. 经过 30 a 的积累, 形成了一整套研究 HBV DNA 整合有效的研究技术. 参与整合的 HBV DNA 片段大小不等, 主要包括乙型肝炎病毒编码反式调节蛋白的基因区段, 如 X 基因和羧基末端截短的表面抗原中蛋白的编码基因等. 关于 HBV DNA 整合位点也没有明确的特异性位点. HBV DNA 与肝细胞基因组 DNA 整合之后, 引起了肝细胞染色体的不稳定性, 甚至导致染色体的异常转位. 整合的 HBV DNA 可通过调节基因序列启动指导细胞恶性转化的相关基因, 同时 HBV DNA 整合的基因片段编码的反式激活蛋白可激活细胞生长及恶性转化的基因, 导致正常肝细胞的恶性转化. 与 HBV DNA 基因整合相关蛋白的研究还处于初级阶段, 包括 15AB 结合蛋白、小鼠上游结合因子结合蛋白、DNA 结合蛋白 A、整合序列结合蛋白 3 以及转录因子阴和阳 1 蛋白有关. 关于 HBV DNA 整合机制和后果的研究, 必将进一步阐明 HCC 发生的分子生物学机制, 为探索新型的治疗技术和治疗方法奠定基础.

成军. 乙型肝炎病毒 DNA 整合的机制及后果. 世界华人消化杂志 2004;12(2):420-427

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/420.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是一种 DNA 病毒, 但是在其生活周期中却存在独特的 DNA-RNA-DNA 的复制过程<sup>[1]</sup>. 在 HBV 感染的长期过程中, 从流行病学和临床研究资料, 积累的大量证据表明 HBV 感染与肝细胞癌(HCC)的发生发展有着十分密切的联系<sup>[2-4]</sup>. 在 HCC 肝组织中检测到整合的 HBV DNA 整合子(integrant)的存在, 相信 HBV DNA 与肝细胞基因组之间的整合在 HCC 的发生发展过程中具有重要的作用<sup>[3-5]</sup>. 但是, HBV DNA 与肝细

胞基因组 DNA 整合的规律我们还知之甚少. 关于 HBV DNA 与肝细胞基因组 DNA 之间的整合已经积累了较为丰富的研究资料, 对阐明 HBV 感染与 HCC 之间的关系具有重要的意义<sup>[6]</sup>.

## 1 研究乙型肝炎病毒基因整合的方法学

对于肝组织中整合的 HBV DNA 的研究, 早期阶段多采取的方法是构建 HBV 相关性 HCC 肝组织的基因组 DNA 文库, 然后以 HBV DNA 不同的基因片段作为探针, 进行杂交筛选, 然后对阳性克隆进行序列测定分析<sup>[7-15]</sup>. Tsuei et al<sup>[16]</sup>以 1 例 9 岁 HCC 患者的肝组织 DNA 构建了噬菌体 λ L47.1 为载体的基因文库, 经杂交筛选获得阳性克隆, 之后的序列分析结果表明, 整合的 HBV DNA 序列发生了缺失和重排, 整合序列主要包括表面抗原蛋白编码基因和 X 基因, 这些基因已经发生了反方向的基因重排. 整合的基因序列不包括 HBV 核心蛋白编码基因, 整合的 X 基因编码产物保留了对于异源性启动子的反式激活作用. 构建基因组 DNA 文库的技术比较繁琐, 筛选的工作量也偏大, 对于大多数实验室条件来说不合适, 不能作为常规的 HBV DNA 整合的研究技术推广<sup>[17-25]</sup>.

多聚酶链反应技术(PCR)的建立和发展对于研究 HBV DNA 整合研究来说意义重大. 只要设计合适的 PCR 引物, 可以很容易地进行整合 HBV DNA 序列的检测, 同时也可以对大批量的标本进行处理, 简单有效. 关于 PCR 技术的应用引物设计是关键所在. 因为事先不清楚整合的是 HBV DNA 的哪一段基因, 也不清楚整合位点的细胞基因序列, 因此, 引物设计的质量直接影响 PCR 扩增的效率<sup>[26-32]</sup>. Minami et al<sup>[33]</sup>根据已知基因序列和人 Alu 重复(Alu repeat)序列分别设计引物, 建立克隆整合的 HBV DNA 及其相邻的细胞基因序列的 PCR 技术. 为了避免扩增 Alu 重复序列之间的 DNA 片段, 引物中引入 dUTPs, 并且在 PCR 的 10 个循环之后, 以尿嘧啶 DNA 糖基化酶(uracil DNA glycosylase)进行处理. 应用这一技术在 3 例 HCC 组织中克隆了与 HBV DNA 整合的相邻的细胞基因序列, 是研究 HBV DNA 整合的理想技术途径.

研究 HBV DNA 整合的另一项基于 PCR 扩增的技术就是反向 PCR(IPCR)技术. 反向 PCR 技术在 HBV DNA 整合的研究中也具有重要的意义<sup>[34-42]</sup>. Tsuei et al<sup>[43]</sup>研究发现在 80% 以上 HBV 相关性 HCC 肝组织可以检测到 HBV DNA 的存在, 但目前还不清楚其在 HCC 发生发

展过程中的机制. Tsuei et al<sup>[44]</sup>对受环境因素影响较小的儿童 HCC 肝组织中的 HBV DNA 整合情况进行了研究. 应用顺向重复序列 1(DR1)和顺向重复序列 2(DR2)基因序列设计引物的反向 PCR 技术对于整合 HBV DNA 及其相邻的细胞基因序列进行扩增, 10 例 HCC 有 9 例扩增的 HBV DNA 序列位于 DR1 和 DR2 附近, 而且都属于 I 型整合子. Southern blot 杂交分析结果表明, 5 例中有 2 例男性特有的细胞基因序列, 即与人长散布 DNA 元件(human long interspersed DNA element, LINE-1)同源. 在 1 例 HBV 整合子中发现 HBV DNA 整合到 RNA 结合域 Y 染色体(RNA binding motif Y chromosome, RBMY)基因之中. RBMY 基因表达仅限于男性精子细胞中, 在非 HCC 组织中没有检测到这种基因的表达. HBV DNA 在 RBMY 位点的整合以及对这一基因表达的激活, 可能是儿童 HCC 发生的机制之一.

原位的 PCR 扩增技术在 HBV DNA 的整合研究中也具有重要应用<sup>[45-56]</sup>. Matsui et al<sup>[57]</sup>利用高度敏感的荧光原位 PCR (fluorescence in situ polymerase chain reaction, FISPCR) 技术对 HCC 组织中整合的 HBV DNA 进行检测, 发现亚历山大细胞(Alexander cell)中有较强的荧光存在, 并可以在一定程度上进行定量分析.

## 2 参与整合的乙型肝炎病毒的基因序列

乙型肝炎病毒的基因组结构复杂, 结构基因与调节基因、结构基因之间相互重叠, 反映出 HBV DNA 的高度紧密型的 DNA 结构, 因此一段基因序列的整合, 可能会涉及到多个编码基因的功能, 因此需要对于整合的 HBV DNA 的基因片段进行研究, 以总结 HBV DNA 整合的片段和后果<sup>[58-66]</sup>. 总的来讲, 整合的基因片段多集中在 HBV DNA 的 2 个反式激活的蛋白的编码基因区, 即 HBV 的表面抗原, 特别是羧基末端截短型的表面抗原的基因整合, 以及具有反式激活功能的 X 蛋白编码基因的整合<sup>[67-78]</sup>.

Takada et al<sup>[79]</sup>发现整合的 HBV DNA 中 X 基因的表达有时与细胞 DNA 融合, 而且以细胞的多聚腺苷酸信号终止. 整合的 X 基因序列分析结果表明, 常有 X 蛋白羧基末端的 5 个氨基酸残基的缺失, 但是, 其上游在各种嗜肝 DNA 病毒基因序列中高度保守的 7 个氨基酸残基序列却始终存在. Yaginuma et al<sup>[80]</sup>在兄弟 2 人的 HCC 儿童患者肝组织中发现了多个位点的 HBV DNA 整合, 2 例组织中整合的 HBV DNA 基因结构类似, 没有发生重排. Wang et al<sup>[81]</sup>对人 HCC 细胞系 HAGS 2.1 中整合的 HBV DNA 应用 IPCR 技术进行了检测, 以期发现新的整合位点. 整合的 HBV DNA 片段位于 C 基因区的 2 111 nt 到 X 基因区的 1 558 nt. 整合的 HBV DNA 片段长度大约是 2.6 kb, 包括部分 C 基因序列、P 区和 X 基因, 以及完整的 S 基因. 整合的 HBV DNA 基因的侧翼的细胞基因序列与人卫星 III 重复序列有高度的同源性. 这一重复序列的左右两侧, 分别有 43 和 56 个 GGAAT 重复序列. 尽

管在 HAGS 2.1 细胞系中发现的 HBV DNA 整合序列及其周围的细胞序列目前还不能用于解释 HCC 的发病机制, 但本项研究所采用的技术提示可以获得更高的检测阳性率. 相当一部分的 HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎患者存在前 -C 区的基因变异, 但是这种前 -C/C 基因的突变与肿瘤是否有关, 是否是野生型 HBV DNA 与肝细胞基因组发生整合以后的选择结果尚不清楚. Zhong et al<sup>[82]</sup>对 HBV 相关的 HCC 进行研究, Southern blot 杂交分析发现 43/56 例患者的 HCC 组织中存在整合的 HBV DNA, 肿瘤组织基因突变发生率为 65% (26/40), 而非肿瘤组织为 45% (14/31). 使 HBeAg 合成停滞的 1 896 位点的突变在肿瘤组织中为 40% (16/40), 在非肿瘤组织中为 35.4% (11/31). 其他位点例如 1 899、1 898、1 912 和 1 886 位点的突变都可以见到, 但肿瘤和非肿瘤组织中的阳性率没有显著差别. 结果表明在机体免疫压力作用下, 前 -C/C 基因突变逐渐上升, 这种突变可能促进 HBV DNA 的整合以及肿瘤的发生. Urashima et al<sup>[83]</sup>以全长 HBV DNA、X 和前 -S2/S 基因片段作为探针进行 Southern blot 杂交分析, 发现 HBV DNA 整合的比率为 57.1% (16/28), X 基因在 87.5% (14/16) 的患者中存在, 前 -S2/S 基因的阳性率为 37.5% (6/16). Laskus et al<sup>[84]</sup>用 PCR 技术对于慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞(PBMC)中整合的 HBV DNA 进行检测, 整合的序列位于 HBV DNA 的 DR1、DR2 区. 除了在肝细胞中发现整合的 HBV DNA 之外, Tagieva et al<sup>[85]</sup>在神经母细胞瘤细胞中检测到了整合的 HBV DNA, 整合的 HBV DNA 结构完整, 只是存在一段 480 bp 片段的缺失突变. 整合的 HBV DNA 片段包括 C 基因、前 -S 和 S 基因, 以及 3' - 末端截短型的 X 基因. 另外, Wei et al<sup>[86]</sup>对于土拨鼠乙型肝炎病毒(WHBV)的整合情况进行了研究, WHBV DNA 整合片段包括表面抗原基因、病毒增强子序列以及各种类型的截短型 X 蛋白反式激活剂. 整合的 WHBV X 基因编码产物仍然保留了对异源性启动子的反式激活作用.

Goto et al<sup>[87]</sup>对儿童慢性 HBV 感染者肝组织中整合的 HBV DNA 进行研究, 发现存在多个随机整合位点, 说明在 HBV 感染的早期阶段就已经发生了 HBV DNA 的整合. Hino et al<sup>[88]</sup>对于 C3 和 C4 两个单一整合子的序列进行分析, C3 克隆的整合的 HBV DNA 的 5' - 末端位于 HBV DNA 的 1 824 nt 处, 即顺相重复序列 DR1 位点, 或者是 HBV DNA 双链的负链 3' 末端的 6 bp 处. 右侧的 HBV DNA 序列位于 1 762 nt 处, 与整合位点的细胞基因序列有 5 bp 的重叠, 细胞基因序列中在整合位点存在 11 bp 的缺失突变. 克隆 C4 的分析结果表明, 一端位于 1 820 nt 处, 即 HBV DNA 负链的 3' - 末端的 2 bp 处. 因此, HBV DNA 负链的顺相重复序列可能是 HBV DNA 整合的热点序列. Chang et al<sup>[89]</sup>在台湾 5/8 例儿童 HCC 肝组织中检测到了整合的 HBV DNA, 其中 4 例为单一位点整合, 1 例为多位点整合. 进一步研究表明, X 基因和表面抗原基因是最常见的整合序列. 单点整合

可能是因为关键位点的整合造成插入突变的发生,造成生命的早期阶段即发生HCC. Nakamura et al<sup>[89]</sup>检测到包括几乎完整HBV DNA的整合子,整合靶基因在整合位点处有15 bp的缺失,整合的靶基因与病毒基因有相当高的同源性. Zhou et al<sup>[90]</sup>在中国大陆HCC患者的研究中发现,HBV DNA的整合仅仅是1个或2个拷贝的HBV DNA,很少有完整的HBV DNA发生整合,而且没有发现整合的热点序列. HBV S基因总是存在,一般情况下X基因也存在,而很少检测到C基因.

Okubo et al<sup>[91]</sup>对HBV DNA在肝细胞整合的情况进行总结,认为HBV DNA在肝细胞中的整合可以分成I、II、III型. I型整合子属于简单型(simple type),病毒基因组的结构非常简单,部分已经缺失. 病毒的黏性末端序列仅见于1处病毒-细胞DNA连接处,整合位点处的细胞DNA存在小片段的缺失. 这种整合可能是HBV DNA复制的中间产物作为整合的底物. 这一类型的整合是最为常见的. 第二种就是II型整合,称为复杂型(complex type),与I型整合类似,但整合的病毒基因组比较复杂,形成过程与I型相似,但整合底物却是新型DNA(novel form DNA). 在胎儿肝细胞的实验感染研究过程中,感染HBV以后几天时间就可以见到整合的HBV DNA. 其中就发现了第三种整合子,即III型整合子,具有较为简单的病毒基因序列,但却存在较大范围的细胞DNA的缺失. 在整合过程中,不同的HBV DNA形式都参与了整合过程,可以引发大小不等的细胞基因组DNA片段的缺失. 最为常见的就是简单HBV DNA片段的整合,只是引起细胞基因组DNA的小片段的缺失<sup>[92-107]</sup>.

### 3 整合位点的细胞基因序列

对于HBV DNA在肝细胞整合的位点进行分析,虽然发现了一些有倾向的整合热点,但是,总的来讲,HBV DNA整合的位点还是随机的<sup>[108-115]</sup>. Chen et al<sup>[116]</sup>应用IPCR技术对于HCC组织中整合的HBV DNA及其邻接的细胞DNA序列进行分析,发现整合位点其中之一就是人28S rRNA的编码基因. Quade et al<sup>[117]</sup>对1例日本HCC患者肝组织中整合的HBV DNA及其周围的序列进行分析,获得了一段3125 nt的基因片段,包括未经重排的HBV DNA序列和相邻的细胞基因序列. HBV DNA属于adr亚型,相当于HBV DNA的1970-1886 nt之间的序列. 在右侧病毒与细胞基因的连接点有7 bp(TGTAGGC)序列的重复,还有2 bp的颠换. 整合的HBV DNA包括完整的核心基因、前-S、S、多聚酶和3'-截短的X基因. 大部分前-C区基因缺失. 整合位点是病毒基因组的热点突变区,在细胞中则是位于 $\beta$ -珠蛋白基因组DNA 3'-末端的半重复序列. Huang et al<sup>[6]</sup>对于HBV DNA在精子细胞中的整合情况进行了研究,利用生物素标记的全长的HBV DNA作为探针的FISH技术对精子细胞中整合的HBV DNA进行检测,在1例慢性迁延型乙型肝炎患者的精子细胞中检测到了整合的HBV

DNA,说明HBV DNA可以整合到人精子细胞的染色体中. Kuo et al<sup>[118]</sup>在HBV DNA整合位点发现ATP合酶6(ATP synthase 6)和细胞色素C氧化酶III(cytochrome C oxidase III),但是这些序列都是异常地连接在一起. 因为HBV的感染可能造成细胞能量代谢的异常,这两种线粒体酶的异常可以部分解释HCC的形成过程.

Pineau et al<sup>[119]</sup>对2例朝鲜患者单一的整合位点的基因序列进行分析,发现都有反向的病毒基因或相邻的细胞基因的双拷贝化,整合的位点位于富含AT的拓扑异构酶I和II裂解的靶序列位点,以及有重组倾向的序列位点. 整合位点定位于8q13和10q22,这两个基因区段都含有肿瘤相关基因. 对于指导整合子表达的顺式作用序列(cis-activating sequence)利用HepG2细胞系的瞬时转染技术进行研究,整合的基因序列对于异源型的启动子具有反式激活作用,但是对于相邻报告基因的激活没有或者仅有较弱的抑制作用. Chen et al<sup>[120]</sup>研究了1例台湾HCC患者肝癌组织建立的细胞系HCC36中HBV DNA的整合情况,发现至少存在4个整合位点. 以HCC36细胞的DNA建立了基因组DNA文库,获得含有HBV DNA片段的两个噬菌体克隆 $\lambda$  36A和 $\lambda$  36B,前者HBV DNA序列相当保守,后者存在有效范围的缺失或插入,两个克隆的HBV DNA序列只有4个核苷酸位点的差异.  $\lambda$  36A克隆插入序列为人Alu重复序列,而克隆 $\lambda$  36B的插入位点是卫星DNA序列.

Yamamoto et al<sup>[121]</sup>分离到HBV DNA整合的HCC细胞系来源的基因克隆DA2-6,证实该整合的基因克隆包括3.7 kb侧翼细胞序列和2.8 kb的HBV DNA序列,包括前-S、S和3'-末端截短型X基因. 利用氯霉素乙酰转移酶(CAT)作为报告基因对于整合的HBV DNA基因片段编码产物的反式激活作用进行研究,证实具有明确的、广泛的反式激活作用. Zhang et al<sup>[122]</sup>在HCC肝组织中发现了HBV DNA整合位点在癌基因erbB附近,序列分析结果表明,整合的HBV DNA基因位于细胞的表皮生长因子(EGF)和其他细胞受体的酪氨酸蛋白激酶(tyrosine protein kinase)催化位点的附近. Berger et al<sup>[123]</sup>对PLC/PRF/5细胞(Alexander细胞)进行研究,在2个HBV DNA整合克隆AL-14和AL-26中没有发现细胞DNA的重排,只有较小片段的缺失. 在克隆AL-14中有2 kb的缺失,在克隆AL-26中仅有17 bp的缺失. AL-26克隆的右侧有182 bp基因序列,以前相信是来源于细胞的基因序列,但经过研究证实这一序列是一种不寻常的HBV DNA片段. 令人惊奇的是这一段HBV DNA序列与WHBV DNA高度同源. 在AL-14和AL-26克隆中都含有小卫星样重复序列(minisatellite-like repetitive sequence). 因此认为人基因组DNA中的重复序列可能是HBV DNA整合的热点之一<sup>[124-131]</sup>.

### 4 乙型肝炎病毒基因整合的细胞遗传学异常

乙型肝炎病毒DNA在细胞中的整合,首先注意到的是

在染色体上的位点和染色体的异常转位(translocation), 这些细胞遗传学上的异常, 是HBV DNA整合, 引起肝细胞肿瘤的重要机制所在. Simon et al<sup>[132]</sup>在HCC组织和肝癌细胞系 Hep 40 细胞中发现了整合的HBV DNA, 在HCC组织中发现1p36染色体位点的异常, 在正常肝组织中这种染色体的异常是不存在的. Livezey et al<sup>[133]</sup>研究证实Hep G2215较母本细胞Hep G2的生长速度减慢. HBV转染的细胞系可以在裸鼠体内缓慢形成肿瘤, 但是母本细胞却不能在裸鼠体内形成肿瘤. Hep G2T14.1细胞系在裸鼠体内形成的肿瘤组织中, HBV状态没有发生改变. 但在Hep G2215形成的肿瘤组织中检测到了一个整合位点. 在Hep G2215细胞系形成的肿瘤组织中仍然存在HBV的复制, 在Hep G2T14.1细胞系形成的肿瘤组织中仍然没有HBV的复制. Hep G2215细胞系中检测到几处染色体重排和肿瘤抑制基因p53位点的杂合子丢失(loss of heterozygosity, LOH). Western blot杂交分析结果表明, 肿瘤抑制蛋白p21/Waf1表达上调. Su et al<sup>[134]</sup>从一株肝癌细胞系Hep3B中克隆到整合的HBV DNA, 病毒细胞基因序列结合点分析, 属于I型整合, 表面抗原主蛋白的开放读码框架(ORF)保持完整, 而前-S1和C区基因发生重排, X蛋白在羧基末端截短, 但仍然保留了对于SV40增强子/启动子的反式激活作用. S1核酸酶作图分析结果表明, 4.0、2.9、2.2 kb的HBV RNA在Hep3B细胞中都存在, 这一整合子的转录在前-S2/S启动子的指导下进行. 利用体细胞杂合作图分析(somatic-cell hybrid mapping), 左右两侧的细胞基因序列分属于13和4号染色体. 提示HBV DNA的整合造成染色体DNA的结构重排, 羧基末端截短型X的反式激活作用在HCC的形成过程中也具有重要意义.

Tokino et al<sup>[135]</sup>在HBV DNA整合的肝组织中发现了大片的染色体基因组DNA的缺失现象, 分别为25、12、11 kb. 每一个整合子都含有很小的病毒基因片段. Tokino et al<sup>[136]</sup>对于整合的HBV DNA的随机克隆进行序列分析, 只发现11号和17号染色体是HBV DNA整合发生的高频率染色体, 但是没有发现特异性HBV DNA整合位点. Slagle et al<sup>[137]</sup>认为HCC发生的原因可能很多, 其中之一便是整合位点的HBV DNA激活了重要基因的表达. 在1例患者中发现在17p11.2-12位点存在HBV DNA整合, 而且在整合位点的细胞基因序列成双拷贝化. 以这一基因片段作为探针, 对于中国HCC患者的肝组织进行检测, 发现这一基因片段的异常决不鲜见. Hatada et al<sup>[138]</sup>在一个具有4个整合位点的HCC组织中, 鉴定出11q13.3号染色体上的hst-1是一种转化基因, 另外一个整合子位于hst-1基因附近. 转化基因hst-1与整合的HBV DNA有共扩增现象, 共扩增的范围也是十分有限的. 说明HBV DNA的整合、扩增与癌基因的激活可能是HBV相关的HCC发生的重要的分子生物学机制. Henderson et al<sup>[139]</sup>发现整合的HBV DNA左侧序列是位于18q11.1-q11.2的基因序列, 右侧序列是4

号染色体末端的基因序列, 提示HBV相关的HCC可能与染色体的异常转位有关.

## 5 乙型肝炎病毒整合的分子遗传学异常

Minami et al<sup>[33]</sup>在3例HCC组织中克隆了与HBV DNA整合的相邻的细胞基因序列, 是研究HBV DNA整合的理想技术途径. Zhou et al<sup>[140]</sup>从上海的1例HCC肝组织中分离到9 kb的整合子基因序列, 序列中包括反向的病毒和细胞的基因序列, 其中病毒的基因序列包括核心基因、前-S区和部分的X、S基因. 整合子中包括3 kb的细胞基因序列, 整合位点位于HBV DNA的DR1区的第11 nt处, 与之邻接的是HBV的X基因, 包括黏性重叠区. 这一段细胞基因位于染色体的17p11.2-17p12之间, 与p53基因很近. 对相邻的细胞基因序列进行分析, 发现有一70 bp的基因片段, 在多个染色体位点上都有存在, 其中包括人自主复制序列1(ARS1). Meyer et al<sup>[141]</sup>在人HCC组织中分离的整合的HBV DNA序列, 包括2个拷贝的X基因及其启动子和增强子序列(717-1796 nt)和3'-末端截短型的前-S/S基因(2703-2423 nt). 由于整个前-C/C基因片段的缺失, 导致X基因的3'-末端与前-S基因融合, 表明HBV DNA的整合过程, 包括HBV DNA的插入整合, 以及整合HBV DNA基因序列之间的重组等2个步骤, 才最终形成目前从HCC组织中所发现的HBV DNA整合子. 位于整合位点的5'-和3'-末端的细胞基因序列包括17号染色体上的 $\alpha$ 卫星DNA序列, 以及14号染色体上的短臂序列p14-pter, 说明HBV DNA的整合引发了异常的染色体转位. 不少研究结果报道17号染色体是HBV DNA整合的热点区, 相信包括携带p53基因的这一染色体结构区的HBV DNA整合, 在HCC的发生发展过程中具有重要意义. Dandri et al<sup>[142]</sup>以Southern blot杂交技术对HepG2 2.2.15细胞系中整合的HBV DNA进行了分析, 大约10%的HepG 2.2.15中有HBV DNA的整合. 以过氧化氢处理细胞以增加细胞中DNA的不稳定性, 可以将有HBV DNA的细胞的比率提高到50%, 抑制DNA修复的多聚(ADP-核糖基化)-1(PARP-1)同样可以使HBV DNA整合的比率提高到50%. 说明氧化应激造成的细胞DNA的不稳定, 可以促进HBV DNA的整合. PARP-1的活性可能是HBV DNA整合的关键酶类.

HBV DNA整合除了造成细胞基因组的插入激活, 还造成了基因重排, 激活癌基因的表达, 造成肝细胞的恶性转化. Pineau et al<sup>[143]</sup>发现在HBV相关性HCC组织中存在t(3;8)的染色体转位现象. 一边是8p23整合位点, 位于羧基肽酶N(carboxypeptidase N)编码基因的附近, 在肝组织中这种酶的转录水平很高, 在HCC和其他表皮细胞肿瘤组织中经常出现缺失突变. 另一边是3q27-29, 这是一个多种肿瘤类型如大细胞型淋巴瘤等都能见到的多发性染色体转位位点. 本研究结果为HBV诱导的染色体转位, 进而为引发HCC的理论提供了直接的证据.

## 6 乙型肝炎病毒基因整合的相关蛋白

Wang et al<sup>[144]</sup>在HBV DNA整合位点的研究中发现HBV DNA可以在细胞周期素A的内含子序列中整合,从HCC的cDNA文库中筛选到几个HBV-细胞周期素A的杂合体,编码HBV-细胞周期素A的融合蛋白,在细胞周期素A的N-末端有缺失,包括细胞周期素A的信号肽序列和细胞周期素降解有关的结构序列,而代之以以前-S2/S基因序列,整个融合蛋白的表达在前-S2/S启动子的指导下进行.这种融合蛋白与天然的细胞周期素A蛋白相比较,是高水平表达的,表达方式是持续的,而且这种融合蛋白由于缺失突变的原因还不易被降解,因此细胞周期素A的作用显著加强.这种不易被降解的细胞周期素A蛋白的持续高水平的表达,是HBV DNA基因整合与HCC发生有关的主要机制之一. Kajino et al<sup>[145]</sup>在体外HBV DNA整合的研究中发现亚基因组15AB(1 855-1 914 nt)片段的整合较为常见,而且还有15AB结合蛋白的存在.这种蛋白的存在可能是HBV DNA与肝细胞基因组整合的相关蛋白造成肝细胞基因组不稳定、肝细胞癌发生的主要因素.利用Southwestern筛选技术,鉴定出小鼠上游结合因子(upstream binding factor, UBF)和DNA结合蛋白A(DNA binding protein A, dbpA),其中UBF属于含有HMG结构域的蛋白家族成员,而dbpA则属于Y盒结合蛋白家族的成员(Y box binding protein).与15AB的结合似乎是保守的DNA结构域与这一家族蛋白之间的结合来介导的.因为HMG1和YB-1等这一家族的成员也可以与15AB结合.因此考虑这些家族成员的蛋白成分可能与HBV DNA与细胞基因组之间的重组过程有关.

Nakanishi-Matsui et al<sup>[146]</sup>的研究结果表明HBV DNA与细胞基因组整合的邻接位点,即HBV DNA的整合序列(integrated sequence, IS)总有一段与顺相重复序列1相邻的25 bp的基因片段.从HepG2细胞中分离纯化到一种与IS序列相结合的蛋白,称为IS结合蛋白3(IS binding protein 3, ISBP3).对于ISBP3进行序列分析,证实与转录因子阴和阳1(Y1)是同一种蛋白.针对Y1羧基末端的单克隆抗体也可以在Western blot杂交分析和电泳迁移率分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)中识别ISBP3.另外,ISBP3还可以与Y1的结合蛋白Y3这种促进多瘤病毒分子内重组的蛋白结合.尽管目前的研究证实Y1是一种转录因子蛋白,但IS却从未表现出与前-C和前基因组RNA的转录有关.因此,考虑Y1与线性复制的HBV DNA分子内部的重组有关.研究表明,Y1在HBV DNA与细胞基因组DNA之间的整合过程中具有重要作用. Yamamoto et al<sup>[147]</sup>在HBV DNA顺式转染的HepG2细胞系中,发现整合的HBV DNA编码的反式激活蛋白可反式激活原癌基因c-fos等的表达. Dejean et al<sup>[148]</sup>对于单一整合位点的HBV DNA整合基因进行序列分析比较,发现HBV DNA整合发生的位点是甲状腺/类固醇激素受体DNA结合位点的编码基因的

外显子.从中克隆的HBV DNA整合的靶基因hap编码视黄酸受体.因为视黄酸调节细胞生长与分化基因的表达,因此认为HBV DNA的整合造成在正常情况下表达水平较低的hap基因表达水平显著升高,造成正常肝细胞的恶性转化. Hsu et al<sup>[149]</sup>对33份由WHV感染引起的HCC组织中病毒DNA的整合进行了检测,发现整合的病毒基因序列包括增强子基因序列,还检测到不同的癌基因的表达,如c-myc、N-myc、c-fos、c-jun和jun-B等.有2份标本中见到c-myc表达激活是由于WHV DNA在c-myc编码区附近整合而引起的.说明病毒基因整合对于c-myc的激活也是HCC发生的重要机制. Takada et al<sup>[150]</sup>以Southern blot杂交技术对整合HBV DNA进行检测,在15/16组织标本中,发现了随机位点的HBV DNA整合,对于3份标本中19个整合子进行序列分析,发现整合的HBV DNA反向双拷贝化,或者转位到细胞重要基因附近.因此,HBV DNA的基因重排或者对于整合位点附近的细胞DNA表达的影响,就是HBV相关的HCC发生的重要的分子生物学机制.但是对于整合位点的细胞DNA进行分析,除了发现小片段的缺失之外,并没有显著的结构异常.提示HBV DNA反向重排或双拷贝化在整合之前就发生了.对于病毒-病毒相邻序列的分析,提出了HBV DNA与HCC相关的反向双拷贝化机制. Wang et al<sup>[151]</sup>在早期HCC组织中单一HBV DNA整合位点发现了细胞的整合位点基因序列,这一基因序列转录1.8 kb和2.7 kb的mRNA,编码产物为432 aa的蛋白,相对分子量为48 536,与人细胞周期素A蛋白同源. HBV DNA整合的位点位于细胞周期素A的内含子(intron)区,因为细胞周期素A是细胞周期的重要调节蛋白<sup>[152-153]</sup>,部分揭示了HBV相关性HCC的形成过程.

## 7 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1997:37-42
- 2 成军. 决定乙肝病毒嗜肝特性的分子机制. 国外医学·病毒学分册 1995;2:78-81
- 3 董菁, 成军, 王勤环, 刘友昭, 王刚, 施双双, 夏小兵, 邵清, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒准种特点的初步研究. 中华内科杂志 2000;39:838-839
- 4 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:217-219
- 5 陆荫英, 刘妍, 李克, 成军, 王琳, 张玲霞. 乙型及丙型肝炎病毒受体的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:211-213
- 6 Huang JM, Huang TH, Qiu HY, Fang XW, Zhuang TG, Qiu JW. Studies on the integration of hepatitis B virus DNA sequence in human sperm chromosomes. *Asian J Androl* 2002; 4:209-212
- 7 Kawai S, Yokosuka O, Imazeki F, Maru Y, Saisho H. State of HBV DNA in HBsAg-negative, anti-HCV-positive hepatocellular carcinoma: existence of HBV DNA possibly as nonintegrated form with analysis by Alu-HBV DNA PCR and conventional HBV PCR. *J Med Virol* 2001;64:410-418
- 8 成军, 斯崇文. 转导肝细胞基因治疗研究进展. 中华内科杂志 1993;32:195-197
- 9 成军, 斯崇文. 抗病毒基因治疗研究进展. 中华实验和临床病毒学杂志 1993;7:436-439
- 10 赵鸿, 成军, 斯崇文. 乙型肝炎病毒S基因单独和联合白介素-12免疫小鼠诱生的特异性体液和细胞免疫应答. 中华传染病杂志 2000;18:190-191
- 11 柯亨宁, 斯崇文, 成军, 于敏, 刘丹, 田秀兰. 表面抗原DNA疫苗

- 诱导小鼠体液免疫及抑制转基因鼠表面抗原的产生. 中华内科杂志 2000;39:319-322
- 12 成军, 钟彦伟, 施双双, 倪勤, 夏小兵, 董菁, 王刚, 刘友昭, 王琳, 刘妍, 杨继珍, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒表面抗原人源单链可变区抗体基因的克隆与鉴定. 肝脏 2000;5:130-132
- 13 成军. 病毒基因组的反式调控及其在抗病毒基因治疗方案设计中的应用. 国外医学·流行病学传染病学分册 1994;21:241-244
- 14 成军, 斯崇文. 肝脏疾病基因治疗研究进展. 临床肝胆病杂志 1995;11:1-4
- 15 成军, 斯崇文, 王勤环, 于敏. 人白介素 - 2 基因表达载体的构建及抗乙型肝炎病毒作用. 中华肝脏病杂志 1995;3:67-70
- 16 Tsuei DJ, Hsu TY, Chen JY, Chang MH, Hsu HC, Yang CS. Analysis of integrated hepatitis B virus DNA and flanking cellular sequences in a childhood hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 1994;42:287-293
- 17 Schluter V, Meyer M, Hofschneider PH, Koshy R, Caselmann WH. Integrated hepatitis B virus X and 3' truncated preS/S sequences derived from human hepatomas encode functionally active transactivators. *Oncogene* 1994;9:3335-3344
- 18 Mabit H, Dubanchet S, Capel F, Daugey C, Petit MA. *In vitro* infection of human hepatoma cells (HepG2) with hepatitis B virus (HBV): spontaneous selection of a stable HBV surface antigen-producing HepG2 cell line containing integrated HBV DNA sequences. *J Gen Virol* 1994;75:2681-2689
- 19 Dong J, Cheng J, Wang QH, Liu Y, Wang G, Shi SS, Xia XB, Shao Q, Si CW. The preliminary study on hepatitis B virus (HBV) quasispecies in patients with chronic HBV infection. *Chin J Infect Dis* 2001;19:199-203
- 20 成军, 斯崇文, 王勤环, 于敏. 人白介素 - 2 基因转移表达及抗乙型肝炎病毒和诱导 LAK 细胞活性的研究. 中华医学杂志 1995;75:388-391
- 21 赵鸿, 成军, 斯崇文. 乙肝病毒 S 基因单独与白介素 - 12 基因联合免疫小鼠诱生的体液免疫应答. 传染病信息 1999;12:69-71
- 22 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 DNA 序列异质性及准种特点的研究. 中华医学杂志 2002;82:81-85
- 23 Cheng J. Progress in gene therapy for liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(Suppl):A261-A262
- 24 刘妍, 成军. HBV 截短的表面抗原蛋白 MHBs' 的反式激活作用. 国外医学·病毒学分册 2000;7:190-193
- 25 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 夏小兵, 斯崇文. 外周血中乙型肝炎病毒截短型囊膜中蛋白基因的克隆化与分析. 中华肝脏病杂志 2001;9:163-165
- 26 Graef E, Caselmann WH, Wells J, Koshy R. Insertional activation of mevalonate kinase by hepatitis B virus DNA in a human hepatoma cell line. *Oncogene* 1994;9:81-87
- 27 Yasui H, Hino O, Ohtake K, Machinami R, Kitagawa T. Clonal growth of hepatitis B virus-integrated hepatocytes in cirrhotic liver nodules. *Cancer Res* 1992;52:6810-6814
- 28 刘妍, 成军, 董菁, 夏小兵, 李克, 杨继珍. 截短型乙肝病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. 肝脏 2001;6:8-10
- 29 钟彦伟, 成军, 施双双, 董菁, 夏小兵, 刘妍, 李克, 杨继珍. 抗HBsAg 人源单链抗体的筛选与可溶性抗体的表达. 中国病毒学 2001;16:105-108
- 30 柯亨亨, 斯崇文, 成军, 于敏, 刘丹. HBsAg 及其与小鼠白介素 - 18 融合蛋白表达质粒的构建和 DNA 免疫. 中华传染病杂志 2001;19:77-80
- 31 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶基因序列准种与变异特点的研究. 病毒学报 2001;17:270-272
- 32 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙肝病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 33 Minami M, Poussin K, Brechet C, Paterlini P. A novel PCR technique using Alu-specific primers to identify unknown flanking sequences from the human genome. *Genomics* 1995;29:403-408
- 34 Georgi-Geisberger P, Berns H, Loncarevic IF, Yu ZY, Tang ZY, Zentgraf H, Schroder CH. Mutations on free and integrated hepatitis B virus DNA in a hepatocellular carcinoma: footprints of homologous recombination. *Oncology* 1992;49:386-395
- 35 成军, 李莉. 胸腺素  $\alpha$  1 在慢性病毒性肝炎治疗中的应用. 国外医学·病毒学分册 2001;8:55-59
- 36 成军. 乙型肝炎病毒准种研究的意义. 中华传染病杂志 2001;19:5-6
- 37 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶区基因序列准种与变异研究. 解放军医学杂志 2001;26:823-825
- 38 成军. 病毒性肝炎的分子发病机制. 临床肝胆病杂志 2001;17:(增刊):31-35
- 39 成军, 李莉. 阿地福韦在慢性乙型肝炎治疗中的应用. 国外医学·病毒学分册 2001;8:85-91
- 40 洪源, 成军. 乙型肝炎病毒 mRNA 转录后剪接的研究进展. 国外医学·病毒学分册 2001;8:115-119
- 41 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及准种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325
- 42 成军, 朱传琳. 肝炎病毒对双链 RNA 激酶 PKR 的调节作用. 国外医学·微生物学分册 2000;23:1-3
- 43 Tsuei DJ, Chen PJ, Lai MY, Chen DS, Yang CS, Chen JY, Hsu TY. Inverse polymerase chain reaction for cloning cellular sequences adjacent to integrated hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinomas. *J Virol Methods* 1994;49:269-284
- 44 Tsuei DJ, Chang MH, Chen PJ, Hsu TY, Ni YH. Characterization of integration patterns and flanking cellular sequences of hepatitis B virus in childhood hepatocellular carcinomas. *J Med Virol* 2002;68:513-521
- 45 甘人宝, 储美瑾, 沈绿萍. 克隆的亚型乙型肝炎病毒(Prd-1) DNA 的全序列. 中国科学(B辑) 1986;1:55-65
- 46 成军, 董菁. 乙型肝炎病毒前基因组启动子的结构与调节机制. 中华医学研究杂志 2001;1:122-125
- 47 Zhao H, Cheng J, Si CW. Effects of IL-12 on the immune response in mice inoculated with nucleic acid vaccine expressing S protein of hepatitis B virus. *Chin Med J* 2001;114:47-52
- 48 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 皇甫竞坤, 王刚, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前 C/C 基因准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:122-123
- 49 成军, 李莉. 清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制. 世界华人消化杂志 2002;10:73-76
- 50 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 刘妍, 夏小兵, 李莉, 张国庆, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子区准种与变异特点的研究. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:264-266
- 51 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体的构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:15-18
- 52 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 X 基因准种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 53 夏小兵, 成军, 杨继珍, 钟彦伟, 王刚, 方洪清, 刘妍, 李克, 董菁. 抗 HBsAg 单链抗体靶向干扰素的构建及原核表达. 中华肝脏病杂志 2002;10:28-30
- 54 钟彦伟, 成军, 王刚, 田小军, 陈新华, 李莉, 陈菊梅, 张玲霞. 乙型肝炎病毒核心抗原人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. 中国公共卫生 2002;18:153-154
- 55 成军. 乙型肝炎病毒基因异质性及准种特点研究的临床意义. 解放军医学杂志 2002;27:112-115
- 56 董菁, 李静, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 王业东, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:116-118
- 57 Matsui H, Shiba R, Matsuzaki Y, Asaoka H, Hosoi S, Doi M, Ohno T, Tanaka N, Muto H. Direct detection of hepatitis B virus gene integrated in the Alexander cell using fluorescence *in situ* polymerase chain reaction. *Cancer Lett* 1997;116:259-264
- 58 Schoub BD, Johnson S, McAnerney JM, Blackburn N, Kew MC, McCutcheon JP, Carlier ND. Integration of hepatitis B vaccination into rural African primary health care programmes. *BMJ* 1991;302:313-316
- 59 Chang MH, Chen PJ, Chen JY, Lai MY, Hsu HC, Lian DC, Liu YG, Chen DS. Hepatitis B virus integration in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma in childhood. *Hepatology* 1991;13:316-320
- 60 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及对其反式激活功能的影响. 解放军医学杂志 2002;27:125-127
- 61 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 韩萍, 牟劲松, 李克, 钟彦伟. 乙型肝炎病毒核心启动子区基因异质性及对其转录活性的影响. 解放军医学杂志 2002;27:128-130
- 62 成军, 董菁. 乙型肝炎病毒前基因组启动子的调节机制. 国外医学·流行病学传染病学分册 2002;29:15-18
- 63 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅.

- 乙型肝炎病毒序列个体化变异的初步观察. 解放军医学杂志 2002;27:119-121
- 64 钟彦伟, 成军, 王刚, 陈新华, 李克, 李莉, 陈菊梅. 乙肝病毒核心蛋白人源单抗抗体在大肠杆菌中的表达. 免疫学杂志 2002;18:85-88
- 65 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调 c-myc 基因表达的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:141-144
- 66 洪源, 成军. 肝炎病毒DNA疫苗的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:221-222
- 67 Fujise K, Nagamori S, Hasumura S, Homma S, Sujino H, Matsuura T, Shimizu K, Niiya M, Kameda H, Fujita K. Integration of hepatitis B virus DNA into cells of six established human hepatocellular carcinoma cell lines. *Hepatogastroenterology* 1990;37:457-460
- 68 Hsu TY, Fourel G, Etiemble J, Tiollais P, Buendia MA. Integration of hepatitis virus DNA near c-myc in woodchuck hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Jpn* 1990;25(Suppl 2):43-48
- 69 Lee HS, Kim ST, Kim CY. Identification of integrated hepatitis B virus DNA sequences in human hepatocellular carcinomas in Korea. *J Korean Med Sci* 1990;5:145-148
- 70 Matsubara K, Tokino T. Integration of hepatitis B virus DNA and its implications for hepatocarcinogenesis. *Mol Biol Med* 1990;7:243-260
- 71 Tay N, Chan SH, Ren EC. Detection of integrated hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma cell lines by nonradioactive in situ hybridization. *J Med Virol* 1990;30:266-271
- 72 Caselmann WH, Meyer M, Kekule AS, Lauer U, Hofschneider PH, Koshy R. A trans-activator function is generated by integration of hepatitis B virus preS/S sequences in human hepatocellular carcinoma DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2970-2974
- 73 Takada S, Gotoh Y, Hayashi S, Yoshida M, Koike K. Structural rearrangement of integrated hepatitis B virus DNA as well as cellular flanking DNA is present in chronically infected hepatic tissues. *J Virol* 1990;64:822-828
- 74 董菁, 成军, 王勤环, 刘友昭, 王刚, 施双双, 夏小兵, 邵清, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒准种特点的初步研究. 临床肝胆病杂志 2002;18:17-19
- 75 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 李莉, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:213-215
- 76 成军, 董菁, 刘妍, 李莉, 斯崇文, 王勤环, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒准种研究的临床意义. 世界华人消化杂志 2002;10:209-211
- 77 洪源, 成军, 董菁, 李克, 王琳, 王刚, 刘妍. 乙型肝炎病毒 HBsAg 重组疫苗与表面抗原 DNA 疫苗诱导 H-2<sup>b</sup> 小鼠免疫应答的实验研究. 世界华人消化杂志 2002;10:137-140
- 78 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒前 S2 基因序列异质性的研究. 中华内科杂志 2002;41:1-4
- 79 Takada S, Gotoh Y, Hayashi S, Kobayashi M, Koike K. Integrated structures of HBV DNA in chronic hepatitis and hepatoma tissues. *Gastroenterol Jpn* 1990;25(Suppl 2):31-37
- 80 Yaginuma K, Kobayashi H, Kobayashi M, Morishima T, Matsuyama K, Koike K. Multiple integration site of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma and chronic active hepatitis tissues from children. *J Virol* 1987;61:1808-1813
- 81 Wang PC, Hui EK, Chiu JH, Lo SJ. Analysis of integrated hepatitis B virus DNA and flanking cellular sequence by inverse polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2001;92:83-90
- 82 Zhong S, Chan JY, Yeo W, Tam JS, Johnson PJ. Frequent integration of precore/core mutants of hepatitis B virus in human hepatocellular carcinoma tissues. *J Viral Hepat* 2000;7:115-123
- 83 Urashima T, Saigo K, Kobayashi S, Imaseki H, Matsubara H, Koide Y, Asano T, Kondo Y, Koike K, Isono K. Identification of hepatitis B virus integration in hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma tissues. *J Hepatol* 1997;26:771-778
- 84 Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Nowicki M, Rakela J. Detection and sequence analysis of hepatitis B virus integration in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 1999;73:1235-1238
- 85 Tagieva NE, Gizatullin RZ, Zakharyev VM, Kisselev LL. A genome-integrated hepatitis B virus DNA in human neuroblastoma. *Gene* 1995;152:277-278
- 86 Wei Y, Etiemble J, Fourel G, Vitvitski-Trepo L, Buendia MA. Hepadna virus integration generates virus-cell cotranscripts carrying 3' truncated X genes in human and woodchuck liver tumors. *J Med Virol* 1995;45:82-90
- 87 Goto Y, Yoshida J, Kuzushima K, Terashima M, Morishima T. Patterns of hepatitis B virus DNA integration in liver tissue of children with chronic infections. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;16:70-74
- 88 Hino O, Ohtake K, Rogler CE. Features of two hepatitis B virus (HBV) DNA integrations suggest mechanisms of HBV integration. *J Virol* 1989;63:2638-2643
- 89 Nakamura T, Tokino T, Nagaya T, Matsubara K. Microdeletion associated with the integration process of hepatitis B virus DNA. *Nucleic Acids Res* 1988;16:4865-4873
- 90 Zhou YZ, Slagle BL, Donehower LA, vanTuinen P, Ledbetter DH, Butel JS. Structural analysis of a hepatitis B virus genome integrated into chromosome 17p of a human hepatocellular carcinoma. *J Virol* 1988;62:4224-4231
- 91 Okubo K, Nakamura T, Tokino T, Matsubara K. Different type of hepatitis B virus (HBV) DNA integrants that may reflect the integration process. *Gastroenterol Jpn* 1990;25(Suppl 2):23-30
- 92 Ding JJ, Saito H, Morizane T, Kagawa T, Matsumoto S, Iwabuchi N, Tsuchiya M, Watanabe T, Kumagai N, Tsuchimoto K. Hepatitis B virus DNA integration in hepatocellular carcinomas and their adjacent non-neoplastic liver tissues. *Keio J Med* 1989;38:443-453
- 93 Sherman M. Complexities of HBV DNA integration. *Hepatology* 1989;9:514-515
- 94 Tanaka Y, Esumi M, Shikata T. Frequent integration of hepatitis B virus DNA in noncancerous liver tissue from hepatocellular carcinoma patients. *J Med Virol* 1988;26:7-14
- 95 Rivkina MB, Lunin VG, Mahov AM, Tikchonenko TI, Kukain RA. Nucleotide sequence of integrated hepatitis B virus DNA and human flanking regions in the genome of the PLC/PRF/5 cell line. *Gene* 1988;64:285-296
- 96 成军, 李莉. 拉米夫定在肝脏移植患者乙肝病毒再感染预防与治疗中的应用 - 第36届欧洲肝病年会巡礼. 国外医学·病毒学分册 2001;8:185-189
- 97 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;16(Suppl):A185
- 98 成军, 李莉. 恩替卡韦及其抗 HBV 效果. 国外医学·流行病学传染病学分册 2002;29:12-14
- 99 董菁, 施双双, 王业东, 皇甫竞坤, 洪源, 李莉, 张玲霞, 成军. cDNA 文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前 S1 蛋白结合蛋白筛选. 解放军医学杂志 2002;27:321-322
- 100 成军, 李莉. 新型抗乙肝病毒药物氟胞苷的作用及机制. 世界感染杂志 2002;2:1-4
- 101 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 洪源, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子区异质性检测的初步研究. 临床检验杂志 2002;20:72-74
- 102 Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Zhang LX. Cloning and expression of pre-S1 gene of hepatitis B virus in yeast. *Hepatobiliary Pancreatic Dis Int* 2002;1:238-242
- 103 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前 -S1 基因酵母表达载体的构建及表达. 解放军医学杂志 2002;27:341-342
- 104 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前 C/C 基因准种与变异特点的研究. 中华微生物学与免疫学杂志 2002;22:27
- 105 董菁, 成军, 王勤环, 刘妍, 王刚, 施双双, 夏小兵, 李克, 邵得志, 斯崇文. 乙型肝炎病毒囊膜中蛋白与白介素 - 18 联合基因免疫的实验研究. 中华传染病杂志 2002;20:148-151
- 106 陆荫英, 刘妍, 成军, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 蛋白的功能研究进展. 国外医学·病毒学分册 2002;9:33-36
- 107 王琳, 陆荫英, 成军, 于敏, 李克, 刘妍. 白介素 - 18 逆转录病毒载体的构建及抗乙型肝炎病毒的研究. 解放军医学杂志 2002;27:699-701
- 108 Imai M, Hoshi Y, Okamoto H, Matsui T, Tsurimoto T, Matsubara K, Miyakawa Y, Mayumi M. Free and integrated forms of hepatitis B virus DNA in human hepatocellular carcinoma cells (PLC/342) propagated in nude mice. *J Virol* 1987;61:3555-3560
- 109 Shih C, Burke K, Chou MJ, Zeldis JB, Yang CS, Lee CS, Isselbacher KJ, Wands JR, Goodman HM. Tight clustering of human hepatitis B virus integration sites in hepatomas near a triple-stranded region. *J Virol* 1987;61:3491-3498
- 110 Togawa K, Arima T, Nagashima H. Subgenomic studies on hepatitis B virus DNA integrated into the genome of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Jpn* 1987;22:621-626
- 111 Sninsky JJ, Siddiqui A, Robinson WS, Cohen SN. Cloning and endonuclease mapping of the hepatitis B viral genome. *Nature*

- 1979;279:346-348
- 112 刘妍, 成军, 张跃新, 段惠娟, 牟劲松, 韩萍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 截短型 HBsAg 中蛋白反式激活基因的克隆. 中华传染病杂志 2002;20:218-221
- 113 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉. 乙型肝炎病毒表面抗原 / 抗体同时阳性患者体内 S 基因序列的分析研究. 中国公共卫生 2002;18:535-537
- 114 董菁, 刘妍, 皇甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原基因多态性的初步研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2002;11:130-135
- 115 陆荫英, 成军, 张玲霞. 分子伴侣及其与乙型肝炎病毒的关系. 胃肠病学和肝病学杂志 2002;11:177-180
- 116 Chen JY, Harrison TJ, Tsuei DJ, Hsu TY, Zuckerman AJ, Chan TS, Yang CS. Analysis of integrated hepatitis B virus DNA and flanking cellular sequences in the hepatocellular carcinoma cell line HCC36. *Intervirology* 1994;37:41-46
- 117 Quade K, Saldanha J, Thomas H, Monjardino J. Integration of hepatitis B virus DNA through a mutational hot spot within the cohesive region in a case of hepatocellular carcinoma. *J Gen Virol* 1992;73:179-182
- 118 Kuo KW, Yang PY, Huang YS, Shieh DZ. Variations in gene expression and genomic stability of human hepatoma cells integrated with hepatitis B virus DNA. *Biochem Mol Biol Int* 1998;44:1133-1140
- 119 Pineau P, Marchio A, Mattei MG, Kim WH, Youn JK, Tiollais P, Dejean A. Extensive analysis of duplicated-inverted hepatitis B virus integrations in human hepatocellular carcinoma. *J Gen Virol* 1998;79:591-600
- 120 Chen WN, Oon CJ, Leong AL, Koh S, Teng SW. Expression of integrated hepatitis B virus X variants in human hepatocellular carcinomas and its significance. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:885-892
- 121 Yamamoto S, Mita E, Nakatake H, Takimoto M, Koshy R, Matsubara K. Transactivating function of integrated hepatitis B virus. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;197:1209-1215
- 122 Zhang XK, Egan JO, Huang D, Sun ZL, Chien VK, Chiu JF. Hepatitis B virus DNA integration and expression of an erb B-like gene in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;188:344-351
- 123 Berger I, Shaul Y. Integration of hepatitis B virus: analysis of unoccupied sites. *J Virol* 1987;61:1180-1186
- 124 成军, 李莉. 抗肝炎病毒序贯治疗方案的研究进展. 国外医学病毒学分册 2002;9:75-79
- 125 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙肝病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:765-769
- 126 刘妍, 成军, 董菁, 王琳, 王刚, 夏小兵. HBV X 蛋白与 HCV 核心蛋白协同反式激活 SV40 病毒早期启动子 / 增强子的研究. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:39-41
- 127 Deng H, Dong J, Cheng J, Huangfu JK, Shi SS, Hong Y, Ren XM, Li L. Quasispecies groups in the core promoter region of hepatitis B virus. *Hepatobil Pancreatic Dis Int* 2002;1:392-396
- 128 钟彦伟, 成军, 施双双, 赵景民, 王刚, 夏小兵, 田小军, 李莉, 张玲霞. HBsAg 人源噬菌体单链抗体的筛选及其在临床治疗和诊断中的应用. 中华实验和临床病毒学杂志 2002;16:223-225
- 129 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 郎振为, 皇甫竞坤, 李莉, 斯崇文. HBsAg 中蛋白与 IL-18 联合核酸免疫 HBsAg 转基因小鼠的实验研究. 中华微生物与免疫学杂志 2002;22:518-519
- 130 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV 核心蛋白与截短型 HBV 表面抗原中蛋白协同反式激活功能的研究. 中华肝脏病杂志 2002;10:354-357
- 131 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前 - S2 基因酵母表达载体的构建及表达. 胃肠病学和肝病学杂志 2002;11:222-224
- 132 Simon D, Carr BI. Integration of hepatitis B virus and alteration of the 1p36 region found in cancerous tissue of primary hepatocellular carcinoma with viral replication evidenced only in noncancerous, cirrhotic tissue. *Hepatology* 1995;22:1393-1398
- 133 Livezey KW, Negorev D, Simon D. Hepatitis B virus-transfected Hep G2 cells demonstrate genetic alterations and de novo viral integration in cells replicating HBV. *Mutat Res* 2000;452:163-178
- 134 Su TS, Hwang WL, Yauk YK. Characterization of hepatitis B virus integrant that results in chromosomal rearrangement. *DNA Cell Biol* 1998;17:415-425
- 135 Tokino T, Tamura H, Hori N, Matsubara K. Chromosome deletions associated with hepatitis B virus integration. *Virology* 1991;185:879-882
- 136 Tokino T, Matsubara K. Chromosomal sites for hepatitis B virus integration in human hepatocellular carcinoma. *J Virol* 1991;65:6761-6764
- 137 Slagle BL, Zhou YZ, Butel JS. Hepatitis B virus integration event in human chromosome 17p near the p53 gene identifies the region of the chromosome commonly deleted in virus-positive hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1991;51:49-54
- 138 Hatada I, Tokino T, Ochiya T, Matsubara K. Co-amplification of integrated hepatitis B virus DNA and transforming gene hst-1 in a hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1988;3:537-540
- 139 Henderson AS, Ripley S, Hino O, Rogler CE. Identification of a chromosomal aberration associated with a hepatitis B DNA integration site in human cells. *Cancer Genet Cytogenet* 1988;30:269-275
- 140 Zhou YZ, Butel JS, Li PJ, Finegold MJ, Melnick JL. Integrated state of subgenomic fragments of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma from mainland China. *J Natl Cancer Inst* 1987;79:223-231
- 141 Meyer M, Wiedorn KH, Hofschneider PH, Koshy R, Caselmann WH. A chromosome 17:7 translocation is associated with a hepatitis B virus DNA integration in human hepatocellular carcinoma DNA. *Hepatology* 1992;15:665-671
- 142 Dandri M, Burda MR, Burkle A, Zuckerman DM, Will H, Rogler CE, Greten H, Petersen J. Increase in de novo HBV DNA integrations in response to oxidative DNA damage or inhibition of poly(ADP-ribosylation). *Hepatology* 2002;35:217-223
- 143 Pineau P, Marchio A, Terris B, Mattei MG, Tu ZX, Tiollais P, Dejean A. T (3;8) chromosomal translocation associated with hepatitis B virus intergration involves the carboxypeptidase N locus. *J Virol* 1996;70:7280-7284
- 144 Wang J, Zindy F, Chenivresse X, Lamas E, Henglein B, Brechot C. Modification of cyclin A expression by hepatitis B virus DNA integration in a hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1992;7:1653-1656
- 145 Kajino K, Yamamoto T, Hayashi J, Umeda T, Takahara T, Hino O. Recombination hot spot of hepatitis B virus genome binds to members of the HMG domain protein family and the Y box binding protein family; implication of these proteins in genomic instability. *Intervirology* 2001;44:311-316
- 146 Nakanishi-Matsui M, Hayashi Y, Kitamura Y, Koike K. Integrated hepatitis B virus DNA preserves the binding sequence of transcription factor Yin and Yang 1 at the virus-cell junction. *J Virol* 2000;74:5562-5568
- 147 Yamamoto S, Nakatake H, Kawamoto S, Takimoto M, Koshy R, Matsubara K. Transactivation of cellular promoters by an integrated hepatitis B virus DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:111-118
- 148 Dejean A, de The H. Hepatitis B virus as an insertional mutagen in a human hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Med* 1990;7:213-222
- 149 Hsu IC, Tokiwa T, Bennett W, Metcalf RA, Welsh JA, Sun T, Harris CC. P53 gene mutation and integrated hepatitis B viral DNA sequences in human liver cancer cell lines. *Carcinogenesis* 1993;14:987-992
- 150 Takada S, Koike K. Trans-activation function of a 3' truncated X gene-cell fusion product from integrated hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5628-5632
- 151 Wang J, Chenivresse X, Henglein B, Brechot C. Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 1990;343:555-557
- 152 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 张玲霞, 王业东, 成军. 乙肝病毒表面抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. 军医进修学院学报 2003;24:49-51
- 153 吴欣, 黄祖瑚, 成军, 吴兴柳, 董菁, 陆北川. 白介素 - 12 和白介素 - 18 质粒对 HBcAg DNA 疫苗诱导小鼠 (H-2d) 体液免疫应答的影响. 南京医科大学学报(自然科学版) 2002;22:284-287

# 基质金属蛋白酶及其抑制物与实验性肝纤维化

郑伟达, 王小众

郑伟达, 王小众, 福建医科大学附属协和医院消化内科 福建省福州市 350001  
项目负责人: 王小众, 350001, 福建省福州市新权路 29 号, 福建医科大学附  
属协和医院消化内科. drwangxz@pub6.fz.fj.cn  
电话: 0591-3357896-8482  
收稿日期: 2003-06-05 接受日期: 2003-09-18

## 摘要

肝纤维化的主要病理变化是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肝脏中过多沉积. 肝脏 ECM 的代谢主要由基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)及其抑制因子基质金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)调节, MMPs 促进 ECM 的降解, 而 TIMPs 通过抑制 MMPs 阻止 ECM 的降解, 从而形成和促进肝纤维化, MMPs 与 TIMPs 不平衡被认为是 ECM 沉积的重要因素. 近年来, 其性质及其在肝纤维化发生、发展过程中的具体机制在体外肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)培养, 肝纤维化动物模型研究中得到进一步阐明.

郑伟达, 王小众. 基质金属蛋白酶及其抑制物与实验性肝纤维化. 世界华人消化杂志 2004;12(2):428-431

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/428.asp>

## 0 引言

基质金属蛋白酶(MMPs)和基质金属蛋白酶组织抑制因子(TIMPs)存在于多种组织器官, 参与细胞外基质代谢, 在正常胚胎发育、器官发生、血管形成、子宫复旧、创伤愈合等生理过程及关节炎、骨质疏松、组织纤维化、肿瘤浸润与转移等多种病理过程中起着重要的作用. 近年来, MMPs 与 TIMPs 在肝脏疾病特别是在肝纤维化、肝硬化中的作用越来越受到重视. 肝细胞与多种间质细胞均能不同程度合成 MMPs 与 TIMPs, 并通过复杂的调节机制, 在维持正常肝脏纤维组织中细胞外基质(ECM)的合成与降解的动态平衡中起关键作用. 肝纤维化是多种慢性肝病晚期共有的组织学变化, 他不仅是慢性肝病向肝硬化发展的必经之路, 而且贯穿肝硬化的始终. 目前认为肝纤维化是肝脏受到慢性损伤时, 肝脏 ECM 分泌和降解失衡, 导致 ECM 可逆积累的结果. 在这过程中, 肝星状细胞(HSC)的决定性作用已被公认, 其被激活后分泌大量 ECM, 造成胶原异常沉积和肝脏组织学重构, 最终导致肝纤维化. 目前的研究表明, 肝脏 ECM 的代谢主要由 MMPs 及其抑制物 TIMPs 所调节, MMPs 促进 ECM 的降解, 而 TIMPs 通过抑制 MMPs 阻止 ECM 的降解, 从而形成和促进纤维化<sup>[1-2]</sup>.

## 1 MMPs 分类、功能及其活性调节

MMPs 是一类具有  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Zn}^{2+}$  离子依赖的内源性蛋白酶, 肝内主要由 HSC 合成, 可降解多种 ECM 成分<sup>[3]</sup>. 目前该酶系已发现 23 个成员, 即  $\text{MMP}_{1-26}$ (其中 4、5、6 位置空缺). 按底物不同分为 4 类: (1)胶原酶(collagenases), 包括 MMP-1、MMP-8、MMP-13, 主要降解 I、II、III 型间质胶原. (2)明胶酶类(gelatinases), 包括明胶酶 A (MMP-2, 72 kD)和明胶酶 B(MMP-9, 92 kD), 主要降解 IV 型胶原及明胶(变性胶原). (3)基质分解素(stromelysin)如 MMP-3、7、10、11, 其底物较广, 包括蛋白多糖、层粘蛋白、纤维连接蛋白、IV 型胶原、明胶等. (4)膜型 MMPs(membrane type matrix metalloproteinase, MT-MMP), 如 MMP-14、-15、-16、-17 等, 除能降解 ECM 外, 也能活化其他 MMPs, 主要是 MMP-2 酶原. MMPs 的基本特征为含有部分相同的氨基酸序列; 至少可以降解一种 ECM 成分; 有  $\text{Zn}^{2+}$  结合的活性位点; 以酶原形式分泌, 需激活产生活性; 其活性可被相应的 TIMPs 所抑制<sup>[3]</sup>.

在体内, MMP-3 在其他 MMPs 的激活中扮演重要角色<sup>[4-5]</sup>. 在肝脏受损后的炎症反应中, 来自炎症细胞的组织蛋白酶 G, 中性粒细胞的弹力蛋白酶, 来自肥大细胞的酪氨酸酶, 均能激活 MMP-3, 后者又可激活多种 MMPs. 炎症反应通过该途径诱发活性的 MMPs 对正常肝组织的破坏. MMP-1, MMP-8, 基质分解素则通过 u-PA(尿激酶纤溶酶原)与 t-PA(组织纤溶酶原)激活系统活化, u-PA 活性受 PAI(纤溶酶原激活物抑制物)抑制<sup>[6]</sup>. 前胶原酶-1(pro matrix metalloproteinase-1, pro-MMP-1)活化分 2 步, 先被纤溶酶裂解, 后被基质分解素(如 MMP-3)裂解<sup>[7]</sup>, 该过程能被 TGF- $\beta$ 1 抑制. 明胶酶 B 的激活过程与此类似<sup>[8]</sup>, 而明胶酶 A 的激活途径与此不同, 前明胶酶 A(pro gelatinase A, pro-MMP-2)在细胞表面被跨膜分子膜型基质金属蛋白酶(membrane type-1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP)激活. 在此过程中, TIMP-2 是连接 pro-MMP-2 的 C 末端和 MT1-MMP 的 N 末端的桥梁, 并形成三联体, 三者的比例必须适当, 当 TIMP-2 过量时, MT1-MMP 失活, 也能抑制已释放 MMP-2 的活性<sup>[9-11]</sup>. MT-MMPs 在 MMP-13 的激活中也起重要作用, 这与上述 MMP-1 的活化不同<sup>[12]</sup>. 活化的 MMP-2 也能激活 MMP-13<sup>[13]</sup>, 但 MMP-13 活化是否需要 TIMP-2 参与并不清楚.

虽然 MMP-1 与 MMP-13 都有降解间质胶原的能力, 但他们对细胞因子和生长因子的反应有很大不同.

IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  能诱导所有的 MMPs, 血小板衍生生长因子(PDGF)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)上调 MMP-1 的表达, 但对 MMP-13 的影响甚小<sup>[14]</sup>. 已有的研究表明, 转化生长因子 $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)抑制 MMP-1 的合成, 却诱导 MMP-13 的表达<sup>[15]</sup>. 因此, 在应用以 MMP-13 为主要间质胶原酶的鼠类制造肝纤维化模型时应予注意<sup>[17]</sup>.

## 2 TIMPs 分类、功能及其活性调节

目前已发现的 TIMPs 包括 TIMP-1、-2、-3、-4 四种, 分别为 28、21、23、22 kD, 由各自独立的基因表达, 功能也有所不同, 但四者氨基酸序列具有部分同源性, 且都可与特定的活性 MMP 通过非共价键结合成 1:1 复合物, 抑制后者对 ECM 的降解, 这种非共价键结合在生理条件下是可逆的<sup>[18]</sup>. 多种细胞可表达 TIMPs, 在肝脏主要由 HSC 表达, 并常与 MMPs 共分泌, 某种程度上自我调节 MMPs 的活性. TIMP 有 2 个结构域, 分别在 N-末端和 C-末端. N-末端介导对已活化 MMPs 的抑制作用, 其中 TIMP-2 对 MMP-2 的抑制较 TIMP-1 强 7-10 倍, 而对 MMP-1 的抑制比 TIMP-1 弱. C-末端能结合 pro-MMPs, 调节后者的酶解活化<sup>[19]</sup>. TIMP-1 结合明胶酶原 B, 阻止基质分解素对明胶酶原 B 的激活<sup>[20]</sup>. TIMP-2 在高浓度时抑制 MT1-MMP 对 pro-MMP-2 的活化, 而低浓度时反而有助于 pro-MMP-2 的活化<sup>[21]</sup>. 多种细胞因子和生长因子既可调节 MMPs 又可调节 TIMPs 的表达. 例如 TNF- $\alpha$  既能增加 MMP-1、MMP-3 表达, 又能增加 TIMP-1 表达, TGF- $\beta$ 1 通过提高 TIMP-1 但降低 MMP-1 和 MMP-3 的表达加速网状基质的累积<sup>[16, 22-24]</sup>. TGF- $\beta$ 1 对 TIMP-1 和 TIMP-2 的调节作用相反, 诱导前者, 抑制后者<sup>[25]</sup>. TIMP-1 和 TIMP-2 是多功能分子, 不仅抑制 MMPs, 而且刺激多种细胞增生, 使这些细胞免于凋亡<sup>[26-27]</sup>, 该作用与其抑制 MMPs 活性无关. 此外, TIMP-1 还可能对细胞的生长有调节作用<sup>[28]</sup>. TIMP-3 能诱导肿瘤细胞和血管平滑肌细胞凋亡<sup>[29-30]</sup>, TIMP-4 的功能尚未明确.

## 3 MMPs 和 TIMPs 在原代 HSC 培养中的表达及意义

在原代培养的人类和大鼠 HSC 的研究中发现 HSC 表达多种 MMPs 和 TIMPs. 随着 HSC 的激活,  $\alpha$ 平滑肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)表达增加, MMPs 和 TIMPs 表达的模式也发生改变. 在早期培养(0-3 d), HSC 表达 MMP-3, MMP-1(人)或 MMP-13(大鼠), 包括 u-PA 及其受体, 但未检测到 TIMP-1 和 TIMP-2<sup>[31-32]</sup>. 该现象是 HSC 离体后接触培养皿表面及含多种生长因子血清培养液的急性期反应, 说明 HSC 激活早期阶段的功能以基质降解为主. 在进一步培养中, MMPs 和 TIMPs 表达显著改变, 基质分解素和 MMP-1/MMP-13 下调, PAI-1, TIMP-1, TIMP-2 明显增加<sup>[33-35]</sup>. 该趋势在原代培养保持至少 21 d, 在传代培养 HSC 中普遍存在. 表明此时 HSC 不仅减少甚至停

止 MMPs 的表达, 而且增加能抑制 MMPs 酶原活化的 TIMPs 的表达, 同时 HSC 分泌 ECM 也明显增加. 证明 HSC 不仅是 ECM 的主要产生细胞, 也是 MMPs, TIMPs 的主要产生细胞. 随着 HSC 活化, 其他 MMPs 特别是 MMP-2(明胶酶 A)和 MT1-MMP 表达也增加<sup>[36]</sup>. 增高表达的 MMP-2 和 MT1-MMP 与 TIMP-2 组成的三联体, 是 pro-MMP-2 酶解活化所必需, 形成 MMP-2 活性的自我放大效应. MMP-2 能降解正常肝脏基质的 IV 型胶原, 但不能增加纤维化肝脏中过多纤维胶原的降解, 可能和 HSC 与正常肝基质间相互作用中断导致 HSC 增生活化有关, 也可能与 MMP-2 直接促进 HSC 增生有关<sup>[37]</sup>. Theret et al<sup>[38]</sup>观察到在有 I 型胶原存在的 HSC 培养中 MMP-2 酶原的活化显著增加. 可能是 I 型胶原纤维结合到 HSC 或纤维母细胞表面, 通过  $\alpha_2\beta_1$  整合素促进 MMP-2 的活化. Theret et al<sup>[39]</sup>还采用 HSC 单独培养及与肝细胞共培养研究 MMP-2 酶原活化过程中肝内细胞的相互作用. 结果表明 HSC 虽能同时表达 MMP-2、TIMP-2 及 MT1-MMP, 但不能分泌活化的 MMP-2, 肝细胞虽不能表达上述物质, 却能通过细胞膜依赖机制诱导 MMP-2 的活化.

## 4 MMPs 和 TIMPs 在肝纤维化进程中的作用

研究表明, 肝纤维化是一个戏剧性过程, 一方面, 基质沉积, 疾病进展; 另一方面, 基质降解, 疾病减轻. 研究还表明, 如果病因有效去除, 肝纤维化可逆转<sup>[40]</sup>. 该过程与 MMPs 和 TIMPs 的表达变化密切相关<sup>[41]</sup>. 研究 CCl<sub>4</sub> 诱导大鼠肝纤维化模型发现: (1) 疾病进展与 pro-MMP-2 和 MT1-MMP 表达增加, MMP-2 活性增强有关<sup>[17]</sup>. MMP-2 在肝纤维化进程中的作用存在互相矛盾的两方面, 一方面, 通过降解正常的肝基底膜成分和促进 HSC 增生, 启动并加重肝纤维化进程, 一方面, MMP-2 又能清除部分变性的过多 ECM, 减缓肝纤维化进程; (2) 肝纤维化进程中活化的 HSC 分泌间质胶原明显增多, 而 MMP-1/MMP-13 表达及活性无相应提高, 导致间质胶原在肝内过度沉积; (3) TIMP-1、-2 蛋白表达在肝损伤 6 h 后显著增加并持续整个肝纤维化过程<sup>[34, 42]</sup>, 同时, 胶原 I mRNA 也进行性增加, ECM 沉积, 提示 ECM 过度沉积不仅是由于 ECM 合成增多, 更大程度上(特别是后期)是由于降解减少引起的. Yoshiji et al<sup>[43]</sup>通过 TIMP-1 转基因小鼠模型研究证实了上述假设. 在 CCl<sub>4</sub> 肝损伤下, TIMP-1 转基因小鼠过度表达 TIMP-1, 肝纤维化发展比野生型小鼠更快, 范围更广, 但在无损伤原因时, TIMP-1 转基因小鼠过度表达 TIMP-1 但无肝纤维化, 表明肝纤维化发展是 ECM 对肝损伤的反应性合成增加与 TIMP-1 介导的 ECM 降解减少的共同结果.

## 5 MMP 和 TIMP 与肝纤维化的自然衰退

随着损肝因素的去, 肝纤维化的自然衰退和逆转已成共识. 大鼠肝纤维化自然逆转模型的研究表明该机制

与 MMPs 和 TIMPs 表达的变化,特别是活化的 HSC 凋亡密切相关。CCl<sub>4</sub> 诱导大鼠肝纤维化 4 wk 后停止给药,可见肝纤维化的自然衰退过程,同时伴有活化 HSC 的凋亡增加,TIMP-1, -2 表达水平快速下降,胶原酶活性增加,但 MMP-13 无明显变化。Iredale et al<sup>[44]</sup>认为是由于活化的 HSC 凋亡导致 HSC 总数减少,HSC 分泌的 ECM 和抑制 ECM 降解的 TIMPs 减少是肝纤维化发生自然衰退的关键。Yoshiji et al<sup>[45]</sup>应用 TIMP-1 转基因小鼠研究 TIMP-1 在肝纤维化自发性恢复中发现,正常对照组小鼠 I 型胶原酶、羟脯氨酸含量、 $\alpha$ -SMA 阳性细胞数量快速下降,而 TIMP-1 转基因小鼠组上述指标变化不大,提出 TIMP-1 可能通过降低 MMPs 活性,抑制活化 HSC 凋亡等机制在阻碍自发性肝纤维化恢复中起重要作用。

## 6 与 MMPs 和 TIMPs 相关的抗纤维化治疗

综合人的正常及纤维化肝脏、大鼠各种肝纤维化动物模型及体外细胞培养实验的研究结果,MMPs 及 TIMPs 在肝纤维化的发展过程中具有十分重要的作用。因此任何提高 MMPs、降低 TIMPs 表达及活性,促进 ECM 降解的方法都有可能成为抗肝纤维化的有效手段。

目前在实验中发现细胞松弛素 B、秋水仙素、前列腺素、IL-10 等的抗纤维化作用与上述机制有关。将激活后的 HSC 暴露于细胞松弛素 B 可使其胶原合成和沉积均减少,伴随 TIMP-1、TIMP-2 的平行下降,提示细胞松弛素是一个特异性下调 TIMP-1、TIMP-2 的因子<sup>[46]</sup>。秋水仙素可干扰胶原蛋白的分泌,在成纤维细胞培养中能够诱导细胞分泌 MMP-1。用秋水仙素治疗 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化,可使肝内胶原纤维比对照组减少约一半<sup>[47]</sup>。前列腺素在肝损伤动物模型中可预防纤维化形成,这可能与前列腺素 PGE<sub>2</sub> 参与各种生长因子诱导 MMP-1 合成增加有关。Wang et al<sup>[48]</sup>进行体内外研究显示 HSC 在激活过程中出现 IL-10 及其受体的表达,研究结果表明 IL-10 可能通过减少胶原合成和增加胶原酶两方面作用重构 ECM,对肝纤维化产生负反馈作用。在观察 IL-10 对实验性肝纤维化影响的实验中发现 IL-10 干预组肝纤维化较对照组明显减轻,且干预时间越长,差异越明显,免疫组织化学检测 IL-10 干预组 MMP-2 表达明显提高<sup>[49-52]</sup>。

## 7 参考文献

- 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
- 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
- Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;30:21491-21494
- Johnson JL, Jackson CL, Angelini GD, George SJ. Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1707-1715
- Zhang J, Gruber BL, Marchese MJ, Zucker S, Schwartz LB, Kew RR. Mast cell tryptase does not alter matrix metalloproteinase

- expression in human dermal fibroblasts: further evidence that proteolytically-active tryptase is a potent fibrogenic factor. *J Cell Physiol* 1999;181:312-318
- Irigoyen JP, Monoz-Canoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci* 1999;56:104-132
  - Hu B, Kapila YL, Buddhikot M, Shiga M, Kapila S. Coordinate induction of collagenase-1, stromelysin-1 and urokinase plasminogen activator (uPA) by the 120-kDa cell-binding fibronectin fragment in fibrocartilaginous cells: uPA contributes to activation of procollagenase-1. *Matrix Biol* 2000;19:657-669
  - Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knauper V, Atkinson S, Gavrilovic J. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS* 1999;107:38-44
  - Hernandez-Barrantes S, Toth M, Bernardo MM, Yurkova M, Gervasi DC, Raz Y, Sang QA, Fridman R. Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem* 2000;275:12080-12089
  - Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, Will H, Tamura T, van Westrum SS, Crabbe T, Clements J, d'Ortho MP, Murphy G. The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem* 1998;273:871-880
  - Monea S, Lehti K, Keski-Oja J, Mignatti P. Plasmin activates pro-matrix metalloproteinase-2 with a membrane-type 1 matrix metalloproteinase-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 2002;192:160-170
  - Cowell S, Knauper V, Stewart ML, D'Ortho MP, Stanton H, Hembry RM, Lopez-Otin C, Reynolds JJ, Murphy G. Induction of matrix metalloproteinase activation cascades based on membrane-type 1 matrix metalloproteinase: associated activation of gelatinase A, gelatinase B and collagenase 3. *Biochem J* 1998;331 (Pt 2):453-458
  - Knauper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, Hembry RM, Murphy G. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 1996;271:17124-17131
  - Balbin M, Pendas AM, Uria JA, Jimenez MG, Freije JP, Lopez-Otin C. Expression and regulation of collagenase-3 (MMP-13) in human malignant tumors. *APMIS* 1999;107:45-53
  - Uria JA, Jimenez MG, Balbin M, Freije JM, Lopez-Otin C. Differential effects of transforming growth factor-beta on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1998;273:9769-9777
  - Martelli-Junior H, Cotrim P, Graner E, Sauk JJ, Coletta RD. Effect of transforming growth factor-beta1, interleukin-6, and interferon-gamma on the expression of type I collagen, heat shock protein 47, matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-2 by fibroblasts from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis. *J Periodontol* 2003;74:296-306
  - Hironaka K, Sakaida I, Matsumura Y, Kaino S, Miyamoto K, Okita K. Enhanced interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-13) production of Kupffer cell by gadolinium chloride prevents pig serum-induced rat liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:290-295
  - Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74:111-122
  - Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, Gomis-Ruth FX, Nagase H, Tschesche H, Maskos K. Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:73-91
  - von Bredow DC, Cress AE, Howard EW, Bowden GT, Nagle RB. Activation of gelatinase-tissue-inhibitors-of-metalloproteinase complexes by matrilysin. *Biochem J* 1998;331 (Pt 3):965-972
  - Hernandez-Barrantes S, Toth M, Bernardo MM, Yurkova M, Gervasi DC, Raz Y, Sang QA, Fridman R. Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem* 2000;275:12080-12089

- 22 Delany AM, Canalis E. The metastasis-associated metalloproteinase stromelysin-3 is induced by transforming growth factor-beta in osteoblasts and fibroblasts. *Endocrinology* 2001;142:1561-1566
- 23 Dudas J, Kovalszky I, Gallai M, Nagy JO, Schaff Z, Knittel T, Mehde M, Neubauer K, Szalay F, Ramadori G. Expression of decorin, transforming growth factor-beta 1, tissue inhibitor metalloproteinase 1 and 2, and type IV collagenases in chronic hepatitis. *Am J Clin Pathol* 2001;115:725-735
- 24 姜虹, 李定国. TGF- $\beta$ 1 与肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2003;11:326-329
- 25 Zafarullah M, Su S, Martel-Pelletier J, DiBattista JA, Costello BG, Stetler-Stevenson WG, Pelletier JP. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) mRNA is constitutively expressed in bovine, human normal, and osteoarthritic articular chondrocytes. *J Cell Biochem* 1996;60:211-217
- 26 Shibusaki T, Yamashita K, Aoki T, Iwayama Y, Nishikawa T, Hayakawa T. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) stimulate osteoclastic bone resorption. *J Bone Miner Metab* 1999;17:245-251
- 27 Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates fibroblast proliferation via a cAMP-dependent mechanism. *J Biol Chem* 1995;270:13453-13459
- 28 Zhao WQ, Li H, Yamashita K, Guo XK, Hoshino T, Yoshida S, Shinya T, Hayakawa T. Cell cycle-associated accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the nuclei of human gingival fibroblasts. *J Cell Sci* 1998;111(Pt 9):1147-1153
- 29 Baker AH, George SJ, Zaltsman AB, Murphy G, Newby AC. Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *Br J Cancer* 1999;79:1347-1355
- 30 Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death *in vitro*. TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest* 1998;101:1478-1487
- 31 Vyas SK, Leyland H, Gentry J, Arthur MJ. Rat hepatic lipocytes synthesize and secrete transin (stromelysin) in early primary culture. *Gastroenterology* 1995;109:889-898
- 32 Leyland H, Gentry J, Arthur MJ, Benyon RC. The plasminogen-activating system in hepatic stellate cells. *Hepatology* 1996;24:1172-1178
- 33 Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJ, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ, Clark N, Murphy G. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology* 1996;24:176-184
- 34 Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJ. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 1996;110:821-831
- 35 陈治新, 陈运新, 翁山耕, 黄月红, 张莉娟, 王小众. PDGF-BB 对肝星状细胞表达 MMP-2 及 TIMP-1 的影响. *胃肠病学和肝病杂志* 2003;12:46-48
- 36 Atkinson SJ, Patterson ML, Butler MJ, Murphy G. Membrane type 1 matrix metalloproteinase and gelatinase A synergistically degrade type 1 collagen in a cell model. *FEBS Lett* 2001;491:222-226
- 37 Benyon RC, Hovell CJ, Da Gaca M, Jones EH, Iredale JP, Arthur MJ. Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation. *Hepatology* 1999;30:977-986
- 38 Theret N, Lehti K, Musso O, Clement B. MMP2 activation by collagen I and concanavalin A in cultured human hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999;30:462-468
- 39 Theret N, Musso O, L'Helgoualc'h A, Clement B. Activation of matrix metalloproteinase-2 from hepatic stellate cells requires interactions with hepatocytes. *Am J Pathol* 1997;150:51-58
- 40 Hammel P, Couvelard A, O'Toole D, Ratouis A, Sauvanet A, Flejou JF, Degott C, Belghiti J, Bernades P, Valla D, Ruszniewski P, Levy P. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N Engl J Med* 2001;344:418-423
- 41 李保森, 游绍莉, 赵志海, 辛绍杰, 赵景民, 王松山. 实验性肝纤维化形成过程中几种金属基质蛋白酶表达的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:483-485
- 42 聂青和, 谢玉梅, 周永兴, 程勇前, 罗红, 罗新栋. 正常及实验性肝纤维化大鼠肝脏中的金属蛋白酶组织抑制因子-1. *世界华人消化杂志* 2003;11:204-208
- 43 Yoshiji H, Kuriyama S, Miyamoto Y, Thorgeirsson UP, Gomez DE, Kawata M, Yoshiji J, Ikenaka Y, Noguchi R, Tsujinoue H, Nakatani T, Thorgeirsson SS, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology* 2000;32:1248-1254
- 44 Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998;102:538-549
- 45 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshiji J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Yanase K, Namisaki T, Imazu H, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology* 2002;36(4 Pt 1):850-860
- 46 Williams EJ, Benyon RC, Trim N, Hadwin R, Grove BH, Arthur MJ, Unemori EN, Iredale JP. Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis *in vivo*. *Gut* 2001;49:577-583
- 47 Favari L, Perez-Alvarez V. Comparative effects of colchicine and silymarin on CCl4-chronic liver damage in rats. *Arch Med Res* 1997;28:11-17
- 48 Wang SC, Ohata M, Schrum L, Rippe RA, Tsukamoto H. Expression of interleukin-10 by *in vitro* and *in vivo* activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1998;273:302-308
- 49 Wang XZ, Zhang LJ, Li D, Huang YH, Chen ZX, Li B. Effects of transmitters and interleukin-10 on rat hepatic fibrosis induced by CCl4. *World J Gastroenterol* 2003;9:539-543
- 50 张莉娟, 王小众, 黄月红, 陈治新. 白介素-10 对实验性肝纤维化的影响. *中华消化杂志* 2002;22:179-180
- 51 黄月红, 张莉娟, 李丹, 陈治新, 王小众. IL-10 对实验性肝纤维化大鼠基质金属蛋白酶-2 影响的研究. *肝脏* 2001;6:162-164
- 52 Wang XZ, Chen ZX, Zhang LJ, Chen YX, Li D, Chen FL, Huang YH. Expression of insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 1 receptor and its intervention by interleukin-10 in experimental hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1287-1291

# 建议将亚临床型肝性脑病更名为轻微型肝性脑病

贾林

贾林, 广州市第一人民医院消化内科 广东省广州市 510180  
项目负责人: 贾林, 510180, 广东省广州市盘福路1号, 广州市第一人民医院消化内科. gzjialin@hotmail.com  
电话: 020-81628877 传真: 020-81628809  
收稿日期: 2003-06-27 接受日期: 2003-08-16

## 摘要

亚临床型肝性脑病(SHE)自1978年提出以来,命名尚存争议.有关专家认为SHE和轻微型肝性脑病(MHE)为概念不同的两个术语,前者重在区别“临床肝性脑病”术语,后者则侧重于患者临床症状的轻重,HE范畴应包含从轻微型(MHE,0期)到肝昏迷(IV期)的不同程度类型,MHE仅为其中一部分;相比之下,SHE概念比较模糊,易被误解为“与HE发病机制不同”的另一种病症.因此,第11届世界胃肠病大会专家小组将SHE更名为MHE.目前国外学者纷纷更名,MHE应用明显增多.

贾林. 建议将亚临床型肝性脑病更名为轻微型肝性脑病.世界华人消化杂志 2004;12(2):432-433

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/432.asp>

## 0 引言

肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE)是指发生于肝脏功能严重障碍或失调,且排除其他已知脑病的神经心理异常综合征.传统分级把HE分为前驱期、昏迷前期、昏睡期和昏迷期四期(I-IV期),而亚临床型肝性脑病(subclinical hepatic encephalopathy, SHE)作为HE补充分级(0期),主要意指某些肝硬化患者缺乏临床常规手段可检测的大脑功能失调,但具有可计量的智力检测和脑诱发电位异常<sup>[1-3]</sup>.在1998年维也纳召开的第11届世界胃肠病大会上,由世界著名肝脏病学、神经病学和神经心理学专家组成的工作小组就HE的标准化命名进行了专门讨论,建议将SHE更名为轻微型肝性脑病(minimal HE, MHE)<sup>[3-5]</sup>.

## 1 亚临床型肝性脑病的命名变迁

MHE并非新发现的综合征,以前曾以不同术语描述(以SHE最为常用)<sup>[2]</sup>.早在1970年,Zeegen et al<sup>[6]</sup>首次利用智力检测(数字连接试验)评定肝硬化门脉术后患者的感知运动异常,Rehnstrom et al<sup>[7]</sup>(1977)发现部分肝硬化患者(无论手术与否)存在智力损害,但其临床表现正常而无临床型肝性脑病,Rickers et al<sup>[8]</sup>则于1978年首次提出了SHE诊断术语,并沿用至今.研究发现SHE患者多为操作能力异常,而不是言语能力低,且

具有发病率高、无特殊临床表现、隐蔽性强、早期诊治效果好等特点,如忽视诊治则存在极大的事故隐患,可能给患者和社会带来巨大损失,其社会学意义受到国内外学者的广泛关注<sup>[1]</sup>.鉴于SHE患者的“无症状、隐蔽性强”等特点,出现了诸如早期肝性脑病(early HE),隐性肝性脑病(latent HE),低分级肝性脑病(low-grade HE)或门体性脑病(portal systemic encephalopathy)等不同命名,但命名尚未统一,且存异议<sup>[2]</sup>.

Mullen为首的HE标准化命名专家小组<sup>[3]</sup>认为SHE和MHE为概念不同的两个术语,前者重在区别“临床型肝性脑病”术语,依赖于常规临床检查手段;后者则侧重于患者临床症状的轻重,需用特殊检测方法诊断,为临床实用的概念.HE范畴应包含从轻微脑功能损害(通过敏感智力检测方法发现)到肝昏迷(IV期)等所有不同程度类型,MHE仅为HE广义概念的一部分,并建议在“肝性脑病范畴为一连续阶段”的原则指导下,充分考虑文化、语言差别和包含各种程度的肝病患者,进行大型临床研究确定最佳检测程序、评分标准和截断值(cutoff score),以有效判断HE轻重程度,阐明准确和可重复的常态分布以及区分临床HE和MHE的截断值;相比之下,SHE概念比较模糊、不实用,易被误解为“与HE发病机制不同”的另一种病症.因此,第11届世界胃肠病大会建议将SHE更名为MHE,旨在减轻“亚临床”术语的潜在误导性<sup>[3-5]</sup>.目前国外学者纷纷更名,MHE应用明显增多<sup>[9-12]</sup>,国内学者于近年也进行了相关概念的引进工作<sup>[4,13-14]</sup>.

## 2 肝性脑病的新标准化命名

既往HE命名系统的定义内涵存在争议,如“门体性脑病”强调了门体分流的重要发病地位,除肝硬化患者外,门体分流也可存在于没有任何内在肝病的患者;“急性HE”是指并发于急性肝功能衰竭的HE,易与“肝硬化伴发急性HE”的可逆性发作相混淆;“慢性HE”既可描述HE的反复发作,又可描述HE中枢症状的持续异常.因此,第11届世界胃肠病大会提出了新的HE标准化命名(表1),以解决上述争议<sup>[3-4]</sup>.

新的HE标准化命名认为,HE广义概念应包含肝脏异常类型,慢性肝病患者神经异常表现特征及其持续时间等内容.按肝脏异常类型可把HE分为A型(急性肝衰竭相关肝性脑病)、B型(门体分流相关肝性脑病,不伴有内在肝病)和C型(肝硬化门脉高压或门体分流相关肝性脑病)3种类型,因恰好与“急性(Acute)”、“分

流(Bypass)”和“肝硬化(Cirrhosis)”的首个英文字母相吻合而有助记忆. 按照慢性肝病患者神经异常表现特征及其持续时间把C型HE又分为发作型(episodic HE)、持续型(persistent HE)和轻微型(MHE)3种亚类<sup>[1]</sup>. 发作型HE可细分为HE伴诱因、自发性HE(无明确诱因)和复发性HE(1 a内HE发作2次或以上)三种; 持续型HE则可进一步细分为轻型(Mild, 1级HE)、重型(Severe, 2-4级HE)和治疗依赖型(HE症状于停药后迅速复发)<sup>[3-4]</sup>.

表1 第11届世界胃肠会议推荐的肝性脑病标准化命名(维也纳, 1998)

HE类型	定义	亚类	亚型
A型	急性肝衰竭相关的肝性脑病		
B型	门体分流相关的肝性脑病, 不伴有内在肝病		
C型	肝硬化门脉高压或门体分流相关的肝性脑病	发作型HE	伴诱因
			自发性
		持续型HE	复发性
			轻型
	重型		
	治疗依赖型		
	轻微型HE		

总之, 笔者建议在国内统一和规范肝性脑病的命名和分类, 将亚临床型肝性脑病更名为轻微型肝性脑病(MHE), 不再使用SHE一词.

### 3 参考文献

1 贾林, 李瑜元. 亚临床型肝性脑病. 中华内科杂志 1996;35:495-497

2 Quero Guillen JC, Groeneweg M, Jimenez Saenz M, Schalm SW, Herrerias Gutierrez JM. Is it a medical error if we do not screen cirrhotic patients for minimal hepatic encephalopathy? *Rev Esp Enferm Dig* 2002;94:544-557

3 Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy-definition, nomenclature, diagnosis, and quantification:final report of the working party at the 11th World congresses of gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 2002;35:716-721

4 贾林, 张美华. 肝性脑病的定义、命名、诊断和定量标准修订方案的新进展. 世界华人消化杂志 2004:(待发表)

5 Gerber T, Schomerus H. Hepatic encephalopathy in liver cirrhosis: pathogenesis, diagnosis and management. *Drugs* 2000;60:1353-1370

6 Zeegen R, Drinkwater JE, Dawson AM. Method for measuring cerebral dysfunction in patients with liver disease. *Br Med J* 1970;2:633-636

7 Rehnstrom S, Simert G, Hansson JA, Johnson G, Vang J. Chronic hepatic encephalopathy. A psychometrical study. *Scand J Gastroenterol* 1977;12:305-311

8 Rikkers L, Jenko P, Rudman D, Freides D. Subclinical hepatic encephalopathy: detection, prevalence, and relationship to nitrogen metabolism. *Gastroenterology* 1978;75:462-469

9 Nam SW, Kim JI, Park SH, Han NI, Han JY, Ahn BM, Kim JK, Choi SW, Chung KW, Sun HS, Yang DW, Ahn KJ, Lee JM. A study for clinical correlation of neuropsychological test and brain magnetic resonance spectroscopy in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Korean J Gastroenterol* 2003;42:50-56

10 Jover R, Company L, Gutierrez A, Zapater P, Perez-Serra J, Girona E, Aparicio JR, Perez-Mateo M. Minimal hepatic encephalopathy and extrapyramidal signs in patients with cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1599-1604

11 Weissenborn K. Minimal hepatic encephalopathy: a permanent source of discussion. *Hepatology* 2002;35:494-496

12 Joebges EM, Heidemann M, Schimke N, Hecker H, Ennen JC, Weissenborn K. Bradykinesia in minimal hepatic encephalopathy is due to disturbances in movement initiation. *J Hepatol* 2003;38:273-280

13 肖扬, 陈成伟. 肝性脑病的新认识. 肝脏 2002;6:201-202

14 刘厚钰, 石虹. 肝性脑病(一). 胃肠病学 2002;7:381-383

## 2002年度医疗机构国内论文被引用次数排名

排名	单位	被引次数	排名	单位	被引次数
1	解放军总医院	1602	11	南京军区南京总医院	822
2	中国协和医科大学北京协和医院	1151	12	上海第二医科大学瑞金医院	754
3	第二军医大学长海医院	1036	13	华中科技大学同济医院	646
4	北京大学附1院	1004	14	复旦大学华山医院	610
5	第四军医大学西京医院	965	15	中日友好医院	589
6	第二军医大学长征医院	920	16	复旦大学中山医院	579
7	第三军医大学西南医院	866	17	第四军医大学唐都医院	543
8	四川大学华西医院	857	18	解放军304医院	515
9	中山大学附1院	837	19	北京大学附3院	510
10	第一军医大学南方医院	825	20	医科院阜外医院	508

# 右叶部分肝移植临床解剖进展

刘 静, 高 毅, 钟世镇

刘静, 钟世镇, 中国人民解放军第一军医大学临床解剖学研究所  
广东省广州市 510515  
高毅, 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 510282  
广东省重点科技项目, No. 99B06703G  
项目负责人: 钟世镇, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学  
临床解剖学研究所. zhszh@fimmu.com  
电话: 020-61648200 传真: 020-6164778  
收稿日期: 2003-08-23 接受日期: 2003-08-27

## 摘要

活体肝移植已显示了巨大优势, 但左肝作为供肝多不能满足成年患者的需要, 故须发展右叶部分供肝术式. 本文概述了活体肝移植和右叶活体肝移植的现状, 结合右叶部分肝移植, 着重描述了肝静脉、肝动脉、胆管、门静脉的正常解剖, 变异的情况及右肝叶部分移植的不同方式下所遇到的管道的情况和建议的处理方法.

刘静, 高毅, 钟世镇. 右叶部分肝移植临床解剖进展. 世界华人消化杂志 2004; 12(2):434-438

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/434.asp>

## 0 引言

肝移植是治疗终末期肝病公认有效的方法, 成人右叶部分肝移植是扩大成人供肝来源的良好途径, 肝脏的解剖对成人右叶部分肝移植极为重要. 为此本文对右叶部分肝移植临床解剖进行综述. 右叶部分肝移植包括右半肝肝移植、右后叶肝移植、扩大右半肝肝移植, 其中, 既有活体肝移植, 又有尸体肝移植中的劈离式肝移植、减体积肝移植.

## 1 活体肝移植的现状

自 1963 年 Starzl 成功的实施世界首例临床原位肝移植以来, 肝移植已成为终末期肝病惟一有效的治疗方法<sup>[1]</sup>. 因肝移植供体严重缺乏和肝移植的显著疗效, 1989 年 Strong 成功开展首例活体肝移植(living donor liver transplantation, LDLT)<sup>[2]</sup>后, LDLT 在许多国家和地区开展, 以亚洲, 尤其是日本、香港、台湾发展较快. 其中日本京都大学开展最多, 已达 500 例, 至 2001 年, 全球 LDLT 已超过 1 500 例<sup>[3-4]</sup>, 仅日本就开展 1 000 例以上. 因 LDLT 有显著的疗效和优势<sup>[5]</sup>, 拓宽了供肝来源, 临床肝移植的重点已转向 LDLT<sup>[6]</sup>.

## 2 中国大陆 LDLT 现状

近年来, 中国大陆的肝移植发展较快, 已在武汉、广州、杭州、天津、成都、重庆、北京、上海等城

市形成较大的肝移植中心, 各中心累计例数均在 100 例以上. 自 1995 年南京医科大学的王学浩开展中国大陆首例 LDLT<sup>[5]</sup>以来, 在西安、杭州、成都、重庆、北京相继开展 LDLT<sup>[7]</sup>. 王学浩已行 26 例活体肝移植<sup>[7]</sup>, 包括 5 例右叶 LDLT 和 1 例急诊 LDLT, 目前中国大陆已行 LDLT 累计 30 例<sup>[7-8]</sup>.

## 3 右叶 LDLT 的现状

LDLT 部分缓解了供肝的严重不足, 起初, 供肝多为左外叶或左半肝, 受者多为儿童, 受体疗效好. 由于等待肝移植的成人患者远多于儿童患者<sup>[9]</sup>, 成年患者供肝缺乏的矛盾更为突出, LDLT 渐渐用于成人患者. 因左半肝只占全肝的 30-40%, 左肝作为成人患者的供肝, 多不能满足其代谢等需要, 因此右叶 LDLT 应运而生<sup>[10]</sup>. 1994 年 Yamaoka et al<sup>[11]</sup>在日本成功开展世界首例右半肝 LDLT, 随后在日本、北美、台湾、香港等地相继开展了此项工作, 取得与儿童 LDLT 相似的疗效. 1996 年香港范上达成功进行世界首例扩大右半肝 LDLT. 取得了良好效果<sup>[12]</sup>. 目前全世界开展右叶 LDLT 已超过 500 例, 以香港范上达报告的最多<sup>[13]</sup>.

但是右叶 LDLT 仍然会遇到问题, 如供者安全性、受者手术并发症、受者术后排斥反应等问题. 为保证供者安全, 术前作影像学的检查, 以观测肝的体积及肝内外与肝移植相关胆管、血管的大小、走行、分布等, 对减少术中出血、术后胆漏、肝坏死、肝脓肿、肝功能低下的发生率有重要意义. 由于目前存在不少困难, 如: (1)较现代化的影像学检查: MRI、CT、超声、DSA 等对活体的肝内较小的管道的发现率仅 88%<sup>[14]</sup>; (2)因离体的肝脏变形和转位, 用影像学方法检查离体肝内的管道, 所得出的结论, 常与活体内的肝脏内实际情况不一致, 导致对肝内部管道解剖结构的误解<sup>[15]</sup>; (3)并不是所有情况下都能进行影像学的检查, 如进行劈离式肝移植、减体积肝移植等. 因此, 识别和正确处理解剖变异, 熟悉肝内外的解剖, 对肝移植科、肝胆外科医生来说是必要, 也是极重要的<sup>[16]</sup>.

## 4 肝内外管道结构的临床解剖在右叶部分肝移植中的作用

4.1 肝静脉的临床解剖及其在右叶部分肝移植的处理  
详细了解肝静脉正常解剖和变异对进行右叶部分肝移植供肝切取、肝静脉的重建等具有重要意义. Imamura et al<sup>[17]</sup>认为在进行 LDLT 时, 应该考虑到有关肝静脉

解剖的两个关键点. 其一是肝静脉与下腔静脉相连处的解剖, 他直接关系到移植肝的静脉回流重建. 其二是肝内静脉的回流, 因为他涉及到LDLT后移植肝和供体残余肝的静脉回流.

4.1.1 肝静脉的临床解剖 肝的静脉主要由三条肝静脉和许多副肝静脉组成, 他们将肝脏的静脉血引流至下腔静脉. 其中右肝静脉最长, 常为单支走行在右叶间裂内<sup>[18]</sup>. 由引流V、VI段(Couinaud分段法, 下同)的前支和引流VII段的后支汇合而成<sup>[18]</sup>. 肝中静脉沿着Cantlie's线位于肝中裂内, 85%与肝左静脉形成共干汇入下腔静脉<sup>[18-19]</sup>. 肝中静脉引流左叶的IV段大部分、右叶的V、VIII段<sup>[20]</sup>, 他是引流右前叶的主要静脉. 肝左静脉引流II、III段及IV段小部分. 肝短静脉引流肝背部, 主要是VI、VII段的静脉血, 在肝后下腔静脉的右侧汇入下腔静脉<sup>[21]</sup>. 上述肝静脉为最常见的引流方式, 但肝静脉在不同个体之间有极大的差异<sup>[17]</sup>. Nakamura et al<sup>[18]</sup>对肝静脉的引流方式进行了广泛的研究后观察到: 右肝静脉的大小似乎决定了肝短静脉的数目和肝短静脉的直径, 并将肝静脉的引流的方式分为三型<sup>[17]</sup>: A型, 占32-39%, 有粗大的肝右静脉引流肝右叶的大部分, 伴有小的肝短静脉引流肝右叶后下小部分. B型, 占31-38%, 有中等大小的肝右静脉和直径0.5-1.0 cm的肝短静脉引流VI段. C型, 占20-24%, 肝右静脉是只引流VII段的短小静脉, 伴随较粗大的肝中静脉和直径最大达1.8 cm的肝短静脉引流肝右叶后下静脉血.

4.1.2 右叶部分肝移植肝静脉的处理 尽管在相邻肝段或叶的静脉之间可能存在交通支, 单个小静脉的阻断, 不会导致肝组织严重的静脉淤血<sup>[22-26]</sup>. 但Imamura et al<sup>[17]</sup>认为在临床肝移植中, 术前不可能知道是否有交通支, 并且用术中超声检查、螺旋CT<sup>[27]</sup>发现不论是在移植肝还是在残余肝上, 肝静脉引流中断相应的肝组织区, 只见到肝动脉分支供血, 而门静脉分支内血逆流, 说明门静脉分支已不是供血的管道, 而成为静脉回流的管道. 因此该区域的肝组织的血供明显减少, 影响肝组织功能的发挥. 所以应尽可能建立肝组织的静脉回流途径, 尤其是肝中静脉回流途径的建立<sup>[28]</sup>. 并根据肝静脉的不同类型, 选择不同方法的重建部分肝移植肝静脉回流<sup>[17]</sup>.

对A型肝静脉供体部分肝移植后, 主要是保证肝右静脉的回流, 吻合肝右静脉; 对B型除吻合肝右静脉外, 应将较粗大的肝短静脉与下腔静脉吻合; 对C型肝静脉的移植部分肝的静脉回流的处理较困难, 除吻合粗大的肝短静脉外, 已不可能让肝中静脉留在左半肝一侧, 可将肝右静脉和肝中静脉分别与下腔静脉吻合, 或将肝中静脉、肝右静脉成形后, 再与下腔静脉吻合, 还有一些办法供选择使用: 用人工血管架桥、用受体的血管如门静脉左支<sup>[29]</sup>、卵巢静脉、肝静脉、小隐静脉<sup>[28]</sup>重建静脉回流, 或放弃右叶部分肝移植手术<sup>[30]</sup>. 对A型、B型的肝静脉行右叶部分肝移植时, 尽可能将

肝中静脉留在左叶, 以引流IV段, 保证供者的安全. 但肝中静脉是一把“双刃剑”, 包括他的移植肝对受者有益, 对供者有害, 反之亦然<sup>[17, 28, 31]</sup>.

对A型肝静脉, 较适合作右半肝移植, 更适合作右后叶肝移植<sup>[32-33]</sup>; 对B型肝静脉, 也可以作右叶部分肝移植; 对C型肝静脉, 作右半肝移植时, 必须重建肝右静脉、肝中静脉的回流, 困难较大, 也不适合作右后叶肝移植. 扩大的肝右叶移植应用较少<sup>[12]</sup>, 此术式对供肝切除较多, 易伤肝左静脉, 从而给供者带来更多的危险, 同时需重建残余肝IV段的血流向肝左静脉的静脉回流.

对肝静脉重建后静脉的回流状态, 可用暂时性的阻断肝动脉或术中超声来检测. 估计有正常静脉回流的肝组织不能满足术后受者代谢需要时, 应重建移植肝淤血区域的静脉回流<sup>[34]</sup>. 如不重建淤血的肝段的静脉回流, 则淤血的肝组织缺血萎缩而丧失肝功能<sup>[35-36]</sup>.

## 4.2 右肝部分移植肝动脉的临床解剖及处理

4.2.1 右肝部分移植肝动脉的临床解剖 肝总动脉由腹腔动脉发出, 分出胃十二指肠动脉后, 形成肝固有动脉, 走行于门静脉的左前方, 在近肝门处分为肝左动脉、肝右动脉, 也可分出肝中动脉. 肝右动脉主干于门静脉右支前下方由肝固有动脉发出, 沿门静脉右支腹侧前下方进入肝实质, 并与门静脉右支一起被包在Glisson鞘内. 肝动脉变异多, 只有55%的人呈上述肝动脉的解剖<sup>[21]</sup>, 17%的人有来源于肠系膜上动脉的副肝右动脉, 12%的人肝右动脉来源于肠系膜上动脉, 2.5%的人肝固有动脉来源于肠系膜上动脉<sup>[16]</sup>, 更少见人的肝固有动脉来源于胃左动脉<sup>[37]</sup>或腹主动脉. 对肝动脉变异分类的意见不一致<sup>[21, 37-38]</sup>. Imamura et al<sup>[17]</sup>对肝动脉变异分为三类: 第一类, 有源于胃左动脉的变异的肝左动脉; 第二类, 有源于肠系膜上动脉的变异的肝右动脉; 第三类, 除了原来的肝左或肝右动脉外, 变异的肝左或肝右动脉仅作为副肝动脉.

4.2.2 右肝部分移植肝动脉处理 活体肝移植术前供者行CT, MRI或DSA来确定肝动脉是必需检查. 术中细心分离所有可能供应肝动脉的分支是获得足够长的肝动脉的关键<sup>[17]</sup>, 注意识别肝动脉的变异, 较常见的变异如向IV段供血的动脉源于肝右动脉<sup>[39]</sup>, 尤其要注意的是少见变异, 如肝左动脉发自肝总动脉<sup>[39]</sup>, 右副肝动脉发自肝左动脉<sup>[40]</sup>, 向肝右后叶供血的动脉支由肝总动脉发出, 以防因未能识别而误伤肝动脉或其分支, 危及供体安全或引起移植肝在动脉重建时的困难.

用显微外科技术对移植肝的动脉重建, 有利于提高动脉重建的成功率. 对移植肝由多支动脉供血的动脉重建的问题上存在明显分歧: Broelsch et al<sup>[41]</sup>把准备移植的部分肝由两支动脉供血作为活体肝移植的相对禁忌证. Michels<sup>[21]</sup>认为肝动脉在肝内的每个分支是分支之间无交通支的终末支, 是一个规律. 因此, Tanaka et al<sup>[42]</sup>建议重建移植肝的所有动脉分支血供, 但也有学者认为

尽管肝动脉造影不能显示肝动脉分支之间的交通支,在多数情况下,不必吻合供应移植肝动脉血的所有动脉分支<sup>[43]</sup>. Imamura et al<sup>[17]</sup>提出:在活体肝移植时用“四步法”来确定有足够的动脉血经肝门部交通支流进未经吻合的肝动脉分支.同时指出单根动脉支的吻合,不仅技术简单,而且减少了因多支吻合引起的吻合处的动脉血流量和流速的下降,继而引起动脉栓塞.

#### 4.3 右肝部分移植胆管的临床解剖及处理

4.3.1 右肝部分移植胆管的临床解剖 通常情况下,肝总管由较长的呈水平向左的肝管和较短的呈垂直向右的右肝管在肝门部汇合而成.右肝管由右前叶胆管和右后叶胆管在肝内部相对较固定处汇合而成.右前叶胆管引流右前叶的胆汁,右后叶胆管引流右后叶的胆汁.肝总管与胆囊管汇合而成胆总管,走行在门静脉的右前方.

十二指肠以上的胆管的血供由胆管周围的血管提供,大约有8根,每根直径0.3 mm左右.最连续的功能上最重要的是在胆总管两侧(3点和9点)的动脉.十二指肠上胆总管的60%的血供来自胰十二指肠后上动脉.38%的血供主要来自肝右动脉,2%的血供来自肝总动脉.胆总管、肝总管、左右肝管及肝内胆管周围都有小血管支组成的血管丛<sup>[40]</sup>.

胆管的变异也多, Blumgart et al<sup>[44]</sup>根据变异将胆管分为六型: A型,占57%,正常解剖结构胆管. B型,占12%,肝总管由右前胆管、右后胆管、左肝管三支汇合而成,缺乏右肝管主干. C型,占20%,无右肝管主干,由右肝一叶变异的胆管直接汇入肝总管. C1型,右前叶胆管汇入肝总管,占16%; C2型,右后叶胆管汇入肝总管,占4%. D型,占6%,无右肝管主干,由右肝一叶变异的胆管直接汇入左肝管. D1型,右后叶胆管汇入左肝管,占5%; D2型,右前叶胆管汇入左肝管,占1%. E型,占3%,无左、右肝管主干,肝左右叶的每侧由两个或两个以上的胆管支汇合成肝总管. E1型,由左侧两个以上的胆管支与右后叶胆管汇合后再与右前叶胆管支汇合成肝总管,占2%; E2型,由左侧两个以上的胆管支与右前叶胆管汇合后再与右后叶胆管支汇合成肝总管,占1%. F型,占2%,无右肝管主干,右后叶肝管直径汇入胆囊管.因胆管的变异多,所有右叶部分肝移植术后,供受体的胆管并发症很常见<sup>[45]</sup>.

#### 4.3.2 右肝部分移植胆管的处理

4.3.2.1 对不同的胆管分型方式各异 对A型和B型胆管,行劈离式肝移植、活体右半肝移植无特殊困难.对B型胆管,可行右后叶活体肝移植,对C型和D型可行右半肝移植、右后叶活体肝移植.但由于C型和D型中有较大的左肝管,较小的右前叶胆管和右后叶胆管,在行右半肝活体肝移植、扩大右半肝活体肝移植时需行移植肝上两个胆管开口的吻合<sup>[17]</sup>,行劈离式肝移植时可将肝总管留在右半肝一边,既有利于保护胆管周围血管丛的完整性,又有利于胆管引流的重建.在C型和

D型中,有21%的肝右后叶胆管汇入异常,其右后叶胆管较长,便于分离和吻合,有利于肝右后叶活体肝移植.对E胆管,行活体右半肝移植困难较大,很容易在肝切除时损伤左半肝胆管,但在E2型适合行右后叶活体肝移植,行劈离式肝移植时,将肝总管留给右半肝,左半肝的断面上至少有两个肝管的断端,需重建其胆汁引流.对F型,较适合行右后叶活体肝移植;若行右半肝活体肝移植、劈离肝移植时,右半肝移植也有两个胆管口需重建胆汁引流<sup>[16]</sup>,但有时会遇到被迫切断IV段汇入右肝管的胆管,若术中不作此胆管引流的重建,将可能导致胆漏,尽管此胆漏可以自愈,但以IV段萎缩为代价<sup>[16]</sup>;F型不适合作扩大右半肝活体肝移植.

肝门部胆管汇合处的胆管似乎是对缺血较敏感的结构<sup>[46]</sup>,在行右肝部分肝移植时,应在肝总管的右侧分离右肝动脉,以避免损伤左肝管的血供<sup>[12]</sup>.也应避免在右肝管的背部进行分离,以避免损伤向右肝管供血的血管<sup>[17]</sup>.尽可能少地对肝门进分离,既减少了对胆管血管丛的破坏,又减少对异常肝管的损伤<sup>[16]</sup>.

4.3.2.2 供体术前、术中识别胆管或其断端的方法 除了术前行MRCP等检查外,术中在开始切肝前及肝已切开2/3时,可胆管造影<sup>[17, 47]</sup>,为了准确定位移植肝断面的胆管断端,可用探针探胆管或用术中超声<sup>[46]</sup>.术中灌注蓝色染料能显示肝断面的胆漏<sup>[16]</sup>.

4.3.2.3 对右叶部分肝移植胆管引流的重建方法 右叶LDLT的胆管并发症高达15-64%<sup>[49]</sup>. Fan et al<sup>[49]</sup>分析74例患者行右叶LDLT术后引起胆管并发症的原因:(1)胆管缺血;(2)两支以上的肝门部胆管肠管的吻合;(3)术中未能发现右叶胆管支;(4)胆管空肠吻合口小于胆管口,(5)进行胆管成形后没有切开新产生的间隔.因此,高度重视胆管重建,尽可能避免上述原因.宜用显微外科技术行胆管端端吻合<sup>[50]</sup>,也可行胆管空肠吻合.一旦术后发生胆管的吻合口狭窄,不用行经皮经肝胆管引流,而再次手术行肝门部胆管吻合是一种值得推荐的方法<sup>[49]</sup>.

#### 4.4 右肝部分移植门静脉的临床解剖及处理

4.4.1 右肝部分移植门静脉的临床解剖 门静脉在肝门分为门静脉左右支,门静脉的右支较短,在尾状叶的前方经肝门板进入肝,分为右前支和右后支.右前支在垂直平面呈弧形向前,分为升支和降支,分别到VIII段、V段.右后支在水平面内弧形向后外侧走行,分为升支和降支,分别到VII段、VI段.

门静脉右支变异较多.其主要变异如下:(1)约10-15%的人门静脉主干直接分出三个分支,即门静脉左支、门静脉右前支、门静脉右后支.(2)偶然出现门静脉右前支起自门静脉左支主干.(3)门静脉右后支起自门静脉主干.在上述三种变异中,门静脉左支横部较短.(4)缺乏门静脉左支.门静脉主干在进入肝实质后分出肝右叶的分支后,再转向左侧,跨过脐裂,在肝实质内作为门静脉左支为左半肝供血<sup>[16]</sup>.

4.4.2 右肝部分移植门静脉的处理 总的来说,门静

脉的变异不对右肝部分肝移植的供肝切取产生大的影响<sup>[16-17]</sup>. 对第(4)种门静脉的变异, 不适合作右肝部分肝移植, 对(1)、(2)、(3)门静脉的变异门静脉支, 均适合作右半肝活体肝移植、右后叶活体肝移植及劈离式肝移植. 但门静脉在肝门处不能分离是右肝部分肝移植的绝对禁忌证<sup>[16]</sup>. 供肝切取时的一个关键因素是获得长的门静脉支<sup>[17]</sup>. 对(1)、(2)、(3)种变异, 行右半肝移植时遇到需要吻合移植肝门静脉分支的两个口. 对此有两种处理办法: (1)将两个门静脉分支口整形成一个开口与受体的门静脉吻合; (2)将供体的门静脉右前支、右后支分别与受体门静脉右支、左支吻合.

尽管右叶部分肝移植术后仍有胆漏、胆管狭窄、肝断面渗血及血管并发症等问题<sup>[51]</sup>, 这些并发症导致有功能的移植肝细胞减少, 严重导致肝功能的丧失. 长期的胆管、血管并发症明显增加患者的发病率和死亡率. 随着信息技术和计算机等新技术在医学领域的应用<sup>[52]</sup>, 对右叶部分肝移植相关血管、胆管解剖复杂性的深入理解, 肝移植过程中对其灵活运用, 右叶肝移植经验的积累, 外科手术技巧的提高, 肝胆外科和肝移植科医生有望对肝的解剖理解更深, 移植外科技术更精湛, 正确运用矛盾观处理临床肝移植面临的问题<sup>[53]</sup>, 从而进一步提高右叶肝移植的成功率, 减少并发症<sup>[16]</sup>. 可以预见在不久的将来, 有更多的成年患者, 受益于右叶部分肝移植, 尤其右叶活体肝移植<sup>[54-55]</sup>.

## 5 参考文献

- Sugawara Y, Makuuchi M. Technical advances in living-related liver transplantation. *J Hepatobil Pancreat Surg* 1999;6: 245-253
- Strong RW, Lynch SV, Ong TN, Matsunami H, Koido Y, Balderson GA. Successful liver transplantation from a living donor to her son. *N Engl J Med* 1990;322:1505-1507
- Hashikura Y, Kawasaki S, Terada M, Ikegami T, Nakazawa Y, Urata K, Chisuwa H, Mita A, Ohno Y, Miyagawa S. Long-term results of living-related donor liver graft transplantation: a single-center analysis of 110 transplants. *Transplantation* 2001;72:95-99
- Chen CL, Fan ST, Lee SG, Makuuchi M, Tanaka K. Living-donor liver transplantation: 12 years of experience in Asia. *Transplantation* 2003;75(3 Suppl):S6-S11
- 李国强, 王学浩. 活体肝移植临床研究的新进展. 中国普外基础与临床杂志 2002;9:279-290
- Haberal M, Emiroglu R, Karakayali H, Arslan G, Turan M, Bilgin N. Living-donor transplants: part of the answer to organ shortage. *Tranplant Proc* 2001;33:2619-2620
- 王学浩, 李国强. 活体肝移植的历史和现状. 实用临床医药杂志 2003;7:18-21
- 王学浩, 李国强. 再论活体肝移植. 中国普外基础与临床杂志 2003;10:318-320
- 王学浩, 李国强, 李相成, 张峰, 钱建民, 孔连宝, 张浩, 成峰, 孙倍成. 活体肝移植手术经验回顾. 中国实用外科杂志 2002;22:345-348
- Kiuchi T, Kasahara M, Uryuhara K, Inomata Y, Uemoto S, Asonuma K, Egawa H, Fujita S, Hayashi M, Tanaka K. Impact of graft size mismatching on graft prognosis in liver transplantation from living donors. *Transplantation* 1999;67:321-327
- Yamaoka Y, Washida M, Honda K, Tanaka K, Mori K, Shimahara Y, Okamoto S, Ueda M, Hayashi M, Tanaka A. Liver transplantation using a right lobe graft from a living related donor. *Transplantation* 1994;57:1127-1130
- Lo CM, Fan ST, Liu CL, Wei WI, Lo RJ, Lai CL, Chan JK, Ng IO, Fung A, Wong J. Adult-to-adult living donor liver transplantation using extended right lobe grafts. *Ann Surg* 1997; 226:261-269
- Fan ST, Yong BH, Lo CM, Liu CL, Wong J. Right lobe living donor liver transplantation with or without venovenous bypass. *Br J Surg* 2003;90:48-56
- Cheng YF, Chen CL, Huang JL, Chen TY, Lee TY, Chen YS, Wang CC, de Villa VD, Goto S, Chiang YC, Eng HL, Jawan B, Cheung HK. Single imaging modality evaluation of living donors in liver transplantation:magnetic resonance imaging. *Transplantation* 2001;72:1527-1533
- Takaysu K, Moriyama N, Muramatsu Y, Shima H, Goto H, Yamada T. Intrahepatic portal vein branches studied by percutaneous transhepatic portography. *Radiology* 1985;154:31-36
- Deshpande RR, Heaton ND, Rela M. Surgical anatomy of segmental liver transplantation. *Br J Surg* 2002;89:1078-1088
- Imamura H, Makuuchi M, Sakamoto Y, Sugawara Y, Sano K, Nakayama A, Kawasaki S, Takayama T. Anatomical keys and pitfalls in living donor liver transplantation. *J Hepatobil Pancreat Surg* 2000;7:380-394
- Nakamura S, Tsuzuki T. Surgical anatomy of the hepatic veins and the inferior vena cava. *Surg Gynecol Obstet* 1981; 152:43-50
- Delattre J, Avisse C, Flament JB. Anatomic basis of hepatic surgery. *Surg Clin North Am* 2000;80:345-362
- Ger R. Surgical anatomy of the liver. *Surg Clin North Am* 1989; 69:179-192
- Dodson TF. Surgical anatomy of hepatic transplantation. *Surg Clin North Am* 1993;73:645-659
- Marcos A. Right lobe living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2000;6(6 Suppl 2):S59-63
- Hribernik M, de Cecchis L, Trotosek B, Gadzijev EM, Ravnik D. Anatomical variations of the right hepatic veins and their relevance to surgery. *Hepatogastroenterology* 2003;50:656-660
- Straberg SM, Lowel JA, Howard TY. Reducing the shortage of donor livers:What would it take to reliably split livers for transplantation into two adult recipients?*Liver Transpl Surg* 1999;5:437-450
- De Cecchis L, Hribernik M, Ravnik D, Gadzijev EM. Anatomical variations in the pattern of the right hepatic veins: possibilities for type classification. *J Anat* 2000;197:487-493
- De Villa VH, Chen CL, Chen YS, Wang CC, Wang SH, Chiang YC, Cheng YF, Huang TL, Jawan B, Cheung HK. Outflow tract reconstruction in living donor liver transplantation. *Transplantation* 2000;70:1604-1608
- Murata S, Itai Y, Asato M, Kobasashi H, Nakajima K, Eguchi N, Saida Y, Kuramoto K, Tohno E. Effect of temporary occlusion of the hepatic vein on dual blood in the liver: Evaluation with spiral CT. *Radiology* 1995;197:351-356
- Fan ST, De Villa VH, Kiuchi T, Lee SG, Makuuchi M. Right anterior sector drainage in right-lobe live-donor liver transplantation. *Transplantation* 2003;75(3 Suppl):S25-S27
- Cattral MS, Greig PD, Muradali D, Grant D. Reconstruction of middle hepatic vein of a living-donor right lobe liver graft with recipient left portal vein. *Transplantation* 2001;71:1864-1866
- Marcos A, Ham JM, Fisher RA, Olzinski AT, Posner MP. Surgical management of anatomical variations of the right lobe in living donor liver transplantation. *Ann Surg* 2000;231:824-831
- Lo CM, Fan ST, Liu CL, Wong J. Hepatic venoplasty in living-donor liver transplantation using right lobe graft with middle hepatic vein. *Transplantation* 2003;75:358-360
- Leelaudomlipi S, Sugawara Y, Kaneko J, Matsui Y, Ohkubo T, Makuuchi M. Volumetric analysis of liver segments in 155 living donors. *Liver Transpl* 2002;8:612-614
- Sugawara Y, Makuuchi M, Takayama T, Imamura H, Kaneko J. Right lateral sector graft in adult living-related liver transplantation. *Transplantation* 2002;73:111-114
- Sano K, Makuuchi M, Miki K, Maema A, Sugawara Y, Imamura H, Matsunami H, Takayama T. Evaluation of he-

- patric venous congestion: proposed indication criteria for hepatic vein reconstruction. *Ann Surg* 2002 ;236:241-247
- 35 Cui D, Kiuchi T, Egawa H, Hayashi M, Sakamoto S, Ueda M, Kaihara S, Uemoto S, Inomata Y, Tanaka K. Microcirculatory changes in right lobe grafts in living-donor liver transplantation: a near-infrared spectrometry study. *Transplantation* 2001;72:291-295
- 36 Cheng YF, Chen CL, Haung TL, Lee TY, Chen TY, Chen YS, Liu PP, Chiang YC, Eng HL, Wang CC, Cheung HK, Jawan B, Goto S. Post-transplant changes of segment 4 after living related liver transplantation. *Clin Transplant* 1998;12:476-481
- 37 Saad S, Tanaka K, Inomata Y, Uemoto S, Ozaki N, Okajima H, Egawa H, Yamaoka Y. Portal vein reconstruction in pediatric liver transplantation from living donors. *Ann Surg* 1998;227:275-281
- 38 Hiatt JR, Gabbay J, Busuttil RW. Surgical anatomy of the hepatic arteries in 1000 cases. *Ann Surg* 1994;220:50-52
- 39 Stapleton GN, Hickman R, Terblanche J. Blood supply of the right and left hepatic ducts. *Br J Surg* 1998;85:202-207
- 40 Rela M, McCall JL, Karani J, Heaton ND. Accessory right hepatic artery arising from the left: implications for split liver transplantation. *Transplantation* 1998;66:792-794
- 41 Broelsch CE, Whittington PF, Emond JC, Heffron TG, Thistlethwaite JR, Stevens L, Piper J, Whittington SH, Lichton JL. Liver transplantation in children from living related donors. Surgical techniques and results. *Ann Surg* 1991;214:428-437
- 42 Tanaka K, Uemoto S, Tokunaga Y, Fujita S, Sano K, Nishizawa T, Sawada H, Shirahase I, Kim HJ, Yamaoka Y, Ozawa K. Surgical techniques and innovations in living-related liver transplantation. *Ann Surg* 1993;217:82-91
- 43 Ikegami T, Kawasaki S, Matsunami H, Hashikura Y, Nakazawa Y, Miyagawa S, Furuta S, Iwanaka T, Makuuchi M. Should all hepatic arterial branches be reconstructed in living-related liver transplantation? *Surgery* 1996;119:431-436
- 44 Blumgart LH, Hann LE. Surgery and radiologic anatomy of the liver and biliary tract. In: Blumgart LH, Fong Y, eds. *Surgery of the Liver and Biliary Tract*. 3-d ed. Beijing: Heath Science Asia, Elsevier Science, 2002:16-19
- 45 Testa G, Malago M, Valentin-Gamazo C, Lindell G, Broelsch CE. Biliary anastomosis in living related liver transplantation using the right liver lobe: techniques and complications. *Liver Transpl* 2000;6:710-714
- 46 Schlitt HJ, Meier PN, Nashan B, Oldhafer KJ, Boeker K, Flemming P, Raab R, Manns MP, Pichimay R. Reconstructive surgery for ischemic-type lesions at the bile duct bifurcation after liver transplantation. *Ann Surg* 1999;229:137-145
- 47 Kapoor V, Peterson MS, Baron RL, Patec S, Eghtesad B, Fung JJ. Intrahepatic biliary anatomy of living adult liver donors: correlation of mangafodipir trisodium-enhanced MR cholangiography and intraoperative cholangiography. *Am J Roentgenol* 2002;179:1281-1286
- 48 Harihara Y, Makuuchi M, Sakamoto Y, Sugawara Y, Inoue K, Hirata M, Kubota K, Takayama T, Kawarasaki H, Kawasaki S. A simple method to confirm patency of the graft bile duct during living-related partial liver transplantation. *Transplantation* 1997;64:534-537
- 49 Fan ST, Lo CM, Liu CL, Tso WK, Wong J. Biliary reconstruction and complications of right lobe live donor liver transplantation. *Ann Surg* 2002;236:676-683
- 50 Settmacher U, Steinmuller T, Schmidt S, Heise M, Pascher A, Theruvath T, Hintze R, Neuhaus P. Technique of bile duct reconstruction and management of biliary complications in right lobe living donor liver transplantation. *Clin Transplant* 2003;17:37-42
- 51 汤钊猷. 肝癌外科治疗的进展. *世界华人消化杂志* 2003;11:249-254
- 52 钟世镇, 原林, 黄文华. 数字化虚拟人体为临床解剖学开拓研究新领域. *中国临床解剖学杂志* 2002;20:3-4
- 53 刘静, 高毅, 孙尔维, 严金海, 钟世镇. 临床肝移植的矛盾观. *医学与哲学* 2003;24:46-49
- 54 Miller CM, Gondodesi GE, Florman S, Matsuramoto C, Munoz L, Yoshizumi T, Artis T, Fishbein TM, Sheiner PA, Kim-Schluger L, Schiano T, Shneider BL, Emre S, Schwartz ME. One hundred nine living-donor liver transplantations in adults and children: a single-center experience. *Ann Surg* 2001;234:301-309
- 55 Wiesner RH, Rakela J, Ishitani MB, Mulligan DC, Spivey JR, Steers JL, Krom RA. Recent advances in liver transplantation. *Mayo Clin Proc* 2003;78:197-210

## World Journal of Gastroenterology 点击和下载次数

《World Journal of Gastroenterology, WJG》从2003年第4-9期电子版, 实现了动态网页制做, 记录每篇论文的点击和下载次数. 4-9期共发表论文322篇, 其中265篇有点击和下载次数的记录, 占82.29%, 无点击和下载次数记录的为57篇(17.70%). 2003-04-15/2003-10-13, 265篇论文的点击次数为35745, 平均每篇论文点击次数为134.89, 最高点击次数为1918, 最低点击次数为11. 其中每篇论文点击次数100次以上为131篇(49.43%); 30-99次为123篇(46.41%); 11-29次为11篇(4.15%). 最高下载次数1087, 最低下载次数10. 例如, 2003年第8期刊出的第四军医大学唐都医院感染科王全楚等撰写的“RNA interference: Antiviral weapon and beyond. *World J Gastroenterol* 2003;9(8):1657-1661”一文的点击次数为1918, 下载次数为1087.

# 肝素酶: 抗肿瘤转移的新靶点

陈陵, 杨仕明, 房殿春, 王东旭

陈陵, 杨仕明, 房殿春, 王东旭, 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 重庆市高滩岩 400038  
国家自然科学基金资助项目, No. 30200123  
项目负责人: 杨仕明, 400038, 重庆市高滩岩, 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. shimingyang@yahoo.com  
电话: 023-68754678 传真: 023-68754124  
收稿日期: 2003-08-08 接受日期: 2003-09-18

## 摘要

肝素酶(hpa)是裂解硫酸乙酰肝素蛋白多糖的惟一酶类,能破坏细胞外基质及基底膜,并参与肿瘤血管生成,与肿瘤的侵袭转移密切相关.hpa也由此逐渐成为引人注目的抗肿瘤治疗新靶点,其抑制剂的研制可望为抗肿瘤治疗开辟新的途径.本文综述了hpa的结构与功能,对肿瘤转移的促进作用与机制,以及hpa抑制剂作为抗肿瘤新药的最新研究进展.

陈陵, 杨仕明, 房殿春, 王东旭. 肝素酶: 抗肿瘤转移的新靶点. 世界华人消化杂志 2004;12(2):439-442

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/439.asp>

## 0 引言

许多恶性肿瘤早期并无症状,但在发生转移后,病情将迅速进展,预后很差.而肿瘤的转移要求必须同时破坏构成细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的两种主要成分:结构蛋白和蛋白多糖.在过去的10多年中,研究兴趣大多集中在以结构蛋白为底物的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)上,但后来发现MMPs至少有17种<sup>[1]</sup>,所有MMPs合起来几乎能够降解所有的细胞外基质的结构蛋白成分,对其中一个酶的抑制会有代偿的途径进行弥补,这样以结构蛋白为底物的蛋白酶的抑制剂就很难在抗肿瘤转移中发挥很好的作用.而近年来发现的肝素酶(heparanase, hpa)是惟一能裂解ECM内蛋白多糖主要成分硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPG)的内源性糖苷内切酶.抑制hpa后可明显减少肿瘤细胞的扩散与转移<sup>[2-4]</sup>,故hpa作为抗肿瘤治疗新靶点具有很好的应用前景.

## 1 hpa的结构与功能

hpa基因位于染色体4q22,基因全长50 kb,内含14个外显子和13个内含子,转录两种mRNA,一种为5 kb大小的hpa-1a型,另一种为1.7 kb大小的hpa-1b型<sup>[5]</sup>.在免疫系统,如脾及外周血白细胞内,hpa基因主要转录前者;而在胎盘,血小板及W138/VA13细胞

系,则主要转录后者<sup>[6]</sup>.两种mRNA亚型均含有相同的开放读码框架,编码含有543个氨基酸(aa)的hpa蛋白前体,Mr 61 192.

hpa蛋白前体共有6个糖基化位点,经糖基化后形成65 kD的前hpa.其上有2个疏水区和1个亲水区.其亲水性最强点位于N端第160 aa附近,使这一区域易于暴露,便于被蛋白酶在N端Glu157-Lys158处水解.被切除的N端157 aa经加工后,形成74 aa(Gln36-Glu109)组成的8 kD片段,此片段再与被切除的C端386 aa(Lys158-Ile543)组成的50 kD的片段通过非共价连接,组成异二聚体,即成熟的hpa<sup>[4, 6-8]</sup>.

在正常情况下,hpa分布于胸腺、脾脏、淋巴结、骨髓、血小板、中性粒细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞等免疫组织及胎盘中,此外,胎肝中也有分布.以外周白细胞表达水平最高,其次为胎盘.除胎盘外的非免疫组织中未见或极少表达<sup>[4, 6, 9-12]</sup>.其生理功能有:(1)帮助胚泡附着于子宫内膜,促进胎盘的发育和功能形成过程.(2)在组织损伤或炎症时,hpa可降解基底膜HSPG,帮助免疫细胞渗出到无血管区,加快创面愈合,帮助组织修复<sup>[12]</sup>.

晚近,McKenzie et al<sup>[11]</sup>克隆了一种新的人类cDNA,即hpa-2,与hpa-1有很高的同源性.基因定位于10q23-24,能编码三种新的肝素酶蛋白(hpa-2a, b, c),分别含480, 534和592 aa.hpa-2分布于脑,乳腺,前列腺,小肠,睾丸与子宫.目前对其功能尚不清楚.该小组正准备在哺乳动物体内过度表达hpa-2来研究其功能,以确定hpa-2是否也象hpa-1一样,能够裂解HSPG.

## 2 hpa对肿瘤扩散及转移中的促进作用及其机制

已有大量实验证明了hpa对肿瘤扩散及转移的促进作用.研究人员对多种肿瘤(胃癌<sup>[13-14]</sup>,肝癌<sup>[15-16]</sup>,胰腺癌<sup>[17-19]</sup>,结肠癌<sup>[20]</sup>,乳腺癌<sup>[4, 6, 21]</sup>,卵巢癌<sup>[22]</sup>,血液系肿瘤<sup>[23]</sup>,前列腺癌<sup>[24]</sup>,膀胱癌<sup>[25-26]</sup>,淋巴瘤及黑色素瘤<sup>[27-28]</sup>,口腔鳞状细胞癌<sup>[29]</sup>,嗜铬细胞瘤<sup>[30]</sup>)采用RT-PCR或原位杂交技术检验肿瘤细胞内hpa mRNA表达水平,或用免疫组化荧光染色技术检验hpa蛋白含量,均发现恶性程度越高,转移潜能越大,生长速度越快的肿瘤细胞hpa的表达水平越高,而良性肿瘤则低水平表达,正常组织则不表达.进一步研究发现,通过载体对无转移潜能的小鼠淋巴瘤细胞系Eb和低转移潜能的黑色素瘤细胞系导入hpa cDNA并形成能够高水

平表达 hpa 的稳定克隆后, 这些肿瘤细胞获得了高转移潜能, 接种到裸鼠肝脏后, 转移能力及致死能力均明显升高<sup>[27-28]</sup>. 这表明低转移潜能的肿瘤细胞可通过导入 hpa cDNA 获得高转移潜能; 具有高转移潜能的肿瘤或细胞系应用 hpa 抑制剂后, 肿瘤细胞转移的数量和部位均明显减少<sup>[31-33]</sup>. 进一步证明了 hpa 具有促进肿瘤细胞转移的作用. 其机制有如下几点: (1) 促进血管生成: 新生血管的形成成为肿瘤的生长转移提供了必需的营养物质和通道. hpa 通过直接和间接两种方式发挥促血管生成作用<sup>[34]</sup>. 直接作用于内皮细胞以生芽方式促进血管生成;  $\beta$ -成纤维细胞生长因子( $\beta$ -fibroblast growth factor, bFGF)是目前认为极有活性的血管生成因子(angiogenesis factor)之一<sup>[4, 6, 35]</sup>, 同时也是强有力的有丝分裂促进因子. 以无活性形式与硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)结合贮存于 ECM 中. hpa 裂解 HSPG 时, bFGF 被释放出来, 诱发血管生成. 此外, 被固化在 HSPG 上无活性的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在 hpa 裂解 HSPG 的过程中也得到释放并被激活, 与 bFGF 共同诱导肿瘤血管生成<sup>[36]</sup>. (2) 破坏限制肿瘤生长转移的屏障 ECM 与 BM: 降解 HSPG, 与其他基质降解酶(如 MMPs、丝氨酸蛋白酶)协同破坏、降解 ECM 和 BM 屏障<sup>[27, 35]</sup>. 促进释放内皮下尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase type-plasminogen activator, u-PA)及组织型纤溶酶原激活物(tissue type-plasminogen activator, t-PA), 激活纤溶酶原, 活化 MMPs, 裂解 ECM、BM 中结构蛋白. t-PA 和 u-PA 还可通过活化表皮生长因子(epidermic growth factor, EGF), 激活细胞外基质中的蛋白质酶联反应, 使膜的屏障功能减退<sup>[37]</sup>. (3) 介导细胞黏附: 表达于细胞表面的 hpa 可介导细胞对 ECM 及 BM 的黏附, 引起细胞在基质中的扩散以及促进 BM 的重塑, 帮助肿瘤细胞侵入血管<sup>[38]</sup>. (4) 增加癌细胞迁移能力: hpa 裂解 HSPG 后产生的 HS 片段可激活 HS 的受体 CD44v3 (CD44 variant exon 3), 发出细胞内迁移信号, 促使细胞变形, 运动, 从而促进肿瘤细胞的扩散与转移<sup>[39]</sup>. (5) 抑制活化 T 淋巴细胞: hpa 降解 HSPG 后的产物可以抑制活化的 T 淋巴细胞的生物学功能, 从而引起免疫抑制<sup>[5, 36]</sup>, 使肿瘤转移更容易.

总之, hpa 通过降解 ECM 和 BM 中的 HSPG, 破坏限制肿瘤转移的屏障, 加强肿瘤细胞的运动能力, 释放促进细胞生长及血管生成的活性因子, 加快血管生成, 促进肿瘤生长和转移, 这是肿瘤进展的重要机制之一.

### 3 针对 hpa 的抗肿瘤治疗

由于 hpa 是目前发现惟一的一种能够降解 ECM 及 BM 中 HSPG 的酶类<sup>[4]</sup>, 而肿瘤的转移又必须突破此屏障, 并且 hpa 在裂解 HSPG 时还可通过多种途径促进肿瘤的生长、扩散与转移, 故针对 hpa 的抗肿瘤治疗意义重大. 目前发现的 hpa 抑制剂有如下几种:

3.1 hpa 类似物 hpa 的底物 HSPG 具有 2 个结构特点,

即含硫酸基团和糖链, 并带负电荷, 故凡具备上述特点的生物或化学物质均有可能与 HSPG 竞争结合 hpa, 阻止 hpa 作用于底物, 抑制其活性. (1) 硫酸化磷酸甘露戊糖(phosphomannopentaose sulfate, PI-88): PI-88 是含硫酸基的寡糖<sup>[32]</sup>, 从酵母菌发酵而来, 主要成分为甘露五糖和四糖, 2.3 kD, 由五个不同片段组成<sup>[40]</sup>. PI-88 能够将乳腺癌细胞 13762MAT 注入大鼠后形成的肺癌降低 90%, 还能将原发性肿瘤的血管供应降低 30%, 同时原发性肿瘤的生长速度降低一半<sup>[32]</sup>. 在体外实验中, PI-88 具有很好的抑制血管生成和抑制 hpa 活性的作用, 对高浸润性鼠乳腺癌 13762MAT 细胞抑制率达 50%, 腹股沟淋巴结转移率降低 40%, 肿瘤周围的血管生成减少达 30%<sup>[33]</sup>. 其副作用主要是可引起免疫介导的剂量限制性的血小板减少症<sup>[41]</sup>. PI-88 已经在志愿者中完成了一期临床试验, 目前, 已在进行多中心临床二期试验<sup>[32]</sup>, 很可能成为第一个应用于临床抗肿瘤治疗的 hpa 抑制剂. (2) 硫酸海带多糖或称昆布多糖(laminarin sulfate, LS): 是含硫酸基的多糖, 在体外实验中可以有效抑制 hpa 对 HSPG 的降解, 0.2-1 mg/L 即可抑制 50% 的活性. 给小鼠皮下注射 LS 后再静脉注入黑色素瘤细胞或乳腺癌细胞, 发现对肺扩散转移的抑制达 80-90%<sup>[31]</sup>. (3) 苏拉明同功异质体: 苏拉明(suramin)是一种多磺酸萘脲(polysulfonated naphthylurea), 其同功异质体 NF127, NF145, NF171 在体外实验中能有效地抑制从人高侵袭性黑色素瘤细胞(70W)提取并纯化的 hpa 活性, 可显著降低 70W 细胞的侵袭能力, 在动物体内则显著减少肿瘤内新生血管的形成. 在 20-30  $\mu\text{mol/L}$  时可抑制 hpa 50% 的活性, 在 100  $\mu\text{mol/L}$  或以上则可 100% 抑制 hpa 的活性<sup>[42]</sup>.

以上所提到的 LS, 苏拉明, 以及硫酸壳多糖(sulfated chitin)<sup>[43]</sup>, calcium spirulan (Ca-SP)<sup>[44]</sup>, 硫代磷酸寡脱氧核苷酸(phosphorothioate oligodeoxynucleotides, PS oligos) SdC28<sup>[31]</sup>等, 由于分子大小, 毒性, 多重生物学效应等各种原因, 在发现他们具有抑制 hpa 表达作用之后不久, 也被发现不适宜应用于临床.

3.2 hpa 反义寡脱氧核苷酸 最近, 国内学者张友磊 et al<sup>[45]</sup>报道 hpa 反义寡脱氧核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, AS-ODN)可与 hpa mRNA 互补结合, 使其不能翻译 hpa 蛋白, 从而抑制 hpa 的表达. AS-ODN 的各种浓度组在体外实验中对人乳腺癌 MDA435 细胞系 hpa mRNA 和蛋白的表达及细胞侵袭力均有明显抑制作用, 在终浓度为 0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、0.2  $\mu\text{mol/L}$  和 0.4  $\mu\text{mol/L}$  时对 MDA435 细胞的侵袭力抑制率分别为 34.0%、57.8% 和 79.7%. 其临床应用价值还有待进一步研究.

自从发现 hpa 在肿瘤转移中的作用来, 其作用机制, 基因序列测定及定位, 蛋白纯化, 单克隆抗体制备等问题逐渐被解决. 目前仍存在的问题是: (1) 检测 hpa 活性可预测肿瘤转移潜能, 判断肿瘤恶性程度<sup>[13, 15, 30]</sup>, 如联合检测端粒酶, 则可更精确地判断预后<sup>[46]</sup>, 但目

前 hpa 活性的检测方法繁琐, 应用于临床有待进一步努力. (2) hpa 与其他肿瘤转移因子或基因间有无联系及如何联系? (3) hpa 在生理及病理情况下表达的调控机制及其影响因素是什么? (4) hpa 除在高转移性肿瘤中有表达外, 在炎性细胞, 如白细胞中也有表达. hpa 在炎性细胞中的表达是否与炎细胞的迁移有关, 抑制炎细胞的 hpa 的表达是否有益于炎症的控制<sup>[8, 47-48]</sup>? (5) hpa 在增生的平滑肌细胞中每有表达. 有研究表明, 平滑肌细胞 hpa 的表达可能与冠心病冠状动脉扩张后再狭窄的发生有关<sup>[48-49]</sup>.

#### 4 参考文献

- Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999; 13:781-792
- Eccles SA. Heparanase: breaking down barriers in tumors. *Nat Med* 1999;5:735-736
- Finkel E. Potential target found for antimetastasis drugs. *Science* 1999;285:33-34
- Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Bitan M, Pappo O, Peretz T, Michal I, Spector L, Pecker I. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med* 1999;5:793-802
- Dong J, Kukuka AK, Toyoshima M, Nakajima M. Genomic organization and chromosome localization of the newly identified human heparanase gene. *Gene* 2000;253:171-178
- Hulett MD, Freeman C, Hamdorf BJ, Baker RT, Harris MJ, Parish CR. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat Med* 1999;5: 803-809
- Fairbanks MB, Mildner AM, Leone JW, Cavey GS, Mathews WR, Drong RF, Slightom JL, Bienkowski MJ, Smith CW, Bannow CA, Heinrichson RL. Processing of the human heparanase precursor and evidence that the active enzyme is a heterodimer. *J Biol Chem* 1999;274:29587-29590
- McKenzie E, Young K, Hircock M, Bennett J, Bhaman M, Felix R, Turner P, Stamps A, McMillan D, Saville G, Ng S, Mason S, Snell D, Schofield D, Gong H, Townsend R, Gallagher J, Page M, Parekh R, Stubberfield C. Biochemical characterization of the active heterodimer form of human heparanase (Hpa1) protein expressed in insect cells. *Biochem J* 2003;373(Pt 2): 423-435
- Dempsey LA, Brunn GJ, Platt JL. Heparanase, a potential regulator of cell-matrix interactions. *Trends Biochem Sic* 2000; 25:349-351
- Parish CR, Freeman C, Hulett MD. Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1471:M99-M108
- McKenzie E, Tyson K, Stamps A, Smith P, Turner P, Barry R, Hircock M, Patel S, Barry E, Stubberfield C, Terrett J, Page M. Cloning and expression profiling of Hpa2, a novel mammalian heparanase family member. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:1170-1177
- Bame KJ. Heparanases: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans. *Glycobiology* 2001;11:91R-98R
- Takaoka M, Naomoto Y, Ohkawa T, Uetsuka H, Shirakawa Y, Uno F, Fujiwara T, Gunduz M, Nagatsuka H, Nakajima M, Tanaka N, Haisa M. Heparanase expression correlates with invasion and poor prognosis in gastric cancers. *Lab Invest* 2003; 83:613-622
- Tang W, Nakamura Y, Tsujimoto M, Sato M, Wang X, Kurozumi K, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. Heparanase: a key enzyme in invasion and metastasis of gastric carcinoma. *Mod Pathol* 2002; 15: 593-598
- 刘颖斌, 陈晓鹏, 彭淑曈, 方河清, 吴育连, 彭承宏, 史留斌, 白明东, 许斌, 王建伟, 邓贵龙. 肝细胞性肝癌中乙酰肝素酶与 nm23-H1 的表达及其临床意义. *中华医学杂志* 2002;82:1553-1556
- El-Assal ON, Yamanoi A, Ono T, Kohno H, Nagasue N. The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1299-1305
- Koliopanos A, Friess H, Kleeff J, Shi X, Liao Q, Pecker I, Vlodavsky I, Zimmermann A, Buchler MW. Heparanase expression in primary and metastatic pancreatic cancer. *Cancer Res* 2001;61:4655-4659
- Rohloff J, Zinke J, Schoppmeyer K, Tannapfel A, Witzigmann H, Mossner J, Wittekind C, Caca K. Heparanase expression is a prognostic indicator for postoperative survival in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002;86:1270-1275
- Kim AW, Xu X, Hollinger EF, Gattuso P, Godellas CV, Prinz RA. Human heparanase-1 gene expression in pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2002;6:167-172
- Friedmann Y, Vlodavsky I, Aingorn H, Aviv A, Peretz T, Pecker I, Pappo O. Expression of heparanase in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa and stroma. Evidence for its role in colonic tumorigenesis. *Am J Pathol* 2000;157: 1167-1175
- Maxhimer JB, Quiros RM, Stewart R, Dowlatshahi K, Gattuso P, Fan M, Prinz RA, Xu X. Heparanase-1 expression is associated with the metastatic potential of breast cancer. *Surgery* 2002;132:326-333
- Ginath S, Menczer J, Friedmann Y, Aingorn H, Aviv A, Tajima K, Dantes A, Glezerman M, Vlodavsky I, Amsterdam A. Expression of heparanase, Mdm2, and erbB2 in ovarian cancer. *Int J Oncol* 2001;18:1133-1144
- Bitan M, Polliack A, Zecchina G, Nagler A, Friedmann Y, Nadav L, Deutsch V, Pecker I, Eldor A, Vlodavsky I, Katz BZ. Heparanase expression in human leukemias is restricted to acute myeloid leukemias. *Exp Hematol* 2002;30:34-41
- Kosir MA, Wang W, Zukowski KL, Tromp G, Barber J. Degradation of basement membrane by prostate tumor heparanase. *J Surg Res* 1999;81:42-47
- Gohji K, Okamoto M, Kitazawa S, Toyoshima M, Dong J, Katsuoka Y, Nakajima M. Heparanase protein and gene expression in bladder cancer. *J Urol* 2001;166:1286-1290
- Gohji K, Hirano H, Okamoto M, Kitazawa S, Toyoshima M, Dong J, Katsuoka Y, Nakajima M. Expression of three extracellular matrix degradative enzymes in bladder cancer. *Int J Cancer* 2001;95:295-301
- Pikas DS, Li JP, Vlodavsky I, Lindahl U. Substrate specificity of heparanases from human hepatoma and platelets. *J Biol Chem* 1998;273:18770-18777
- Vlodavsky I, Fuks Z, Bar-Ner M, Ariav Y, Schirmacher V. Lymphoma cell-mediated degradation of sulfated proteoglycans in the subendothelial extracellular matrix: relationship to tumor cell metastasis. *Cancer Res* 1983;43:2704-2711
- Kurokawa H, Katsube K, Podyma KA, Ikuta M, Iseki H, Nakajima M, Akashi T, Omura K, Takagi M, Yanagishita M. Heparanase and tumor invasion patterns in human oral squamous cell carcinoma xenografts. *Cancer Sci* 2003;94:277-285
- Quiros RM, Kim AW, Maxhimer J, Gattuso P, Xu X, Prinz RA. Differential heparanase-1 expression in malignant and benign pheochromocytomas. *J Surg Res* 2002;108:44-50
- Miao HQ, Elkin M, Aingorn E, Ishai-Michaeli R, Stein CA, Vlodavsky I. Inhibition of heparanase activity and tumor metastasis by laminarin sulfate and synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Int J Cancer* 1999; 83: 424-431
- Parish CR, Freeman C, Brown KJ, Francis DJ, Cowden WB. Identification of sulfated oligosaccharide-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel in vitro assays for angiogenesis and heparanase activity. *Cancer Res* 1999;59: 3433-3441
- Bentolila A, Vlodavsky I, Ishai-Michaeli R, Kovalchuk O, Haloun C, Domb AJ. Poly (N-acryl amino acids): a new class of biologically active polyanions. *J Med Chem* 2000;43:2591-2600
- Vlodavsky I, Elkin M, Pappo O, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-

- Michaeli R, Aviv A, Pecker I, Friedmann Y. Mammalian heparanase as mediator of tumor metastasis and angiogenesis. *Isr Med Assoc J* 2000;2(Suppl):37-45
- 35 Marchetti D, Li J, Shen R. Astrocytes contribute to the brain-metastatic specificity of melanoma cells by producing heparanase. *Cancer Res* 2000;60:4767-4770
- 36 Gohji K, Katsuoka Y, Okamoto M, Kamidono S, Kitazawa S, Toyoshima M, Dong J, Nakajima M. Human heparanase: roles in invasion and metastasis of cancer. *Hinyokika Kyo* 2000;46:757-762
- 37 Pillarisetti S, Paka L, Sasaki A, Vanni-reyes T, Yin B, Parthasarathy N, Wagner WD, Goldberg JJ. Endothelial cell heparanase modulation of lipoprotein lipase activity. Evidence that heparan sulfate oligosaccharide is an extracellular chaperone. *J Biol Chem* 1997;272:15753-15759
- 38 Goldshmidt O, Zcharia E, Cohen M, Aingorn H, Cohen I, Nadav L, Katz BZ, Geiger B, Vlodavsky I. Heparanase mediates cell adhesion independent of its enzymatic activity. *FASEB J* 2003;17:1015-1025
- 39 Kuniyasu H, Chihara Y, Kubozoe T, Takahashi T. Co-expression of CD44v3 and heparanase is correlated with metastasis of human colon cancer. *Int J Mol Med* 2002;10:333-337
- 40 Piccolo P, Iqbal O, Demir M, Ma Q, Gerbutavicius R, Fareed J. Global anticoagulant effects of a novel sulfated pentomanan oligosaccharide mixture. *Clin Appl Thromb Hemost* 2001;7:149-152
- 41 Rosenthal MA, Rischin D, McArthur G, Ribbons K, Chong B, Fareed J, Toner G, Green MD, Bassar RL. Treatment with the novel anti-angiogenic agent PI-88 is associated with immune-mediated thrombocytopenia. *Ann Oncol* 2002;13:770-776
- 42 Marchetti D, Reiland J, Erwin B, Roy M. Inhibition of heparanase activity and heparanase-induced angiogenesis by suramin analogues. *Int J Cancer* 2003;104:167-174
- 43 Saiki I, Murata J, Nakajima M, Tokura S, Azuma I. Inhibition by sulfated chitin derivatives of invasion through extracellular matrix and enzymatic degradation by metastatic melanoma cells. *Cancer Res* 1990;50:3631-3637
- 44 Mishima T, Murata J, Toyoshima M, Fujii H, Nakajima M, Hayashi T, Kato T, Saiki I. Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:541-550
- 45 张友磊, 傅志仁, 张军, 王元和, 沈茜. 乙酰肝素酶反义寡核苷酸对人乳腺癌细胞株 MDA435 侵袭力的抑制作用. *中华医学杂志* 2003;83:204-207
- 46 赵坡, 吕亚莉, 钟梅, 王殿军. 结肠直肠癌端粒酶、肝素酶表达升高与预后的关系. *癌症* 2001;20:624-627
- 47 Irony-Tur-Sinai M, Vlodavsky I, Ben-Sasson SA, Pinto F, Sicsic C, Brenner T. A synthetic heparin-mimicking polyanionic compound inhibits central nervous system inflammation. *J Neurosci* 2003;206:49-57
- 48 Benezra M, Ishai-Michaeli R, Ben-Sasson SA, Vlodavsky I. Structure-activity relationships of heparin-mimicking compounds in induction of bFGF release from extracellular matrix and inhibition of smooth muscle cell proliferation and heparanase activity. *J Cell Physiol* 2002;192:276-285
- 49 Francis DJ, Parish CR, McGarry M, Santiago FS, Lowe HC, Brown KJ, Bingley JA, Hayward IP, Cowden WB, Campbell JH, Campbell GR, Chesterman CN, Khachigian LM. Blockade of vascular smooth muscle cell proliferation and intimal thickening after balloon injury by the sulfated oligosaccharide PI-88: phosphomannopentaose sulfate directly binds FGF-2, blocks cellular signaling, and inhibits proliferation. *Circ Res* 2003;92:e70-e77

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

• 消息 •

## 2002年度各学科影响因子较高的医学3种期刊

学科	排名	期刊	影响因子
预防医学	1	中华传染病杂志	1.416
	2	中华结核和呼吸杂志	1.239
	3	营养学报	0.749
基础医学综合类	1	中华医院管理杂志	1.708
	2	中华医院感染学杂志	1.349
	3	中国危重病急救医学	0.845
药学	1	中国新药与临床杂志	0.537
	2	中国海洋药物	0.528
	3	药学学报	0.508
临床医学	1	WORLD J GASTROENTEROL	2.579
	2	世界华人消化杂志	1.926
	3	中华肝脏病杂志	1.858
中医中药学	1	骨与关节损伤杂志	0.720
	2	中国中西医结合急救杂志	0.533
	3	中草药	0.478
军事医学与特种医学	1	中国内镜杂志	0.992
	2	中华放射学杂志	0.975

# 肠道上皮特异性基因CDX2

宋艳, 李凌

宋艳, 李凌, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院病理科 北京市 100021  
项目负责人: 李凌, 100021, 北京市朝阳区潘家园南里 17 号, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院病理科. www-111222@163.com  
电话: 010-67781331-8498  
收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-10-12

## 摘要

同源异型框基因及相关蛋白是指在生物体中一个具有相对保守序列的基因及蛋白家族, 广泛存在于从酵母到哺乳动物的所有真核生物, 对生物的发育和细胞分化具有重要的调节作用. 本文主要从各个方面对肠道特异性表达的同源异型框转录因子 -CDX2(caudal-related homeodomain transcription 2) 做一简单概述.

宋艳, 李凌. 肠道上皮特异性基因 CDX2. 世界华人消化杂志 2004;12(2): 443-445  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/443.asp>

## 0 引言

在多细胞生物体的发生、发展过程中, 生物体的基因序列不仅需编码具有特异性结构与功能的蛋白, 还需编码决定位置信息的遗传因子, 这类基因决定着各个细胞和组织之间的相对位置并指导着数以万计的细胞沿着正常的轨道进行移动, 保证生物体正常结构形成<sup>[1]</sup>. 同源异型框基因及相关蛋白正是这样一类基因家族, 以核转录调节因子的形式调节生物结构及细胞分化, 在生物体的不断演化过程中, 决定着生物体正常结构并始终保持相对的保守性. 同源异型框基因首次在果蝇的保守序列中发现, 至今只有十几年的时间, 其蛋白以螺旋-环-螺旋的方式结合于 DNA 的相应区域, 发挥核转录因子的作用. 随着研究的深入, 在酵母菌、鼠及人类中相关基因及蛋白被相继确定<sup>[2]</sup>. 至今为止, 已发现的同源异型框基因及相关蛋白有数百种. 根据基因序列及染色体分布区域的异同, 同源异型框基因及相关蛋白可分为两大家族: HOX 及 PARAHOX 家族, 前者包括 HOX-A, HOX-B, HOX-C 及 HOX-D 四类, 后者包含 GSH, PDX 和 CDX(CDX1、CDX2、CDX4)<sup>[1]</sup>.

## 1 CDX2 的结构与功能

CDX2 基因及相关蛋白最早由 Mlodzik 于果蝇中分离成功, 与 parahox 家族呈高度的同源性<sup>[3]</sup>. 近年来人体的染色体研究表明, CDX2 基因全长 22-23 kb, 位于染色体的 13q12-13, 由 3 个外显子和 2 个内含子构成,

与之对应的 CDX2 蛋白包含 311 个单氨基酸, 通过螺旋-环-螺旋的方式结合于 DNA 的相应区域, 以转录因子的形式调节 DNA 的表达<sup>[4-5]</sup>.

CDX2 的存在是受精卵种植的必需条件之一. 正常小鼠中, 受精卵的滋养层可检测到大量 CDX2 的存在. 由于滋养层 CDX2 的缺失, CDX2 基因敲除的小鼠受精卵无法种植于子宫内膜<sup>[6]</sup>. 正常生物体发育过程中, CDX2 对消化道特别是结肠和小肠上皮的发育起着关键的作用. CDX2 基因敲除的小鼠, 消化道畸形发育且内胚层细胞无法发育成小肠或结肠上皮, 多发的息肉样病变及鳞状化生大量出现, 此类息肉样病变被覆不表达 CDX2 的立方状黏膜上皮或鳞状上皮<sup>[6]</sup>. 正常胃黏膜上皮中, CDX2 阴性表达, 在慢性萎缩性胃炎的胃黏膜上皮中, 随着杯状细胞等一系列肠道特异性细胞的出现, CDX2 的表达明显增强. 食管黏膜细胞的细胞系长期培养于酸性培养基中, CDX2 的表达增强, 细胞向肠黏膜上皮化生<sup>[7]</sup>. 反流性食管炎所致的 Barrett's 食管中, 食管的鳞状上皮被肠上皮所代替, CDX2 的表达亦呈明显增强趋势<sup>[8]</sup>. 另外, 人们在体外细胞系的研究中, 发现 CDX2 具有显著的诱导分化作用. 人为导入 CDX2 基因的未分化结肠癌细胞系中, 可以检测到细胞明显的分化现象, 如产生分化特异性标记物蔗糖异麦芽糖酶和乳糖酶<sup>[9]</sup>. 以上研究均表明 CDX2 具有诱导细胞向肠上皮分化的作用.

## 2 CDX2 的分布

在小鼠胚胎发育的早期, CDX2 基因可分布于各个胚层, 如前所述, 早期胚胎种植前, 细胞滋养层 CDX2 的表达对于受精卵的子宫种植起着关键的作用, CDX2 的缺失将导致胚胎无法种植于动物体子宫. 随后, CDX2 可表达于胎盘. 在发育早期的胚胎内部, CDX2 的表达最早出现于第 8.5 d (交配后), 广泛分布于内胚层、中胚层和外胚层、神经管等, 随着胚胎的发育, CDX2 的表达呈局限化趋势, 在第 12.5 d 时, 除神经管有少许的分布外, CDX2 主要局限于内胚层的肠黏膜. CDX2 在内胚层的表达在内胚层向小肠细胞转化时期(第 15 d)呈逐渐增强趋势, 在成年小鼠中, CDX2 表达于所有的小肠绒毛膜上皮细胞及结肠的腺体上皮细胞中, 并长期保持稳定的分布<sup>[10]</sup>. 人体各种上皮细胞的免疫组化研究中发现, 从胚胎发育的第 8 wk 开始, 胎儿的胃肠道即可检测出 CDX2 的表达. 在人体正常上皮细胞中, CDX2 可表达于内胚层来源的肠道上皮及

胰腺的导管和腺泡上皮,但CDX2在食管和正常胃黏膜上皮中不表达.除消化系统外,其他各系统正常上皮内未检测到CDX2<sup>[11]</sup>.

### 3 CDX2的分子生物学特征

CDX2的作用机制涉及同源分子间、细胞内外分子间相互作用的各个方面,如可促进LI-粘连蛋白及黏液蛋白基因MUC2的分泌,特异性提高增强子的表达等,下面选取代表性的作用因子作一简单概述.

**3.1 CDX2与CDX1** CDX2与CDX1同属CDX家族,在结构上具有高度的同源性,如与DNA结合的相应同源转化框蛋白片段,二者几乎完全一致,胃肠道上皮中,在发育的某些阶段(第8.5-12 wk)可同时检测到二者的存在.然而,CDX2与CDX1的分布及功能有许多不同之处.小鼠中,CDX1在胚胎发育的第8.5-12 wk可表达于多种组织如神经管、中胚层等,在第12 wk时,随着内胚层向肠道上皮的分化,CDX2的表达增强,与此同时,CDX1的表达明显减弱<sup>[10]</sup>.CDX1基因与生物体的神经系统发育密切相关,在CDX1基因敲除的小鼠中,可以观察到神经系统的发育畸形,消化道则无明显变化<sup>[12]</sup>.CDX2基因的表达可显著诱导未分化细胞向肠上皮分化,CDX1则无此作用<sup>[13]</sup>.Van den Akker et al<sup>[14]</sup>的研究表明,当CDX1表达降低或CDX2表达升高时,可明显促进结肠腺上皮细胞的分化.

**3.2 CDX2与LI-粘连蛋白** 肝肠特异性整合素(liver intestine-cadherin, LI-粘连蛋白),作为钙粘连蛋白家族的一员,与经典的钙粘连蛋白分子虽具有相同的作用机制,结构却不同.传统的钙粘连蛋白如E-钙粘连蛋白和N-钙粘连蛋白等,具有5段细胞外的氨基酸重复序列,每段由110个aa组成,细胞内的片段则由150-160个aa组成.LI-粘连蛋白的细胞外区域由7段氨基酸重复序列组成,细胞内的序列只有20个aa左右<sup>[15]</sup>.无论在小鼠或人体,LI-粘连蛋白均特异性表达于小肠及结肠的正常黏膜上皮细胞中,与CDX2的表达具有相当程度的一致性.在CDX2基因敲除的小鼠中,CDX2与LI-粘连蛋白在肠道多发的息肉样病变的表达均为阴性.分子生物学研究表明,CDX2可特异性作用于LI-粘连蛋白的5'端,与LI-粘连蛋白直接结合从而促进LI-粘连蛋白的表达.Hinoi et al<sup>[15]</sup>的研究表明,CDX2阳性表达的黏膜上皮中,80%可以检测到LI-粘连蛋白;CDX2阴性表达的黏膜上皮中,LI-粘连蛋白的表达基本为阴性,二者的表达显示高度的一致性.

**3.3 CDX2与MAPKs** 细胞的正常增生及分化,不仅需要细胞内自身内环境的调节,细胞间信号传导也具有重要的作用.P38分裂激活蛋白激酶(P38 mitogen-activated protein kinase, MAPKs),作为细胞间信号传导通路的作用途径之一,在细胞向小肠上皮的分化中,起着重要的调节作用.在细胞向肠道上皮的生长和分化过程中,MAPKs的表达显著,特异性的分布于小肠的绒毛上皮

细胞核中<sup>[16]</sup>.研究表明,MAPKs可以与CDX2的启动子序列特异性结合,调节其转录活性.MAPKs的抑制剂SB203580对细胞的生长无任何影响,但显著抑制CDX2的表达及细胞向肠黏膜上皮细胞分化,如明显减低特异性分化标记物如绒毛膜蛋白及乳糖等的合成<sup>[16]</sup>.

**3.4 CDX2与层粘连蛋白-1** 细胞外基质成分对于细胞的分化和生长起着重要的调节作用,在体外实验中,沿腺体和绒毛上皮广泛分布的层粘连蛋白-1可以显著刺激肠上皮的分化.Lorentz et al<sup>[17]</sup>通过特异性阻断内源性层粘连蛋白-1的作用,观察到层粘连蛋白-1与CDX2的表达呈高度一致性.当体外层粘连蛋白-1浓度升高时,CDX2的表达呈同步的升高趋势.但层粘连蛋白-1究竟以何途径作用于CDX2,有待于进一步的研究<sup>[17]</sup>.

**3.5 CDX2与增强子** 顺势作用元件在细胞DNA的转录中发挥着重要的调节作用.CDX2可以和DNA的部分区域特异性结合,从而调节DNA的转录活性.Taylor et al<sup>[10]</sup>研究表明,CDX2可以显著增强启动子的激活,不同的细胞系无显著差异,针对增强子的作用,CDX2则特异性作用于小肠相关细胞系,对其他细胞系影响较小.与强效增强蛋白VP16相比,CDX2具有明显的细胞系特异性,即在小肠表达中,增强子和启动子的变化呈现一致性,而在其他细胞系中,只观察到启动子的显著提高,增强子未见明显变化.以上研究表明,CDX2细胞具有特异性促进增强子表达的作用,与CDX2在肠道上皮分化中的重要作用相一致.

**3.6 CDX2与P13/PTEN** 在促进细胞分裂、细胞生长等一系列细胞信号传导通路中,P13K发挥着重要的作用.P13K可以催化第二信号分子PIP3的产生,从而起到促进细胞分化、增生及代谢的作用.PTEN作为P13K的拮抗剂,可将PIP3分解为无活性的PIP2,发挥负调节作用.PTEN位于10q23,此区域在乳腺癌及前列腺癌中经常缺失.Lynch et al<sup>[9]</sup>的研究表明,CDX2与PTEN在组织中的分布呈一致性,在人为降低PTEN的细胞系中,CDX2的表达明显下降.分子测序及蛋白电泳实验表明,PTEN可以显著提高CDX2基因启动子序列的表达活性.

**3.7 CDX2与MUC2** 杯状细胞作为肠黏膜上皮的特征性细胞之一,广泛分布于小肠和结肠黏膜上皮中.黏液蛋白基因MUC2特异性分布于杯状细胞中,含量非常丰富,Yamamoto et al<sup>[18]</sup>为了研究MUC2与CDX2的关系,将CDX2基因导入小肠上皮细胞系中,应用RT-PCR及EMSA的方法<sup>[18]</sup>,检测到CDX2可特异性结合于MUC2基因的启动子,显著提高MUC2的表达水平,从而为CDX2可特异性诱导肠黏膜上皮分化作了有力的说明.

**4 CDX2在上皮性肿瘤中的表达及病理鉴别诊断中的意义** 近年来,商用CDX2抗体大批量制备成功为CDX2免疫组化方面的应用提供了广阔的前景,2002年起,CDX2单克隆抗体首次由美国的Biogenex公司出售.在CDX2

与预后关系的研究中, Seno et al<sup>[19]</sup>发现 89% 的慢性萎缩性胃炎及 64% 的肠型胃癌中可检测到 CDX2 抗体的表达, 其他类型胃癌中 CDX2 不表达. 2003 年, Werling et al<sup>[11]</sup>研究了 476 例人体各部分不同肿瘤的 CDX2 抗体的表达情况, 研究表明, 食管、胃、十二指肠、结肠、胰腺、胆囊等消化道上皮肿瘤中均可不同程度检测到 CDX2 的表达, 其中结肠和十二指肠表达最强. 在胃肠道以外的其他肿瘤中, 卵巢和膀胱的黏液性上皮性肿瘤偶而可检测到 CDX2 阳性表达, 肺、乳腺、肾等各个器官的上皮性肿瘤中, 均无表达<sup>[11]</sup>. 与肠道特异性蛋白 Villin 相比, CDX2 具有更高的特异性.

与胞质特异性标记物比较, CDX2 有以下优点: (1) CDX2 的标记敏感性高, 特异性强, 阳性标记者基本阳性率在 90% 以上; (2) 定位于细胞核, 减少了内源性生物素的假阳性干扰. 作为胃肠道特异性标记物, Villin 与 CDX2 联合应用, 可以明确转移性腺癌的来源. 二者均为阴性时, 可以基本排除肿瘤胃肠道来源的可能性; 二者均为阳性时, 肿瘤可能起源于胃肠道的任何部位; 只有 CDX2 强阳性而 Villin 表达不明确时, 则可以基本认定肿瘤的结肠部位起源性<sup>[11]</sup>.

关于 CDX2 与肿瘤的分化程度的关系, 学者观点不一, 部分学者认为 CDX2 与肿瘤细胞的分化程度无关; 其他学者则认为随着细胞分化程度的降低, CDX2 的表达呈逐渐下降趋势, CDX2 与细胞分化程度呈正相关<sup>[20]</sup>. CDX2 与生存率的研究中, Seno 发现 40 例胃癌患者中, CDX2 阳性的胃腺癌患者生存率明显高于 CDX2 表达阴性的患者<sup>[19]</sup>. 作为迄今胃肠道特异性最高的基因及抗体, CDX2 的研究及应用必将会对胃肠道上皮的研究及肿瘤的鉴别发挥重要的作用.

## 5 参考文献

- Berk F. Homeobox genes in gut development. *Gut* 2002;51:450-454
- Banerjee-Basu S, Baxevanis AD. Molecular evolution of the homeodomain family of transcription factors. *Nucleic Acids Res* 2001;29:3258-3269
- Beck F, Chawengsaksophak K, Luckett J, Giblett S, Tucci J, Brown J, Poulson R, Jeffery R, Wright NA. A study of regional gut endoderm potency by analysis of *Cdx2* null mutant chimaeric mice. *Devel Biol* 2003;255:399-406
- James R, Erler T, Kazenwadel J. Structure of the murine homeobox gene *cdx-2*. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *J Biol Chem* 1994;269:15229-15237
- Drummond F, Putt W, Fox M, Edwards YH. Cloning and chromosome assignment of the human CDX2 gene. *Ann Hum Genet* 1997;61(Pt 5):393-400
- Beck F, Chawengsaksophak K, Waring P, Playford RJ, Furness JB. Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in *Cdx 2* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7318-7323
- Marchetti M, Caliot E, Pringault E. Chronic acid exposure leads to activation of the *cdx2* intestinal homeobox gene in a long-term culture of mouse esophageal keratinocytes. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 8):1429-1436
- Eda A, Osawa H, Satoh K, Yanaka I, Kihira K, Ishino Y, Mutoh H, Sugano K. Aberrant expression of CDX2 in Barrett's epithelium and inflammatory esophageal mucosa. *J Gastroenterol* 2003;38:14-22
- Lynch JP, Silberg DG. To differentiate or proliferate? The interaction between PI3K/P TEN and *Cdx2*. *Gastroenterology* 2002;123:1395-1397
- Taylor JK, Levy T, Suh ER, Traber PG. Activation of enhancer elements by the homeobox gene *Cdx2* is cell line specific. *Nucleic Acids Res* 1997;25:2293-2300
- Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, Gown AM. CDX2, a Highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: An immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2003;27:303-310
- Houle M, Prinos P, Iulianella A, Bouchard N, Lohnes D. Retinoic acid regulation of *Cdx1*: an indirect mechanism for retinoids and vertebral specification. *Mol Cell Biol* 2000;20:6579-6586
- Domon-Dell C, Freund JN. Stimulation of *Cdx1* by oncogenic beta-catenin/Tcf4 in colon cancer cells; opposite effect of the CDX2 homeoprotein. *FEBS Lett* 2002;518:83-87
- Van den Akker E, Forlani S, Chawengsaksophak K, de Graaff W, Beck F, Meyer BI, Deschamps J. *Cdx1* and *Cdx2* have overlapping functions in anteroposterior patterning and posterior axis elongation. *Development* 2002;129:2181-2193
- Hinoi T, Lucas PC, Kuick R, Hanash S, Cho KR, Fearon ER. CDX2 regulates liver intestine-cadherin expression in normal and malignant colon epithelium and intestinal metaplasia. *Gastroenterology* 2002;123:1565-1577
- Houde M, Laprise P, Jean D, Blais M, Asselin C, Rivard N. Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *J Biol Chem* 2001;276:21885-21894
- Lorentz O, Duluc I, Arcangelis A, Simon-Assmann P, Kedinger M, Freund JN. Key role of the CDX2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J Cell Biol* 1997;139:1553-1565
- Yamamoto H, Bai YQ, Yuasa Y. Homeodomain protein CDX2 regulates goblet-specific MUC2 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:813-818
- Seno H, Oshima M, Taniguchi MA, Usami K, Ishikawa TO, Chiba T, Taketo MM. CDX2 expression in the stomach with intestinal metaplasia and intestinal-type cancer: Prognostic implications. *Int J Oncol* 2002;21:769-774
- Hinoi T, Tani M, Lucas PC, Caca K, Dunn RL, Macri E, Loda M, Appelman HD, Cho KR, Fearon ER. Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. *Am J Pathol* 2001;159:2239-2248

# 细胞凋亡与肝移植免疫耐受

刘静, 汪爽, 高毅, 孙尔维

刘静, 汪爽, 高毅, 孙尔维, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院移植科 广东省广州市 510282  
国家自然科学基金资助, No. 39970705  
项目负责人: 孙尔维, 510282, 广东省广州市工业大道 253 号, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院移植科. ewsun@263.net  
电话: 020-61643402 传真: 020-6164778  
收稿日期: 2002-03-05 接受日期: 2002-09-12

## 摘要

终末期肝病的发病率很高, 在亚洲尤其突出, 肝移植是其治疗的有效手段. 如何诱导肝移植免疫耐受是免疫学工作者及临床医师遇到的免疫学理论和临床现实问题. 细胞凋亡是近 10 a 来研究的热点问题. 本文主要介绍细胞凋亡的概念, 形态学的改变, 检测方法, 肝移植免疫耐受的特殊性, 细胞凋亡与肝移植免疫耐受、排斥反应的关系等研究现状. 强调了 T 细胞凋亡诱导肝移植免疫耐受.

刘静, 汪爽, 高毅, 孙尔维. 细胞凋亡与肝移植免疫耐受. 世界华人消化杂志 2004;12(2):446-449

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/446.asp>

## 0 引言

细胞凋亡是细胞和组织的生理学基础, 是细胞在生理状态下特征性死亡形式, 在移植免疫中发挥极其重要的作用. 细胞凋亡与肝移植排斥及免疫耐受之间关系密切, 深入研究细胞凋亡与肝移植免疫的作用机制, 将对解决肝移植的免疫理论问题, 提高肝移植长期存活率具有重大的理论和实际意义.

## 1 细胞凋亡

细胞凋亡(apoptosis), 是由多基因控制的细胞自主性死亡方式. 1972年英国的Kerr首先提出凋亡的概念<sup>[1]</sup>. 细胞凋亡与调控机体发育, 维护内环境稳定、肿瘤、病毒感染、免疫密切相关. 有文献称细胞凋亡又叫程序化细胞死亡(programmed cell death, PCD). 实际上二者并不完全相同, 前者主要是形态学概念, 而后者强调的是功能性概念.

1.1 细胞凋亡形态学改变 细胞凋亡的形态变化与坏死截然不同, 主要表现在: (1)细胞核内染色质浓缩形成不均一点状结构; (2)细胞膜微绒毛及细胞间连接复合体消失; (3)内质网、高尔基体及核膜膨大形成泡状结构与细胞膜融合; (4)可见典型的凋亡小体: 他由细胞膜包被结构尚完整的细胞器(线粒体等)及核碎片形成, 并很快被邻近细胞吞噬<sup>[2]</sup>. 以上变化可通过染色, 在光镜、荧光显微镜及电镜下观察到, 其中电镜是定性检测细胞凋

亡的可靠手段之一. 但形态学观察方法均很难准确鉴定和量化凋亡的发生情况.

1.2 生物化学特征 (1)凋亡的细胞内  $Ca^{2+}$  浓度增高. (2)  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  依赖性内源性核酸内切酶活化引起的 DNA 降解, 这是细胞凋亡的显著特征, 是确证细胞凋亡的重要依据.

1.3 检测方法 目前细胞凋亡的常用检测方法有: (1)形态学方法如光镜、电镜; (2)电泳法. (3)免疫学方法. (4)分子生物学方法如: 原位缺口翻译法(ISNT)、脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记技术(TUNEL)、流式细胞术(FCM)等. 以上方法均为细胞凋亡的研究提供了良好工具<sup>[3]</sup>.

1.4 细胞凋亡的基因调控 随着现代免疫学及分子生物学技术的不断发展, 细胞凋亡的基因调控研究逐渐深入. 近期研究表明: 许多信号途径参与细胞凋亡的调节, 其中死亡受体途径中的 Fas/FasL 信号途径占据重要地位. Fas 属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)和神经生长因子受体(NGFR)超家族, 按人白细胞分化抗原分类又称 CD95, 与 APO-1 抗原为同种蛋白质. Fas 抗原的天然配体 FasL 属于 TNF 家族成员<sup>[4]</sup>. Itoh et al<sup>[5]</sup> 研究证实: Fas 是由 325 个氨基酸(aa)组成的  $M_r$  45 000 的 I 型膜蛋白, 其膜内区有一段 aa 序列与 TNFR 膜内区高度同源, 具有传导“死亡信号”的作用, 称为死亡结构域. FasL 是  $M_r$  40 000 的 II 型膜蛋白, 其胞外区约有 150 aa 与 TNF 家族成员同源. Fas 蛋白表达于心脏、肝脏、肺脏、睾丸等多种组织中; 另外, 激活的成熟淋巴细胞以及感染的淋巴细胞 Fas 表达增高, 人体部分肿瘤细胞也有 Fas 表达<sup>[6]</sup>. 最初认为 FasL 仅表达在活化的 T 细胞上, 且 Th1 克隆的表达高于 Th2 克隆. FasL 及其可溶形式 sFasL 均可与 Fas 阳性靶细胞结合, 通过一系列级联反应, 最终导致 Fas 阳性靶细胞凋亡. sFas 与 FasL 虽然有很高的亲和力, 可同膜型 Fas 竞争结合 FasL, 但不引起凋亡, 起到间接抑制凋亡的作用; sFas 和 sFasL 的作用也可能是体内细胞凋亡的一种调节方式<sup>[7]</sup>.

除 Fas 家族外, 细胞凋亡还受 Bcl-2 家族、c-myc 家族、p53、白介素 1 $\beta$  转换酶(ICE)等多种凋亡相关基因的调控. 在 Bcl-2 家族中, Bcl-2 及 Bcl-xl 抑制细胞凋亡, 而 Bax 和 Bad 可促进细胞凋亡, 并发现 Fas 系统诱导细胞凋亡与 Bcl-2 的低表达相偶联; c-myc 癌基因的表达既能促进细胞的增生, 也能诱导细胞凋亡; p53 是一种抑癌基因, 可通过抑制 Bcl-2 转录促进 Bax 转录发挥促细胞凋亡作用; ICE 可激活白介素 1 $\beta$  导致细胞凋

亡, 其作用可受 Bcl-2 基因的控制. 另外, 干扰素 (IFN)、白介素 (IL)、肿瘤坏死因子 (TNF) 等细胞因子也参与细胞凋亡的调控<sup>[8]</sup>.

## 2 肝移植免疫耐受

肝脏是移植免疫中的特殊器官, 具有“肝免疫耐受性”, 肝移植排斥反应的发生率及程度较其他器官移植低<sup>[9]</sup>. 在部分大鼠<sup>[10]</sup>和猪<sup>[11]</sup>及许多小鼠<sup>[12]</sup>的肝移植模型中, 在不用任何免疫抑制剂的情况下也能够成功诱导供者特异性耐受. 在狗、狒狒和人的肝移植中排斥反应较易控制. 肝移植还可以用来保护其他器官移植, 如肾移植、心脏移植, 显著延长移植物的存活时间<sup>[13]</sup>. 但肝脏与角膜和睾丸的免疫赦免性不同, 肝移植排斥反应较常见. 肝仅为“免疫特惠”器官. 肝移植的免疫耐受具有其独特性, 为外周的分离耐受<sup>[14]</sup>. 肝移植免疫耐受的形成可能与肝脏的组织解剖学特点<sup>[15]</sup>、可溶性 MHC I 类抗原<sup>[16-17]</sup>及细胞因子<sup>[18-19]</sup>的作用、嵌合状态的形成<sup>[20-21]</sup>、肝脏未成熟树突状细胞与枯否氏细胞的作用<sup>[22-23]</sup>、调节性 T 细胞的作用<sup>[24-25]</sup>及细胞凋亡等相关.

## 3 凋亡细胞与肝脏免疫耐受

3.1 免疫耐受中存在细胞凋亡 1996 年 Griffith et al<sup>[26]</sup> 研究向眼前房注射抗原后细胞死亡与免疫耐受诱导的关系, 指出在赦免器官的免疫耐受中 CD95 介导了淋巴细胞的凋亡; 免疫赦免不是一个被动过程, 而是导致细胞死亡和免疫耐受的主动过程. 不仅在免疫耐受中细胞凋亡存在, 而且, Qian et al<sup>[27]</sup> 发现用 MHC 不相配小鼠行肝移植, 受鼠自然的接受移植肝, 注射 IL-2 诱导排斥反应后, 毒性 T 细胞的凋亡减少, 而毒性 T 细胞的活力提高, 认为: T 细胞的删除, 导致肝的自然不被排斥; 作用于移植物的毒性 T 细胞的凋亡是引起小鼠肝移植分离免疫耐受的基本机制. Meyer et al<sup>[28]</sup> 用大鼠和小鼠进行肝和小肠移植后认为: 细胞凋亡既在排斥反应中出现, 又在免疫耐受中出现; T 淋巴细胞的激活与移植物质细胞的凋亡有关, T 细胞的失活似乎导致毒性 T 细胞的凋亡和特殊的免疫耐受; 细胞凋亡可以作为调节免疫的一个仪器.

Fas/FasL 途径是细胞凋亡的重要调节方式. Famularo et al<sup>[29]</sup> 报道 Fas/FasL 的相互作用是克隆删除、免疫耐受、赦免、在免疫反应中 T 细胞增生的控制、毒性 T 细胞的杀伤一个主要机制, 确信通过调节 Fas/FasL 的表达必将适合治疗与此有关的免疫参与的疾病. Tagawa et al<sup>[30]</sup> 报道由 Fas 导致肝细胞凋亡引起 ConA- 肝炎模型中, IFN- $\gamma$  起中心作用. Solary et al<sup>[31]</sup> 研究肿瘤与细胞凋亡的关系时, 报道 FasL 的表达数量决定肿瘤细胞是被机体清除还是耐受. 低剂量的细胞毒性药物增加肿瘤细胞 Fas 表达, 从而改善了通过免疫细胞清除肿瘤细胞. Li et al<sup>[32]</sup> 报道 Fas 对同种移植物的耐受不是必不可少的. 在 IL-2 依赖性的同种移植免疫耐受机制中, Fas 介导的细胞

凋亡不是中心环节. Li et al<sup>[33]</sup> 报道通过 FasL 基因转染的肝移植, 观察大鼠的生存期明显延长, 认为 FasL 表达的移植肝被受者免疫系统所保护. 国内外学者普遍认为角膜 FasL 的表达对于维持角膜免疫赦免具有非常重要的作用<sup>[34]</sup>, 其可能机制为: Fas 与 FasL 相互作用引起 T 淋巴细胞凋亡, 降低免疫排斥反应发生率.

3.2 T 细胞的凋亡导致免疫耐受 Bohmig et al<sup>[35]</sup> 用一种短链脂肪酸下调了抗原提呈细胞 (APC) 的共刺激分子的表达, 使 T 细胞不能活化, 导致 T 细胞凋亡. Pender et al<sup>[36]</sup> 提出: 在靶器官中对自身的和对同种反应的 T 细胞活化诱导细胞凋亡是免疫耐受的主要发生机制, 进一步分析指出: 已活化的自身反应 T 细胞当进入靶器官时, 主要由非专职 APC 使之再活化, 在产生明显的靶器官损害之前通过 Fas (CD95) 途径由活化诱导凋亡而被删除, 这是因为与 Bcl-2 相关的抗凋亡蛋白通过抑制 CD95 途径引起细胞凋亡, 再活化的 T 细胞不能从抗凋亡蛋白的表达已上调的非专职 APC 获得足够的共刺激分子. 而在周围淋巴器官, 情况相反, T 细胞由专职 APC 再活化, 产生足够的共刺激分子, 导致抑制经 CD95 途径引起凋亡的与 Bcl-2 相关的蛋白表达上调, 从而允许 T 细胞以记忆 T 细胞存活、增值. 他用活化导致针对同种移植 T 细胞的凋亡来解释同种移植物的自然不被排斥, 也用以解释 MHC 不相符合的肝移植不发生排斥.

以上观点虽然能较好地解释器官移植的免疫耐受, 但不能解释皮肤、心脏、肾脏移植的耐受不如肝移植容易诱导和肝移植的特殊性. Crispe et al<sup>[37]</sup> 认为肝脏是细胞死亡的“坟墓”, 即肝脏是清除活化、凋亡 T 细胞的场所, 凋亡细胞在肝内的聚集是一主动过程, 肝脏的血窦内皮细胞 (LSEC)、枯否氏细胞 (KCs) 和肝细胞均能够诱导细胞凋亡. Lu et al<sup>[38]</sup> 发现移植肝内可迁徙的 DC 能表达 FasL, 从而诱导同种异体反应的活化 T 细胞的凋亡. Weller et al<sup>[39]</sup> 发现肝脏分泌的转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 可以诱导 T 细胞凋亡, 可能也参与了调节 T 细胞的反应. 这些有助与解释肝移植免疫耐受的特殊性, 如“分离免疫耐受”.

近年研究表明 APC 的抗原提呈能力不是一成不变的, 而是与 APC 的成熟程度和受刺激状况密切相关<sup>[40]</sup>. 在炎症因子作用下, APC 的 MHC II 合成增加、半衰期延长、结合抗原能力增强, 同时提供共刺激信号的能力大大加强<sup>[41-42]</sup>. 而在 IL-10 的作用下, APC 共刺激信号弱表达并能诱导免疫耐受<sup>[43]</sup>. 这表明细胞因子在调节 APC 的抗原提呈能力及免疫反应方向等方面起着至关重要的作用.

在同种异体移植时给予供体凋亡细胞, 受体的 APC 在一些特异性的凋亡细胞的识别和结合受体如 CD36、CD14、 $\alpha v \beta 3$  等的协助下迅速吞噬凋亡细胞, 以免细胞破裂损伤周围组织<sup>[44-46]</sup>. 我们推测凋亡细胞由于能快速被 APC 吞噬, 凋亡细胞上的抗原将被浓集在 APC 内, 因而能够短时提供大量供者抗原, 有效地被提呈; 而凋

亡细胞通过其主动的调节免疫反应的作用,使APC调节细胞因子由TH1型(如:IL-12、TNF- $\alpha$ )向TH2型(如:IL-10)转化,并形成局部的高浓度.凋亡细胞造成局部的免疫抑制环境,使受体APC共刺激信号表达被抑制,抑制了T细胞的激活,使相应的T细胞克隆灭能,从而诱发供体特异性的免疫耐受<sup>[47-48]</sup>.T细胞凋亡引起移植物免疫耐受的观点已得到多数学者的赞同.

最近Sun et al<sup>[48]</sup>提出了一个新观点:肝脏是特异性地吞噬凋亡细胞的场所,凋亡细胞有局部免疫抑制作用,吞噬了凋亡细胞的肝脏抗原提呈细胞在局部免疫抑制的环境下提呈抗原给T细胞,而诱导了对被吞噬抗原的免疫耐受.以上观点能较好地解释肝移植免疫耐受的特殊性,值得引起重视.

#### 4 细胞凋亡与排斥反应

Krams et al<sup>[49]</sup>用大鼠肝移植模型,检测肝酶、单核细胞肝脏浸润、肝脏病理、细胞凋亡变化后,1995年首次提出在肝移植排斥反应中,细胞凋亡可以是细胞坏死机制之一,证实了以前描述的细胞因子在细胞凋亡中的作用在器官移植的排斥反应和免疫相关性疾病中,细胞凋亡普遍存在<sup>[29, 50-53]</sup>,排斥反应时,器官组织的实质细胞发生凋亡.

#### 5 细胞凋亡在肝移植免疫中的临床意义

在同种器官移植免疫中,细胞凋亡发挥双刃剑作用.当宿主T细胞凋亡,可诱导免疫耐受;另一方面,免疫排斥反应发生时,移植物细胞发生凋亡.所以可从两方面着手为移植排斥反应防治提供新的策略:(1)预防移植物细胞凋亡,减少移植物损伤;(2)促进受体反应性T淋巴细胞凋亡,维持免疫赦免、诱导移植耐受.

在同种器官移植中某些高表达FasL的器官(如:角膜、睾丸)易于诱导免疫耐受,而其他一些器官则不易诱导耐受.这一现象已引起各国学者注意,并着手通过基因工程技术使某一器官特异表达FasL,诱导免疫耐受<sup>[54]</sup>.最近研究表明,临床上部分新型药物可通过细胞凋亡途径发挥免疫抑制作用.Bcl-xl能阻止Fas介导的凋亡,而FK506可通过下调Bcl-xl的表达明显增强T淋巴细胞的凋亡,并可增强AICD的作用,清除活化的T淋巴细胞,发挥免疫抑制效能<sup>[55]</sup>.Migita et al<sup>[56]</sup>通过体外实验观察CsA和FK506对SEB诱导的活化T细胞的凋亡情况,结果表明,FK506可下调Bcl-xl的表达,促进T淋巴细胞的凋亡,而CsA则不能.CsA可通过调节Bcl-2基因的表达,使细胞毒T淋巴细胞发生凋亡,从而防治移植抗原引发的排斥反应<sup>[57]</sup>.

总之,细胞凋亡在参与肝移植免疫耐受及移植排斥反应中具有重要意义.对该领域的不断深入研究,在器官移植,尤其是肝移植排斥反应的防治、免疫耐受的诱导等方面前景广阔.

#### 6 参考文献

- 1 龚非力. 医学免疫学. 第1版. 北京: 科学出版社, 2000:258-272
- 2 Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis, its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73:2013-2026
- 3 Gavriely Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501
- 4 Suda T, Nagata S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J Exp Med* 1994;179:873-879
- 5 Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991;66:233-243
- 6 Behrmann I, Walczak H, Krammer PH. Structure of the human APO-1 gene. *Eur J Immunol* 1994;24:3057-3062
- 7 Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med* 1996;2:574-577
- 8 Itoh N, Tsujimoto Y, Nagata S. Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J Immunol* 1993;151:621-627
- 9 Calne RY. Immunological tolerance--the liver effect. *Immunol Rev* 2000;174:280-282
- 10 Gugenheim J, Samuel D, Reynes M, Bismuth H. Liver transplantation across ABO blood group barriers. *Lancet* 1990;336:519-523
- 11 Calne RY, Sells RA, Pena JR, Davis DR, Millard PR, Herbertson BM, Binns RM, Davies DA. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 1969;223:472-476
- 12 Qian S, Demetris AJ, Murase N, Rao AS, Fung JJ, Starzl TE. Murine liver allograft transplantation: Tolerance and donor cell chimerism. *Hepatology* 1994;19:916-924
- 13 Rasmussen A, Davies HF, Jamieson NV, Evans DB, Calne RY. Combined transplantation of liver and kidney from the same donor protects the kidney from rejection and improves kidney graft survival. *Transplantation* 1995;59:919-921
- 14 Qian S, Lu L, Li Y, Fu F, Li W, Starzl TE, Thomson AW, Fung JJ. Apoptosis of graft-infiltrating cytotoxic T cells: a mechanism underlying "split tolerance" in mouse liver transplantation. *Transplant Proc* 1997;29:1168-1169
- 15 Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 2000;174:21-34
- 16 Davies HS, Pollard SG, Calne RY. Soluble HLA antigens in the circulation of liver graft recipients. *Transplantation* 1989;47:524-527
- 17 Qian S, Fu F, Li Y, Lu L, Rao AS, Starzl TE, Thomson AW, Fung JJ. Impact of donor MHC class I or class II antigen deficiency on first and second-set rejection of mouse heart or liver allografts. *Immunology* 1996;88:124-129
- 18 Thai NL, Fu F, Qian S, Sun H, Gao L, Wang SC, Demetris AJ, Woo J, Thomson AW, Duquesnoy RJ, Fung JJ. Cytokine mRNA profiles in murine orthotopic liver transplantation: Graft rejection is associated with augmented Th1 function. *Transplantation* 1995;59:274-281
- 19 Thai NL, Li Y, Fu F, Qian S, Demetris AJ, Duquesnoy RJ, Fung JJ. Interleukin-2 and interleukin-12 mediate distinct effector mechanisms of liver allograft rejection. *Liver Transplant Surg* 1997;3:118-129
- 20 Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Ildstad S, Ricordi C, Trucco M. Cell migration, chimerism and graft acceptance. *Lancet* 1992;339:1579-1582
- 21 Meyer D, Loffler S, Otto C, Czup S, Gassel HJ, Timmermann W, Thiede A, Ulrichs K. Donor-derived alloantigen-presenting cells persist in the liver allograft during tolerance induction. *Transpl Int* 2000;13:12-20
- 22 Thomson AW, Drakes ML, Zahorchak AF, O'Connell PJ, Steptoe RJ, Qian S, Lu L. Hepatic dendritic cells: immunobiology and role in liver transplantation. *J Leukoc Biol* 1999;66:322-330
- 23 Khanna A, Morelli AE, Zhong C, Takayama T, Lu L, Thomson AW. Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol* 2000;164:1346-1354
- 24 Zhai Y, Kupiec-Weglinski JW. What is the role of regulatory T cells in transplantation tolerance? *Cur Opin Immunol* 1999;11:

- 497-503
- 25 Knoop M, Pratt JR, Hutchinson IV. Evidence of alloreactive T suppressor cells in the maintenance phase of spontaneous tolerance after orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1994;57:1512-1515
- 26 Griffith TS, Yu X, Herndon JM, Green DR, Ferguson TA. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity* 1996;5:7-16
- 27 Qian S, Lu L, Fu F, Li Y, Li W, Starzl TE, Fung JJ, Thomson AW. Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts: evidence for deletion of cytotoxic T cell and implications for tolerance induction. *J Immunol* 1997;158:4654-4661
- 28 Meyer D, Baumgardt S, Loeffler S, Czub S, Otto C, Gassel HJ, Timmermann W, Thiede A, Ulrichs K. Apoptosis of T lymphocytes in liver and/or small bowel allografts during tolerance induction. *Transplantation* 1998;66:1530-1536
- 29 Famularo G, Nucera E, Marcellini S, De Simone C. Fas/Fas ligand on the road: an apoptotic pathway common to AIDS, autoimmunity, lymphoproliferation and transplantation. *Med Hypotheses* 1999;53:50-52
- 30 Tagawa Y, Sekikawa K, Iwakura Y. Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN-gamma (-/-) mice, but not in TNF-alpha (-/-) mice: role for IFN-gamma in activating apoptosis of hepatocytes. *J Immunol* 1997;159:1418-1428
- 31 Solary E, Micheau O, Dimanche-Boitrel MT, Martin F. The Fas/Fas-ligand system: implications in the antitumor immune response and in the activity of cytotoxic agents. *Bull Cancer* 1998;85:685-694
- 32 Li XC, Li Y, Dodge I, Wells AD, Zheng XX, Turka LA, Strom TB. Induction of allograft tolerance in the absence of Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 1999;163:2500-2507
- 33 Li XK, Okuyama T, Tamura A, Enosawa S, Kaneda Y, Takahara S, Funashima N, Yamada M, Amemiya H, Suzuki S. Prolonged survival of rat liver allografts transfected with Fas ligand-expressing plasmid. *Transplantation* 1998;66:1416-1423
- 34 Rocha G, Deschenes J, Rowsey JJ. The immunology of corneal graft rejection. *Crit Rev Immunol* 1998;18:305-325
- 35 Bohmig GA, Krieger PM, Saemann MD, Wenhardt C, Pohanka E, Zlabinger GJ. N-butyrate downregulates the stimulatory function of peripheral blood-derived antigen-presenting cells: a potential mechanism for modulating T-cell responses by short-chain fatty acids. *Immunology* 1997;92:234-243
- 36 Pender MP. Activation-induced apoptosis of autoreactive and alloreactive T lymphocytes in the target organ as a major mechanism of tolerance. *Immunol Cell Biol* 1999;77:216-223
- 37 Crispe IN, Dao T, Klugewitz K, Mehal WZ, Metz DP. The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunol Rev* 2000;174:47-62
- 38 Lu L, Qian S, Hershberger PA, Rudert WA, Lynch DH, Thomson AW. Fas ligand (CD95L) and B7 expression on dendritic cells provide counter-regulatory signals for T cell survival and proliferation. *J Immunol* 1997;158:5676-5684
- 39 Weller M, Constam DB, Malipiero U, Fontana A. Transforming growth factor-beta 2 induces apoptosis of murine T cell clones without down-regulating bcl-2 mRNA expression. *Eur J Immunol* 1994;224:1293-1300
- 40 Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252
- 41 Pierre P, Turley SJ, Gatti E, Hull M, Meltzer J, Mirza A, Inaba K, Steinman RM, Mellman I. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 1997;388:787-792
- 42 Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997;388:782-787
- 43 De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 1997;27:1229-1235
- 44 Savill J. Apoptosis. Phagocytic docking without shocking. *Nature* 1998;392:442-443
- 45 Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 1990;343:170-173
- 46 Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhardwaj N. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via  $\alpha\beta 3$  and CD36, and cross-present antigen to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998;188:1359-1368
- 47 Kitajima T, Ariizumi K, Bergstresser PR, Takashima A. Ultraviolet B radiation sensitizes a murine epidermal dendritic cell line (XS52) to undergo apoptosis upon antigen presentation to cells. *J Immunol* 1996;157:3312-3316
- 48 Sun EW, Shi YF. Apoptosis: the quiet death silences the immune system. *Pharmacol Ther* 2001;92:135-145
- 49 Krams SM, Egawa H, Quinn MB, Villanueva JC, Garcia-Kennedy R, Martinez OM. Apoptosis as a mechanism of cell death in liver allograft rejection. *Transplantation* 1995;59:621-625
- 50 Laine J, Etelamaki P, Holmberg C, Dunkel L. Apoptotic cell death in human chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1997;63:101-105
- 51 Sedivy R, Gollackner B, Casati B, Mittlböck M, Kaserer K, Steininger R, Wrba F. Apoptotic hepatocytes in rejection and vascular occlusion in liver allograft specimens. *Histopathology* 1998;32:503-507
- 52 Blankenberg F, Ohtsuki K, Strauss HW. Dying a thousand deaths. Radionuclide imaging of apoptosis. *Q J Nucl Med* 1999;43:170-176
- 53 Lai JH, Ho LJ, Lu KC, Chang DM, Shaio MF, Han SH. Western and Chinese antirheumatic drug-induced T cell apoptotic DNA damage uses different caspase cascades and is independent of Fas/Fas ligand interaction. *J Immunol* 2001;166:6914-6924
- 54 Kabelitz D. Apoptosis, graft rejection, and transplantation tolerance. *Transplantation* 1998;65:869-875
- 55 Migita K, Origuchi T, Kawabe Y, Tominaga M, Ida H, Kawakami A, Eguchi K. FK506 markedly enhances apoptosis of antigen-stimulated peripheral T cells by down-regulation of Bcl-xL. *Transplantation* 1999;68:1018-1023
- 56 Migita K, Eguchi K. FK506-Mediated T-cell apoptosis induction. *Transplant Proc* 2001;33:2292-2293
- 57 Labalette M, Queyrel V, Masy E, Noel C, Pruvot FR, Dessaint JP. Implication of cyclosporine in up-regulation of Bcl-2 expression and maintenance of CD8 lymphocytosis in cytomegalovirus-infected allograft recipients. *Transplantation* 1995;59:1714-1723

# 自身免疫性肝炎诊断与治疗

欧强, 谭德明

欧强, 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: 欧强, 410008, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅医院传染科.  
ouqiang7606@sohu.com  
电话: 0731-4362620  
收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-09-24

## 摘要

我国是慢性肝病的高发区, 病毒性肝炎占大多数, 但是肝炎病毒感染指标阴性、原因不明的慢性肝病患者也并非少见, 其中一部分可能是自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH). AIH 是一种原因不明, 伴血清自身免疫性抗体阳性、高球蛋白血症和肝脏慢性炎症及纤维化组织学改变的反应性肝病. 本病临床较为少见, 各年龄人群均可发病, 其病因、发病机制至今尚不清楚, 临床上对其诊断与治疗也存在较大分歧. 我们结合近几年国外文献, 综述了自身免疫性肝炎诊断与治疗研究进展.

欧强, 谭德明. 自身免疫性肝炎诊断与治疗. 世界华人消化杂志 2004;12(2): 450-453

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/450.asp>

## 0 引言

我国是慢性肝病的高发区, 病毒性肝炎占大多数, 但是肝炎病毒感染指标阴性、原因不明的慢性肝病患者也并非少见, 其中一部分可能是自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH). AIH 是一种原因不明, 伴血清自身免疫性抗体阳性、高球蛋白血症和肝脏慢性炎症及纤维化组织学改变的反应性肝病<sup>[1-2]</sup>, 既往曾命名为自身免疫性慢性活动性肝炎. 本病全球散发, 各年龄人群均可发病, 人们对其认识还不充分, 许多问题如相关病因、发病机制至今尚不清楚<sup>[3-4]</sup>, 临床上对其诊断与治疗也存在较大分歧. 本文就 AIH 诊断与治疗及相关问题, 结合近几年国外文献, 作一简要综述.

## 1 AIH 的诊断

1.1 临床特点 AIH 常呈隐袭性发生, 患者可很长一段时间完全无症状. 部分患者也可呈现急性、亚急性发作, 临床上很难与急性病毒性肝炎相鉴别. 该病各年龄人群均可发病, 青春期(15-24岁)和女性绝经期前后(45-60岁)为两个好发年龄段. AIH 的临床特点主要有<sup>[5]</sup>: (1) 女性患者多见(女:男为 4-6:1). (2) 类似病毒性肝炎的症状和体征, 如极度乏力、右上腹不适或疼痛、肝脾肿大、黄疸、腹水等. 约 10% 的患者无任何症状. (3) 血液中存在自身免疫性抗体. (4) 肝功能异常, 如转氨

酶、胆红素、AKP、r-GT 升高. 肝功能异常程度与肝活检组织学病变的严重程度并不完全一致. (5) 各型病毒性肝炎病原学检查为阴性. (6) 血清球蛋白, 尤其是 r-球蛋白增高. (7) 肝脏病理组织学检查示轻、中度慢性肝炎表现, 小叶性肝炎多见<sup>[3]</sup>. (8) 10-50% 的患者伴有肝外免疫性疾病, 如自身免疫性甲状腺炎、溃疡性结肠炎、滑膜炎等.

1.2 AIH 的相关自身抗体 血清自身免疫性抗体是 AIH 的重要特征之一, 也是 AIH 诊断和分型的必备条件<sup>[6-7]</sup>. AIH 中的主要自身抗体有<sup>[8-9]</sup>: 抗核抗体(ANA)、抗平滑肌抗体(ASMA)、抗肝肾微粒体抗体(ALKM)、抗可溶性肝抗原抗体(ASLAA). 同时还可以检出各种非疾病特异性抗体如抗中性粒细胞胞质抗体(CANCA)、抗无唾液酸糖蛋白受体抗体(ASG-PR). 最近又发现许多 AIH 患者中存在抗肝细胞胞质抗原 I 型抗体(LC I A)、抗细胞角蛋白抗体(CK-8, 18, 19)和识别肝脏、胰腺细胞胞质抗原的抗肝胰抗体(ALP)<sup>[10]</sup>. 相信, 随着检测水平及方法的不断发展和提高, 将会发现更多与 AIH 相关的自身免疫抗体.

1.3 诊断和分型 AIH 缺乏特异性诊断方法, 必须综合临床、实验室检查、肝组织学特点, 并排除其他致肝损害病因(药物、酒精、病毒、寄生虫)后才可确诊<sup>[11]</sup>. 1993 年国际 AIH 学术组(International autoimmune hepatitis group, IAIHG)统一了 AIH 的诊断标准<sup>[12]</sup>: (1) IgG 甲型肝炎病毒抗体、HBcAb-IgM 抗体和 HCV 抗体阴性及无致肝病毒(巨细胞病毒、EB 病毒)感染征象, 无肠外接触血液或血制品; (2) 自身免疫抗体(ANA, ASMA, LKM-1, SLA)滴度成人大于或等于 1:80, 儿童大于或等于 1:20 阳性; (3) 血清 r-球蛋白或 IgG 浓度超过正常上限的 1.5 倍; (4) 肝生化检查: 转氨酶异常, 特别是无血清碱性酶显著增高(如升高并不排除). 血清抗-1-抗胰蛋白酶、铜、铜蓝蛋白正常; (5) 肝病理组织学: 中度慢活肝或伴有碎片样坏死的严重活动表现, 抑或小叶性肝炎, 小叶中央和门脉区的架桥样坏死, 但无胆汁淤积、铜沉积或其他任何提示不同病因的改变; (6) 其他病因因素: 男每日饮酒小于或等于 35 g, 女小于或等于 25 g, 晚近无服用肝毒性药物史. 同时 IAIHG 还根据 AIH 的重要症状和体征制定了一个含有组织学指标的评分系统.

1999 年国际 AIH 小组重新修订了 AIH 的评分系统<sup>[13]</sup>. 与 1993 年制定的评分系统相比, 新修订后的 AIH 评分系统更为科学, 确诊或疑诊 AIH 的敏感性达 89.8%,

但也存在不足, 尤其是其特异性较低. Talwalkar et al<sup>[14]</sup>对 137 例原发性胆汁性肝硬化(PBC)使用新修订的 AIH 评分系统评分, 显示有近 20% 的 PBC 会疑诊为 AIH. 故有学者建议对那些评分已达 AIH 确诊或疑诊标准, 但常规激素治疗无效者, 需行胆管造影术以排除原发

性胆管疾病. 另外也有文献报道使用修订后的 AIH 评分系统难以诊断急性发作的 AIH. AIH 的评分系统仍需进一步完善<sup>[15]</sup>, 见表 1.

根据血清自身免疫抗体的不同, 结合发病情况、病程经过及对治疗的反应, 目前将 AIH 分为 4 型, 见表 2.

表 1 自身免疫性肝炎国际评分系统(1999 IAIHG)

指标	记分	指标	记分
性别	女 +2 男 0	其他因素	
血清 ALP/ALT	>3.0 -2 1.5-3.0 0 <1.5 +2	肝损害药物病史: 有 -4 无 +1	
血清球蛋白类高于正常上限倍数	>2.0 +3 1.5-2.0 +2 1.0-1.5 +1 <1.0 0	酗酒(平均消耗量) <25 g/d +2 >60 g/d -2	
自身抗体阳性		遗传因素:HLADR3 或 DR4 +1	
成人 ANA, SMA 或 LKM-1	>1 : 80 +3 1 : 80 +2 1 : 40 +1 <1 : 40 0	伴随其他自身免疫性疾病 +2 对治疗的反应 完全有效 +2 治疗终止后复发 +3	
抗线粒体抗体(AMA)	阳性 -4 阴性 0	肝脏病理组织学: 桥状坏死 +3 淋巴细胞浸润占优势 +1 肝细胞玫瑰花瓣样改变 +1 缺乏上述改变 -5 胆管改变 -3 其他组织学改变 -3	
其他已确定自身抗体	阳性 +2	肝炎病毒标志物 阳性 -3 阴性 +3	

确诊: 总积分治疗前>15 及治疗后>17; 疑诊: 治疗前 10-15 及治疗后 12-17 分.

表 2 各型自身免疫性肝炎(AIH)特点

类型	相关阳性抗体	临床特点	治疗效果
AIH- I 型	ANA 和(或)ASMA	起病较慢, 女性多见, 常伴有高丙种球蛋白血症	较好
AIH- II a 型	ALKM-1	多为女性, 常伴肝外自身免疫性疾病	较好
AIH- II b 型	ALKM-1、HCV-Ab	年龄较大, 常见于男性	欠佳, 需行肝移植 <sup>[16]</sup>
AIH- III 型	ASLAA/ALP	与 AIH- I 型相似	有效
AIH- IV 型	无	具有 AIH 的典型表现	有效

ANA: 抗核抗体; ASMA: 抗平滑肌抗体; ALKM: 抗肝肾微粒体抗体; ASLAA: 抗可溶性肝抗原抗体、ALP: 抗肝胰抗体.

表 3 自身免疫性肝炎(AIH)推荐治疗方案

	单一治疗	联合治疗
诱导缓解期	强的松: 首剂 60 mg/d, 4 wk 内减至维持量	强的松: 首剂 30mg/d, 4 wk 内减至维持量 硫唑嘌呤: 50 mg/d
维持治疗期	强的松: 20 mg/d 或更低或硫唑嘌呤: 每日 2 mg/kg	强的松: 20 mg/d 或更低 硫唑嘌呤: 50 mg/d
临床缓解	强的松: 每周减量 2.5 mg	强的松: 每周减量 2.5 mg
后撤药	硫唑嘌呤: 每 3 wk 减量 25 mg	硫唑嘌呤: 每 3 wk 减量 25 mg

临床缓解是指持续治疗 12-24 mo, 肝生化正常, 组织病理学改善. 维持治疗过程中应避免过早或突然停药. 目前关于药物如何减量的规定并不统一. 对于症状较轻、转氨酶低于正常值上限 5 倍的年轻 AIH 患者可直接用维持量治疗.

## 2 AIH的治疗和预后

重型 AIH 如果不及早诊断和治疗, 常常发展为肝硬化甚至肝衰竭<sup>[17]</sup>, 死亡率高达 80% 以上. 目前主张对急性发病, 转氨酶高于正常值上限 5-10 倍的 AIH 患者尽早治疗, 而对于年龄偏大、发病较缓、症状不明显、转氨酶低于正常值上限 5-10 倍的 AIH 患者则要权衡治疗的利弊决定治疗与否.

2.1 内科标准治疗 单用强的松或强的松联用硫唑嘌呤, 是治疗 AIH 的标准免疫抑制治疗法. 文献报道强的松联用硫唑嘌呤能减轻其副作用. 一般认为联合疗法适用于年龄偏大, 伴有骨质疏松症、代谢性疾病或精神症状的 AIH 患者, 而对年龄较轻, 伴有血液系统疾病的患者单用激素治疗. 目前学术界推荐的治疗方案见表 3<sup>[18]</sup>. 现代医学研究证实, 长期使用免疫抑制剂可阻止肝纤维化进程, 保护肝细胞, 而早期或突然撤药会导致 50-80% 的患者复发, 增加肝纤维化甚至肝衰竭的发生率, 故临床上主张长期维持治疗(硫唑嘌呤, 每天 2 mg/kg)<sup>[19]</sup>. 80% 以上的 AIH 患者经糖皮质激素和(或)其他免疫抑制剂治疗可减轻肝组织损伤, 纠正肝生化异常, 改善肝脏病理组织学改变, 最终降低死亡率. 长期服用激素可诱发消化道出血、引起水钠潴留、增加肝性骨病等严重毒副作用, 治疗中需注意观察, 一旦发现, 应及时停药. AIH 易复发, Czaja et al<sup>[20]</sup>认为抗 SLA 抗体与 HLA-DR3, DRB1\*0301 相关联, 可能是 AIH 复发的遗传替代标志物. 最近有报道提出首次激素治疗效果较好者以及复发后再治疗者可获得较持久的缓解<sup>[21]</sup>.

2.2 免疫抑制剂治疗 强的松和(或)硫唑嘌呤治疗顽固性 AIH 疗效并不理想<sup>[22]</sup>. 应用类似于器官移植术后免疫抑制方法治疗重型或顽固性 AIH 目前正在多中心临床试验中进行研究.

2.2.1 环孢霉素 A (cyclosporin A CyA) CyA 能减低细胞表面淋巴活性因子的表达, 具有抑制 T 淋巴细胞功能的作用. 有学者用 CyA (每日 2-3 mg/kg) 治疗 32 例 AIH- I 型和 4 例 AIH- II 型患儿时发现所有肝脏组织学得到明显的改善, 提示治疗有效. 在另外一个开放性多中心研究中, 用小剂量强的松联合硫唑嘌呤治疗 32 例 AIH 患儿 1 mo 后停药, 再单用 CyA 治疗 6 mo, 结果发现有 25 例转氨酶在 6 mo 内降为正常, 1 a 后所有患者的转氨酶正常. 同时发现 AIH 患者对 CyA 具有良好的耐受性.

2.2.2 他克罗姆 (tacrolimus FK-506) FK-506 是一种大环内酯类化合物, 作用机制与 CyA 相似, 但免疫抑制作用强于 CyA. 有报道显示 FK-506 能降低 AIH 患者的转氨酶和胆红素水平. FK-506 治疗 AIH 的价值需要更多的临床随机对照实验来证实.

2.2.3 布地奈德(丁地去炎松 budesonide) 布地奈德是一种合成的皮质类固醇, 在体内转化快, 相对其他皮质激素, 其副作用少见. 目前认为布地奈德治疗 AIH 有效, 且患者对布地奈德也能较好地耐受. 由于该药副作用较少, 有学者主张在维持治疗时用布地奈德代替强的松.

2.2.4 麦考酚酸酯 (mycophenolate mofetil, MMF) MMF 是麦考酚酸的酯类衍生物, 对淋巴细胞具有高度选择作用. Paul et al<sup>[23]</sup>报道 7 名标准免疫抑制剂治疗无效的 AIH- I 型患者采用 MMF(1 g, Bid) 平均治疗 46 mo, 结果发现 5 例患者的转氨酶在治疗 3 mo 后降为正常, 临床症状好转, 且无明显毒副作用, 从而提示 MMF 是治疗顽固性 AIH 的另一有效方法.

另外, 环磷酰胺(cyclophosphamide)、熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid)等药也用于治疗 AIH, 其确切疗效有待进一步在临床试验中证实.

2.3 肝移植治疗 AIH 的现况和展望 激素或免疫抑制剂持续治疗 4 a 仍未缓解的 AIH 患者发生肝衰竭的机率很高, 需要行原位肝移植(orthotopic liver transplantation OLT). 移植受者多为年轻女性, 移植后会 3-12 mo 不等的细胞排斥反应. 大约 50% 的患者 OLT 术后 1 a 内出现各种异常, 5 a 生存率 >90%<sup>[24]</sup>. 77% 的 AIH 患者在肝移植后自身抗体持续存在, 但滴度较移植前为低. 有 10-35% 的 AIH 患者肝移植后会再次复发, 复发的平均时间是肝移植后  $2.6 \pm 1.5$  a<sup>[25]</sup>. 最近文献报道同种异体移植受体抗原表达细胞的增生和无选择细胞毒性 T 细胞的作用可能是肝脏移植后 AIH 复发的主要因素<sup>[26]</sup>. 关于 AIH 患者在肝移植后是否需要长时间接受较大剂量免疫抑制剂治疗仍存在分歧. 尽管 AIH 患者在 OLT 术后复发现象并不罕见, 但 OLT 能明显提高患者存活率, 给激素或免疫抑制剂治疗 AIH 失败者以及晚期 AIH 患者带来了希望<sup>[27-29]</sup>.

AIH 未经治疗预后不良, 最终几乎都将发展为肝硬化. 相对有临床症状的 AIH 患者, 无症状者对激素治疗效果佳, 预后良好<sup>[30]</sup>. AIH 的预后还与遗传因素有关. 携带人类白细胞抗原(HLA)-DR3 的 AIH 患者比 DR4 者易复发, 预后差.

总之, AIH 是一种原因不明的慢性肝炎综合征, 其临床表现与病毒性肝炎极为相似, 诊治较困难, 早期诊断、及时治疗是挽救患者生命的关键. 我们相信随着免疫学、分子生物学及临床检验水平的提高, 在不久的将来, AIH 临床诊断与治疗等方面必将取得突破性进展.

## 3 参考文献

- 1 Peters MG. Animal models of autoimmune liver disease. *Immunol Cell Boil* 2002;80:113-116
- 2 Leonardi S, Pavone P, Rotolo N, Spina M, La Rosa M. Autoimmune hepatitis associated with celiac disease in childhood: Report of two cases. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18:1324-1327
- 3 Al-Khalidi JA, Czaja AJ. Current concepts in the diagnosis, pathogenesis, and treatment of autoimmune hepatitis. *Mayo Clin Proc* 2001;76:1237-1252
- 4 Feld JJ, Heathcote EJ. Epidemiology of autoimmune liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:1118-1128
- 5 Ferreira AR, Roquete ML, Penna FJ, Topa NH. Autoimmune hepatitis in children and adolescents: clinical study, diagnosis and therapeutic response. *J Pediatr (Rio J)* 2002;78:309-314
- 6 Strassburg CP, Obermayer-Straub P, Manns MP. Autoimmunity in liver diseases. *Cli Rev Allergy Immunol* 2000;18:127-139

- 7 Luxon BA. Autoimmune hepatitis. Making sense of all those antibodies. *Postgrad Med* 2003;114:79-82
- 8 Ozen H, Kocak N, Saltik IN, Yuca A, Gurakan F. Autoimmune hepatitis. *Indian J Pediatr* 2001;68:725-728
- 9 Murota M, Nishioka M, Fujita J, Dobashi N, Wu F, Ohtsuki Y, Hojo S, Takahara J, Kuriyama S. Anti-cytokeratin antibodies in sera of the patients with autoimmune hepatitis. *Clin Exp Immunol* 2001;125:291-299
- 10 Stechemesser E, Klein R, Berg PA. Characterization and clinical relevance of liver-pancreas antibodies in autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1993;18:1-9
- 11 赵超, 叶光福, 曲军平, 何维熊. 自身免疫性肝炎. 世界华人消化杂志 1997;5:667-668
- 12 Johnson PJ, McFarlane IR. Meeting report: International autoimmune hepatitis group. *Hepatology* 1993;18:998-1005
- 13 Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Buschenfelde KH, Zeniya M. International autoimmune hepatitis group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:929-938
- 14 Talwalkar JA, Keach JC, Angulo O, Lindor KD. Overlap of autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis: an evaluation of a modified scoring system. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1191-1197
- 15 Abe M, Hiasa Y, Masumoto T, Kumagi T, Akbar SM, Ninomiya T, Matsui H, Michitaka K, Horiike N, Onji M. Clinical characteristics of autoimmune hepatitis with histological features of acute hepatitis. *Hepatol Res* 2001;21:213-219
- 16 Cattan P, Berney T, Conti F, Calmus Y, Homberg JC, Houssin D, Soubrane O. Outcome of orthotopic liver transplantation in autoimmune hepatitis according to subtypes. *Transpl Int* 2002;15:34-38
- 17 Saadah OI, Smith AL, Hardikar W. Long-term outcome of autoimmune hepatitis in children. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1297-1302
- 18 Michael P, Manns P. Autoimmune hepatitis: clinical challenges. *Am J Gastroenterol* 2001;120:1502-1503
- 19 Heneghan MA, McFarlane IG. Current and novel immunosuppressive therapy for autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2002;35:7-13
- 20 Czaja AJ, Donaldson PT, Lohse AW. Antibodies to soluble liver antigen/liver pancreas and HLA risk factors for type I autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2002;97:413-419
- 21 Czaja AJ, Menon KV, Carpenter HA. Sustained remission after corticosteroid therapy for type I autoimmune hepatitis: a retrospective analysis. *Hepatology* 2002;35:890-897
- 22 Zugmaier G, Jager R, Neubauer A, Mennel HD, Knabbe C, Dienes HP. Fatal bleeding complications caused by Evans syndrome (autoimmune thrombocytopenia and hemolytic anemia) and type II autoimmune hepatitis in a 56-year-old patient. *Med Klin (Munich)* 2002;97:88-90
- 23 Bariol C, Meagher AP, Vickers CR, Byrnes DJ, Edwards PD, Hing M, Wettstein AR, Field A. Early studies on the safety and efficacy of thalidomide for symptomatic inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:233-235
- 24 Molmenti EP, Netto GJ, Murray NG, Smith DM, Molmenti H, Crippin JS, Hoover TC, Jung G, Marubashi S, Sanchez EQ, Gogel B, Levy MF, Goldstein RM, Fasola CG, Gonwa TA, Klintmalm GB. Incidence and recurrence of autoimmune/alloimmune hepatitis in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2002;8:519-526
- 25 Duclos-Vallee JC, Sebah M, Rifai K, Johanet C, Ballot E, Guettier C, Karam V, Hurtova M, Feray C, Reynes M, Bismuth H, Samuel D. A 10 year follow up study of patients transplanted for autoimmune hepatitis: histological recurrence precedes clinical and biochemical recurrence. *Gut* 2003;52:893-897
- 26 Czaja AJ. Autoimmune hepatitis after liver transplantation and other lessons of self-intolerance. *Liver Transpl* 2002;8:505-513
- 27 Yusoff IF, House AK, De Boer WB, Ferguson J, Garas G, Heath D, Mitchell A, Jeffrey G. Disease recurrence after liver transplantation in Western Australia. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:733-736
- 28 Nunez-Martinez O, De la Cruz G, Salcedo M, Molina J, De Diego A, Ripoll C, Calleja J, Alvarez E, Clemente G. Liver transplantation for autoimmune hepatitis: fulminant versus chronic hepatitis presentation. *Transplant Proc* 2003;35:1857-1858
- 29 Heffron TG, Smallwood GA, Oakley B, Pillen T, Welch D, Connor K, Martinez E, Romero R, Stieber AC. Adult and pediatric liver transplantation for autoimmune hepatitis. *Transplant Proc* 2003;35:1435-1436
- 30 Kogan J, Safadi R, Ashur Y, Shouval D, Ilan Y. Prognosis of symptomatic versus asymptomatic autoimmune hepatitis: a study of 68 patients. *J Clin Gastroenterol* 2002;35:75-81

## World Journal of Gastroenterology 荣誉

《World Journal of Gastroenterology, WJG》是我国自然科学核心期刊及全国优秀科技期刊, 荣获第二届国家期刊奖百种重点期刊, 2001 年入选中国期刊方阵“双百”期刊. 2002-10-11 获得国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助(项目批准号: 30224801), 资助期限 2 年, 资助强度为每年 8 万元.

# VEGF 在肝癌中的作用

邓靖宇, 何生

邓靖宇, 何生, 四川大学华西医院肝胆胰外科 四川省成都市 610041  
项目负责人: 邓靖宇, 610041, 四川省成都市人民南路三段 17 号, 四川大学  
华西医院肝胆外科. dengery@hotmail.com  
电话: 028-81695583 传真: 028-85405581  
收稿日期: 2003-10-21 接受日期: 2003-12-06

## 摘要

血管内皮细胞生长因子(VEGF)是体内一种强效力的促血管生成因子,能直接或间接参与血管生成,在肝癌的发生、发展及预后中具有极其重要的地位.近年来,VEGF已成为肿瘤抗血管治疗的热点,故本文对VEGF的研究现状进行综述,并提出VEGF在肝癌中生成增多的机制及其意义;减少VEGF在肝癌中的产生及抑制VEGF在肝癌中表达效应为其进一步研究方向.

邓靖宇, 何生. VEGF 在肝癌中的作用. 世界华人消化杂志 2004;12(2):454-458  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/454.asp>

## 0 引言

肿瘤的生长代谢、浸润转移和复发均与肿瘤的血供密切相关.在肿瘤生长的血管前期,仅能够依靠肿瘤周围组织弥散的营养物质来满足其需要<sup>[1]</sup>,因而生长受到抑制,肿瘤直径难以超过 2 mm<sup>[2]</sup>.而当肿瘤进入血管期时,肿瘤内及其周围组织出现大量肿瘤相关血管,改善了肿瘤血供,并促进其生长. Folkman 于 1973 年首先提出了肿瘤血管生成因子(tumor angiogenesis factor, TAF)以后,已经证实肿瘤患者体内存在有多种血管生成因子,其中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是体内最强的一种血管生成因子<sup>[3]</sup>. VEGF 及其受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)在肝癌组织中较正常肝组织呈过高表达,并与肝癌的生长、转移、复发及治疗密切相关<sup>[4]</sup>,而其机制并未完全被阐明,故本文就此进行总结和探讨.

## 1 VEGF 和 VEGFR

1.1 VEGF 简介 VEGF 是由 Ferrara et al<sup>[5]</sup>于 1989 年从牛垂体滤泡星状细胞培养基中分离纯化出的肝素结合性生长因子,能特异地结合于血管内皮细胞,促进其增生形成新生血管,且能增强血管通透性.进一步研究发现,VEGF 是由 2 条亚基间及亚基内借二硫键联结形成的二聚体糖蛋白分子,其 M<sub>r</sub> 约为 34-46 kD. 人体内 VEGF mRNA 由于剪接方式不同而得出 4 种不同 VEGF 氨基酸残基: VEGF<sub>121</sub>、VEGF<sub>165</sub>、VEGF<sub>189</sub> 和 VEGF<sub>206</sub><sup>[6]</sup>,其中 VEGF<sub>165</sub> 是体内不易溶解且与肝素类物结合稳定性较

差的 VEGF 分子<sup>[7]</sup>,而其促血管内皮细胞分裂增生的活性最强,也是肿瘤相关血管生成的最重要因子.近年来,已证实 VEGF 除了在机体炎症、创伤后组织内高表达外,VEGF 也在许多肿瘤中出现高表达,如:肝癌、脑肿瘤、乳腺癌、肺癌及肾癌组织中<sup>[8]</sup>.

1.2 VEGFR 简介 VEGF 的生物学效应均是通过其特异性受体 VEGFR 介导来实现的,VEGFR 可导致由配体介导的二聚体化,受体的二聚体化促使相邻受体亚基自身磷酸化和去磷酸化,从而触发信号转导<sup>[9]</sup>. VEGF 结合 VEGFR 后,激活磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路<sup>[10-11]</sup>,内皮细胞胞质内的磷脂酰肌醇-3 激酶和磷脂酶 C<sub>γ</sub> 等发生磷酸化,促使磷脂酰肌醇磷酸化,释放第二信使、钙离子和激活蛋白酶 C,造成内皮细胞分裂增生,血管内皮通透性增加以及其他细胞外形发生皱折、细胞内肌动蛋白重组<sup>[12]</sup>. VEGFR 均为酪氨酸蛋白激酶,按其功能和结构分为: fms- 样酪氨酸激酶 1(VEGFR-1/Flt-1)、激酶插入区受体(VEGFR-2/Flk-1/KDR)、fms- 样酪氨酸激酶 4(VEGFR-3/Flt-4)及一些低分子量 VEGFR(neuropilin-1)<sup>[13]</sup>. Flt-1 和 KDR 主要分布于血管内皮细胞上, Flt-4 则主要分布于淋巴管内皮细胞上.与 VEGF 相结合的主要为 Flt-1 和 KDR, Flt-1 与 VEGF 的结合力较 KDR 高<sup>[14]</sup>,他们都是糖基化的跨膜受体,直接参与 VEGF 进入细胞内的信号传递. Flt-1 与 VEGF 结合后能促使血管内皮细胞的形成和调节血管渗透性; KDR 与 VEGF 结合后则能促进血管内皮细胞的增生及成熟<sup>[15-16]</sup>.

## 2 VEGF 在肝癌中的作用

肝癌是多血管肿瘤,恶性程度高,生长速度快,转移范围广,复发性率高. VEGF 在肝癌生长、转移和复发中有重要意义. VEGF 在肝癌组织中表达较肝硬化和正常肝组织显著性增高(P < 0.05)<sup>[17]</sup>,增多的 VEGF 主要为肿瘤细胞和肝星状细胞旁分泌和自分泌所致<sup>[18]</sup>. 增多的 VEGF 对肝癌的作用主要为增加肝癌细胞的血供和促进肝癌细胞浸润及转移.

### 2.1 增加肝癌细胞的血供

2.1.1 由于肝癌细胞在快速生长过程中对氧和营养的需求量过大,易导致癌组织内缺血缺氧,而缺氧恰为 VEGF 最强烈的诱导剂<sup>[19]</sup>,因而导致 VEGF 大量分泌,并特异性与 VEGFR 相结合,加速血管内皮细胞的增生和分化,促使新生血管生成,以满足肿瘤生长的需求.肿瘤的恶性程度越高、体积越大、转移范围越广

及浸润程度越深, 则对氧的需求越高, 故 VEGF 的分泌则越多, 并且二者呈正相关<sup>[20]</sup>.

2.1.2 VEGF 可激活血管内皮细胞基因, 增强尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)和组织型纤溶酶原激活物(tPA), 并减弱纤溶酶原激活剂抑制物(PAI-1)的表达, 进而诱导蛋白水解酶、间质胶原酶和组织因子的产生来促进血管的形成, 改善癌细胞营养和氧的需求<sup>[21]</sup>.

2.1.3 VEGF 促使血管内皮细胞产生金属蛋白酶-9(MMP-9), 使凝血酶原转化为凝血酶, 激活明胶酶原 A 降解原来的基膜, 促使血管形成, 使肿瘤营养和氧供给加大<sup>[22]</sup>.

2.1.4 VEGF 可通过细胞内钙调节蛋白及磷酸肌醇途径增强 NO 合酶(NOS)表达, 导致 NO 生成增多, 进而促进新生血管网建立和管腔的形成<sup>[23]</sup>.

2.2 促进肝癌细胞浸润和转移 在肝癌患者中, 已发生转移的患者的 VEGF 血清水平也较未发生转移的患者显著增高<sup>[24]</sup>, 其机制如下: (1) VEGF 能增强血管通透性, 加之新生的肿瘤相关血管的结构不完善且通透性强, 部分肿瘤细胞可以穿过血管壁进入血管向远处转移, 故加速了肿瘤浸润和转移<sup>[25]</sup>. (2) VEGF 还可以通过结合分布于肝癌细胞膜上 VEGFR 促进其自身生长<sup>[26]</sup>, 并使肝癌细胞的伪足增长、增多, 使之移动能力加强, 通过直接黏附或吞噬靶细胞的方式, 增强了癌细胞的浸润和转移能力<sup>[27]</sup>. (3) VEGF 作用于肝癌细胞后, 能降低癌细胞的同质黏附性, 使之更易发生分离、脱落, 与基质胶原纤维黏附后利于其运动和转移<sup>[28-29]</sup>. 并且此现象与 VEGF 的剂量及作用时间呈依赖关系, 因而加速了肝癌的发展<sup>[30]</sup>. 因此, VEGF 在整个肝癌发生、发展过程和肝癌抗血管生成治疗中占有十分重要的地位. (4) VEGF 促使血管内皮细胞产生基质降解蛋白酶类(如基质金属蛋白酶-2/MMP-2), 可降解血管基底层和细胞外基质, 增强血管壁的通透性, 利于肝癌细胞的浸润和转移<sup>[31]</sup>.

### 3 VEGF 在肝癌中表达增高的机制

VEGF 在肝癌组织中表达较正常肝组织及其他良性肝病显著性增高<sup>[17]</sup>, 并由此导致大量的肿瘤相关血管增生形成, 促进了肝癌的进展、转移和复发. 肝癌中可能由于以下机制而导致 VEGF 的增多:

3.1 缺氧 任何肿瘤的生长和转移都必须依赖相关血管的存在. 如没有肿瘤相关血管的介入和支持, 肿瘤细胞则发生凋亡和坏死, 瘤体直径不能超过 1-2 mm<sup>[32-33]</sup>. 肝癌实质是一种多血管肿瘤, 且恶性程度高、进展快、转移早, 肝癌在发展过程中对氧的依赖性相当大. 肝癌早期主要依靠门静脉血流提供其生长所需的营养和氧. 而在肝癌进一步发展时期, 癌细胞的浸润和转移使周围组织难以满足其对氧的需求, 肿瘤细胞的氧紧张度增加, VEGF mRNA 表达上调, 故合成分泌大量 VEGF, 促使新生血管形成, 改善肝癌细胞的氧供<sup>[34]</sup>. 此外, 肝癌的恶性程度越高, 其生长发展越快, 缺氧出现越早且程度重, 因而分泌 VEGF 越多<sup>[35]</sup>. 缺氧促进 VEGF 表

达增多的具体机制为: (1) 缺氧诱导因子-1(HIF-1)能与肝癌细胞的缺氧增强子碱基序列相结合, 启动并加强 VEGF 基因转录; (2) 缺氧可激活 c-Src 基因而上调 VEGF 的表达<sup>[9]</sup>; (3) 缺氧时, VEGF mRNA 的稳定性增强, 半衰期也延长, 其表达水平升高 2-3 倍以上<sup>[36]</sup>.

3.2 雌激素增多 肝脏不仅是雌激素的代谢场所, 而且也是其作用靶器官<sup>[37]</sup>. 肝癌患者由于肝功能受损, 血清中雌二醇水平明显升高<sup>[38]</sup>, 并且肝癌发生转移的患者体内雌激素水平也明显高于未发生转移者. 近年来, 已有学者报道应用雌激素抑制剂治疗肝癌成功的病例<sup>[39]</sup>. 高水平的雌激素除能直接刺激肝细胞过度增生至癌变外; 还能通过与雌激素受体结合途径, 促进肝癌细胞 VEGF mRNA 的稳定性, 促进 VEGF 的合成和表达<sup>[40-41]</sup>.

3.3 p<sub>53</sub> 突变 p<sub>53</sub> 肿瘤抑制基因在调控肿瘤血管生成中具有重要作用, 是肿瘤从无血管期向血管期过渡的关键环节之一, 与 VEGF 表达显著相关<sup>[42]</sup>. p<sub>53</sub> 和 VEGF 免疫组化研究中发现: p<sub>53</sub> 和 VEGF 在已发生转移的肿瘤标本上的阳性率远较未发生转移组高, 而 p<sub>53</sub> 和 VEGF 均阴性组则无转移发生, 提示 p<sub>53</sub> 可增加 VEGF 的表达和作用<sup>[43]</sup>.

3.4 NO 的刺激作用 采用 NO 生成剂(SNAP)生成 NO 后, 刺激肝癌细胞(HePG2), 激活鸟苷酸环化酶, 而使 VEGF mRNA 水平升高 8-11 倍, 导致 VEGF 大量合成分泌<sup>[44]</sup>.

3.5 肝癌细胞周期启动 处于 G<sub>0</sub> 期的肝癌细胞(HePG2)低表达 VEGF, 而一旦 HePG2 细胞启动进入 G<sub>1</sub> 期后, 细胞内即发生复杂的生化事件, DNA 合成增多, VEGF 出现表达. 应用 VEGF 反义核苷酸使 HePG2 细胞周期停滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期时, 则 VEGF 表达下调<sup>[45]</sup>.

3.6 内分泌激素紊乱 肝脏是机体内分泌重要的代谢场所, 故肝癌患者常出现内分泌紊乱. TSH 增多可通过旁分泌机制促进甲状腺细胞合成释放 VEGF<sup>[46]</sup>; 高血糖和血管紧张素 II 增多均可使血管平滑肌细胞 VEGF mRNA 和 VEGF 蛋白表达增多<sup>[47]</sup>.

3.7 肾素-血管紧张素转化酶 肾素-血管紧张素系统常在慢性肝病中激活. 肾素-血管紧张素转化酶(ACE)的激活导致血管紧张素 II 生成增多, 而血管紧张素 II 可进一步促进 VEGF 产生. ACE 抑制剂 Perindopril (PE)能明显地抑制原发性肝癌细胞和癌组织中血管的生长<sup>[48]</sup>.

### 4 抑制 VEGF 在肝癌中的作用

以抑制肿瘤相关血管为中心治疗肿瘤, 已成为当今肿瘤治疗的热点. 与传统抗肿瘤细胞治疗手段相比, 抗肿瘤相关血管治疗主要有以下优势: (1) 肿瘤血管内皮细胞为二倍体细胞, 遗传性稳定, 耐药性小; (2) 对肿瘤杀伤范围广泛; (3) 广谱抗肿瘤并且毒副作用小<sup>[49-51]</sup>. 近年来, 抗肿瘤血管方式已发展为多途径:

4.1 反义核苷酸 反义核苷酸技术是目前肿瘤基因治疗应用中的热点, 以人工合成的反义寡核苷酸为主, 并已具有发展为新型抗肿瘤的基因药物.

4.1.1 VEGF反义核苷酸 VEGF反义核苷酸(VEGF-ODN)能抑制VEGF的表达,且抑制率与剂量呈线性关系<sup>[52]</sup>.据国外报道,VEGF-ODN能抑制增生性视网膜病变的新生血管形成<sup>[53]</sup>,也可抑制艾滋病卡氏肉瘤细胞VEGF的表达<sup>[54]</sup>.Saleh et al<sup>[55]</sup>报道,应用VEGF-ODN能有效下调肿瘤的VEGF表达,抑制肿瘤相关血管形成,达到抑制肿瘤生长的作用.VEGF-ODN根据VEGF mRNA碱基序列第3个外显子单链区互补设计而成,其碱基序列为:5'-GCAGTAGCT-GCGCTCATAGCGC-3'<sup>[56]</sup>,稳定性高,毒副作用小,已具备进入临床条件.VEGF-ODN通过与VEGF mRNA上特定的靶序列互补或反义,阻断VEGF mRNA翻译,抑制或阻断肝癌细胞VEGF蛋白质的表达,从而抑制肿瘤血管的生成<sup>[57]</sup>.VEGF-ODN抑制靶基因表达的机制为:(1)与VEGF mRNA前体作用,与其内含子及外显子连接区域结合后干扰剪切和外显子拼接;(2)与VEGF mRNA形成杂交双链,诱发Rnase H水解VEGF mRNA效应<sup>[58]</sup>.VEGF-ODN可通过胞饮方式或通过细胞膜的被动扩散进入细胞<sup>[59]</sup>.由于VEGF-ODN穿透细胞膜的能力弱,且易被核酶降解,故对VEGF-ODN采用了结构多样修饰,包括使之形成环状结构,硫代化及甲基化等方式,以提高其抗肿瘤作用<sup>[60]</sup>.VEGF-ODN在肝癌细胞内主要分布于细胞质和细胞核内.当肝癌细胞处于分裂期时,则对VEGF-ODN摄取增多,且VEGF-ODN多位于细胞核内,抑制VEGF mRNA转录;而肝癌细胞处于非分期时,则对VEGF-ODN摄取减少,且VEGF-ODN多位于细胞质内,抑制VEGF mRNA翻译<sup>[61-62]</sup>.采用VEGF-ODN局部注射治疗的肝癌裸鼠,其肝癌生长受到明显抑制,成瘤潜伏期延长,瘤体重量减轻;并从此肝癌组织HE染色切片可见VEGF-ODN治疗组癌巢小、癌细胞数目少、细胞分界清楚、间质丰富、纤维包围明显、血管数目较未采用VEGF-ODN明显减少,并可见癌细胞核与细胞质固缩样坏死<sup>[63]</sup>.因此,采用VEGF-ODN治疗肝癌具有广阔前景和实用性.

4.1.2 VEGFR反义核苷酸 肿瘤细胞表达的VEGF通过与其自身的VEGFR和血管内皮细胞上VEGFR相结合后发生效应,而促进肿瘤细胞增生和新生血管形成.因此,利用VEGFR反义核苷酸(VEGFR-ODN)阻断VEGF和VEGFR的结合,对于抗肿瘤相关血管生成有积极作用.VEGFR-ODN以胞饮方式进入细胞后,与mRNA特异性结合后产生空间位阻效应,从而阻止mRNA的翻译,并激活体内Rnase酶,降解mRNA<sup>[64-65]</sup>.KDR是最常用的VEGFR-ODN,并在抗胃癌实验中作用显著<sup>[66]</sup>.

4.2 VEGFR抗体 VEGFR单克隆抗体可封闭VEGFR,阻止其与VEGF结合,抑制肿瘤相关血管生成.刘承利 et al<sup>[67]</sup>在研究KDR抗体对体外培养的肝癌细胞系HHCC的影响中发现,KDR抗体不仅抑制肿瘤相关血管生成,而且对HHCC细胞生长产生抑制作用.Prewett et al<sup>[68]</sup>也证实KDR单克隆抗体DCI01对裸鼠的不同肿瘤均有抑制

生长作用.Lu et al<sup>[69]</sup>曾报道一种可同时阻止VEGF和KDR,VEGF与Flt-1结合的双向抗体,并认为是更有效的肿瘤相关血管生成抑制剂.

4.3 生长抑素 生长抑素在人体内具有广泛的生物抑制作用,人工合成的生长抑素奥曲肽不仅具有抑制绝大多数神经内分泌肿瘤的增生的作用,并对许多实体性肿瘤如:胃癌、结肠癌、乳腺癌、胰腺癌及前列腺癌等也有抑制作用<sup>[70]</sup>.孙培龙 et al<sup>[71]</sup>利用奥曲肽对肝癌裸鼠进行治疗,发现治疗组裸鼠肿瘤体积明显减小,MVD及VEGF表达均有显著减低( $P < 0.05$ ).

4.4  $\alpha$ -干扰素(IFN- $\alpha$ ) 干扰素具有影响细胞增生、分化及免疫功能的作用,也具有抗肿瘤相关血管形成的作用<sup>[72]</sup>.IFN- $\alpha$ 可降低血管形成因子的表达<sup>[73]</sup>,并且能降低VEGF,bFGF等血管形成因子对血管内皮细胞的作用<sup>[74]</sup>.王鲁 et al<sup>[75]</sup>利用IFN- $\alpha$ 对肝癌裸鼠进行实验研究,证实IFN- $\alpha$ 具有降低VEGF和MVD表达,进而抑制肝癌生长和转移的作用.

4.5  $\alpha$ -肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ ) TNF- $\alpha$ 具有抗血管生成作用,其机制为:(1)TNF- $\alpha$ 可抑制VEGF诱导的血管内皮细胞DNA合成;(2)TNF- $\alpha$ 减少VEGFR mRNA表达<sup>[76]</sup>.

4.6 竞争性抑制 竞争性抑制VEGF和VEGFR在抗肿瘤血管治疗中也取得一定效果.VEGF部分多肽(3-4外显子)具有竞争性抑制VEGF和人脐静脉内皮细胞VEGFR相结合的作用,在肿瘤生物靶向治疗中有潜在价值<sup>[77]</sup>.此外,KDR的可溶部分(Flt-1胞外区)及苏拉明也具有竞争性抑制VEGF和VEGFR结合的作用.

4.7 阻断p38MAPK信号传导通路 分裂原激活蛋白酶(MAPK)级联是细胞内主要信号传导系统,可将细胞外信号转至核内,介导细胞产生反应<sup>[78]</sup>,p38MAPK是MAPK家族新信号通路<sup>[79]</sup>.VEGF可激活p38MAPK信号传导通路,使肝癌细胞内F肌动蛋白排列改变,丝状伪足增多、增长,促进其侵袭和迁移能力<sup>[80]</sup>.毛华 et al<sup>[27]</sup>采用p38MAPK信号传导通路阻断剂SB203580培养肝癌细胞后,发现SB203580能明显抑制VEGF可激活p38MAPK信号传导通路对肝癌细胞的作用,增强了肝癌细胞的同质黏附性,并使肝癌细胞出现融合现象,减弱了癌细胞的侵袭和转移<sup>[81]</sup>.

4.8 VEGF受体酪氨酸激酶抑制剂 PTK787/ZK 222584 (PTK/ZK)是最常用的口服VEGF受体酪氨酸激酶抑制剂,能有效降低VEGF生物效应的表达而抑制种植在裸鼠的人类肿瘤细胞的生长及肿瘤组织中的微血管形成,并对于结直肠癌的肝转移的治疗也有很好的效果<sup>[82]</sup>.

总之,肝癌是现代医学中最常见且难以治愈的恶性肿瘤之一,VEGF在肝癌的发生、进展和治疗中有着十分重要的作用,对VEGF的进一步研究,抑制或减少VEGF在肝癌的表达,将会给肝癌抗血管治疗带来新的突破.

## 5 参考文献

- 1 Luiten RM, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV. Target-specific activation of mast cells by immunoglobulin E reac-

- tive with a renal cell carcinoma-associated antigen. *Lab Invest* 1996;74:467-475
- 2 Potgens AJ, Westphal HR, de Waal RM, Ruiter DJ. The role of vascular permeability factor and basic fibroblast growth factor in tumor angiogenesis. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995;376:57-70
  - 3 Kraizer Y, Mawasi N, Seagal J, Paizi M, Assy N, Spira G. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin in liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287:209-215
  - 4 Suzuki H, Seto K, Shinoda Y, Mori M, Ishimura Y, Suematsu M, Ishii H. Paracrine upregulation of VEGF receptor mRNA in endothelial cells by hypoxia-exposed Hep G2 cells. *Am J Physiol* 1999;276(1 Pt 1):G92-97
  - 5 Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparinbinding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-858
  - 6 Leung DW, Cachiancs G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-1309
  - 7 Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266:11947-11954
  - 8 Samoto K, Ikezaki K, Ono M, Shono T, Kohno K, Kuwano M, Fukui M. Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors. *Cancer Res* 1995;55:1189-1193
  - 9 陈红辉, 孙圣刚, 董萋塘. 血管内皮细胞生长因子与缺血性脑损伤. *国外医学·脑血管疾病分册* 2001;9:72-74
  - 10 Dimmeler S, Zeiher AM. Akt takes center stage in angiogenesis signaling. *Circ Res* 2000;86:4-5
  - 11 Jiang BH, Zheng JZ, Aoki M, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1749-1753
  - 12 Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994;269:26988-26995
  - 13 Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in FLK-1-deficient mice. *Nature* 1995;376:62-66
  - 14 de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-991
  - 15 Goldberg MA, Schneider TJ. Similarities between the Oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem* 1994;269:4353-4359
  - 16 Barleon B, Siemeister G, Martiny-Baron G, Weindel K, Herzog C, Marme D. Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase (FLT-1) and a soluble variant of Flt-1 in human vascular endothelial cells. *Cancer Res* 1997;57:5421-5425
  - 17 Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999;18:5356-5362
  - 18 Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Tognazzi K. Expression of vascular permeability factor(vascular endothelial growth factor) and its receptors in endometrial carcinoma. *Cancer* 1996;78:454-460
  - 19 Marti HH, Risau W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15809-15814
  - 20 Takahashi Y, Bucana CD, Clearly KR, Ellis LM. P53 vessel count and vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer. *Int J Cancer* 1998;79:34-38
  - 21 Kohn S, Nagy JA, Dvorak HF, Dvorak AM. Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels. *Lab Invest* 1992;67:596-607
  - 22 Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human a rodent tumor cell lines. *Cancer Res* 1986;46:5629-5632
  - 23 王鲁, 汤钊猷. 一氧化氮的产生与肿瘤血管形成. *国外医学·肿瘤学分册* 1999;5:262
  - 24 Zhao J, Hu J, Cai J, Yang X, Yang Z. Vascular endothelial growth factor expression in serum of patients with hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:772-776
  - 25 陶厚权, 王瑞年, 林言箴. 血管内皮生长因子与肿瘤. *肿瘤* 1997;17:52-54
  - 26 刘承利, 窦科峰, 李冰. 血管内皮生长因子及其受体在肝癌细胞株中的表达及意义. *第四军医大学学报* 2000;21:770-772
  - 27 毛华, 袁爱力, 赵敏芳, 赖卓胜, 张亚历, 周殿元. p38MAPK 信号通路影响血管内皮细胞生长因子诱导肝癌细胞超微结构变化. *世界华人消化杂志* 2000;8:536-538
  - 28 蔡建春, 江绍基, 陈治平. 细胞黏附分子与肿瘤的浸润和转移. *上海第二医科大学学报* 1993;13:159-63
  - 29 司履生, 王一理. 粘连分子及其在病理学中的作用. *中华病理学杂志* 1994;23:245-248
  - 30 毛华, 赵敏芳, 袁爱力, 赖卓胜, 姜文奇. 血管内皮生长因子对肝癌细胞侵袭能力和同质性黏附作用影响. *肿瘤* 2002;22:197-199
  - 31 Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:624-633
  - 32 Potgens AJ, Westphal HR, de Waal RM, Ruiter DJ. The role of vascular permeability factor and basic fibroblast growth factor in tumor angiogenesis. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995;376:57-70
  - 33 Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6
  - 34 Miura H, Miyazaki T, Kuroda M, Oka T, Machinami R, Kodama T, Shibuya M, Makuuchi M, Yazaki Ohnishi S. Increased expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1997;27:854-861
  - 35 Takahashi Y, Bucana CD, Clearly KR, Ellis LM. P53 vessel count, and vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer. *Int J Cancer* 1998;79:34-38
  - 36 Zheng S, Wu Z, Ruan Y, Tang J. Expression of vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma and its relationship to tumor growth and metastasis. *J Tongji Med Univ* 1998;18:10-12
  - 37 Eagon PK, Porter LE, Francavilla A, Dileo A, Van Thiel DH. Estrogen and androgen receptors in liver: their role in liver disease and regeneration. *Semin Liver Dis* 1985;5:59-69
  - 38 齐海智, 胡辅珍, 左放鸣, 虞抗民. 原发性肝癌血清性激素及组织性激素受体的研究. *新消化病学杂志* 1997;5:114-115
  - 39 Manesis EK, Giannoulis G, Zpboulis P, Vafiadou I, Hadziyannis SJ. Treatment of hepatocellular carcinoma with combined suppression and inhibition of sex hormones: a randomized, controlled trial. *Hepatology* 1995;21:1535-1542
  - 40 Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Rajput-Williams J, Burch D, Schofield JP, Fountain SA, Booco CA, Smith SK. Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endothelial carcinoma cell lines. *Biol Reprod* 1993;48:1120-1128
  - 41 Martignone S, Menard S, Bufalino R, Cascinelli N, Pellegrini R, Tagliabue E, Andreola S, Rilke F, Colnaghi MI. Prognostic significance of the 67-kilodalton laminin receptor expression in human breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:398-402
  - 42 Volpert OV, Dameron KM, Bouck N. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene* 1997;14:1495-1502
  - 43 Kang SM, Maeda K, Onoda N, Chung YS, Nakata B, Nishiguchi Y, Sowa M. Combined analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in colorectal carcinoma for determination of tumor vascularity and liver metastasis. *Int J Cancer* 1997;74:502-507
  - 44 Chin K, Kurashima Y, Ogura T, Tajiri H, Yoshida S, Esumi H. Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* 1997;15:437-442
  - 45 张晓实, 姚榛祥, 陶小红. 血管内皮生长因子表达和肝癌细胞周期启动的关系. *中国普外基础与临床杂志* 1999;6:342-343
  - 46 Viglietto G, Romano A, Manzo G, Chiappetta G, Paoletti I, Califano D, Galati MG, Mauriello V, Bruni P, Lago CT, Fusco A, Persico MG. Upregulation of the angiogenic factors PlGF,

- VEGF and their receptors (Flt-1, Flk-1/KDR) by TSH in cultured thyrocytes and in the thyroid gland of thiouracil-fed rats suggest a TSH-dependent paracrine mechanism for goiter hypervascularization. *Oncogene* 1997;15:2687-2698
- 47 Natarajan R, Bai W, Lanting L, Gonzales N, Nadler J. Effects of high glucose on vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1997;273(5 Pt 2):H2224-H2231
- 48 Yoshiji H, Kuriyama S, Fukui H. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitors may be an alternative anti-angiogenic strategy in the treatment of liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. Possible role of vascular endothelial growth factor. *Tumour Biol* 2002;23:348-356
- 49 Folkman J. Antiangiogenic gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9064-9066
- 50 陈汝福, 邹声泉. 抗肿瘤血管形成基因治疗研究现状. 国外医学肿瘤学分册 1998;25:211-213
- 51 Denekamp J. Review article: Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br J Radiol* 1993;66:181-196
- 52 王宏光, 李开宗, 窦科峰. 血管内皮生长因子反义寡核苷酸抑制肝癌的血管形成. 中华普通外科杂志 2001;16:222-224
- 53 Robinson GS, Pierce EA, Rook SL, Foley E, Webb R, Smith LE. Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4851-4856
- 54 Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Naidu Y, Gill PS. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is an autoocrine growth factor for AIDS-Kaposi sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:979-984
- 55 Saleh M, Stacker SA, Wilks AF. Inhibition of growth of C6 glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence. *Cancer Res* 1996;56:393-401
- 56 王宏光, 李开宗, 窦科峰. 反义寡核苷酸抑制肝癌细胞血管内皮生长因子的表达. 第四军医大学学报 2000;21:1327-1329
- 57 Wagner RW. Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* 1994;372:333-335
- 58 Narayanan R, Akhtar S. Antisense therapy. *Curr Opin Oncol* 1996;8:509-515
- 59 Antopolsky M, Azhayeva E, Tengvall U, Auriola S, Jaaskelainen I, Ronkko S, Honkakoski P, Urtti A, Lonnberg H, Azhayev A. Peptide-oligonucleotide phosphorothioate conjugates with membrane translocation and nuclear localization properties. *Bioconjug Chem* 1999;10:598-606
- 60 王宏光, 李开宗, 窦科峰. 血管内皮生长因子反义寡核苷酸对肝癌血管形成的抑制作用. 中华实验外科杂志 2000;17:465
- 61 Helin V, Gottikh M, Mishal Z, Subra F, Malvy C, Lavignon M. Cell cycle-dependent distribution and specific inhibitory effect of vectorized antisense oligonucleotides in cell culture. *Biochem Pharmacol* 1999;58:95-107
- 62 王宏光, 李开宗, 窦科峰, 陈丹, 王春梅. 反义寡核苷酸在肝癌细胞中的分布及作用. 第四军医大学学报 2002;23:1944-1947
- 63 陈汝福, 衣龙海, 邹声泉, 石学涛, 张鑫, 李敏. 反义 VEGF 硫代寡脱氧核苷酸抑制裸鼠肝癌移植瘤生长的研究. 肿瘤防治杂志 2001;8:34-37
- 64 He Y, Huang L. Growth inhibition of human papillomavirus 16 DNA positive mouse tumor by antisense RNA transcribed from U6 promoter. *Cancer Res* 1997;57:3993-3999
- 65 Katoh O, Takahashi T, Oguri T, Kuramoto K, Mihara K, Kobayashi M, Hirata S, Watanabe H. Vascular endothelial growth factor inhibits apoptotic death in hematopoietic cells after exposure to chemotherapeutic drug by inducing MCL1 acting as an antiapoptotic factor. *Cancer Res* 1998;58:5565-5569
- 66 任娟, 董蕾, 徐仓宝, 潘伯荣, 李明众, 王晖, 王晓丽, 王梅. KDR 反义寡核苷酸对人胃癌细胞的作用. 第四军医大学学报 2002;23:333-336
- 67 刘承利, 王宏光, 窦科峰, 李开宗. 血管内皮生长因子反义寡核苷酸及抗 KDR 抗体对人肝癌细胞系 HHCC 的生长抑制作用. 中华普通外科杂志 2001;16:572-573
- 68 Prewett M, Huber J, Li Y, Santiago A, O' Connor W, King K, Overholser J, Hooper A, Pytowski B, Witte L, Bohnlen P, Hicklin DJ. Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibitor tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res* 1999;59:5209-5218
- 69 Lu D, Jimenez X, Zhang H, Wu Y, Bohlen P, Witte L, Zhu Z. Complete inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) activities with a bifunctional diabody directed against both VEGF kinase receptors, fms-like tyrosine kinase receptor and kinase insert domain-containing receptor. *Cancer Res* 2001;61:7002-7008
- 70 Robbins RJ. Somatostatin and cancer. *Metabolism* 1996;45(8 Suppl 1):98-100
- 71 孙培龙, 汪永录, 林万隆, 郭伟剑, 刘须才, 马晓明, 陈汉. 生长抑素对肝癌细胞血管内皮生长因子表达的影响. 肝胆外科杂志 2001;9:53-54
- 72 Majewski S, Szmurlo A, Marcak M, Jablonska S, Bollag W. Inhibition of tumor cell-induced angiogenesis by retinoids, 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and their combinations. *Cancer Lett* 1993;75:35-39
- 73 Slaton JW, Perrott P, Inoue K, Dinney CP, Fidler IJ. Interferon-alpha-mediated down-regulation of angiogenesis-related genes and therapy of bladder cancer are dependent on optimization of biological dose and schedule. *Clin Cancer Res* 1999;5:2726-2734
- 74 Dinney CP, Bielenberg DR, Perrotte P, Reich R, Eve BY, Bucana CD, Fidler IJ. Inhibition of basic fibroblast growth factor expression, angiogenesis, and growth of human bladder carcinoma in mice by systemic interferon-alpha administration. *Cancer Res* 1998;58:808-814
- 75 王鲁, 汤钊猷, 孙惠川, 钦伦秀, 纪元, 薛琼, 吴志全, 刘银坤, 叶胜龙. 抗肿瘤血管形成剂抑制肝癌生长及转移的实验研究. 中华肝胆外科杂志 2002;8:723-727
- 76 Cao Y, Linden P, Shima D, Browne F, Folkman J. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. *J Clin Invest* 1996;98:2507-2511
- 77 李先茂, 曾位森, 张亚历. 血管内皮生长因子部分多肽抗血管生成的研究. 中华肿瘤杂志 2002;24:448-450
- 78 Livingstone C, Patel G, Jones N. ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J* 1995;14:1785-1797
- 79 Simon C, Goepfert H, Boyd D. Inhibition of the p38 Mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced M<sub>1</sub>92000 type IV collagenase secretion and in vitro invasion. *Cancer Res* 1998;58:1135-1139
- 80 韩立群, 董化一, 高进, 赵天德, 高福云, 俞郁. 整装培养人鼻咽癌细胞系的胞质和伪足内质网的电镜观察. 中华病理学杂志 1994;23:344-346
- 81 毛华, 袁爱力, 赵敏芳, 赖卓胜. 分裂原激活蛋白激酶 p38 信号传导通路在抑制血管内皮细胞生长因子诱导肝癌转移的实验研究. 中华消化杂志 2000;20:14-16
- 82 Thomas AL, Morgan B, Dreves J, Unger C, Wiedenmann B, Vanhoefer U, Laurent D, Dugan M, Steward WP. Vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: PTK787/ZK 222584. *Semin Oncol* 2003;30(3 Suppl 6):32-38

# 胰腺癌组织中 COX-2 和 Bcl-2 蛋白的表达及其意义

刘希双, 李玉军, 田字彬, 张翠萍, 孙显路, 魏良洲, 薛会光, 刘思良

刘希双, 田字彬, 张翠萍, 魏良洲, 薛会光, 刘思良, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市 266003  
李玉军, 孙显路, 青岛大学医学院附属医院病理科 山东省青岛市 266003  
项目负责人: 刘希双, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院消化内科.  
电话: 0532-2911525  
收稿日期: 2003-06-26 接受日期: 2003-08-18

## 摘要

目的: 通过检测环氧合酶-2(COX-2)和Bcl-2蛋白在不同胰腺组织中的表达, 探讨COX-2和Bcl-2蛋白在胰腺癌发生发展过程中的作用及其意义。

方法: 应用免疫组织化学方法PicTure™通用型二步法检测47例胰腺癌、12例胰腺导管上皮内肿瘤(PIN)和10例正常胰腺组织中COX-2和Bcl-2蛋白的表达。

结果: 在10例正常胰腺组织中COX-2阳性表达2例, Bcl-2蛋白阳性表达9例; COX-2在PIN和胰腺癌中均呈高表达, 分别为75%和68%, 明显高于正常胰腺组织( $P < 0.05$ )。Bcl-2蛋白在PIN组织中阳性表达者占83%, 与正常胰腺组织相近( $P > 0.05$ ), 明显高于在胰腺癌组织中47%的阳性表达( $P < 0.05$ )。胰腺癌组织中COX-2和Bcl-2蛋白的表达呈明显负相关( $r = -0.4552, P = 0.005$ )。

结论: COX-2在PIN和胰腺癌组织中高表达与胰腺癌的发生密切相关, Bcl-2蛋白在胰腺癌发生早期起作用, 二者在胰腺癌组织中的表达呈明显负相关。

刘希双, 李玉军, 田字彬, 张翠萍, 孙显路, 魏良洲, 薛会光, 刘思良. 胰腺癌组织中COX-2和Bcl-2蛋白的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2004;12(2):459-461

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/459.asp>

## 0 引言

胰腺癌是一种较常见的消化系统恶性肿瘤, 死亡率为发病率的95%, 患者存活时间中位数仅为4 mo<sup>[1]</sup>, 5 a生存率仅为1.3%<sup>[2]</sup>。大量流行病学和实验室资料表明, 长期应用阿司匹林或其他非甾体类抗炎药物(NSAIDs)可降低消化道肿瘤的发病危险性<sup>[3-4]</sup>, 从而认识到环氧合酶(cyclooxygenase, COX)可能在肿瘤的发生和发展中起一定作用。Bcl-2基因是细胞凋亡的重要抑制基因之一, 通过其编码的Bcl-2蛋白抑制许多因素引起的细胞凋亡, 与肿瘤的发生、发展和预后密切相关<sup>[5]</sup>。近几年, 有关COX-2和Bcl-2蛋白在胰腺癌的发生、发展过程中的作用国内外已有少量研究报道<sup>[1-2, 6-10]</sup>, 但结果差异较大, 有关二者的表达在胰腺癌发生过程中的关系尚未见报道。因此, 我们采用免疫组织化学染色法

检测COX-2及Bcl-2蛋白在胰腺癌、胰腺导管上皮内肿瘤(PIN)及正常胰腺组织中的表达, 探讨二者在胰腺癌的发生、发展过程中的作用及其意义, 以便为今后探讨胰腺癌的预防、早期诊断及判断预后奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集47例1995-01/1999-12在青岛大学医学院附属医院外科手术切除的胰腺癌组织蜡块, 12例伴有上皮中度不典型增生的PIN来源于胰腺癌患者的癌旁胰腺组织; 10例正常胰腺组织来源于尸检标本, 连续切成4 μm厚的切片, 经苏木精-伊红(HE)染色, 其诊断正确。试剂: (1)鼠抗人COX-2单克隆抗体: 美国Santa Cruz公司产品。(2)鼠抗人Bcl-2蛋白单克隆抗体: 美国Dako公司产品。(3)PicTure™通用型试剂盒: ZYMED公司产品。(4)DAB显色试剂盒: 武汉博士德公司。

1.2 方法 采用免疫组织化学PicTure™通用型二步法。用PBS代替一抗作阴性对照, 用已知COX-2和Bcl-2蛋白阳性组织结肠癌切片作阳性对照。免疫组织化学染色结果判定: (1)COX-2阳性为胞质内或核膜染色呈棕黄色。计数10个高倍视野细胞数, 阳性细胞数大于或等于5%为阳性。(2)Bcl-2蛋白阳性为胞质染色呈棕黄色。计数10个高倍视野细胞数, 阳性细胞数大于或等于10%为阳性。统计学处理 采用 $\chi^2$ 检验、确切概率及等级相关分析。

## 2 结果

2.1 COX-2和Bcl-2蛋白在不同胰腺组织中的表达 两两比较显示, COX-2的阳性表达率在正常组与PIN组和胰腺癌组间均有显著性差异( $\chi^2 = 6.600, 6.049, P < 0.05$ ), 而PIN组和胰腺癌组间无显著性差异( $\chi^2 = 0.013, P > 0.05$ )。Bcl-2蛋白的阳性表达率在正常组和PIN组间无显著性差异( $P = 0.429$ ), 胰腺癌组与正常组和PIN组间均有显著性差异( $\chi^2 = 4.582, 5.138, P < 0.05$ ) (表1)。

表1 COX-2和Bcl-2蛋白在不同胰腺组织中的表达

	n	COX-2			Bcl-2蛋白		
		(+)	(-) 阳性表达率	(+)	(-) 阳性表达率		
正常胰腺组织	10	2	8 20%	9	1 90%		
PIN	12	9	3 75%	10	2 83%		
胰腺癌	47	32	5 68%	22	25 47%		

2.2 COX-2和Bcl-2蛋白表达间的相关性 经等级相关分析显示, 胰腺癌组织中COX-2和Bcl-2蛋白阳性表达呈明显负相关( $r = -0.4552, \chi^2 = 7.888, P = 0.005$ ) (表2)。

表2 胰腺癌组织中COX-2和Bcl-2蛋白表达的相关性

COX-2	n	Bcl-2 蛋白	
		(+)	(-)
(+)	32	10	22
(-)	15	12	3

### 3 讨论

**3.1 COX-2与胰腺肿瘤** COX是花生四烯酸合成前列腺素(PGs)的关键酶,分为COX-1和COX-2两种异构酶,COX-1存在于多种正常组织中且表达恒定,而COX-2在正常组织中几乎无表达,仅在各种刺激因素刺激下表达<sup>[2]</sup>.COX-2主要定位于核膜,可调节细胞的凋亡,使一些致癌物质被氧化后激活具有致癌性或激活癌基因,促进血管内皮细胞增生,也可由其参与合成的PGs产物进入核内调节细胞内其他基因的转录,活化癌基因,抑制免疫监视利于癌细胞的免疫逃逸,促进恶性细胞增生生长和癌栓形成并转移<sup>[1,11]</sup>.鉴于COX-2与肿瘤的发生和发展的关系,许多学者应用COX抑制剂或COX-2抑制剂对某些癌株及某些癌前病变或疾病进行干预,在COX下降的同时,PGs水平降低甚至测不出,结肠息肉减少或消失;结肠上皮细胞、腺瘤细胞、癌细胞凋亡.因此,提出了以COX-2抑制剂治疗家族性腺瘤性息肉病和预防结肠癌及胰腺癌的观点<sup>[11-13]</sup>.

本研究对10例正常胰腺组织进行了COX-2免疫组化染色,仅2例呈阳性反应,明显低于PIN和胰腺癌组织的75%和68%的阳性率( $P < 0.05$ ),说明了COX-2表达少见于正常胰腺组织,而易出现于PIN和胰腺癌组织中.本组所选PIN伴中度不典型增生,属胰腺癌前病变,极易发展成为胰腺癌<sup>[13]</sup>,虽其COX-2阳性率略高于胰腺癌组织,但无统计学意义,提示PIN已具备了与胰腺癌相似的分子生物学特征,应给予积极的干预措施.

**3.2 Bcl-2蛋白与胰腺肿瘤** Bcl-2蛋白为25kD含239个氨基酸残基的Bcl-2编码产物,主要存在于核膜皱褶处、内质网膜及线粒体膜上<sup>[14]</sup>,抑制许多因素引起的细胞凋亡,阻遏程序性细胞凋亡和延长细胞生命,但不促进细胞增生,只是细胞数目累积促进肿瘤的形成<sup>[5]</sup>.在本研究中10例正常胰腺组织中Bcl-2蛋白阳性染色9例,其阳性表达率与PIN组83%相近( $P > 0.05$ ),二者均明显高于胰腺癌组47%的阳性表达率( $P < 0.05$ ),显示正常胰腺导管上皮和伴中度不典型增生的导管上皮细胞的凋亡受抑,寿命较长,尤其是具有癌变倾向的PIN Bcl-2蛋白的表达明显高于胰腺癌,更支持bcl-2在肿瘤发生早期起作用的观点<sup>[15]</sup>.其机制可能为: Bcl-2蛋白表达存在于具有寿命长和增生能力正常的外分泌导管上皮、癌前病变组织和某些上皮性肿瘤<sup>[15]</sup>,他在肿瘤发生早期起作用,随着肿瘤的进展在肿瘤形成后或向恶性度高的方向转化中,部分肿瘤细胞可失去Bcl-2蛋白表达<sup>[16]</sup>,作为机体自我保护机制的凋亡增加,达到肿瘤生长过程中细胞增生和凋亡相对平衡<sup>[5,15]</sup>.

**3.3 COX-2和Bcl-2蛋白表达的相关性** 实验研究表明,COX-2表达的增加,使肠道上皮细胞Bcl-2蛋白表达增加,细胞凋亡减弱<sup>[17]</sup>,COX-2表达的细胞株中Bcl-2上调,NSAIDs或COX-2抑制剂可降低抗凋亡基因Bcl-2水平<sup>[6]</sup>,PGs合成抑制剂在抑制PGs合成的同时亦可降低bcl-2的水平<sup>[18]</sup>.因而许多学者认为,COX-2表达的致癌作用可能与抗凋亡基因Bcl-2水平上调、细胞凋亡减少有关.但也有COX-2过度表达与细胞凋亡无关<sup>[19]</sup>的报道.因此,肿瘤细胞的COX-2过度表达与Bcl-2蛋白的关系有待进一步探讨,尤其是目前关于胰腺癌发生过程中COX-2和Bcl-2蛋白表达间的关系尚未见报道.我们在本组研究中发现,胰腺癌组织中COX-2的表达与Bcl-2蛋白的表达显著负相关( $r = -0.4552$ ,  $\chi^2 = 7.888$ ),具有统计学意义( $P = 0.005$ ),提示在胰腺癌的发生过程中COX-2的过度表达主要不是通过Bcl-2蛋白表达上调、凋亡减少所致,可能存在着其他机制.

### 4 参考文献

- Ahlgren JD. Epidemiology and risk factors in pancreatic cancer. *Semin Oncol* 1996;23:241-250
- Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG, Frazier ML, Sinicrope FA. Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res* 1999;59:4356-4362
- Farrow DC, Vaughan TL, Hansten PD, Stanford JL, Risch HA, Gammon MD, Chow WH, Dubrow R, Ahsan H, Mayne ST, Schoenberg JB, West AB, Rotterdam H, Fraumeni JF Jr, Blot WJ. Use of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:97-102
- Coogan PF, Rosenberg L, Palmer JR, Strom BL, Zauber AG, Stolley PD, Shapiro S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of digestive cancers at sites other than the large bowel. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:191-223
- Joensuu H, Pylkkanen L, Toikkanen S. Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. *Am J Pathol* 1994;145:1191-1198
- Merati K, Said Siadaty M, Andea A, Sarkar F, Ben-Josef E, Mohammad R, Philip P, Shields AF, Vaitkevicius V, Grignon DJ, Adsay NV. Expression of inflammatory modulator COX-2 in pancreatic ductal adenocarcinoma and its relationship to pathologic and clinical parameters. *Am J Clin Oncol* 2001;24:447-452
- Okami J, Yamamoto H, Fujiwara Y, Tsujie M, Kondo M, Noura S, Oshima S, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Ishikawa O, Sakon M, Matsuura N, Nakamori S, Monden M. Overexpression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res* 1999;5:2018-2024
- Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, Soslow RA, Masferrer JL, Woerner BM, Koki AT, Fahey TJ 3rd. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1999;59:987-990
- Yip-Schneider MT, Barnard DS, Billings SD, Cheng L, Heilman DK, Lin A, Marshall SJ, Crowell PL, Marshall SM, Sweeney CJ. Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 2000;21:139-146
- Campani D, Esposito I, Boggi U, Cecchetti D, Menicagli M, De Negri F, Colizzi L, Del Chiaro M, Mosca F, Fornaciari G, Bevilacqua G. Bcl-2 expression in pancreas development and pancreatic cancer progression. *J Pathol* 2001;194:444-450
- Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;93:705-716

- 12 Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM. Suppression of intestinal polyposis in APC $\beta$ 716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2(COX-2). *Cell* 1996;87:803-809
- 13 Kokawa A, Kondo H, Gotoda T, Ono H, Saito D, Nakadaira S, Kosuge T, Yoshida S. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors. *Cancer* 2001; 91:333-338
- 14 Reed JC. Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hemato Oncol Clin North Am* 1995;9:451-473
- 15 Lu QL, Abel P, Foster CS, Lalani EN. Bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol* 1996;27:102-110
- 16 Du M, Singh N, Husseuin A, Isaacson PG, Pan L. Positive correlation between apoptotic and proliferative indices in gastrointestinal lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue(MALT). *J Pathol* 1996;178:379-384
- 17 Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E<sub>2</sub> in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998;58:362-366
- 18 Shiff SJ, Qiao L, Tsai LL, Rigas B. Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *J Clin Invest* 1995;96:491-503
- 19 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

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

• 研究快报 •

### 3种富集胃癌患者外周血中胃癌细胞方法的比较

陈健, 郭俊明, 金之瑾, 肖丙秀

陈健, 郭俊明, 金之瑾, 肖丙秀, 宁波大学医学院 浙江省宁波市 315211  
浙江省医药卫生科研基金资助项目, No. 2002A073  
宁波市重点博士基金资助项目, No. 02J20101-07  
宁波大学重点科研项目, No. z0214015  
项目负责人: 郭俊明, 315211, 浙江省宁波市镇西西路 1211 号, 宁波大学医学院. junmingguo@yahoo.com  
电话: 0574-87600758 传真: 0574-87608638  
收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-09-18

#### 摘要

目的: 建立一种富集胃癌患者外周血中癌细胞的有效方法。

方法: 先将不同浓度胃癌MGC-803细胞加入到健康人外周血中, 再用淋巴细胞分离液收集单核细胞, 然后等分成3份, 并用3种方法处理 - A方法, 用CD45磁珠去除白细胞; B方法, 用Ber-EP4磁珠富集癌细胞; C方法, 先后使用上述2磁珠. 最后用定量RT-PCR检测看家基因 $\beta$ 2微球蛋白( $\beta$ 2MG)mRNA的量. 同法检测30例胃癌患者外周血。

结果:  $\beta$ 2MG mRNA扩增曲线的交叉点(crossing point, Cp)数值与癌细胞数间有良好的负相关(方法A,  $P < 0.05$ , 方法B或C,  $P < 0.01$ ). 方法C检测到的Cp值为3种方法中最大的; 其灵敏度为1 mL血中含有1个癌细胞. 用A、B和C方法检测30例胃癌患者外周血癌细胞的阳性率分别为70.00%, 60.00%和36.57%(C与A比较,  $\chi^2=5.79$ ,  $P < 0.05$ ; C与B比较,  $\chi^2=4.92$ ,  $P < 0.05$ ).

结论: 在检测胃癌患者外周血癌细胞的实验中, 联用阴性和阳性免疫磁珠可减少来自外周血白细胞的污染。

陈健, 郭俊明, 金之瑾, 肖丙秀. 3种富集胃癌患者外周血中胃癌细胞方法的比较. 世界华人消化杂志 2004;12(2):461-464

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/461.asp>

#### 0 引言

现代肿瘤学认为, 实体恶性肿瘤的血道转移是一相对早期事件<sup>[1]</sup>. 在外周血中发现癌细胞的患者应采取有效的监测措施. 胃癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 建立检测外周血胃癌细胞的有效方法显得非常必要. 免疫磁珠技术是近年来发展起来的一种新技术, 已被应用于肿瘤学领域中<sup>[2-4]</sup>. 为建立一种较为理想的富集外周血实体瘤细胞的方法, 本研究比较了采用阴性、阳性免疫磁珠和联用2磁珠富集胃癌患者外周血癌细胞的情况。

#### 1 材料和方法

1.1 材料 胃癌30例取自2002-08/2003-03在宁波大学医学院附属医院的住院患者, 均经病理确诊. 男19例, 女11例, 年龄 $65 \pm 12$ 岁. 临床分期: I期3例, II期6例, III期8例和IV期13例. 人胃黏膜腺癌细胞系MGC-803购自中国科学院上海细胞库. RPMI-1640培养液为美国Gibco BRL公司产品. 小牛血清为杭州四季青公司产品. 抗人CD45免疫磁珠和抗人Ber-EP4免疫磁珠分别购自宁波新芝生物科技股份有限公司和挪威Dyna公司. RNeasy Mini RNA提取试剂盒和SYBR Green一步法逆转录-PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒均由德国Qiagen公司生产. LightCycler荧光定量PCR仪由德国Roche公司生产。

#### 1.2 方法

1.2.1 胃癌细胞稀释实验 MGC-803细胞置于含100 mL/L小牛血清的RPMI-1640培养液中,  $37^\circ\text{C}$ 、50 mL/L  $\text{CO}_2$ 培养. 细胞用0.5 g/L EDTA消化后准确计数. 用磷酸盐缓冲液(PBS)将细胞稀释后加入到健康人血中, 使每毫

升含癌细胞数分别为  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^1$ ,  $1$ .

1.2.2 单核细胞分离 取患者外周血或上述制备的含胃癌细胞的血液 4 mL, EDTA 抗凝. 用等体积 Hank' s 液稀释, 然后用淋巴细胞分离液分离单核细胞(mononuclear cells, MNC).

1.2.3 实验方法分类 获得的 MNC 等分成 3 份, 分别进行处理: (1)A 方法(阴性磁珠法): 加入  $25 \mu\text{L}$  ( $1 \times 10^7$ ) 抗人 CD45 免疫磁珠, 室温下混匀 30 min. 在磁场中吸取上清, 1 000 rpm 室温下离心 5 min, 收集细胞. (2)B 方法(阳性磁珠法): 加入  $25 \mu\text{L}$  ( $1 \times 10^7$ ) 上皮细胞特异性的抗人 Ber-EP4 免疫磁珠, 混匀 30 min ( $4^\circ\text{C}$ ). 在磁场中放置 3 min ( $4^\circ\text{C}$ ), 弃上清. 加  $800 \mu\text{L}$  PBS 清洗磁珠 5 次. (3) C 方法(联用阴性和阳性磁珠法): 先后使用 CD45 磁珠和 Ber-EP4 磁珠. 然后常规制作细胞涂片和 HE 染色. 按照 Mattsson et al [5] 报道的方法, 细胞结合 3 个及以上的磁珠为阳性.

1.2.4 总 RNA 提取 按 RNeasy Mini RNA 提取试剂盒说明书提取.

1.2.5 引物 扩增看家基因  $\beta 2$  微球蛋白( $\beta 2$  microglobulin,  $\beta 2\text{MG}$ ) mRNA 的引物序列为: ACCCCCACTGAAAAAGATGA (正义链) 和 ATCTTCAAACCTCCATAGTG (反义链) [6].

1.2.6 荧光定量 RT-PCR 用 SYBR Green 一步法 RT-PCR 试剂盒在 LightCycler 荧光定量 PCR 仪上进行.  $20 \mu\text{L}$  反应体积中含有  $2 \mu\text{L}$  RT-PCR 反应混合物, 引物  $10 \text{ pmol}$ , RNA  $8 \mu\text{L}$ . 逆转录反应在  $50^\circ\text{C}$  进行 20 min, 随后  $95^\circ\text{C}$  保温 15 min. PCR 反应的参数为:  $94^\circ\text{C}$  15 s,  $50^\circ\text{C}$  25 s,  $72^\circ\text{C}$  20 s, 共 40 个循环.  $\beta 2\text{MG}$  mRNA 的定量以扩增曲线的交叉点(crossing point, Cp)的数值来表示. 产物特异性经解链曲线分析确定.

统计学处理 应用 SPSS(10.0) 统计学软件对结果进行分析. 通过计算相关系数  $r$  来确定 Cp 值与细胞数的关系, 阳性率比较采用  $\chi^2$  检验. 以  $P < 0.05$  有统计学意义.

## 2 结果

2.1 细胞形态学观察 健康人血中加入 MGC-803 细胞, 经阴性磁珠筛选去除了绝大多数白细胞, 保留了癌细胞和少量白细胞(图 1). 用阳性筛选和联用阴、阳性磁珠富集的癌细胞与磁珠呈玫瑰花样结合(图 2, 3). 中间直径大者为胃癌细胞, 其余为白细胞.

2.2 MGC-803 细胞稀释实验结果 MGC-803 细胞加入到正常人外周血中, 经 3 种方法富集癌细胞, 然后用 RT-PCR 检测  $\beta 2\text{MG}$  mRNA 的量(图 4A). 经解链曲线分析各方法扩增产物的  $T_m$  值一致, 并与阳性对照的  $T_m$  值吻合(图 4B). 说明 RT-PCR 的特异性好. 阴性对照均未见扩增, 表明无污染(图 4).  $\beta 2\text{MG}$  mRNA 的 Cp 值与细胞数成负相关(A 方法,  $r=0.848$ ,  $P < 0.05$ ; B 方法,  $r=0.988$ ,  $P < 0.01$ ; C 方法,  $r=0.959$ ,  $P < 0.01$ ; 表 1). 在含相等癌细胞的血液中, C 方法的 Cp 值均大于 A 和 B 方法的 Cp 值, 其灵敏度为每 mL 血含 1 个癌细胞(表 1).

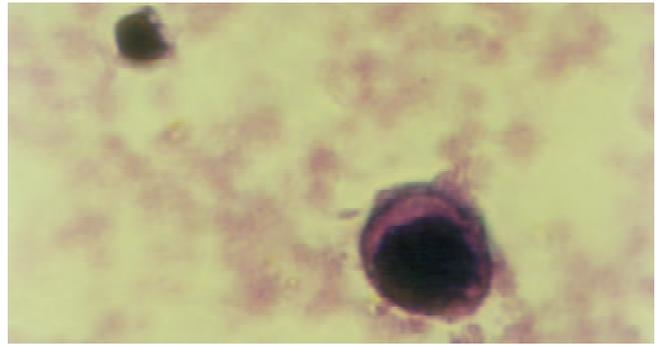


图 1 用阴性免疫磁珠去除白细胞后检测到的胃癌细胞(HE染色,  $\times 1000$ ).

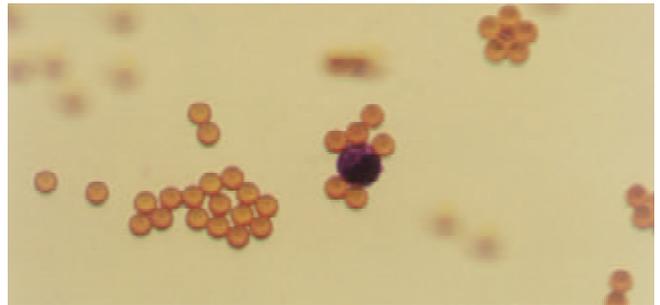


图 2 用阳性免疫磁珠筛选到的胃癌细胞(HE染色,  $\times 400$ ).



图 3 联用阴性和阳性免疫磁珠筛选到的胃癌细胞(HE染色,  $\times 1000$ ).

表 1 健康人血中加入胃癌细胞后  $\beta 2\text{MG}$  mRNA RT-PCR 测定的 Cp 值

癌细胞数( $n/\text{mL}$ )	A 方法 <sup>a</sup>	B 方法 <sup>b</sup>	C 方法 <sup>b</sup>
$1 \times 10^4$	19.35	18.87	21.21
$1 \times 10^3$	20.00	23.80	26.87
$1 \times 10^2$	20.46	24.56	27.19
$1 \times 10^1$	20.91	24.89	27.22
$1 \times 10^0$	21.09	25.50	29.30

数据为 2 次 RT-PCR 结果的平均数. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ .

2.3 胃癌患者  $\beta 2\text{MG}$  mRNA 检测结果 由于细胞数与 Cp 值呈负相关(表 1), 故以各方法的最低检测灵敏度的 Cp 值作为阳性结果判断的临界值. 30 例胃癌患者的结果显示, A、B 和 C 方法的阳性率分别为 70.00%、60.00% 和 36.67%. C 与 A 比较,  $\chi^2=5.79$ ,  $P < 0.05$ ; C 与 B 比较,  $\chi^2=4.92$ ,  $P < 0.05$ . C 方法阳性病例与病期的关系为: I 期 0.00% (0/3), II 期 33.33% (2/6), III 期 37.50% (3/8), IV 46.15% (6/13).

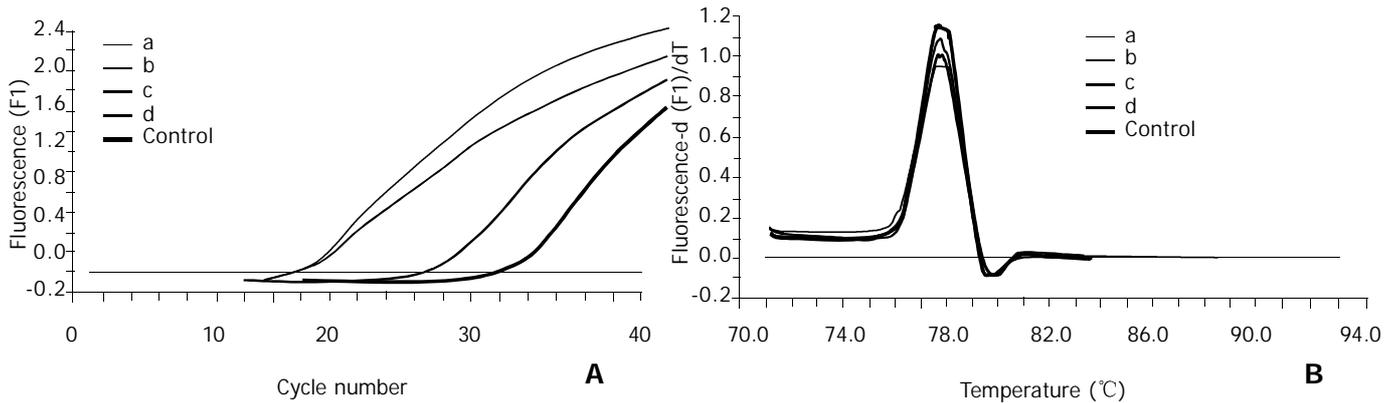


图4  $\beta 2$  微球蛋白 mRNA 定量 RT-PCR 检测结果. (A) 及其解链曲线分析(B). a: 阳性对照, MNC 未经免疫磁珠筛选; b: 阴性免疫磁珠筛选; c: 阳性免疫磁珠筛选; d: 联用阴性和阳性免疫磁珠筛选; control. 无 RNA 对照.

### 3 讨论

外周血肿瘤微转移的检测对于治疗方案的选择具有重要意义, 而瘤细胞的富集可提高 RT-PCR、免疫组织化学、端粒酶活性分析和流式细胞术等分析肿瘤细胞方法的灵敏度和特异度<sup>[2, 7-8]</sup>. 免疫磁珠可应用于富集外周血、淋巴结、胸腹水、尿液等中的癌细胞, 可分为阳性筛选和阴性筛选<sup>[4]</sup>. 对于上皮性肿瘤来说, Ber-EP4 磁珠和 CD45 磁珠分别为阳性磁珠和阴性磁珠<sup>[4, 7, 9]</sup>.

根据荧光定量 RT-PCR 的原理, 扩增曲线的 Cp 值与被检测 mRNA 的拷贝数呈负相关, 可以代表 mRNA 的拷贝数<sup>[10]</sup>. 有多项研究认为  $\beta 2$ MG 是最合适的参照基因<sup>[11-13]</sup>. 定量检测  $\beta 2$ MG mRNA 已成功用于微量残留白血病的监测中<sup>[11]</sup>. 本研究的胃癌微转移的模型实验结果显示,  $\beta 2$ MG mRNA 扩增曲线的 Cp 值与细胞数间有良好的相关性, 尤其是联用 2 类磁珠时相关性更好(表 1). 荧光定量 RT-PCR 在封闭的毛细管中进行, 无需扩增后的产物分析(如: 电泳), 可避免产物对反应的污染; 实验结果通过 Cp 值来反映, 不受循环数的影响.

使用免疫磁珠富集外周血中的肿瘤细胞时, 有可能存在一定数目的血细胞的污染. de Cremoux et al<sup>[7]</sup>报道, 大约有 100 个白细胞的污染. 本研究结果显示, 在正常人外周血中混入胃癌细胞后, 用联用磁珠方法检测到的  $\beta 2$ MG mRNA 的 Cp 值明显比相应的单用阳性或阴性磁珠测出的值大(表 1); 涂片镜检也发现阴性筛选后仍可见少数白细胞(图 1). 这说明单用免疫磁珠有白细胞的污染. Ikeguchi et al<sup>[14]</sup>以细胞角蛋白 20 mRNA 作为胃癌细胞的分子标志, 发现癌细胞的阳性率为 33.3%. 此结果明显低于本实验单独使用一种磁珠的结果. 提示单独使用一种免疫磁珠会造成白细胞的污染. 因外周血微转移的检测对于肝癌<sup>[15-17]</sup>、胃癌<sup>[18]</sup>和肠癌<sup>[19-20]</sup>等的诊断、判断转移和指导预后等有较大的临床意义, 所以, 本文报道的方法对进一步提高实体瘤血道微转移检测水平可能有较大的应用价值.

### 4 参考文献

1 Heiss MM, Allgayer H, Gruetzner KU, Funke I, Babic R, Jauch

- KW, Schildberg FW. Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumor cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer. *Nat Med* 1995;1:1035-1039
- 2 Nakamura T, Yasumura T, Hayashi K, Eguchi R, Ide H, Takasaki K, Kasajima T. Immunocytochemical detection of circulating esophageal carcinoma cells by immunomagnetic separation. *Anticancer Res* 2000;20:4739-4744
- 3 Denis MG, Lipart C, Leborgne J, LeHur PA, Galmiche JP, Denis M, Ruud E, Truchaud A, Lustenberger P. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 1997;74:540-544
- 4 Zigeuner RE, Riesenberger R, Pohla H, Hofstetter A, Oberneder R. Immunomagnetic cell enrichment detects more disseminated cancer cells than immunocytochemistry *in vitro*. *J Urol* 2000;164:1834-1837
- 5 Mattsson L, Bondjers G, Wiklund O. Isolation of populations from arterial tissue, using monoclonal antibodies and magnetic microspheres. *Atherosclerosis* 1991;89:25-34
- 6 Burchill SA, Bradbury MF, Pittman K, Southgate J, Smith B, Selby P. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1995;71:278-281
- 7 de Cremoux P, Extra JM, Denis MG, Pierga JY, Bourstyn E, Nos C, Clough KB, Boudou E, Martin EC, Muller A, Pouillart P, Magdelenat H. Detection of MUC1-expressing mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients by real-time polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res* 2000;6:3117-3122
- 8 Soria JC, Gauthier LR, Raymond E, Granotier C, Morat L, Armand JP, Boussin FD, Sabatier L. Molecular detection of telomerase-positive circulating epithelial cells in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 1999; 5:971-975
- 9 Iinuma H, Okinaga K, Adachi M, Suda K, Sekine T, Sakagawa K, Baba Y, Tamura J, Kumagai H, Ida A. Detection of tumor cells in blood using CD45 magnetic cell separation followed by nested mutant allele-specific amplification of p53 and K-ras genes in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer* 2000; 89:337-344
- 10 Emig M, Saussele S, Wittor H, Weisser A, Reiter A, Willer A, Berger U, Hehlmann R, Cross NC, Hochhaus A. Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia* 1999;13:1825-1832
- 11 Degan M, Mazzocco FT, Di Francia R, Rossi FM, Pinto A, Gattei V. Normalizing complementary DNA by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction of beta2-microglobulin: molecular monitoring of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia. *Diagn Mol Pathol* 2000; 9:98-109
- 12 Lupberger J, Kreuzer KA, Baskaynak G, Peters UR, le Coutre P, Schmidt CA. Quantitative analysis of beta-actin, beta-2-microglobulin and porphobilinogen deaminase mRNA and their comparison as control transcripts for RT-PCR. *Mol Cell Probes* 2002;16:25-30

- 13 Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experiment treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 2000;46:69-81
- 14 Ikeguchi M, Ohro S, Maeda Y, Fukuda K, Yamaguchi K, Shirai H, Kondo A, Tsujitani S, Kaibara N. Detection of cancer cells in the peripheral blood of gastric cancer patients. *Int J Mol Med* 2003;11:217-221
- 15 张开泰, 韩本立, 王玉芝. 肝细胞性肝癌 AFP-mRNA 检测外周血癌细胞的价值. *华人消化杂志* 1998;6:689-691
- 16 邬光惠, 陈乃玲, 范公忍, 田惠英, 熊锦华, 黄耀煌. 原发性肝癌患者外周血中甲胎蛋白 mRNA 的意义. *世界华人消化杂志* 1999;7:153-155
- 17 刘迎娣, 杨德利, 梁敏, 梁浩, 孙晓华, 程留芳, 汪鸿志. 原发性肝癌患者手术前后外周血 AFPmRNA 测定的意义. *世界华人消化杂志* 1999;7:925
- 18 章希炜, 范萍, 杨宏宇, 杨力, 陈国玉. CK20 mRNA RT-PCR 检测诊断胃癌微小转移. *世界华人消化杂志* 2002;10:1463-1464
- 19 杨家辉, 饶本强, 王瑶, 涂小煌, 张连阳, 陈少华, 欧阳学农, 戴西湖. 大肠癌患者外周血循环癌细胞检测的临床意义. *世界华人消化杂志* 2000;8:187-189
- 20 王志伟, 陈瑞新, 周广军, 沈洪薰, 陈玉泉. 大肠癌患者外周血 CK20 mRNA 的表达. *世界华人消化杂志* 2000;8:818-820

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

• 研究快报 •

## 肠缺血再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输功能的影响

黎君友, 孙丹, 吕艺, 晋桦, 胡森, 盛志勇

黎君友, 孙丹, 吕艺, 晋桦, 胡森, 盛志勇, 中国人民解放军第 304 医院全军烧伤研究所基础部 北京市 100037  
 项目负责人: 黎君友, 100037, 北京市海淀区阜成路 51 号, 中国人民解放军第 304 医院全军烧伤研究所基础部. lijunyou2003@yahoo.com.cn  
 电话: 010-66867395 传真: 010-68429998  
 收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-07-24

### 摘要

目的: 从不同角度探讨大鼠肠缺血再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输等功能的影响, 为更深入地研究肠道损伤及其保护提供防治依据。

方法: 以 Wistar 大鼠肠缺血再灌注(I/R)作模型, 将动物随机分为健康对照(C)、肠系膜上动脉夹闭 1 h(I)、夹闭后再灌 1 h(R 1h)、2 h(R 2h)和 4 h(R 4h)共 5 个组. 分别测血或小肠组织的二胺氧化酶(DAO)、D-乳酸、D-木糖、肠传输、脂质过氧化物(MDA)和髓过氧化物酶(MPO), 并作小肠普通光镜检查。

结果: R 1h 和 R 4h 组的血浆 DAO 显著升高(R 1h  $1.60 \pm 0.53$ , R 4h  $1.58 \pm 0.63$  vs C  $0.94 \pm 0.30$ ,  $P < 0.05$ ), 小肠 DAO 各组有不同程度的降低, R 2h 组降低显著(R 2h  $2.52 \pm 0.49$  vs C  $3.59 \pm 1.18$ ,  $P < 0.05$ ), 血浆和小肠 DAO 的变化呈负相关( $r = -0.648$ ,  $P < 0.05$ ). 缺血和再灌注后各时相点血 D-乳酸浓度升高, 其中 R 1h 和 R 2h 升高显著(R 1h  $4.63 \pm 1.13$ , R 2h  $3.58 \pm 0.57$  vs C  $2.31 \pm 0.89$ ,  $P < 0.05$ ). 缺血再灌注后肠道 D-木糖的吸收增加, 小肠的传输显著加快。

结论: 肠缺血和再灌注后小肠的屏障、吸收、通透和传输功能均显示不同程度的改变。

黎君友, 孙丹, 吕艺, 晋桦, 胡森, 盛志勇. 肠缺血再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输功能的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):464-466

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/464.asp>

### 0 引言

近 20 a 的研究表明肠道在 MODS 发生发展过程中具有重要作用<sup>[1-6]</sup>, 为此建立了多种创伤动物模型<sup>[7-10]</sup>, 旨在探讨其发病机制<sup>[11-17]</sup>, 其中尤以肠黏膜屏障功能损害及其保护具有重要临床意义<sup>[18-22]</sup>. 本研究拟从大鼠肠缺血再灌注模型中, 动态地探讨肠系膜上动脉缺血后再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输等方面功能的影响。

### 1 材料和方法

1.1 材料 健康 ♂ Wistar 大鼠 42 只, 体质量 180-240 g, 购自军事医学科学院动物中心. 动物经适应性饲养 1-2 wk 后, 随机分为对照组(C)、肠系膜上动脉夹闭 1 h(I)、夹闭后再灌 1 h(R 1h)、2 h(R 2h)和 4 h(R 4h)5 组, 每组 7-10 只动物, 禁食过夜, 自由饮水. 大鼠腹腔注射 30 g/L 的戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉后, 常规消毒取腹正中切口, 游离肠系膜上动脉(SMA), 以无损动脉夹夹闭 SMA 起始部, 1 h 后松夹恢复 SMA 血流, 即为肠缺血-再灌注模型. 对照组行同样步骤, 但不夹闭 SMA. 全部动物按不同时间点活杀取血和小肠组织制作样品。

1.2 方法 血和小肠组织二胺氧化酶(DAO)测定采用黎君友 et al<sup>[23]</sup>稍作方法调整的 DAO 法测定血和小肠组织 DAO 活性; 以 Brandt et al<sup>[24]</sup>方法测血浆 D-乳酸含量; 以 Eberts et al<sup>[25-26]</sup>方法作适当调整测血浆 D-木糖含量; 以胃内注射葡聚糖蓝(0.5 g/mL)动物活杀后, 取小肠全长, 以 5 g 天平法码垂挂量小肠全长, 然后再量葡聚糖蓝染色长度, 以计算动物小肠传输百分率<sup>[27]</sup>. 参考 Koike 和 Mullane 方法<sup>[28-29]</sup>作适当修改测定小肠组织髓过氧化物酶活性(MPO). 小肠组织丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量采用 TBA 分光光度法测定<sup>[30]</sup>. 光镜下观察小肠组织形态学变化。

统计学处理 数据以均值加减标准差表示(mean±SD),

采用 t 检验、 $\chi^2$  检验和相关分析。

## 2 结果

肠缺血和再灌注后各时相点血浆 DAO 活性较 C 组升高, 其中在 R 1 h 和 R 4h 显著升高( $P < 0.05$ ), 而小肠 DAO 活性各组有不同程度的降低, 其中 R 2 h 降低显著( $P < 0.05$ ), 血浆与小肠 DAO 活性的变化显示负相关( $r = -0.648$ ,  $P < 0.05$ ); 血浆 D-乳酸含量在 I、R 1 h 和 R 2 h 升高显著; 肠缺血和再灌注后小肠葡聚糖蓝的染色

的百分长度较 C 组显著增加( $P < 0.05$ , 表 1); 缺血和再灌注后各时相点小肠的 MDA 含量升高, R 4 h 升高显著( $P < 0.05$ ); 缺血和再灌注后除 R 2 h 显著升高(R 2 h  $40.4 \pm 12.7$  vs C  $26.2 \pm 14.1$ ,  $P < 0.05$ )外未见小肠组织 MPO 升高(表 2). 缺血再灌注后血 D-木糖浓度较 C 组高(表 3); 血浆 DAO 活性与血浆 D-乳酸浓度呈正相关( $r = 0.585$ ,  $P < 0.05$ ), 小肠组织 MDA 与 MPO 呈负相关( $r = 0.554$ ,  $P < 0.05$ )(表 4). 小肠组织染色光镜检查见小肠绒毛较多嗜酸性粒细胞, 有少量淋巴细胞浸润, 小肠绒毛出血。

表 1 肠缺血再灌注大鼠某些肠功能指标的变化

	C	I	R 1 h	R 2 h	R 4 h
血 DAO(u/mL)	$0.94 \pm 0.30$	$1.52 \pm 0.65$	$1.60 \pm 0.53^a$	$1.47 \pm 0.74$	$1.58 \pm 0.63^a$
小肠 DAO(u/g pro)	$3.59 \pm 1.18$	$3.41 \pm 1.05$	$2.94 \pm 1.23$	$2.52 \pm 0.49^b$	$2.71 \pm 0.60$
血 D-乳酸(u/mL)	$2.31 \pm 0.89$	$5.07 \pm 2.19^a$	$4.63 \pm 1.13^a$	$3.58 \pm 0.57^a$	$2.56 \pm 0.66$
小肠传输(%)	$17.30 \pm 4.30$	$28.9 \pm 7.90^a$	$25.4 \pm 5.40^a$	$33.1 \pm 6.30^a$	$27.9 \pm 6.90^a$

<sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照.

表 2 肠缺血再灌注大鼠小肠 MDA 和 MPO 活性的变化

	C	I	R 1 h	R 2 h	R 4 h
MDA(nmol/mg)	$2.84 \pm 0.55$	$3.30 \pm 1.26$	$3.33 \pm 1.18$	$2.51 \pm 0.69$	$3.89 \pm 0.63^b$
MPO(u/g)	$26.2 \pm 14.1$	$27.2 \pm 17.7$	$27.4 \pm 15.4$	$40.4 \pm 12.7^a$	$25.8 \pm 10.5$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照.

表 3 肠缺血再灌注大鼠小肠 D-木糖吸收变化(mg/L)

	1 h	3 h
正常对照组	$30.4 \pm 9.50$	$40.7 \pm 13.0$
缺血再灌注组	$50.1 \pm 23.0$	$47.7 \pm 17.6$

表 4 肠缺血再灌注大鼠某些相关指标的相关分析

X 项	Y 项	r 值	P 值
血 DAO	小肠 DAO	-0.648	<0.05
血 DAO	D-乳酸	0.585	<0.05
小肠 DAO	D-乳酸	0.039	>0.05
MDA	MPO	-0.554	<0.05

## 3 讨论

通过测定血或组织 DAO 的活性变化来反映肠黏膜上皮细胞损伤及肠屏障结构的破坏, 其理由是 DAO 是存在于小肠黏膜上皮细胞内高活性的一种结构酶, 肠黏膜上皮细胞损伤后可释放入血. 这已在不同创伤模型的实验动物和部分临床患者中得以肯定<sup>[31-36]</sup>. 本实验的测定结果也表明血浆 DAO 从肠缺血直到再灌注后 4 h 的各个时相点较缺血前活性增加, 同时也见小肠组织 DAO 活性降低, 血和小肠组织的 DAO 活性呈负相关. 同样,

人们也试图通过测定创伤后血内毒素浓度<sup>[37]</sup>、尿乳果糖、甘露醇的变化<sup>[5]</sup>和血 D-乳酸浓度的变化<sup>[15, 38-39]</sup>间接地反映肠上皮细胞的屏障作用, 细菌和毒素的移位及肠道通透性. 本结果显示血 D-乳酸浓度的升高, 间接地反映细菌及其代谢产物进入循环增加, 因为 D-乳酸是胃肠固有细菌产物, 哺乳类动物不具备其分解代谢的酶系统. DAO 和 D-乳酸变化高度相关表明肠缺血再灌注后确实损伤了肠黏膜的上皮细胞, 改变了小肠的屏障功能, 进而使其通透性增强. 有研究指出, 肠道免疫活性降低与谷氨酰胺保护小肠黏膜通透性有一定关系, 小肠黏膜通透性升高的原因之一是紧密连接松弛<sup>[40-43]</sup>.

如上所述, DAO 反映小肠屏障功能损伤, D-乳酸间接反映肠通透性的改变, 可见肠缺血再灌注后小肠屏障及通透性功能受损. 此时小肠的传输和吸收情况如何, 在创伤休克脓毒症等相关研究中有报告<sup>[44-46]</sup>. 本研究肠道给予葡聚糖蓝染色结果表明, 从小肠缺血到再灌注的各个时相点小肠的染色百分长度显著增加, 同时可见肠缺血再灌注 1 h 血浆 D-木糖的浓度明显高于健康大鼠 1 h 的血浆浓度. 提示肠道损伤使大分子物质通过增加和引起炎症反应, 从而使体液渗出增加, 进而刺激肠道传输加快.

MPO 的激活和 MDA 是反映氧自由基损伤的另一途

径,活化的PMN分泌MPO,催化过氧化氢和氯离子形成次氯酸.强氧化剂次氯酸和超氧阴离子可氧化巯基,使血红蛋白和细胞色素失活,再使蛋白质降解而造成组织细胞损伤.当肠缺血再灌注损伤引起炎症反应时,小肠组织中PMN的滞留及PMN激活后MPO释放产生的过氧化作用可能参与肠组织的损伤过程<sup>[28-30,47]</sup>.本研究见缺血再灌注后2h小肠组织MPO活性显著升高,提示PMN在小肠组织中聚集、活化,是损伤肠组织细胞的病理生理基础之一.同样,肠缺血再灌注时活化的PMN产生和释放的活性氧中间产物可导致脂质过氧化,直接造成内皮细胞的损伤.

#### 4 参考文献

- 1 Marshair JC, Meakins JL. The gut as the "motor" of multiple system organ failure. In Marston GB, Bulkley RG, Fiddian-Green, Haglund V.H. eds, Splanchnic ischemia and multiple organ failure. *St Louis Mosby* 1989:339-348
- 2 Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 1996;20:411-417
- 3 陈海龙, 吴咸中, 裴德凯, 关凤林. 肠道屏障在多器官功能不全综合征中的发病学意义探讨. *中华普通外科杂志* 1998;13:50-53
- 4 姚咏明, 张立天, 陆家齐, 董宁, 于燕, 鄢小建, 方文惠, 盛志勇. 脓毒症大鼠内毒素增敏系统改变与高迁移率族蛋白-1表达的关系. *中华创伤杂志* 2002;18:540-543
- 5 Li JY, Lu Y, Hu S, Sun D, Yao YM. Preventive effect of glutamine on intestinal barrier dysfunction induced by severe trauma. *World J Gastroenterol* 2002;8:168-171
- 6 Moore FA. The role of the gastrointestinal tract in postinjury multiple organ failure. *Am J Surg* 1999;178:449-453
- 7 黎君友, 胡森, 孙晓庆, 严鸣, 晋桦, 姜小国, 孙丹, 周宝桐, 盛志勇. 创伤脓毒症早期病理生理过程的探讨. *中国危重病急救医学* 2001;13:291-294
- 8 Fang WH, Yao YM, Shi ZG, Yu Y, Wu Y, Lu LR, Sheng ZY. The significance of changes in high mobility group-1 protein mRNA expression in rats after thermal injury. *Shock* 2002;17:329-333
- 9 胡森, 盛志勇, 黎君友, 陆江阳, 晋桦, 吕艺, 姜小国, 张蓉. 小剂量酵母多糖诱发肠缺血-再灌注后全身炎症反应和多器官功能障碍综合征. *中国危重病急救医学* 2003;15:11-14
- 10 胡森, 盛志勇, 周宝桐. MODS动物模型研究进展. *中国危重病急救医学* 1999;11:504-507
- 11 黎君友, 吕艺, 付小兵, 晋桦, 胡森, 孙晓庆, 盛志勇. 二胺氧化酶在创伤后肠道损伤中变化及意义. *中国危重病急救医学* 2000;12:482-484
- 12 黎君友, 吕艺, 胡森, 晋桦, 周宝桐, 熊得鑫, 盛志勇. 小肠屏障功能监测的实验研究. *创伤外科杂志* 2001;3:109-112
- 13 于勇, 施志国, 柴家科, 郭振荣, 姚咏明, 李立根, 侯晓霞, 蒋伟, 王海滨, 盛志勇. 严重烧伤患者肠内容的IgA水平变化及其意义. *中国危重病急救医学* 1998;10:725-727
- 14 Doe WF. The intestinal immune system. *Gut* 1989;30:1679-1685
- 15 Murray MJ, Barbose JJ, Cobb CF. Serum D(-)-lactate levels as a predictor of acute intestinal ischemia in a rat model. *J Surg Res* 1993;54:507-509
- 16 吴志谷, 盛志勇, 耿森, 周宝桐, 胡森, 黄凯, 付小兵. 自制胃肠黏膜内pH测试囊在严重创伤实验研究中的应用. *世界华人消化杂志* 2000;8:1287-1288
- 17 Zhou X, Li YX, Li N, Li JS. Effect of bowel rehabilitative therapy on structural adaptation of remnant small intestine: animal experiment. *World J Gastroenterol* 2001;7:66-73
- 18 杨银辉, 付小兵, 孙同柱, 陈伟, 邢峰, 黎君友. 碱性成纤维细胞生长因子对缺血-再灌注损伤后肠道细胞信号转导途径的影响. *中国危重病急救医学* 2002;14:407-410
- 19 Heithan TH, Kone BC, Mercer DW, Moody FG, Weisbrodt NW, Moore FA. Postinjury multiple organ failure: the role of the gut. *Shock* 2001;15:1-10
- 20 Hu S, Sheng ZY. The effects of anisodamine and dobutamine on gut mucosal blood flow during gut ischemia/reperfusion. *World J Gastroenterol* 2002;8:555-557
- 21 黎君友, 吕艺, 薛立波, 王淑英, 孙世荣, 于燕, 许惠君, 盛志勇. 口服谷氨酰胺对烫伤大鼠小肠功能和结构的影响. *解放军医学杂志* 1996;21:91-93
- 22 Tazuke Y, Wasa M, Shimizu Y, Wang HS, Okada A. Alanine-glutamine-supplemented parenteral nutrition prevents intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Parenter Enteral Nutr* 2003;27:110-115
- 23 黎君友, 于燕, 郝军, 晋桦, 许惠君. 分光光度法测定血和小肠组织二胺氧化酶活性. *氨基酸和生物资源* 1996;18:28-30
- 24 Brandt RB, Siegel SA, Waters MG, Bloch MH. Spectrophotometric assay for D(-)-lactate in plasma. *Anal Biochem* 1980;102:39-46
- 25 Eberts TJ, Sample RH, Glick MR, Ellis GH. A Simplified, colorimetric micromethod for xylose in serum or urine, with phloroglucinol. *Clin Chem* 1979;25:1440-1443
- 26 Li JY, Sun D. Experimental study of gut absorptive capacity after trauma detected by D-xylose content test with micromethod. *Chinese J Clin Rehabil* 2003;7:2810-2811
- 27 Cullen JJ, Doty RC, Ephgrave KS, Hinkhouse MM, Broadhurst K. Changes in intestinal transit and absorption during endotoxemia are dose dependent. *J Surg Res* 1999;81:81-86
- 28 Koike K, Moore FA, Moore EE, Poggetti RS, Tuder RM, Banerjee A. Endotoxin after gut ischemia/reperfusion causes irreversible lung injury. *J Surg Res* 1992;52:656-662
- 29 Mullane KM, Kraemer R, Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods* 1985;14:157-167
- 30 Ohkawa H, Ohish N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358
- 31 张连阳, 王正国, 朱佩芳, 秦红军, 唐苏雅拉图. 大鼠失血性休克复苏后肠屏障功能障碍. *世界华人消化杂志* 2001;9:767-770
- 32 于勇, 黎君友, 姚咏明, 于燕, 陆连荣. 烧伤后回肠组织二胺氧化酶活性变化的动态观察. *氨基酸和生物资源* 2000;22:47-49
- 33 吕艺, 黎君友, 孙世荣, 晋桦, 姜小国, 孙晓庆, 盛志勇. 肠缺血-再灌注大鼠血浆二胺氧化酶活性的变化与肠损伤的关系. *氨基酸和生物资源* 2000;22:50-54
- 34 黎君友, 孙世荣, 薛立波, 吕艺, 晋桦, 郭振荣. 烧伤后二胺氧化酶活性的变化. *中华整形外科杂志* 1997;13:40-42
- 35 吴承堂, 黎沾良. 二胺氧化酶在急性坏死性胰腺炎肠道损伤中的作用. *世界华人消化杂志* 1999;7:64-65
- 36 黎君友, 吕艺, 晋桦, 孙晓庆, 姜小国, 盛志勇. 创伤后血二胺氧化酶的变化与肠黏膜的损伤. *氨基酸和生物资源* 1999;21:17-19
- 37 姚咏明, 田惠民, 王亚平, 于燕, 施志国. 氨酸新法预处理血浆定量检测微量内毒素的鲎试验方法及其应用. *上海医学检验杂志* 1993;8:31-33
- 38 孙晓庆, 付小兵, 张蓉, 吕艺, 邓群, 张诚, 姜小国, 盛志勇. 创伤后肠道通透性改变血浆标志物D-乳酸的实验研究. *中国危重病急救医学* 2000;12:476-478
- 39 Murray MJ, Gonze MD, Nowak LR, Cobb CF. Serum D(-)-lactate levels as an aid to diagnosing acute intestinal ischemia. *Am J Surg* 1994;167:575-578
- 40 Hulst VD, Prof VM, Tiebosch A, Buurman WA, Soeters PB. Original communications glutamine and intestinal immune cells in humans. *JPEN* 1997;21:310-315
- 41 杨俊涛, 王正国, 朱佩芳. 谷氨酰胺对创伤大鼠细胞免疫功能的影响. *营养学报* 1999;21:8-12
- 42 邢峰, 郭宝琛, 黎君友, 孙同柱, 杨银辉, 陈伟, 付小兵. 表皮生长因子对大鼠肠缺血-再灌注所致肠黏膜通透性改变的影响. *中国危重病急救医学* 2002;14:650-653
- 43 黎君友, 吕艺, 薛立波. 烫伤大鼠早期口服谷氨酰胺对血浆氨基酸代谢的影响. *氨基酸和生物资源* 2000;22:51-56
- 44 Singh G, Harkema JM, Mayberry AJ, Chaudry IH. Severe depression of gut absorptive capacity in patients following trauma or sepsis. *J Trauma* 1994;36:803-808
- 45 Singh G, Chaudry KI, Chudler LC, Chaudry IH. Depressed gut absorptive capacity early after trauma-hemorrhagic shock. Restoration with diltiazem treatment. *Ann Surg* 1991;214:712-718
- 46 Singh G, Chaudry KI, Chudler LC, O'Neil PJ, Chaudry IH. Measurement of D-xylose gut absorptive capacity in conscious rats. *Am J Physiol* 1991;261(5 Pt 2):1313-1320
- 47 黎君友, 孙世荣, 严鸣, 吕艺, 胡森, 孙晓庆, 晋桦, 姜小国, 盛志勇. 低血容量休克复合内毒素血症时血和组织髓过氧化物酶的变化. *氨基酸和生物资源* 2000;22:43-46

# MUC5AC 蛋白在大肠肿瘤中的表达及意义

卜晓东, 李 俐, 黄培林, 樊克武, 赵建华

卜晓东, 黄培林, 东南大学基础医学院病理教研室 江苏省南京市 210009  
李俐, 樊克武, 赵建华, 南京市第一医院病理科 江苏省南京市 210006  
项目负责人: 卜晓东, 210009, 江苏省南京市丁家桥 87 号, 东南大学基础医学院病理教研室. bxd-74@163.com  
电话: 025-3272507 传真: 025-3324887  
收稿日期: 2003-04-04 接受日期: 2003-06-02

## 摘要

目的: 探讨大肠肿瘤组织中MUC5AC蛋白的表达情况及其意义.

方法: 采用S-P免疫组化法对10例正常大肠黏膜及60例大肠肿瘤石蜡包埋标本中MUC5AC蛋白的表达进行了检测, PBS代替一抗作为阴性对照.

结果: 正常大肠黏膜几乎不表达MUC5AC蛋白. 肿瘤组织中MUC5AC的总阳性率为46.67%(28/60), 其中, 大肠腺瘤(100%, 10/10)与印戒细胞癌(70%, 7/10)中表达率较高, 与高、中、低分化的腺癌及黏液腺癌相比, MUC5AC的表达具有显著性差异( $P < 0.05$ ).

结论: MUC5AC表达的异常变化可能是大肠肿瘤发生过程中的早期事件.

卜晓东, 李俐, 黄培林, 樊克武, 赵建华. MUC5AC 蛋白在大肠肿瘤中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2004;12(2):467-469  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/467.asp>

## 0 引言

MUC5AC 与 MUC2、MUC5B、MUC6 基因都位于染色体11p15, 各自编码不同的黏液核心蛋白, 正常情况下, MUC5AC 多表达于胃和呼吸道黏膜的上皮细胞, 在大肠黏膜中很少检测到. 为了探讨MUC5AC在大肠肿瘤恶变过程中的变化及意义, 我们采用免疫组织化学方法对正常大肠黏膜和大肠肿瘤中MUC5AC蛋白的表达进行了检测.

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集南京市第一医院病理科存档的手术切除大肠肿瘤石蜡标本. 其中腺瘤、高分化腺癌、中分化腺癌、低分化腺癌、黏液腺癌及印戒细胞癌各 10 例, 另取 10 例距肿瘤边缘 5-10 cm 以上正常黏膜石蜡标本作为对照. 各标本均经 HE 染色, 病理确诊.

1.2 方法 每例标本连续 4  $\mu\text{m}$  切片, 按照 S-P 法进行染色, 同时用 PBS 代替一抗设阴性对照. 即用型抗 MUC5AC 单克隆抗体与 S-P 试剂盒均购自福州迈新生物技术开发公司. 结果判断: 以分泌细胞胞质和/或周围

出现棕黄色物质为阳性表达, 根据染色强度和阳性细胞数(25% 为一级)分为: 阴性(-); 弱阳性(+); 阳性(++); 强阳性(+++), 每张切片均随机观察 10 个高倍视野, 计算其平均值.

统计学处理 采用 $\chi^2$ 检验和精确概率法分析组间差异.

## 2 结果

正常大肠黏膜中偶见 MUC5AC 阳性的分泌细胞(0/10), 但肿瘤组织中均可见不同程度的阳性表达, 其中腺瘤的阳性率为 100% (10/10), 高、中、低分化腺癌中的阳性率分别为 30%(3/10)、30%(3/10)和 20%(2/10), 黏液腺癌中 MUC5AC 的阳性率为 30%(3/10), 而在印戒细胞癌中, 其阳性率为 70%(7/10)(表 1, 图 1-5).

表 1 MUC5AC 在正常大肠黏膜及肿瘤组织中的表达

	n	MUC5AC				阳性率(%)
		-	+	++	+++	
正常大肠黏膜	10	10	0	0	0	0
腺瘤	10	0	2	4	4	100
高分化腺癌	10	7	1	1	1	30
中分化腺癌	10	7	2	1	0	30
低分化腺癌	10	8	2	0	0	20
黏液腺癌	10	7	2	0	1	30
印戒细胞癌	10	3	4	2	1	70

统计学分析显示, 大肠腺瘤与高、中、低分化腺癌及黏液腺癌相比, MUC5AC 蛋白的表达具有显著性差异( $P < 0.05$ ). 不同分化程度的腺癌之间以及腺癌与黏液腺癌之间, MUC5AC 的表达未见显著差异( $P > 0.05$ ). 此外, 大肠印戒细胞癌中 MUC5AC 的阳性率也较高, 与高、中、低分化腺癌及黏液腺癌相比, 有显著性差异 ( $P < 0.05$ ).

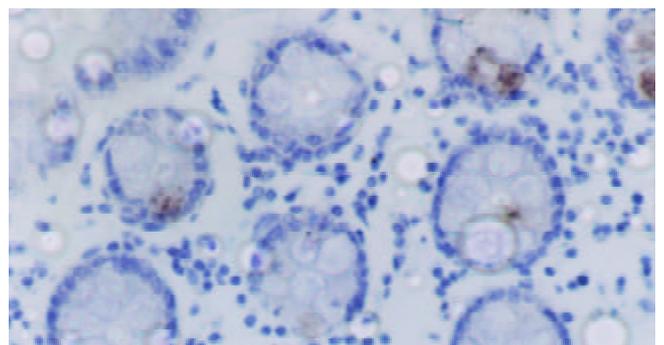


图 1 正常大肠黏膜中偶见 MUC5AC 蛋白阳性细胞(SP × 100).

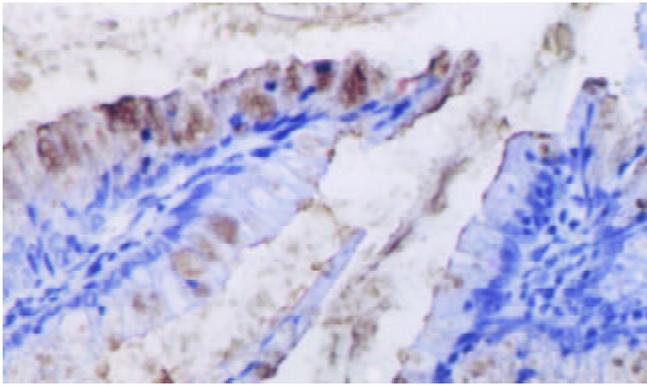


图2 大肠腺瘤中 MUC5AC 蛋白高表达, 阳性部位主要为分泌细胞胞质及管腔面(SP × 100).

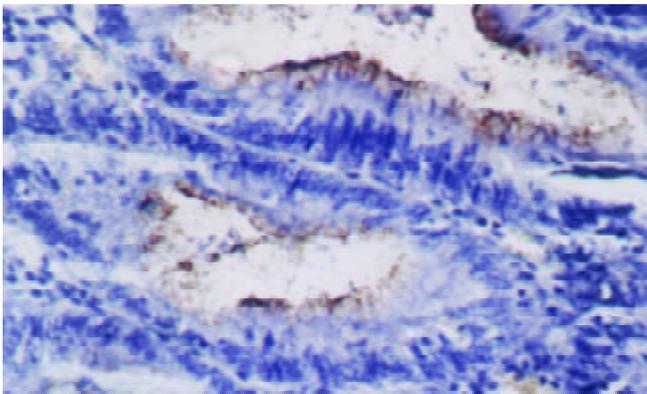


图3 大肠腺瘤中 MUC5AC 蛋白的阳性部位主要为分泌细胞管腔面(SP × 100).

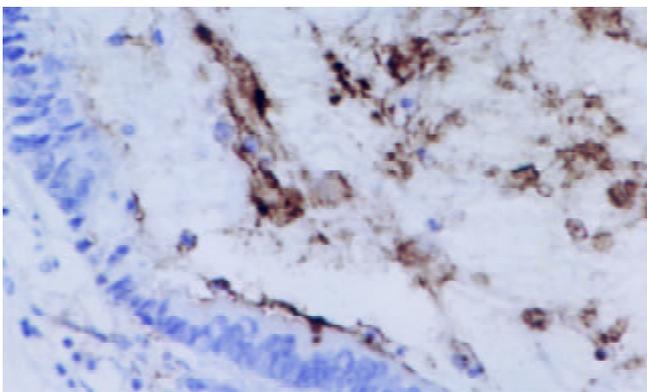


图4 大肠黏液腺癌的黏液湖中可见 MUC5AC 蛋白的表达(SP × 100).

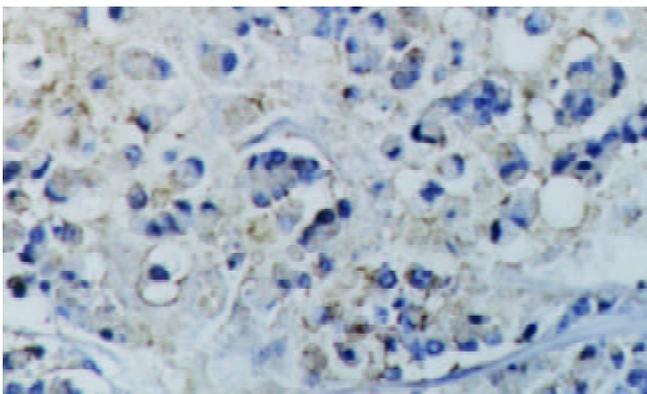


图5 大肠印戒细胞癌中 MUC5AC 蛋白弥漫表达于肿瘤细胞胞质(SP × 100).

### 3 讨论

黏液核心蛋白 MUC5AC 在正常大肠黏膜中几乎不表达, 但是, 在大肠腺瘤及腺癌中, 常可见不同程度的阳性表达<sup>[1-3]</sup>, 尤其在腺瘤组织中, 其表达率较高. Longman et al<sup>[4]</sup> 研究显示, MUC5AC 在 10/11 的绒毛状腺瘤以及 5/11 的管状绒毛状腺瘤中均有表达. 在腺瘤和腺癌黏膜中, MUC5AC 编码的抗原表型有所不同<sup>[5]</sup>. 结直肠肿瘤中 MUC5AC 的异常表达可能在腺瘤到腺癌的发展过程中具有一定的意义<sup>[6-7]</sup>. 本实验结果显示, MUC5AC 在大肠腺瘤组织中高度表达, 而完全癌变的腺癌及黏液腺癌组织中, 其表达水平均明显降低(与腺瘤相比,  $P < 0.05$ ). 与分泌缺乏 MUC5AC 核心蛋白黏液的正常大肠黏膜相比, 腺瘤组织中分泌细胞的数量不仅增加, 而且其分泌黏液的性状也发生了“质”的改变, 随着腺瘤中分泌细胞异型增生程度的增加, 其分泌功能逐渐下降, 胞质分泌空泡减少, 逐渐演变为 MUC5AC 表达较低的腺癌. 因此, MUC5AC 的过度表达可能是大肠黏膜上皮细胞恶变的早期事件, 细胞分泌的黏液性状的变化, 可能会在细胞恶变过程中发挥一定作用. 有人认为, 对腺瘤术后患者进行 MUC5AC 的检测, 将有利于预测其复发的可能性<sup>[8]</sup>.

有关 MUC5AC 表达的调控机制, 尚未完全明了. MUC5AC 可能是表皮生长因子受体(EGFR)的靶基因, 其上调过程与 EGFR/Ras/Raf/细胞外信号调控激酶途径有关<sup>[9-10]</sup>. Biemer-Huttman et al<sup>[11]</sup> 研究显示, 大肠肿瘤细胞中 DNA 微卫星不稳定性越高, MUC5AC 的表达越高. 在体外实验中, 致癌剂 PMA 可诱导大肠癌细胞株 HM3 中 MUC5AC mRNA 表达, 同时细胞外液中基质金属蛋白酶(MMPs)的含量明显增高, 细胞的侵袭能力增加, 蛋白激酶 C 抑制剂可抑制这一过程的发生<sup>[12]</sup>. 此外, ATP、TNF- $\alpha$  均可诱导 MUC5AC 的表达增加<sup>[13-14]</sup>, 而 IL-13 则抑制 MUC5AC 基因的表达, 从而减少黏液分泌<sup>[15]</sup>.

本实验还显示, 印戒细胞癌中 MUC5AC 的表达率较高, 并且与大肠腺瘤及黏液腺癌相比, 具有显著性差异. 以细胞内黏液分泌为主的印戒细胞癌是分化较低, 预后较差的恶性肿瘤, 其 MUC5AC 蛋白的高表达原因尚不清楚. 可能在腺瘤-腺癌的发展过程中, 受其他因子的作用, 在分泌细胞异型增生的同时, MUC5AC 仍保持较高活性, 肿瘤细胞表现为不成熟的细胞内黏液分泌与储留, 逐渐发展为印戒细胞癌. MUC5AC 在大肠肿瘤发生、发展过程中的作用也可能与多种癌基因和/或抑癌基因有关, 其确切机制尚有待于进一步探讨.

### 4 参考文献

- 1 Myerscough N, Sylvester PA, Warren BF, Biddolph S, Durdey P, Thomas MG, Carlstedt I, Corfield AP. Abnormal subcellular distribution of mature MUC2 and de novo MUC5AC mucins in adenomas of the rectum: immunohistochemical detection using non-VNTR antibodies to MUC2 and MUC5AC peptide. *Glycoconj J* 2001;18:907-914
- 2 Sylvester PA, Walsh M, Myerscough N, Warren BF, Corfield AP, Thomas MG, Durdey P. Mucin gene expression in the ileoanal reservoir is altered and may be relevant to the risk of

- inflammation and dysplasia. *Gut* 2002;51:386-391
- 3 Lee MJ, Lee HS, Kim WH, Choi Y, Yang M. Expression of mucins and cytokeratins in primary carcinomas of the digestive system. *Mod Pathol* 2003;16:403-410
  - 4 Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester PA, O' Leary D, Warren BF, Corfield AP, Thomas MG. Lack of mucin MUC5AC field change expression associated with tubulovillous and villous colorectal adenomas. *J Clin Pathol* 2000;53:100-104
  - 5 Nollet S, Forgue-Lafitte ME, Kirkham P, Bara J. Mapping of two new epitopes on the apomucin encoded by MUC5AC gene: expression in normal GI tract and colon tumors. *Int J Cancer* 2002;99:336-343
  - 6 Sylvester PA, Myerscough N, Warren BF, Carlstedt I, Corfield AP, Durdey P, Thomas MG. Differential expression of the chromosome 11 mucin genes in colorectal cancer. *J Pathol* 2001;195:327-335
  - 7 Baldus SE, Hanisch FG, Putz C, Flucke U, Monig SP, Schneider PM, Thiele J, Holscher AH, Dienes HP. Immunoreactivity of Lewis blood group and mucin peptide core antigens: correlations with grade of dysplasia and malignant transformation in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Histol Histopathol* 2002;17:191-198
  - 8 Kocer B, Soran A, Erdogan S, Karabeyoglu M, Yildirim O, Eroglu A, Bozkurt B, Cengiz O. Expression of MUC5AC in colorectal carcinoma and relationship with prognosis. *Pathol Int* 2002;52:470-477
  - 9 Perras M, Pigny P, Copin MC, Aubert JP, Van Seuning I. Induction of MUC2 and MUC5AC mucins by factors of the epidermal growth factor (EGF) family is mediated by EGF receptor/Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase cascade and sp1. *J Biol Chem* 2002;277:32258-32267
  - 10 Kohri K, Ueki IF, Shim JJ, Burgel PR, Oh YM, Tam DC, Dao-Pick T, Nadel JA. Pseudomonas aeruginosa induces MUC5AC production via epidermal growth factor receptor. *Eur Respir J* 2002;20:1263-1270
  - 11 Biemer-Huttman AE, Walsh MD, McGuckin MA, Simms LA, Young J, Leggett BA, Jass JR. Mucin core protein expression in colorectal cancers with high levels of microsatellite instability indicates a novel pathway of morphogenesis. *Clin Cancer Res* 2000;6:1909-1916
  - 12 Han SY, Lee MS, Kim HR, Baek SH, Ahn DH, Chae HS, Erickson RH, Sleisenger MH, Kim YS. Phorbol 12-myristate 13-acetate induces alteration in mucin gene expression and biological properties of colon cancer cells. *Int J Oncol* 2000;17:487-494
  - 13 Roger P, Gascard JP, Bara J, de Montpreville VT, Yeaton M, Brink C. ATP induced MUC5AC release from human airways in vitro. *Med Inflamm* 2000;9:277-284
  - 14 Smirnova MG, Birchall JP, Pearson JP. TNF-alpha in the regulation of MUC5AC secretion: some aspects of cytokine-induced mucin hypersecretion on the in vitro model. *Cytokine* 2000;12:1732-1736
  - 15 Kim CH, Song KS, Koo JS, Kim HU, Cho JY, Kim HJ, Yoon JH. IL-13 suppresses MUC5AC gene expression and mucin secretion in nasal epithelial cells. *Acta Otolaryngol* 2002;122:638-643

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

• 研究快报 •

## 5-FU 和抗 Fas 单抗联合治疗结肠癌的体外实验研究

朱 强, 刘吉勇, 许洪伟, 徐 麟, 傅丽娜

朱强, 刘吉勇, 许洪伟, 徐麟, 傅丽娜, 山东省立医院消化内科  
山东省济南市 250021  
项目负责人: 朱强, 250021, 山东省济南市经5纬7路324号, 山东省立医院消化内科. tedqiangzhu@21cn.com  
电话: 0531-7938911-2355 传真: 0531-7904002  
收稿日期: 2003-06-17 接受日期: 2003-10-12

### 摘要

目的: 探讨5-氟尿嘧啶(5-FU)和抗Fas单抗联合治疗结肠癌的效果及其机制。

方法: 分10 μg/mL 5-FU、抗Fas单抗(CH11)1 μg/mL、5 μg/mL 5-FU+0.5 μg/mL 抗Fas单抗及空白对照四组, 与SW480细胞共培养。MTT法检测SW480细胞的存活率, TUNEL法检测SW480细胞的凋亡率。免疫细胞化学法检测5-FU和抗Fas单抗处理前后, SW480细胞中Bcl-2的变化。

结果: 10 μg/mL 5-FU、1 μg/mL 抗Fas单抗、5 μg/mL 5-FU+0.5 μg/mL 抗Fas单抗均可抑制细胞生长, 且均可诱导细胞凋亡, 联合作用组诱导效果最明显, 其次是5-FU组, 抗Fas单抗组诱导效果较差。抗Fas单抗、5-FU均可降低SW480细胞Bcl-2的表达, 5-FU与抗Fas单抗对

SW480细胞Bcl-2蛋白的表达有协同抑制作用。

结论: 5-FU和抗Fas单抗对结肠癌细胞具有协同的增生抑制和诱导凋亡作用, 其机制可能是协同抑制Bcl-2蛋白的表达。

朱强, 刘吉勇, 许洪伟, 徐麟, 傅丽娜. 5-FU和抗Fas单抗联合治疗结肠癌的体外实验研究. 世界华人消化杂志 2004;12(2):469-471

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/469.asp>

### 0 引言

免疫治疗是抗肿瘤治疗的一个重要方面, 药物治疗和免疫治疗相结合是抗肿瘤治疗的一个重要研究方向。Fas系统在结肠癌的肿瘤免疫中具有重要作用<sup>[1]</sup>, 针对Fas系统的免疫治疗可能有一定效果。本实验旨在观察治疗结肠癌的首选药物5-氟尿嘧啶(5-FU)和抗Fas单抗对结肠癌细胞株SW480的联合作用及其作用机制。

### 1 材料和方法

1.1 材料 抗Fas单抗(CH11)购自深圳晶美生物工程有限公司, 细胞凋亡原位检测试剂盒为德国Boehringer

Mannheim 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 5-FU 和抗 Fas 单抗联合处理结肠癌细胞 将对数生长期的 SW480 细胞按 1 × 10<sup>5</sup>/mL 接种于 96 孔培养板, 24 h 后分为 10 μg/mL 5-FU 组、1 μg/mL 抗 Fas 单抗(CH11)组、5 μg/mL 5-FU+0.5 μg/mL 抗 Fas 单抗组及空白对照四组, 与 SW480 细胞共培养.

1.2.2 MTT 法检测细胞的增殖活性 四组细胞共培养 0、24、48、72、96 h 后, 做 MTT 染色. 以每毫升活细胞数为纵坐标, 培养时间为横坐标, 描绘 SW480 细胞生长曲线.

1.2.3 TUNEL 法检测细胞的凋亡率 将细胞以 2 × 10<sup>5</sup>/mL 的密度接种在含小盖玻片的 24 孔培养板中, 24 h 后分四组, 药物与细胞共培养, 作用 0、24、48、72、96 h, 取出盖玻片, PBS 冲洗 3 次, 用 40 mL/L 多聚甲醛溶液(溶于 pH7.4 的 PBS 中), 室温固定 30 min, TUNEL 染色, 检测细胞的凋亡率. 计数 1 000 个细胞, TUNEL 阳性细胞与总细胞数的比值即为 SW480 细胞的凋亡率.

1.2.4 免疫细胞化学法检测处理前后细胞中 Bcl-2 的变化 将细胞以 2 × 10<sup>5</sup>/mL 的密度接种在含小盖玻片的 24 孔培养板中, 24 h 后分四组药物与细胞共培养 72 h 后, 取出盖玻片, PBS 冲洗 3 次, 用 950 mL/L 酒精固定 20 min, 免疫细胞化学法检测处理前后细胞中 Bcl-2 的变化, 免疫化学过程参照 S-P 试剂盒操作说明书.

统计学处理 两个样本均数的比较采用 t 检验, 多个样本均数的比较采用单因素方差分析(F-q 检验), 显著性水准 α 为 0.05.

2 结果

2.1 三种方法处理后 SW480 细胞的存活率 10 μg/mL 5-FU、1 μg/mL 抗 Fas 单抗、5 μg/mL 5-FU+0.5 μg/mL 抗 Fas 单抗均可抑制细胞生长, 联合作用组抑制效果最明显, 其次是 5-FU 组, 抗 Fas 单抗组抑制效果较差(图 1).

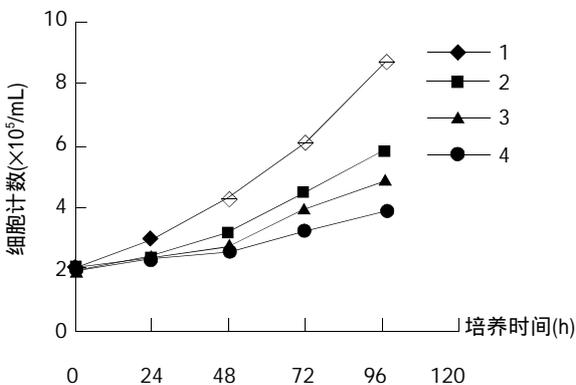


图 1 三种方法处理后 SW480 细胞的存活率. 1: 对照组; 2: 抗 Fas 单抗组; 3: 5-FU 组; 4: 联合组.

2.2 三种方法处理后 SW480 细胞的凋亡率 10 μg/mL 5-FU、1 μg/mL 抗 Fas 单抗、5 μg/mL 5-FU+0.5 μg/mL

抗 Fas 单抗均可诱导细胞凋亡. 在 48 h 时, 5-FU 组、抗 Fas 单抗组、联合组的凋亡率, 与空白对照组相比均有统计学差异(P < 0.05); 在 72 h 时, 联合组的凋亡率、5-FU 组和抗 Fas 单抗组两两相比, 均有统计学差异(P < 0.05), 联合作用组诱导效果最明显, 其次是 5-FU 组, 抗 Fas 单抗组诱导效果较差(图 2).

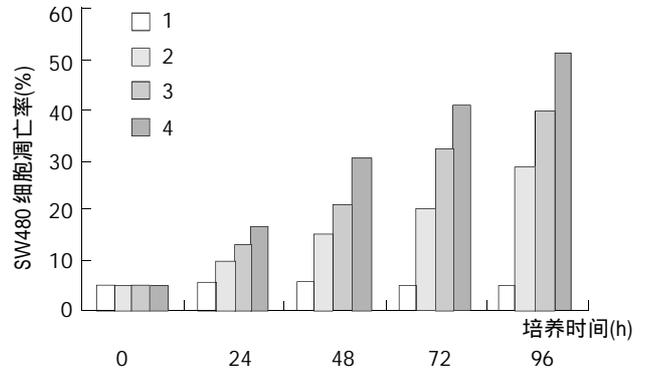


图 2 三种方法处理后 SW480 细胞的凋亡率. 1: 对照组; 2: 抗 Fas 单抗组; 3: 5-FU 组; 4: 联合组.

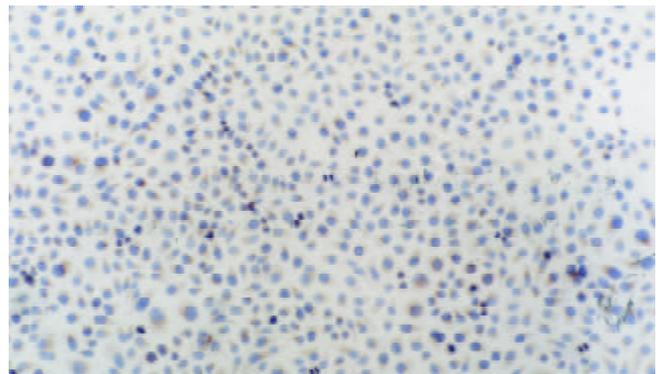


图 3 5-FU 或抗 Fas 单抗处理前 SW480 细胞 Bcl-2 表达水平(× 100).

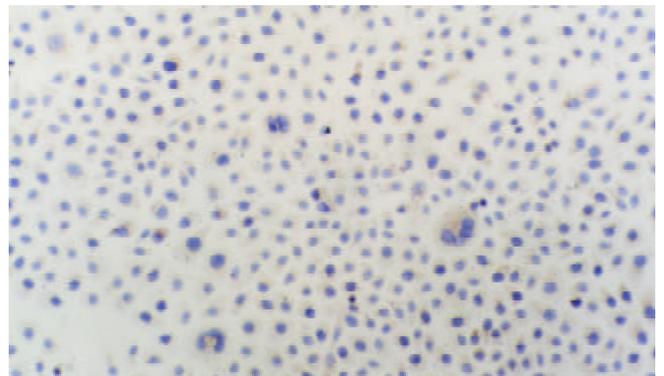


图 4 经 5-FU 或抗 Fas 单抗处理后 SW480 细胞 Bcl-2 表达降低(× 100).

2.3 药物处理后细胞中 Bcl-2 的变化 与细胞共培养 72 h 后, 抗 Fas 单抗组、5-FU 组和抗 Fas 单抗+5-FU 联合组中, SW480 细胞 Bcl-2 阳性细胞率与空白对照组相比均有统计学差异(P < 0.05); 抗 Fas 单抗组、5-FU 组和联合组两两相比, 均有统计学差异(P < 0.05), 抑制 SW480 细胞 Bcl-2 表达的强度由高到低依次是联合组、5-FU 组、Fas 单抗组. 以上结果表明, 抗 Fas 单抗、5-FU 均

可抑制 SW480 细胞 Bcl-2 的表达, 5-FU 与抗 Fas 单抗对 SW480 细胞 Bcl-2 的表达有协同抑制作用. 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  5-FU 比 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抗 Fas 单抗对 SW480 细胞 Bcl-2 表达的抑制作用强(表 1)(图 3, 4).

表 1 药物处理后 SW480 细胞中 Bcl-2 的变化

分组	Bcl-2 阳性细胞率(% mean $\pm$ SD)
空白对照组	81.2 $\pm$ 2.74
抗 Fas 单抗组	65.3 $\pm$ 2.68
5-FU 组	59.5 $\pm$ 3.08
联合组	43.9 $\pm$ 1.97

### 3 讨论

Fas 系统包括 Fas 及其配体 FasL. Fas 系统在结肠癌的发生、发展过程中起着重要的作用, 结肠癌细胞可减少其细胞表面 Fas 表达, 逃逸机体免疫系统的监视, 避免免疫系统的杀伤; 结肠癌细胞还可增加其细胞表面 FasL 表达, 反击机体免疫系统, 诱导淋巴细胞凋亡<sup>[1]</sup>. 针对结肠癌 Fas 系统的药物治疗和免疫治疗可能在一定程度上能够治疗结肠癌.

本实验证实, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  5-FU、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抗 Fas 单抗、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  5-FU+0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抗 Fas 单抗均可诱导 SW480 细胞凋亡. 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抗 Fas 单抗与其他两组相比作用较弱, 这是因为抗 Fas 单抗通过与 SW480 细胞上的 Fas 相结合, 从而诱导细胞发生凋亡. 但结肠癌细胞 SW480 一方面 Fas 表达较少<sup>[2]</sup>, 另一方面 SW480 细胞中存在着 Fas 信号传导障碍<sup>[3]</sup>, 因此单独应用抗 Fas 抗体诱导肿瘤细胞凋亡效果是有限的.

在临床上治疗结肠癌时, 大剂量 5-FU 可出现骨髓抑制、胃肠道反应等副作用. 本实验将小剂量 5-FU 和抗 Fas 单抗联合处理结肠癌细胞 SW480 发现, 尽管 5-FU 和抗 Fas 单抗的剂量均减半, 但比单独应用 5-FU 和抗 Fas 单抗诱导 SW480 细胞凋亡的作用增强, 药物处理后的肿瘤细胞对抗 Fas 单抗诱导凋亡的敏感性增加. 5-FU 和抗 Fas 单抗对诱导 SW480 凋亡有协同作用, 可以降低 5-FU 的用量, 减少副反应的发生.

Fas 途径调节细胞凋亡过程与 Bcl-2 的表达存在某种程度的耦联, Bcl-2 的表达可以部分地阻断 Fas 介导的凋亡<sup>[4-5]</sup>. 本实验结果表明, 5-FU 和抗 Fas 单抗对 SW480 细胞 Bcl-2 蛋白的表达有协同抑制作用, 可以降低 Bcl-2 的表达率, 增强 Fas 信号传导. 5-FU 还可以诱导 SW480 细胞表达 Fas 增加<sup>[1]</sup>, 这也可以解释在诱导 SW480 细胞凋亡时, 5-FU 比抗 Fas 单抗作用明显.

### 4 参考文献

- Bennett MW, O'Connell J, Houston A, Kelly J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. Fas ligand upregulation is an early event in colonic carcinogenesis. *J Clin Pathol* 2001;54:598-604
- 朱强, 邓长生. 5-氟尿嘧啶对结肠腺癌细胞 Fas、FasL 表达的影响. *中华消化杂志* 2002;22:188
- Lee SH, Shin MS, Lee HS, Bae JH, Lee HK, Kim HS, Kim SY, Jang JJ, Joo M, Kang YK, Park WS, Park JY, Oh RR, Han SY, Lee JH, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ. Expression of Fas and Fas-related molecules in human hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 2001;32:250-256
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediated cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998;94:481-490
- Vollmers HP, Dammrich J, Hensel F, Ribbert H, Meyer-Bahlburg A, Ufken-Gaul T, von Korff M, Muller-Hermelink HK. Differential expression of apoptosis receptors on diffuse and intestinal type stomach carcinoma. *Cancer* 1997;79:433-440

## 肛管直肠原发性恶性黑色素瘤临床病理特点

赵尔增, 张建中, 岳茂兴

赵尔增, 张建中, 中国人民解放军 306 医院病理科 北京市 100101  
岳茂兴, 中国人民解放军 306 医院腹部外科中心 北京市 100101  
项目负责人: 赵尔增, 100101, 北京市德外安翔北里 9 号, 中国人民解放军 306 医院病理科.  
电话: 010-66356111  
收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-10-07

### 摘要

目的: 探讨肛管直肠原发性恶性黑色素瘤的临床病理学特征及其鉴别诊断.

方法: 对 2 例发生在肛管直肠的恶性黑色素瘤进行光镜观

察, 应用 SP 法做免疫组化染色.

结果: 2 例均为女性, 年龄分别 50 岁和 54 岁, 病程分别 6 mo 和 12 mo, 肿瘤位于齿状线附近及其以下, 呈息肉样和蕈样. 光镜下, 瘤细胞大小不同、形态多样, 组织结构复杂, 未找见黑素颗粒. 免疫组化染色结果: HMB45、S-100 蛋白阳性, CK、EMA、Desmin 阴性.

结论: 肛管直肠原发性恶性黑色素瘤罕见, 病理学诊断困难. HMB45、S-100 蛋白表达在病理诊断中具有重要作用.

赵尔增, 张建中, 岳茂兴. 肛管直肠原发性恶性黑色素瘤临床病理特点. 世界华人消化杂志 2004;12(2):471-473

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/471.asp>

## 0 引言

恶性黑色素瘤(简称恶黑)是一种高度恶性肿瘤, 原发于肛管直肠区者甚为少见. 病理学上, 恶黑的表现千变万化, 组织结构和细胞形态复杂多样, 尤其无黑素者, 极易误诊其他恶性肿瘤. 现就我科工作中遇到的2例结合文献对其组织起源、临床病理特点和鉴别诊断进行分析讨论.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2例肛管直肠原发性恶性黑色素瘤为我院1981/2002住院手术患者的病理存档蜡块. 免疫组化所用一抗HMB45、S-100蛋白、EMA、CK、Desmin均购自北京中山生物技术有限公司.

1.2 方法 标本经100 mL/L甲醛固定, 石蜡包埋, 常规切片, 分别做HE和SP法免疫组织化学染色, 操作步骤按试剂盒说明进行. DAB显色, 苏木素复染, 光镜观察, 并复习有关临床病史.

## 2 结果

2.1 临床资料 两例均为女性, 年龄54岁和59岁, 病程6 mo和12 mo. 临床症状主要为乏力消瘦, 体重下降, 大便带血, 次数增多, 甚至黏脓血便. 直肠镜检查: 胸膝位见肿瘤位于齿状线附近, 呈息肉样和蕈样, 蒂基宽, 分别6.0 cm × 3.0 cm × 3.0 cm和4.0 cm × 3.0 cm × 2.5 cm, 顶端表面污秽. 分别在硬膜外麻醉下行腹会阴联合根治肿瘤切除术. 术前活检, 1例被误诊为低分化鳞状细胞癌, 1例被误诊为平滑肌肉瘤. 随访结果, 分别于术后14 mo和18 mo死于肿瘤转移.

2.2 病理检查 两例均为肛直肠切除标本. 其中1例肿瘤呈蕈样, 位于齿状线处, 4.5 cm × 4.0 cm × 3.0 cm; 另1例肿瘤呈息肉样, 位于齿状线以下1 cm处, 大小3.5 cm × 2.5 cm × 2.0 cm. 两例肿瘤均有宽基蒂并与肠壁相连, 表面均有大面积溃烂并炎性坏死渗出物附着. 切面呈灰白及灰褐色, 质细较脆. 显微镜检查: 1例近溃疡区浅层肿瘤细胞呈上皮样, 弥漫性分布, 细胞质较丰富, 大小比较一致, 嗜酸性核仁醒目(图1), 核分裂象多见; 深部瘤细胞呈胞核肥胖的短梭形, 轻度异型, 可见个别肛导管存留; 瘤组织限于黏膜下层, 局部瘤组织片状坏死. 另1例浅部以瘤巨细胞和多核瘤巨细胞为主, 弥漫性分布, 细胞质丰富, 核偏位, 形态多样、有的双核呈“八”字芽瓣状(图2), 少数巨核细胞有1-2个明显增大的嗜酸性核仁; 深部区域瘤细胞以梭形为主, 编织样或束状排列. 瘤组织侵及肌层并转移至肛周淋巴结. 相邻肛管黏膜被覆鳞状上皮基底层可见增生黑色素细胞. 2例均未找见黑素颗粒. 免疫表型: HMB<sub>45</sub>(+)(图3)、

S-100蛋白(+)(图4), CK(-)、EMA(-)、Desmin(-).

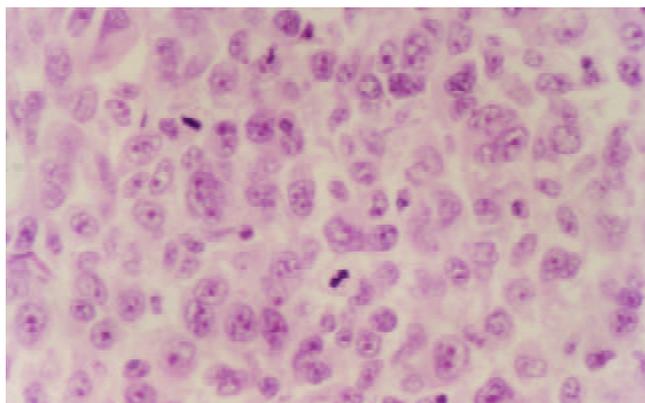


图1 肛管恶性黑色素瘤, 瘤细胞呈上皮样, 嗜酸性核仁醒目. HE 400 ×.

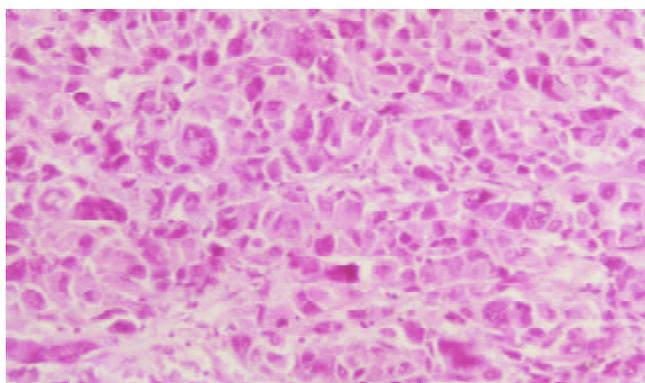


图2 肛管恶性黑色素瘤, 瘤细胞呈多型性, 弥漫性分布. HE 400 ×.

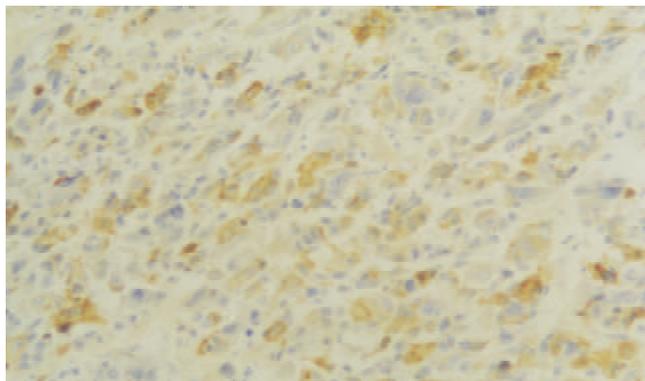


图3 肛管恶性黑色素瘤, 瘤细胞 HMB<sub>45</sub> 表达阳性. S-P 200 ×.

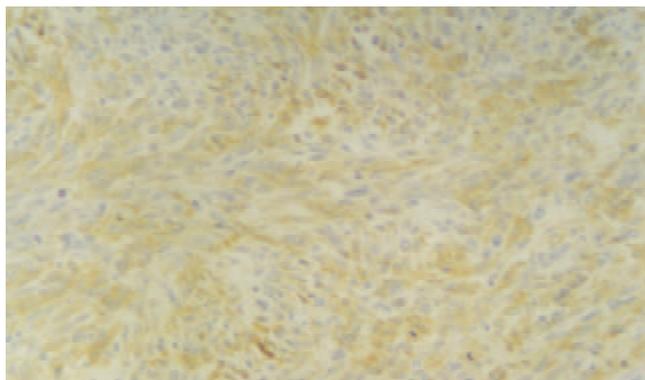


图4 肛管恶性黑色素瘤, 瘤细胞 S-100 蛋白表达阳性 S-P 200 ×.

### 3 讨论

原发于肛管直肠的恶黑非常少见, 国外文献报道不超过300例<sup>[1]</sup>, 占肛管直肠区恶性肿瘤的0.25-2.5%<sup>[2-3]</sup>, 不足所有黑色素瘤的3%, 占黏膜恶黑的0.2-0.25%<sup>[4-5]</sup>. 该瘤起病隐匿, 缺乏特异性症状和体征. 后期常大便带血, 由于肿瘤表面溃烂发炎, 常出现黏脓血便, 大便次数增多, 里急后重感. 临床常将其误诊为痔、息肉或直肠癌. 文献[6-7]报道误诊率高达80-100%. 因为肛管区血管和淋巴管丰富, 易早期发生淋巴结和远隔脏器转移, 加之部位隐蔽, 被发现时, 常常肿瘤体积已较大, 尽管予以根治性手术, 但通常预后很差. 文献报道, 5a生存率仅为12%<sup>[8]</sup>, Ceccopieri et al<sup>[9]</sup>报告2例, 因肿瘤复发分别于术后10 mo和24 mo死亡. 影响患者预后的因素除淋巴结转移等外, 肿瘤的大小和浸润深度或厚度与预后有直接关系<sup>[8, 10-12]</sup>. 本组2例分别于术后14 mo和18 mo死于肿瘤转移.

典型的恶黑因其胞质内含有黑素颗粒, 于光镜下容易诊断. 事实上, 恶黑的镜下表现千变万化, 细胞形态和组织结构复杂多样, 尤其活检取材少又缺乏黑素颗粒时容易与癌或肉瘤混淆. 本组2例, 术前活检曾被误诊为低分化鳞状细胞癌和平滑肌肉瘤. 光镜下, 常表现为以下组织形态特征: 细胞形态呈多型性; 组织结构既像癌又像肉瘤; 双细胞核呈“八”字排列的芽瓣样细胞、印戒样细胞或腺样、乳头样、血管外皮瘤样结构; 醒目的嗜酸性核仁; 胞质内黑素颗粒; 丰富的间质血管<sup>[3]</sup>. 上述特点有助于恶黑的病理诊断及与鳞癌、平滑肌肉瘤的鉴别. 免疫组化HMB45联合S-100蛋白的表达对恶黑的诊断具有可靠帮助<sup>[3-4, 13-14]</sup>. 本组2例HMB45、S-100阳性. 电镜下黑色素小体和/或前黑色素小体的存在, 对恶黑的确诊有决定性意义<sup>[15]</sup>.

关于肛管恶黑的组织起源, 一般被认为由肛管黏膜鳞状上皮基底层的黑色素母细胞恶变而来. 本组2例肿瘤相邻黏膜被覆上皮底层见增生黑素细胞, 支持肛

管恶黑来自黑色素母细胞恶变的观点. 对于直肠恶黑的来源有两种意见. 一种认为由原发于肛管的恶黑侵袭蔓延而来, 另一种认为直肠黏膜存在黑色素细胞, 在某种因素刺激下发生恶变所致<sup>[3, 14, 16]</sup>.

### 4 参考文献

- 1 Tsigris C, Pikoulis E, Bramis J, Leppaniemi A, Alexiou D, Bastounis E. Malignant melanoma of the anorectal area. Report of two cases. *Dig Surg* 2000;17:194-196
- 2 Phade VR, Lawrence WR. Anorectal melanoma. *Br J Surg* 1981; 68:667-668
- 3 刘月仙, 侯敏, 焦士兰. 42例肛管直肠恶性黑色素瘤病理及免疫组织化学研究. *中华病理学杂志* 1994;23:358-360
- 4 孟刚. 40例原发性黏膜恶性黑色素瘤临床病理分析. *临床与实验病理学杂志* 1997;13:27-29
- 5 DeMatos P, Tyler DS, Seigler HF. Malignant melanoma of the mucous membranes: a review of 119 cases. *Ann Surg Oncol* 1998;5:733-742
- 6 章美珍, 赵再秋, 翟美娟. 黏膜恶性黑色素瘤19例临床病理分析. *中国肿瘤临床与康复* 2002;9:108
- 7 王崇树, 赵国刚, 魏寿江, 夏羿凡. 肛管直肠恶性黑色素瘤的诊断和治疗(附8例临床分析). *四川医学* 2002;23:21-22
- 8 Wanebo HJ, Woodruff JM, Farr GH, Quan SH. Anorectal melanoma. *Cancer* 1981;47:1891-1900
- 9 Ceccopieri B, Marcomin AR, Vitagliano F, Fragapane P. Primary anorectal malignant melanoma: report of two cases. *Tumori* 2000;86:356-358
- 10 Fukui R, Hata F, Yasoshima T, Honma T, Nomura H, Sasaki K, Nishimori H, Sasaki K, Kutomi G, Ohno K, Oikawa I, Sasaki K, Tarumi K, Ishiyama Y, Kobayashi K, Yamamoto N, Hirata K. Malignant melanoma of the anorectum: report of four cases. *Surg Today* 2002;32:555-558
- 11 Batsakis JG, Suarez P. Mucosal melanoma: a review. *Adv Anat Pathol* 2000;7:167-180
- 12 Ooi BS, Eu KW, Seow-Choen F. Primary anorectal malignant melanoma: clinical features and results of surgical therapy in Singapore—a case series. *Ann Acad Med Singapore* 2001;30: 203-205
- 13 王丽霞, 畅俊平, 孙亚菲, 殷卫东, 王晋芬. 无色素性恶性黑色素瘤的免疫组化研究. *肿瘤研究与临床* 1999;11:173-174
- 14 沈丹华, 阚秀, 虞有智, 薛卫成. 5例肛管直肠恶性黑色素瘤的临床病理分析. *诊断病理学杂志* 1994;1:88-89
- 15 黄文清. *肿瘤电子显微镜诊断学*. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 1993:179-180
- 16 陈宣章. 肛管直肠原发恶性黑色素瘤12例. *新消化病学杂志* 1996; 4:321-322

## 细胞周期蛋白 D1 RT-PCR ELISA 的建立及其初步应用

陈兵, 张雪, 府伟灵, 常杭花, 刘为纹, 徐采朴, 史景泉

陈兵, 中国人民解放军第三军医大学西南医院内分泌科 重庆市 400038  
张雪, 府伟灵, 中国人民解放军第三军医大学西南医院检验科 重庆市 400038  
常杭花, 重庆市第九人民医院胃镜室 重庆市 400001  
刘为纹, 徐采朴, 中国人民解放军第三军医大学西南医院消化科 重庆市 400038  
史景泉, 中国人民解放军第三军医大学西南医院病理科 重庆市 400038

中国博士后科学基金和解放军总后勤部博士后科学基金资助课题, No. 中博基 98(6)23  
项目负责人: 陈兵, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号, 中国人民解放军第三军医大学西南医院内分泌科. bingchen67@hotmail.com  
电话: 023-68754138 传真: 023-68754138  
收稿日期: 20003-08-07 接受日期: 2003-09-18

## 摘要

目的: 建立一种灵敏、特异和简便实用的细胞周期蛋白D1 (Cyclin D1) mRNA表达水平的检测手段。

方法: 生物素标记 Cyclin D1 5' 端引物, PCR DIG Labeling Mix 取代 dNTP, RT-PCR 终产物置于链霉亲和素包被的 ELISA 板中孵育, 洗涤、显色后, 自动酶联检测仪测  $A_{450nm}$  值。常规 RT-PCR 方法作对照。检测对象包括 Cyclin D1 表达细胞系 SGC7901, 转染反义 Cyclin D1 基因的 SGC7901D1AS 细胞及转染空载体的 SGC7901neo 细胞, 原发性胃癌组织 30 例、胃癌旁和正常胃黏膜组织 20 例, 胃良性病变组织 22 例。

结果: RT-PCR ELISA 与 RT-PCR 琼脂糖电泳检测结果吻合, 所测得的  $A_{450nm}$  值与 Cyclin D1 特异性基因片段的丰度和检测细胞数量有一很好的对应关系。SGC7901 胃癌细胞转染 Cyclin D1 反义基因后, Cyclin D1 mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.05$ )。Cyclin D1 mRNA 在胃良性疾病起即开始明显升高 ( $P < 0.05$ )。在胃癌各组中, 进展期胃癌伴转移组的 Cyclin D1 mRNA 表达水平显著高于其他两组 ( $P < 0.05$ )。

结论: 本文建立的 Cyclin D1 RT-PCR ELISA 可作为一种候选的、较为简便和半定量的 cyclin D1 mRNA 检测方法。

陈兵, 张雪, 府伟灵, 常杭花, 刘为纹, 徐采朴, 史景泉. 细胞周期蛋白 D1 RT-PCR ELISA 的建立及其初步应用. 世界华人消化杂志 2004;12(2):473-475 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/473.asp>

## 0 引言

酶联免疫黏附测定法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 是临床检测中最常用的方法, 具有半定量、自动化程度高和可大批量检测的优势<sup>[1]</sup>。逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 是一种检测 mRNA 水平的高灵敏度方法<sup>[2]</sup>。本文中建立的细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) RT-PCR ELISA 结合了两种方法的优点, 旨在建立一种灵敏、特异和简便实用的 Cyclin D1 mRNA 表达水平的检测手段。

## 1 材料和方法

1.1 材料 细胞标本: 人胃癌细胞系 SGC7901 由军事医学科学院提供, 为 Cyclin D1 表达阳性细胞系<sup>[3]</sup>, 来源于伴淋巴结转移的胃癌组织, 其培养及生物学特性见文献<sup>[4]</sup>。稳定表达反义 Cyclin D1 基因的 SGC7901 衍生细胞 SGC7901D1AS 及转染其空载体的细胞 SGC7901neo 为自行制备, 其培养及生物学特性见文献<sup>[3]</sup>。

组织标本: 分别取自我院、第三军医大学大坪医院和重庆市第九人民医院手术和胃镜活检标本, 均经临床和病理诊断, 无化疗和放疗经历。标本搜集至 DEPC 处理后的容器中速冻,  $-80^{\circ}\text{C}$  贮藏备用<sup>[2, 5]</sup>。

## 1.2 方法

1.2.1 引物及其生物素标记 Cyclin D1 引物根据文献<sup>[6]</sup>

设计, 由上海生工生物工程公司合成。其序列为: 5' - AAGCCTCAGCCCTCCCCAGCTGCCAG - 3'; 5' - AACCAACAACAAGGAGGATG - 3'。按军事医学科学院“生物素核酸标记和检测试剂盒”使用说明书进行标记<sup>[7]</sup>。

1.2.2 RT-PCR 细胞和组织标本总 RNA 的提取按 Boehringer Mannheim 公司 TriPure™ Isolation Reagent Kit 说明书进行。RT-PCR 参照 Boehringer Mannheim 公司 Titan™ One Tube RT-PCR System 说明书及文献<sup>[8]</sup>进行。

1.2.3 RT-PCR ELISA RT-PCR ELISA 中 RT-PCR 条件不变, 但用生物素标记的 Cyclin D1 5' 端引物替代其中原未标记的引物, 用 PCR DIG Labeling Mix 取代 dNTP。阳性对照为 SGC7901 细胞, 阴性对照为 K562 细胞<sup>[9]</sup>。扩增产物按下述流程进行检测: 扩增产物 5  $\mu\text{L}$  与 0.01 mol/L pH7.5 PBS 300  $\mu\text{L}$  混匀, 100  $\mu\text{L}$  / 孔加入 Streptavidin-coated Microtite (链霉亲和素包被的 ELISA 板, Boehringer Mannheim 公司) 中,  $37^{\circ}\text{C}$ 、300 rpm 振荡孵育 2 h, 弃液、PBS-T 250  $\mu\text{L}$  / 孔, 30 S  $\times$  3, 加入 10 mU/mL Anti-DIG-POD 工作液 100  $\mu\text{L}$  / 孔,  $37^{\circ}\text{C}$ 、300 rpm 振荡孵育 30 min, 弃液、PBS-T 250  $\mu\text{L}$  / 孔, 30 S  $\times$  3, 加 TMB 底物液 100  $\mu\text{L}$  / 孔,  $37^{\circ}\text{C}$ 、300 rpm 振荡孵育 17 min, 加终止液 100  $\mu\text{L}$  / 孔, EIA V.1.8-0 自动酶联检测仪测  $A_{450nm}$  值。

统计学处理 利用 STATISTICA/W5.0 统计软件进行统计学分析。统计项目包括 Descriptive statistics、t-test 和  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

2.1 Cyclin D1 RT-PCR ELISA 的建立 文献报道应用免疫细胞化学和原位杂交的方法证实 SGC7901 胃癌细胞中有 Cyclin D1 蛋白和 mRNA 的高表达<sup>[3, 9-10]</sup>。本文 RT-PCR 的方法也检出 Cyclin D1 mRNA 在此细胞中表达。RT-PCR 琼脂糖电泳检测结果可见 1 100 bp 的 Cyclin D1 特异性基因片段出现, 其丰度随细胞数量的减低而减低 (图 1)。而本文中建立的 RT-PCR ELISA 检测的结果 (图 2) 与 RT-PCR 琼脂糖电泳检测结果吻合, 且所测得的  $A_{450nm}$  值与 Cyclin D1 特异性基因片段的丰度和检测细胞数量有一很好的对应关系。

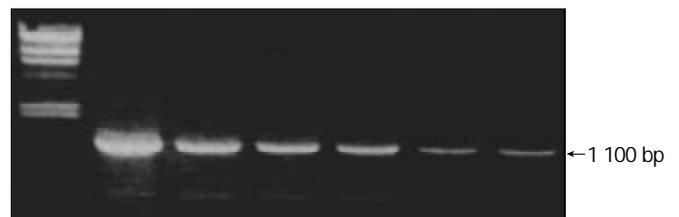


图 1 SGC7901 细胞 Cyclin D1 RT-PCR 电泳图。1: DNA Marker ( $\lambda$  DNA/Hind III); 2-7: SGC7901 细胞数目分别为  $10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3$ 。

2.2 细胞、组织标本检测结果 利用 Cyclin D1 RT-PCR ELISA 对 SGC7901 胃癌细胞及其衍生细胞 SGC7901neo、

SGC7901D1AS, 未经治疗的原发性胃癌 30 例、食管癌 6 例、结肠癌 6 例, 胃癌旁和正常胃黏膜组织 20 例, 胃良性病变组织 22 例进行检测. 检测数据及统计结果见表 1 和表 2. SGC7901 胃癌细胞转染 Cyclin D1 反义基因后, Cyclin D1 mRNA 表达显著降低( $P < 0.05$ ). 由表 2 看出, Cyclin D1 mRNA 在胃良性病变起即开始明显升高( $P < 0.05$ ). 在胃癌各组中, 进展期胃癌伴转移组的 Cyclin D1 mRNA 表达水平显著高于其他两组( $P < 0.05$ ), 但早期胃癌组的 Cyclin D1 mRNA 表达水平与进展期胃癌组差别不明显( $P > 0.05$ ).

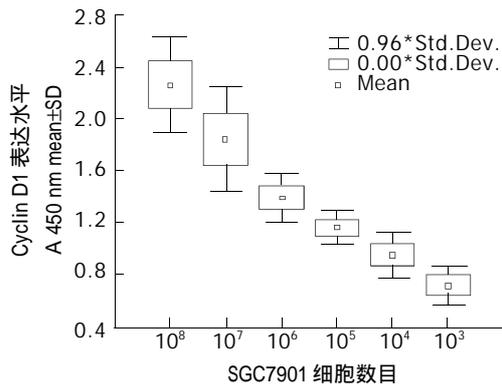


图 2 Cyclin D1 RT-PCR ELISA STATISTICA/W5.0 统计软件自动绘图.

表 1 Cyclin D1 RT-PCR 对细胞标本的检测

检测对象	cyclin D1 表达(A <sub>450nm</sub> , mean±SD)
SGC7901D1AS	0.017 ± 0.006 <sup>a</sup>
SGC7901neo	1.399 ± 0.037
SGC7901	1.397 ± 0.049

<sup>a</sup>P < 0.05 vs SGC7901.

表 2 Cyclin D1 RT-PCR 对组织标本的检测

检测对象(n)	cyclin D1 表达(A <sub>450nm</sub> , mean±SD)
进展期胃癌伴转移(6)	1.175 ± 0.362 <sup>a, b</sup>
进展期胃癌(18)	0.292 ± 0.255 <sup>a, c</sup>
早期胃癌(6)	0.534 ± 0.202 <sup>a, b</sup>
重度异型增生(4)	0.269 ± 0.100 <sup>a</sup>
中度异型增生(5)	0.271 ± 0.104 <sup>a</sup>
轻度异型增生(5)	0.180 ± 0.011 <sup>a</sup>
胃良性病变(8)	0.111 ± 0.046 <sup>a</sup>
癌旁和正常组织(20)	0.049 ± 0.030

<sup>a</sup>P < 0.05 vs 癌旁和正常组织; <sup>b</sup>P < 0.05 vs 重度异型增生; <sup>c</sup>P < 0.05 vs 进展期胃癌伴转移.

### 3 讨论

Cyclin D1 是目前研究较为深入的一种 G1 期 Cyclin, 其异常高表达在多种肿瘤中检出<sup>[3, 9-10]</sup>, 被认为是癌基因. 因此探索简便、有效的 Cyclin D1 表达检测手段具有较好

的科学研究和临床应用意义<sup>[10]</sup>. 常用检测 Cyclin D1 mRNA 表达方法有 Northern blot、原位杂交、RT-PCR<sup>[3, 9]</sup>. 其中 RT-PCR 具有灵敏度高、操作相对简便的优点, 但在大规模检测、检测结果半定量尚显不足. RT-PCR ELISA 则可弥补常规 RT-PCR 的不足. 我们建立的 Cyclin D1 RT-PCR ELISA 除去空白和对照外, 每个 ELISA 板可检测 40 个复孔样本, 通过呈色反应可获得数量化的结果数据. 本文在同一标本的不同量的检测中, Cyclin D1 RT-PCR ELISA 检测结果与 Cyclin D1 RT-PCR 琼脂糖电泳检测结果吻合, 且所测得的 A<sub>450nm</sub> 值与 Cyclin D1 特异性基因片段的丰度和检测细胞数量有很好的对应关系. 同时, 在多标本的 Cyclin D1 RT-PCR ELISA 检测中, 证实胃癌组织中 Cyclin D1 mRNA 异常高表达, 与文献报道的用其他方法如 RT-PCR、Northern blot 和原位杂交的检测结果相同<sup>[3, 9]</sup>. 同时还发现 Cyclin D1 mRNA 在胃良性病变起即开始明显升高( $P < 0.05$ ), 早期胃癌组的 Cyclin D1 mRNA 表达水平与进展期胃癌组差别不明显( $P > 0.05$ ). 可能与 RT-PCR ELISA 具有自动化大批量半定量检测的优势有关, 减少了批间差异和主观评估的影响, 使检测的灵敏度和特异性有所提高. Cyclin D1 RT-PCR ELISA 细胞学检测结果表明, 细胞中 Cyclin D1 mRNA 水平与 Cyclin D1 表达的受抑与否有明确的对应关系(表 1). 这些结果提示本文建立的 Cyclin D1 RT-PCR ELISA 可能具备了 RT-PCR 和 ELISA 两种方法的优点, 可作为一种候选的、较为简便和半定量的 Cyclin D1 mRNA 检测方法.

致谢: 第三军医大学数学教研室罗明奎主任在本课题结果统计分析的工作中给予了无私的指导和帮助.

### 4 参考文献

- Plested JS, Coull PA, Gidney MA. ELISA. *Methods Mol Med* 2003;71:243-261
- Emrich T, Karl G. Nonradioactive detection of telomerase activity using a PCR-ELISA-based telomeric repeat amplification protocol. *Methods Mol Biol* 2002;191:147-158
- Chen B, Zhang XY, Zhang YJ, Zhou P, Gu Y, Fan DM. Antisense to cyclin D1 reverses the transformed phenotype of human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 1999;5:18-21
- 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 第 1 版. 西安: 世界图书出版社西安公司 1996:66-66
- Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 1999;26:112-122
- Jiang W, Kahn SM, Tomita N, Zhang YJ, Lu SH, Weinstein I. Amplification and expression of the human cyclin D1 gene in esophageal cancer. *Cancer Res* 1992;52:2980-2983
- 苑锡同, 李德荣, 李晓葵, 黄如统. 逆转录 PCR - 生物素探针杂交法鉴定戊型肝炎病毒. *军事医学科学院院刊* 1995;19:161-166
- Manayani DJ, Cherian T, Murali N, Finny GJ, Green J, Brown D, Ravi V, Abraham M, Sridharan G. Evaluation of a one-tube RT-PCR system for detection of enteroviruses. *J Clin Virol* 2002;24:25-30
- Oda K, Okabayashi T, Kataoka M, Takeda A, Shibuya Y, Ori Tanaka N. Evaluation of cyclin D1 mRNA expression in gastric and colorectal cancers. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1999;105:237-252
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003;36:131-149

# 胃肠激素与不同类型反流所致食管炎的相关性

王雯, 李兆申, 许国铭, 张志坚, 林克荣

王雯, 张志坚, 林克荣, 南京军区福州总医院消化内科  
福建省福州市 350025  
李兆申, 许国铭, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科  
上海市 200433  
福建省青年科技人才创新项目, No. 2002J059  
项目负责人: 王雯, 350025, 福建省福州市西二环北路 156 号, 南京军区福州总医院消化内科. wangw68@medmail.com.cn  
电话: 0591-2859371  
收稿日期: 2003-10-10 接受日期: 2003-11-19

## 摘要

目的: 通过动物实验探讨胃肠激素与不同类型反流引起食管炎的相关性。

方法: 用不同手术制作单纯胃食管反流(G组)、单纯十二指肠食管反流(D组)、十二指肠胃混合食管反流(DG组)及无反流对照组(C组)动物模型, 于术后不同时期取静脉血, 用放射免疫法测定血浆促胃液素(GAS)和血管活性肠肽(VIP)含量。

结果: 反流性食管炎程度由轻至重依次为 D 组、DG 组、G 组。术后 1 wk 时 D 组血浆 GAS 含量(6.1 pg/ml)较对照组(26.5 pg/ml)明显降低( $P < 0.01$ ), G 组(48.3 pg/ml)和 DG 组(46.9 pg/ml)升高( $P < 0.05$ ), 4 wk 时仍维持相同趋势。D 组、DG 组血浆 VIP 含量在术后 1 wk 时无明显变化, 4 wk 时 2 组 VIP 含量(117.4 pg/ml, 88.1 pg/ml)均高于对照组( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), 而 G 组 1 wk 时轻度降低, 4 wk 时升高(75.6 pg/ml,  $P < 0.05$  vs C 组 33.8 pg/ml), D 组与 G 组间比较差别显著( $P < 0.05$ )。

结论: 不同反流类型引起的 GAS 和 VIP 改变不同, 可能与其所致食管炎的程度不同有关。胃肠激素与反流性食管炎的发生密切相关。

王雯, 李兆申, 许国铭, 张志坚, 林克荣. 胃肠激素与不同类型反流所致食管炎的相关性. 世界华人消化杂志 2004;12(2):476-477  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/476.asp>

## 0 引言

胃肠道可分泌多种神经肽类激素, 其含量和活性异常可能与许多消化道疾病的发生有关, 而许多消化道疾病又可导致胃肠激素分泌异常。但目前胃肠激素与反流性食管炎的关系研究较少, 本研究通过动物实验了解不同反流所导致的反流性食管炎大鼠血浆内促胃液素(GAS)和血管活性肠肽(VIP)含量的变化, 以探讨部分胃肠激素与大鼠反流性食管炎的相关性。

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康 SD 大鼠 80 只, 均为 ♂, 体质量 220-

260 g, 由上海必凯实验动物有限公司提供。GAS 和 VIP 放免药盒由第二军医大学神经生物教研室提供。

## 1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制作 将 SD 大鼠随机分为 4 组: 单纯胃食管反流组(G 组)28 只, 单纯十二指肠食管反流组(D 组)20 只, 胃十二指肠混合食管反流组(DG 组)20 只及无反流对照组(C 组)12 只。运用不同手术方式制作以上 3 种食管反流大鼠模型及对照组<sup>[1-2]</sup>。于术后 1 wk、4 wk 时分批开腹, 取 5 mL 下腔静脉血置于含 EDTA 二钠及抑肽酶的试管中, 并取出大鼠食管行肉眼观察及常规病理切片染色、光镜观察。

1.2.2 血浆 GAS 和 VIP 含量测定 血标本以 3 000 r/min 低温离心 20 min, 取上清 -20 °C 冻存备用。用放射免疫法测定血浆 GAS 和 VIP 含量。

统计学处理 数据用 mean±SD 表示, 采用 t 检验。

## 2 结果

2.1 不同反流组食管大体形态及光镜检查结果 大体观察各反流组于术后逐渐出现食管下段黏膜充血、粗糙、糜烂、溃疡及“树皮样”黏膜增生白斑等病变, 4 wk 时病变发生率分别为 G 组 40.0%、D 组 100%、DG 组 89.5%, D 组及 DG 组与 G 组比均有显著差别( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), D 组与 DG 组之间相差无统计学意义( $P > 0.05$ )。光镜下表现为食管壁炎症、糜烂溃疡及上皮过度增生, 4 wk 时后者发生率分别为 D 组 75.0%、DG 组 47.4%、G 组 15.0%、C 组 0, D 组较 DG 组、G 组均高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), DG 组高于 G 组( $P < 0.05$ ), 后者与 C 组相比无显著差异( $P > 0.05$ )。

2.2 不同反流组血浆 GAS 和 VIP 含量变化 对照组 2 个时间点间血浆 GAS 和 VIP 含量无显著性变化。术后 1 wk 时 D 组血浆 GAS 含量明显较对照组降低, G 组和 DG 组显著升高, 4 wk 时 D 组血浆 GAS 仍较低, 而 G 组升高程度较前轻度下降, DG 组仍较高, 但后 2 组间相比无显著差异。D 组、DG 组血浆 VIP 含量在术后 1 wk 时无明显变化, 术后 4 wk 时 2 组血浆 VIP 含量均高于对照组, 而 G 组 1 wk 时较对照组轻度降低, 4 wk 时显著增加, D 组与 G 组间比较差别显著(表 1)。

表 1 反流性食管炎大鼠血浆 GAS 和 VIP 含量变化(pg/ml)

分组	GAS		VIP	
	1 wk	4 wk	1 wk	4 wk
C	26.5	25.8	32.2	33.8
G	48.3 <sup>ad</sup>	38.5 <sup>c</sup>	21.6	75.6 <sup>bc</sup>
DG	46.9 <sup>ad</sup>	52.4 <sup>ad</sup>	38.3	88.1 <sup>a</sup>
D	6.1 <sup>b</sup>	8.3 <sup>a</sup>	39.5	117.4 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs D 组。

### 3 讨论

反流性食管炎的发生主要与下食管括约肌(LES)和食管体、胃十二指肠功能异常有关,而调控胃肠功能的因素除交感神经、迷走神经外,近年受重视的还有非肾上腺素能、非胆碱能神经及胃肠激素<sup>[3]</sup>。反流引起的刺激和损伤又可能引起神经体液的一系列反应。本研究探讨了不同类型反流对食管黏膜的损伤作用及与大鼠体内胃肠激素变化的关系。

GAS 具有调节胃肠道营养、运动和分泌的多种功能,他主要由胃窦黏膜中的 G 细胞分泌,其分泌受迷走神经、胃窦扩张、胃内容物的种类和酸度以及其他多种胃肠激素的复杂调控<sup>[4]</sup>。本实验结果显示反流术后 D 组血浆 GAS 含量明显降低,这与全胃切除、缺失 G 细胞有关,而 D 组食管炎最为严重,可能与失去了促胃液素对食管黏膜的营养作用,以及 GAS 减少后食管体的蠕动减弱导致反流物停留在食管内的时间延长有一定关系。G 组和 DG 组血浆 GAS 含量升高可能由于肠液反流至胃中,降低了胃内 pH 所引起,而 4 wk 时 G 组 GAS 升高程度较 1 wk 时轻度下降,可能酸反流至食管后刺激食管黏膜,通过负反馈机制抑制促胃液素的释放。提示 GAS 虽可致反流物酸性增加,但本身又能对食管黏膜具有一定保护作用,减少反流性食管炎的发生,尤其是对抗胆汁反流的损伤。而一旦食管黏膜受反流物损伤后,又对促胃液素的分泌起非常复杂的影响。

VIP 是消化道主要的非肾上腺素能、非胆碱能抑制性神经递质<sup>[5]</sup>。血浆 VIP 浓度可反映非肾上腺素能、非胆碱能神经的功能改变,给小鼠静脉注射 VIP 可引起剂量依赖性的下食管括约肌压力(LESP)下降<sup>[6]</sup>。有研究<sup>[7-8]</sup>显示反流性食管炎和 Barrett 食管患者血浆 VIP 水平较对照组显著升高,与 LESP 水平呈负相关,另一研究<sup>[9]</sup>发现酸反流引起的食管炎症反应可导致 VIP 神经纤维增生,从而引起上皮细胞增生增加,基底细胞层增

厚。可见 VIP 与反流性食管炎的关系是非常错综复杂的。我们的研究结果显示 G 组血浆 VIP 含量在术后 1 wk 时降低,4 wk 时增加,而术后 4 wk 时 D 组、DG 组血浆 VIP 含量显著高于对照组,可能的机制为早期酸反流对食管黏膜的刺激通过负反馈抑制 VIP 的合成或释放,以促进食管体蠕动、增加 LES 压力,减少酸反流。手术所致的较长时间的反流引起食管黏膜损伤炎症较重,反而使 VIP 释放增加,以加快食管上皮细胞的代偿增生。

总之,不同反流类型引起的大鼠血浆 GAS 和 VIP 改变不同,可能与其所致食管炎的程度不同有关,说明胃肠激素变化与反流性食管炎的发生密切相关。

### 4 参考文献

- 1 王雯,李兆申,许国铭,王烈,邹多武.不同方式建成3种反流性食管炎模型.解放军医学杂志 2000;25:171-173
- 2 王雯,李兆申,许国铭.食管反流大鼠肿瘤诱发过程中抑癌基因 mRNA 表达的变化.世界华人消化杂志 2002;10:1048-1049
- 3 Hallgren A, Flemstrom G, Nylander O. Interaction between neurokinin A, VIP, prostanooids and enteric nerves in regulation of duodenal function. *Am J Physiol* 1998;275(Pt 1):G95-103
- 4 周吕.胃肠生理学-基础与临床.第1版.北京:科学出版社,1991:101-104
- 5 Jin JG, Misra S, Grider JR, Makhlof GM. Functional difference between SP and NKA: relaxation of gastric muscle by SP is mediated by and VIP and NO. *Am J Physiol* 1993;264(4 Pt 1):G678-685
- 6 Guelrud M, Rossiter A, Souney PF, Rossiter G, Fanikos J, Mujica V. The effect of vasoactive intestinal polypeptide on the lower esophageal sphincter in achalasia. *Gastroenterology* 1992;103:377-382
- 7 Rossiter A, Guelrud M, Souney PF, Mendoza S, Rossiter G, Gelrud D. High vasoactive intestinal polypeptide plasma levels in patients with barrett's esophagus. *Scand J Gastroenterol* 1991;26:572-576
- 8 Kassim SK, El Touny M, El Guinaidy M, El Moghni MA, El Mohsen AA. Serum nitrates and vasoactive intestinal peptide in patients with gastroesophageal reflux disease. *Clin Biochem* 2002;35:641-646
- 9 Newton M, Kamm MA, Soediono PO, Milner P, Burnham WR, Burnstock G. Oesophageal epithelial innervation in health and reflux oesophagitis. *Gut* 1999;44:317-322

## 尼美舒利对结肠癌细胞 ICAM-1 mRNA 表达的影响

刘伟,张超

刘伟,张超,中国人民解放军第三军医大学西南医院普外科  
重庆市 400038  
项目负责人:张超,400038,重庆市高滩岩正街30号,中国人民解放军第三军医大学西南医院普外科. meizhang6688@yahoo.com  
电话:023-68773074  
收稿日期:2003-10-09 接受日期:2003-11-19

### 摘要

目的:初步研究尼美舒利对培养结肠癌细胞生长及其 ICAM-1 mRNA 表达的作用。

方法:以人结肠癌细胞株 HT-29, HCT-116 为研究对象,体外药物敏感试验(MTT)法检测尼美舒利对肿瘤细胞的增生抑制效应; RT-PCR 方法检测尼美舒利作用前后细胞 ICAM-1 mRNA 表达的变化。

结果:尼美舒利对结肠癌细胞 HT-29、HCT-116 生长抑制作用呈时间、剂量依赖性方式,对 HT-29 细胞抑制效果强于 HCT-116 细胞。尼美舒利下调 HT-29 细胞 ICAM-1

mRNA 表达, 而对 HCT-116 细胞 ICAM-1 mRNA 的表达无显著作用。

结论: 尼美舒利可明显抑制结肠癌细胞 HT-29 生长, 提示 NIM 可能通过抑制 COX-2 酶活性, 下调细胞 ICAM-1 的表达, 从而降低癌细胞播散及转移几率。

刘伟, 张超. 尼美舒利对结肠癌细胞 ICAM-1 mRNA 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(2):477-479

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/477.asp>

## 0 引言

研究发现非甾体类抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)可抑制环氧合酶(cyclooxygenase, COX)活性, 拮抗结肠肿瘤形成. 结肠癌的转移及复发可能与 COX-2 的高表达有关<sup>[1-2]</sup>. 细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)是体内重要的免疫活性分子, 有关 ICAM-1 与肿瘤侵袭转移的关系是近年来研究的热点<sup>[3]</sup>. 本试验应用 COX-2 选择性抑制剂 - 尼美舒利(nimesulide, NIM)作用于结肠腺癌细胞, 通过检测肿瘤细胞的增生及细胞 ICAM-1 mRNA 表达情况, 初步探讨 COX-2 选择性抑制剂对结肠癌侵袭转移的作用机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 DMEM 培养基、小牛血清(Gibco 公司)、MTT、DMSO、NIM(Sigma 公司)、CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo Forma 公司), 人结肠癌细胞株 HT-29 (COX-2 高表达)和 HCT-116 (COX-2 低表达)。

1.2 方法 HT-29 和 HCT-116 细胞于含 100 mL/L 小牛血清的 DMEM 液中培养, 置 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱中, 取对数生长期的细胞备实验之用。

1.2.1 体外药物敏感试验 噻唑蓝(MTT)法: 取两种细胞接种于 96 孔板中, 加入 NIM 原液, 使终浓度为 25 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L, 设加溶剂 DMSO 对照组, 继续培养 24 h、48 h 和 72 h, 加入 MTT 液, 孵育 4 h 后弃上清, 加入 DMSO 150 μL, 轻轻振荡 10 min, 测定各孔光吸收值(A 值), 绘制细胞生长曲线. 计算药物对细胞的生长抑制率。

1.2.2 RT-PCR 法检测 ICAM-1 表达变化 两种细胞培养过夜后, 收集 0 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L NIM 作用 72 h 和 200 μmol/L NIM 作用 12 h、24 h、48 h、72 h 的细胞, 抽提细胞总 RNA, 测定其 A<sub>260</sub>, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, 进行逆转录和 PCR 反应. 产物以琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外光照下以 UVP 凝胶图像分析系统成像和定量分析。

统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计学处理, 所得到的数值均以 mean±SD 表示。

## 2 结果

2.1 NIM 对 HT-29 和 HCT-116 细胞增生的影响 MTT 试验结果显示: 随 NIM 浓度的增加, 作用时间的延长, 药物对 HT-29 和 HCT-116 细胞生长抑制率明显增高. NIM 对 HT-29 细胞的增生抑制效果较 HCT-116 细胞明显(图 1)。

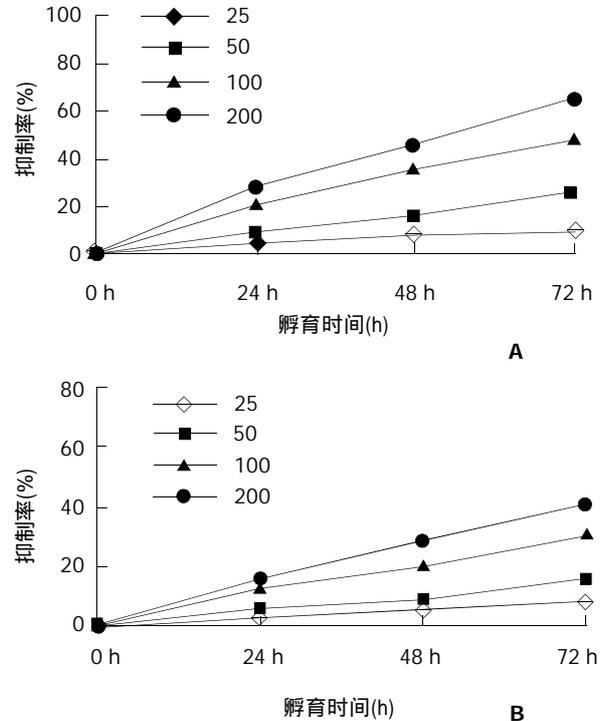


图 1 尼美舒利对结肠腺癌细胞株 HT-29 (A) 和 HCT-116 (B) 的增生抑制作用。

2.2 NIM 不同浓度、不同培育时间对 ICAM-1 mRNA 表达的影响 HT-29 和 HCT-116 细胞株均表达 ICAM-1 mRNA, 对照组 HT-29 细胞表达较 HCT-116 细胞为高, 差异有显著性( $P < 0.05$ ); NIM 作用 72 h 的 HT-29 细胞, ICAM-1 mRNA 表达量随药物浓度增加逐渐降低. 50 μmol/L NIM 作用组与对照组相比有显著性差异( $P < 0.05$ ), 100 μmol/L 和 200 μmol/L 组与对照组差异更为显著( $P < 0.01$ ). 各 NIM 浓度组 HCT-116 细胞 ICAM-1 mRNA 表达无显著性差异. 200 μmol/L NIM 作用于 HT-29 细胞 24 h、48 h 和 72 h 后, 细胞 ICAM-1 mRNA 表达与 12 h 组相比均有极其显著差异( $P < 0.01$ ). 而同样浓度药物的 HCT-116 细胞不同作用时间组 ICAM-1 mRNA 表达则无显著性差异。

## 3 讨论

流行病学资料表明: 长期服用 NSAIDs 类药物可使罹患大肠癌危险性降低 40-50%. COX-2 受抑制可能是 NSAIDs 抗肿瘤作用的机制之一. COX-2 为 COX 诱导性异构酶, 其过度表达可能是结肠肿瘤发生的早期事件, 并在诱导肿瘤血管生成和转移的过程中发挥重要作用. 我们采用 MTT 方法证实 NIM 可以时间、剂量依赖方式抑制结肠腺癌细胞的增生。

ICAM-1 是一种跨膜蛋白, 通过与其配体淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1、CD11a/CD18)和巨噬细胞相关复合体(Mac-1、CD11b/CD18)结合, 介导细胞与细胞之间的相互活动; 参与呈递抗原信息、激活细胞免疫等过程<sup>[4-5]</sup>。正常情况下, ICAM-1 仅在血管内皮细胞等细胞低水平的表达, 但在炎症、器官移植、肿瘤免疫等情况下表达量明显增多<sup>[6-8]</sup>。研究发现, 结肠癌组织中有高水平 ICAM-1 的表达, 而癌旁组织和结肠腺瘤组织的表达水平较低, 原因可能为结肠癌细胞能自分泌或刺激邻近组织旁分泌 ICAM-1<sup>[9]</sup>。研究显示: 癌细胞通过表达 ICAM-1 作用于其配体 LFA-1, 致肿瘤细胞间黏附力降低, 而与血管内皮细胞、淋巴细胞和胞外基质紧密结合, 易从原发灶脱落, 黏着到基质成分, 并可随淋巴细胞进入血液循环。同时, ICAM-1 的可溶性形式 sICAM-1 进入血液循环后, 竞争性抑制瘤细胞与 T 细胞与 LFA-1 的结合, 使肿瘤细胞逃避了免疫监视, 在肿瘤的转移过程中起了重要的作用<sup>[10-12]</sup>。有研究者认为 sICAM-1 可作为结肠癌早期诊断及转移判断的有用指标<sup>[13]</sup>。但是, 也有研究发现 ICAM-1 与肿瘤的侵袭和转移呈负相关。Yasuda et al<sup>[14]</sup> 研究发现: 肿瘤细胞在转移起始阶段, 表达高水平的 ICAM-1, 避免受到免疫攻击, 易于肿瘤细胞着床、形成转移灶; 当肿瘤细胞受到细胞外基质刺激时, 通过激活酪氨酸激酶途径, 下调 ICAM-1 表达, 增加 sICAM-1 的表达, 使肿瘤细胞免遭杀伤<sup>[15]</sup>。

目前, 对 COX-2 是否影响 ICAM-1 表达, 进而影响结肠癌侵袭转移的相关研究目前国内外尚未见报道。为探讨其作用机制, 我们采用 RT-PCR 方法检测 NIM 对肿瘤细胞 ICAM-1 mRNA 表达的影响, 结果显示: 随着 NIM 浓度增加, 作用时间延长, HT-29 细胞 ICAM-1 mRNA 表达水平逐渐降低; 而同样作用形式 HCT-116 细胞组别间 ICAM-1 mRNA 表达无显著差异。结果提示结肠癌细胞 COX-2 与 ICAM-1 表达存在相关性, 说明 NIM 可能通过抑制 COX-2 酶活性的途径, 下调肿瘤细胞 ICAM-1 表达, 从而抑制结肠癌细胞生长, 削弱癌细胞与淋巴细胞和单核细胞的黏附, 加强同质细胞间的黏附, 降低癌播散及转移几率。

#### 4 参考文献

- Nagatsuka I, Yamada N, Shimizu S, Ohira M, Nishino H, Seki S, Hirakawa K. Inhibitory effect of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on liver metastasis of colon cancer. *Int J Cancer* 2002;100:515-519
- Kakiuchi Y, Tsuji S, Tsujii M, Murata H, Kawai N, Yasumaru M, Kimura A, Komori M, Irie T, Miyoshi E, Sasaki Y, Hayashi N, Kawano S, Hori M. Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. *Cancer Res* 2002;62:1567-1572
- 倪海滨, 张彦亮, 黄介飞. 细胞间黏附分子-1与胃癌侵袭转移关系的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:356-357
- Uzendoski K, Kantor JA, Abrams SI, Schlom J, Hodge JW. Construction and characterization of a recombinant vaccinia virus expressing murine intercellular adhesion molecule-1: induction and potentiation of antitumor responses. *Hum Gene Ther* 1997;8:851-860
- Bessa X, Elizalde JJ, Mitjans F, Pinol V, Miquel R, Panes J, Piulats J, Pique JM, Castells A. Leukocyte recruitment in colon cancer: role of cell adhesion molecules, nitric oxide, and transforming growth factor beta1. *Gastroenterology* 2002;122: 1122-1132
- Banner BF, Savas L, Woda BA. Expression of adhesion molecules in the host response to colon carcinoma. *Ultrastruct Pathol* 1995;19:113-118
- Liu YZ, Chen B, She XD. A clinical evaluation of serum concentrations of intercellular adhesion molecule-1 in patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol* 1998;4:225-227
- Sun JJ, Zhou XD, Zhou G, Liu YK. Expression of intercellular adhesive molecule-1 in liver cancer tissues and liver cancer metastasis. *World J Gastroenterol* 1998;4:202-205
- 杨明智, 王培戈, 陈积圣, 伍衡, 张敬智, 李玉军. 大肠癌 ICAM-1 的表达及临床意义. *癌症* 2001;20:311-313
- Kaihara A, Iwagaki H, Gouchi A, Hizuta A, Isozaki H, Takakura N, Tanaka N. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and natural killer cell activity in gastric cancer patients. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1998;100:283-300
- Lin SJ, Yan DC. ICAM-1 (CD54) expression on T lymphocytes and natural killer cells from umbilical cord blood: regulation with interleukin-12 and interleukin-15. *Cytokines Cell Mol Ther* 2000;6:161-164
- Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Kremmyda A, Bramis I, Tsigris C. Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. *Eur J Cancer* 2001;37:2392-2397
- 陈春生, 张宏, 丛进春, 尚奔. 结肠癌患者血中 sICAM-1 和 sVCAM-1 变化的临床意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:115-116
- Yasuda M, Tanaka Y, Tamura M, Fujii K, Sugaya M, So T, Takenoyama M, Yasumoto K. Stimulation of beta1 integrin down-regulates ICAM-1 expression and ICAM-1-dependent adhesion of lung cancer cells through focal adhesion kinase. *Cancer Res* 2001;61:2022-2030
- Araki T, Miki C, Kusunoki M. Biological implications of circulating soluble intercellular adhesion molecule-1 in colorectal cancer patients. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:399-404

# 腹腔镜次/全结肠切除术治疗结肠慢传输性便秘 4 例

张连阳, 刘宝华, 陈金萍, 文亚渊

张连阳, 刘宝华, 陈金萍, 文亚渊, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科 重庆市 400042  
项目负责人: 张连阳, 400042, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科. hpzhangly@163.com  
电话: 023-68757248  
收稿日期: 2003-09-06 接受日期: 2003-09-24

## 摘要

目的: 评价经腹腔镜行次/全结肠切除术的安全性和可行性.

方法: 回顾性分析2002-04/2003-07我院经腹腔镜手术治疗的4例结肠慢传输性便秘, 均为女性, 平均50.4岁, 均行结肠传输试验证实全胃肠道传输时间在4 d以上, 均行排粪造影检查, 3例合并直肠内脱垂, 1例合并盆底痉挛综合征.

结果: 4例均完成腹腔镜次全或全结肠切除术, 3例回肠直肠吻合器吻合, 1例经下腹正中6 cm切口行回肠乙状结肠手法吻合. 手术时间平均323 min, 术中出血量平均138 mL, 以肛门排气为标志术后肠道功能平均3 d恢复, 术后平均住院10.2 d. 1例出现左侧胸腔血性积液. 术后1-16 mo随访, 平均排便2.5次/d.

结论: 腹腔镜次/全结肠切除术治疗结肠慢传输性便秘是安全、有效的方法, 美容效果好, 但手术时间长.

张连阳, 刘宝华, 陈金萍, 文亚渊. 腹腔镜次/全结肠切除术治疗结肠慢传输性便秘4例. 世界华人消化杂志 2004;12(2):480-481

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/480.asp>

## 0 引言

结肠慢传输型便秘是指结肠运动功能迟缓、传输功能减慢导致的便秘, 临床以大便次数减少, 无便意, 在长期未排便后感腹胀, 常有长期应用多种接触性泻剂的病史, 病程常在5 a以上. 其发病原因尚不清楚, 但存在结肠肌间神经丛的损害, 与“泻剂结肠”类似. 药物治疗、饮食调整等效果不佳, 部分需行次/全结肠切除术治疗. 我们回顾性分析我院经腹腔镜手术治疗的结肠慢传输性便秘4例如下:

## 1 材料和方法

1.1 材料 2002-04/2003-07 我院腹腔镜手术治疗的结肠慢传输性便秘4例, 均为女性, 平均50.4岁, 结肠传输试验证实全胃肠道传输时间在4 d以上; 均行排粪造影检查, 3例合并直肠内脱垂, 1例合并盆底痉挛综合征. 肠道功能恢复以肛门排气为标志, 排便后开始进流质饮食.

1.2 方法 患者取低截石位, 于脐、右上腹、右下腹、左下腹作4-5个穿刺切口, 除右下腹必需采用12 mm

套管外, 其他穿刺口可根据情况采用10 mm或12 mm. 根据重建肠道的方法决定结肠远端切断位置, 采用吻合器吻合则于骶岬水平切断直肠乙状结肠交界, 并可首先用腹腔镜下切割缝合器切断肠道, 便于分离系膜时提起结肠; 采用手法吻合则于乙状结肠下段系膜缘开窗, 暂不切断, 待完成全结肠游离后, 将全结肠自腹壁小切口提出再切断. 用超声刀(harmonic scalpel 超晰迅)剪开两侧Toldt线、脾结肠韧带和肝结肠韧带. 游离结肠的方法有两种, 可采用在边缘血管弓内侧上钛夹后剪断的方法依次处理乙状结肠动脉、左结肠动脉、中结肠动脉和右结肠动脉, 盲肠和末端回肠系膜提出腹壁外分离, 本组1例采用; 也可用超声刀在边缘动脉弓与结肠壁间直接切割系膜的方法, 可完成全结肠系膜的分离, 本组3例采用. 至横结肠时, 首先将大网膜自结肠网膜带剥下保存. 完成全结肠游离后, 扩大右下腹穿刺切口至3-4 cm, 提出全结肠, 分离盲肠、回肠系膜, 切断回肠移去标本, 安置抵钉座后还纳腹腔, 经肛门小心插入圆形吻合器(PROXIMATE CDH29)完成吻合; 手法吻合则于下腹正中作4-6 cm切口, 提出结肠, 分离盲肠、回肠和乙状结肠系膜, 切断结肠和回肠, 两层法吻合, 并关闭系膜裂孔. 合并子宫后倒者在腹腔镜下或经小切口折叠缝合子宫圆韧带, 前倾位固定子宫. 经左下腹穿刺口留置多孔橡胶引流管1根于盆腔.

## 2 结果

本组4例腹腔镜全结肠切除术均成功, 无中转病例. 3例回肠直肠吻合器吻合, 1例经下腹正中6 cm切口行回肠乙状结肠手法吻合; 2例合并直肠内脱垂、子宫后倒者行子宫圆韧带折叠子宫前倾位固定术. 手术时间平均323 min, 术中出血量平均138 mL, 以肛门排气术后肠道功能平均3 d恢复, 排便时间平均3.2 d, 术后平均住院10.2 d. 术后3-5 d拔除引流管. 1例出现左侧胸腔血性积液, 经穿刺抽液后治愈. 出院时需服用易蒙停控制排便次数2例, 术后1-16 mo随访, 排便次数平均2.5次/d. 术后病理报告, 4例均有黏膜慢性炎, 黏膜下血管扩张, 肠壁肌层局部变薄伴肌间神经丛变性, 1例合并黏膜黑变病.

## 3 讨论

腹腔镜全结肠切除术文献报道较少, 2003-08以前检索的Medline上文献报道仅30例. 腹腔镜全结肠切除术适应证包括多原发结肠癌、家族性腺瘤性结肠息肉病、炎症性肠病和结肠慢传输性便秘等. 腹腔镜全结肠

切除术需2-3台监视器,位于手术台的两侧,并根据情况上下移动监视器位置.取低截石位,根据手术进程调整体位,游离乙状结肠时采用头低足高位,游离横结肠时则需头高足低位;游离左半结肠、脾曲时左高右低位,游离右半结肠、肝曲则右高左低位.可采用4-5个穿刺切口,我们多于脐、右上腹、右下腹、左下腹作5个穿刺切口,为便于使用腹腔镜下切割缝合器,右下腹采用12 mm套管;因可能更换镜头、超声刀套管位置,其他穿刺口也均采用10 mm或12 mm,不使用5 mm套管.同样,术者和助手的位置也应根据手术部位随时调整.我们按乙状结肠、降结肠、脾曲、横结肠、肝曲和升结肠顺序游离,游离一段、分离一段,避免重复暴露一个视野,有助于缩短手术时间,并保证了手术的连贯性.慢传输性便秘是良性疾病,应保留大网膜,且横结肠游离涉及邻近脏器较多,包括十二指肠、胰腺、脾等,是全结肠中分离最困难的部分<sup>[1]</sup>.完成全结肠游离后,扩大右下腹穿刺切口至3-4 cm,提出全结肠,进一步分离盲肠和回肠系膜,切断回肠后即可移去全结肠标本.有报道在完成结肠游离后,将结肠从开放的直肠经肛管拖出,将安置了抵钉座的回肠还纳入腹腔,关闭直肠残端,完成吻合,不作腹部小切口,可避免切口感染,缩短手术时间<sup>[2]</sup>.

吻合器吻合时,安置抵钉座后于抵钉座上结扎1根丝线后还纳入腹腔,可避免在小肠襻中寻找回肠断端的困难.由于吻合常位于直肠上段或直肠乙状结肠交界,应采用弯吻合器,在直肠腔内插入时应小心避开直肠横襞,有时会难于插到位,应轻柔、耐心.吻合时,由于腹腔镜大体观不如开放手术,应反复确认回肠系膜无扭转再吻合.另外,手助器的应用可进一步加

快全结肠的分离速度,有利于减轻操作困难,确保手术安全,缩短学习曲线,对于操作较困难、耗时长的完全腹腔镜全结肠切除术是一种有效的辅助方法<sup>[3]</sup>.

腹腔镜全结肠切除术由于手术范围大,涉及腹腔内多个视野,需多次更换镜头位置和其他器械,手术时间长,本组平均手术时间为323 min,较我们同期的8例开放全结肠切除的276 min延长47 min,与文献的平均延长30-50 min接近.Chen et al<sup>[4]</sup>报道腹腔镜辅助全结肠切除、回肠直肠吻合术治疗家族性腺瘤性息肉病2例,认为是安全、容易的方法.Marcello et al<sup>[1]</sup>报道19例完全腹腔镜全结肠切除术和29例开放全结肠切除术治疗急性中毒性结肠炎的结果,2组的出血量接近,虽然腹腔镜组虽然手术时间长,但腹腔镜手术后肠功能恢复快.而腹腔镜全结肠切除术具有创伤小、疼痛轻、住院短和恢复快的优点,本组及文献报道也说明这一手术是安全、有效的,且术后患者均对外观美容效果满意.

#### 4 参考文献

- 1 Marcello PW, Milsom JW, Wong SK, Brady K, Goormastic M, Fazio VW. Laparoscopic total colectomy for acute colitis: a case-control study. *Dis Colon Rectum* 2001;44:1441-1445
- 2 Inoue Y, Noro H, Komoda H, Kimura T, Mizushima T, Taniguchi E, Yumiba T, Itoh T, Ohashi S, Matsuda H. Completely laparoscopic total colectomy for chronic constipation: report of a case. *Surg Today* 2002;32:551-554
- 3 Targarona EM, Gracia E, Garriga J, Martinez-Bru C, Cortes M, Boluda R, Lerma L, Trias M. Prospective randomized trial comparing conventional laparoscopic colectomy with hand-assisted laparoscopic colectomy: applicability, immediate clinical outcome, inflammatory response, and cost. *Surg Endosc* 2002;16:234-239
- 4 Chen JB, Wang HM, Chen CC. Laparoscopic-assisted operation for familial adenomatous polyposis patients-two case reports. *JSLs* 2002;6:189-191

## 内镜下氩离子凝固术治疗胃肠息肉

毛振彪, 黄介飞, 陆静娴, 俞智华, 倪润洲

毛振彪, 黄介飞, 陆静娴, 俞智华, 倪润洲, 南通医学院附属医院消化内科 江苏省南通市 226001

项目负责人: 毛振彪, 226001, 江苏省南通市西寺路 27, 江苏省南通医学院附属医院消化内科.

电话: 0513-5052453 传真: 0513-3519878

收稿日期: 2003-06-05 接受日期: 2003-08-18

#### 摘要

目的: 探讨内镜下氩离子凝固术(APC)对胃肠各种类型息肉的治疗价值和安全性.

方法: 广基扁平息肉 19 例(45 枚), 行内镜下 APC 切除; 细蒂息肉(蒂直径 < 0.8 cm) 4 例(4 枚), 行 ICC200 圈套切除; 大息肉(直径 > 2 cm) 和粗蒂息肉(蒂直径 > 0.8 cm) 4 例(4 枚), 行内镜下金属钛夹 Clip-APC 序贯治疗.

结果: 内镜下 APC 皆能清除各种大小的广基扁平息肉, 包括位于消化道弯曲处和结肠皱襞沟病灶, Endocut 高频电刀切除细蒂息肉切口平整, 无粘连和碳化, Clip-APC 序

贯治疗可完全根除大息肉和粗蒂息肉。少数病例有腹胀不适,无出血、穿孔等严重并发症。

结论:APC治疗广基扁平息肉简单、有效,结合智能电刀切除细蒂息肉较其他高频电刀更为安全。Clip-APC序贯治疗大息肉和粗蒂息肉,可根除病灶,有效止血,避免复发,有一定的临床推广价值。

毛振彪,黄介飞,陆静娴,俞智华,倪润洲.内镜下氩离子凝固术治疗胃肠息肉.世界华人消化杂志 2004;12(2):481-483

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/481.asp>

## 0 引言

氩离子凝固术(argon plasma coagulation, APC)是一种非接触性电凝固技术,其原理是利用特殊装置将氩气离子化,通过由钨丝电极产生的高频电能,能量被传导至靶组织产生凝固效应。国内外学者<sup>[1-5]</sup>经多年的临床实践,证实APC在消化内镜治疗方面具有简便、有效、安全等优点。本文探讨内镜下APC治疗胃肠各种类型息肉的价值和安全性。

## 1 材料和方法

1.1 材料 2002-12/2003-03,因腹痛、嗝气、返酸、腹泻和便血等症状来我院行电子胃镜和电子肠镜检查者27例,男16例,女11例,年龄24-81岁,平均46.2岁。息肉部位:食管2枚,胃14枚,十二指肠1枚,直肠16枚,乙状结肠12枚,降结肠6枚,升结肠2枚。息肉直径:小于0.5 cm 20枚,0.5-1.0 cm 22枚,1.0-1.5 cm 4枚,1.5-2.0 cm 3枚,2.0-2.5 cm 2枚,大于2.5 cm 2枚。息肉形态:扁平型27枚,广基型18枚,亚蒂型4枚,有蒂型4枚(其中蒂直径小于0.8 cm 4枚,大于0.8 cm 4枚)。器械:主要设备为德国ERBE公司生产的内镜专用APC系统,氩气发生器为APC300,高频电流发生器为Endocut ICC200,设定氩气流量为2 L/min,功率40-80 W;胃肠道用APC探头直径2.3 mm,长2.2 m,金属夹推送器为HX-5LR-1,金属钛夹为MD-850。

1.2 方法 在电子胃镜或电子肠镜的直视下,观察胃或结肠病灶,对于胃肠广基扁平息肉,经内镜钳道插入氩离子凝固器导管,导管伸出内镜头端,直至病灶上方0.5-1.0 cm处,以每次1-3 s的时间施以氩离子凝固治疗,直至病灶表面泛白、泛黄,甚至出现黝黑样变,APC治疗次数视病灶大小、质地情况决定。对于息肉直径小于2.0 cm,蒂直径小于0.8 cm者,则以Endocut ICC200圈套器切除,切割时电凝效果设置为2,设置功率限值为80 W;对于息肉直径大于2.0 cm,蒂直径大于0.8 cm者,则通过内镜钳道插入金属推送器,用金属钛夹夹大息肉近基底部的蒂柄,以色泽变紫为结扎有效的标志,2-4 wk后复查内镜,息肉残留部分再行APC治疗。

## 2 结果

2.1 广基扁平息肉 APC 治疗 19例 45枚广基扁平息肉,

直径小于0.5 cm的病灶APC治疗1次,病灶创面均凝固泛白,0.5-1.0 cm者需2-3次,1.0-1.5 cm者需3-5次,1.5-2.0 cm需5-6次凝固治疗。其中4枚病灶分别位于贲门下大弯侧、十二指肠球部大弯侧、直肠-乙状结肠弯角处和乙状结肠皱襞沟,均1次完全灼除。本组2例在APC治疗过程中诉腹胀,经反复抽吸气体后缓解,未出现其他并发症。

2.2 细蒂息肉Endocut ICC200治疗 4例蒂直径小于0.8 cm的息肉,则以Endocut ICC200圈套器切除,切口平整,无粘连、碳化、烟雾等,切面无出血、穿孔等并发症。

2.3 粗蒂大息肉Clip-APC序贯治疗 4例息肉直径大于2.0 cm,蒂直径大于0.8 cm者,则先以金属钛夹(1-3枚)钳夹大息肉近基底部的蒂柄,完全阻断血供,则见息肉表面色泽由红变紫,2-4 wk复查内镜见息肉坏死脱落,残留病灶再以APC完全灼平,治疗过程中未见出血、穿孔等。

2.4 临床病理情况 炎性息肉4例,增生型息肉10例(其中2例胃窦扁平息肉伴有肠上皮化生和中度异型增生),管状腺瘤10例,绒毛状腺瘤3例。

## 3 讨论

根据物理学原理,电流通过离子化的氩气将使导向的靶组织表面产生高温凝固,APC装置就是利用此工作原理产生效应的,其具有非接触性、轴向传导、侧向传导、自动导向<sup>[6]</sup>和对深部组织损害较小<sup>[2]</sup>等特点。近年来内镜下APC已被国内外消化界广泛接受,主要应用于非静脉曲张消化道出血的内镜下止血、血管畸形病变、小隆起型病变、Barrett's食管及晚期肿瘤的姑息治疗<sup>[1-5]</sup>。

胃肠道息肉及腺瘤具有潜在恶变的可能,内镜检查发现时应予切除。对于广基扁平息肉,直径小于1.5 cm者,一般采用微波或热凝电极等治疗,尽管这2种方法操作简单,但探头易与病灶组织发生粘连,操作者需不断清理探头,产生的烟雾大,影响操作视野,妨碍治疗进程;直径大于1.5 cm广基扁平息肉可行黏膜圈套切除术,但术中、术后胃肠道出血、穿孔有一定的发生率,如圈套切除不彻底,病灶边缘部分残留,可引起日后复发。APC在这方面却显示独特的优越性。我们采用内镜下APC治疗19例(45枚)胃肠广基扁平息肉,病灶直径小于0.5 cm者,APC治疗1次,病灶表面凝固泛白,0.5-1.0 cm者需2-3次,1.0-1.5 cm者需3-5次,1.5-2.0 cm者需5-6次凝固治疗,本组患者病灶均完全灼除。治疗过程中探头与组织不会发生粘连,产生的烟雾极少,不影响操作视野,单个病灶的治疗时间较短,与常规微波或热凝电极比较,更为便捷。此外,在一些受解剖条件限制微波、热凝电极或黏膜切除术等操作技术的患者中,使用APC术则具有更好的灵活性和安全性。本组病例中有4枚病灶位于贲门口下大弯侧、十二指肠球部大弯侧、直肠-乙状结肠弯角处和乙状结肠皱襞沟,最初拟用微波治疗,通过调整内镜操作旋钮,变换患者体位,微波探头仍无法与病灶部位接

触,遂改用APC治疗,利用其非接触性、侧向传导的特点,均完全灼平病灶。

内镜下高频电摘除有蒂息肉是治疗消化道息肉的首选方法。ERBE开发了新的高频电装置 Endocut ICC200,其应用 Power Peak 系统,具有内切、弱电凝、凝固3种功能,可感知与之接触的组织电阻,在瞬间产生不同的电流、电压变化,进而自动控制其输出功率。本组4例细蒂息肉采用 ICC200 治疗,均一次套切成功,切口平整,无粘连、无碳化、无烟雾,术中、术后无出血、穿孔等迹象,与其他高频电刀相比,显得更加方便和安全。

大息肉和粗蒂息肉常有大血管存在,即使选择良好的电凝、电切指数,电凝切除时即时或术后出血甚至穿孔的可能性较大。近年来许多学者开展的内镜直视下尼龙圈和金属夹结扎大息肉蒂部,阻断血流后再行电凝切除,增加了安全性<sup>[6]</sup>。我们对4例大息肉和粗蒂息肉采用 Clip-APC 序贯治疗法,即先以金属夹牢固地钳夹息肉蒂基部,通过结扎滋生血管,使其黏膜及黏膜下组织发生缺血、绞窄、坏死后自行脱落,2-4 wk 后对其残留部分再行 APC 治疗,避免了日后复发。我们认为 Clip-APC 序贯治疗大息肉和粗蒂息肉,方法简单、疗效确切、安全性高,有一定的临床推广价值。

采用内镜下 APC 切除癌前病变是近年来消化界关注的热点。国外学者<sup>[7,9]</sup>报道单用 APC 或联合应用 APC 和黏膜切除术治疗 Barrett's 食管,术后随访发现大部分病灶部位柱状上皮被鳞状上皮所取代,异型增生程度减轻或消失。我们应用 APC 治疗2例胃窦扁平状息肉伴肠上皮化生和 II 级异型增生,尚在随访之中。APC 治疗癌前病变至今仍缺乏大样本、随机及回顾性的研

究,对其最终评价仍需进一步的临床实践及资料积累。我们建议:(1)结合内镜超声检查,以了解癌前病变区域累及胃肠壁层次和范围,仅限于黏膜层,可选用 APC 切除;(2)APC 治疗效果不受组织表面显色影响,为保证病变区域完全切除,减少复发率,APC 切除前应对病变区域行常规膜染色;(3)为确保日后内镜随访病变区域的前后一致性,正确地判断 APC 切除癌前病变的疗效,对所需 APC 治疗的病灶均需术前定位(如注射墨汁)。

#### 4 参考文献

- Grund KE, Storek D, Farin G. Endoscopic argon plasma coagulation(APC): first clinic experiences in flexible endoscopy. *Endosc Surg Allied Technol* 1994;2:42-46
- Wahab PJ, Mulder CJ, den Hartog G, Thies JE. Argon plasma coagulation in flexible gastrointestinal endoscopy: pilot experiences. *Endoscopy* 1997;29:196-198
- Johanns W, Luis W, Janssen J, Kahl S, Greiner L. Argon plasma coagulation(APC) in gastroenterology: experimental and clinic experiences. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9:581-587
- 吴云林,冯莉,孙波,季圣防,季雁浩,方文莉,诸琦,钟捷.氩离子血浆凝固术治疗胃肠广基扁平息肉和出血. *中华消化内镜杂志* 2001;18:325-327
- 陈隆典,韩树堂,徐肇敏,盛永宏.氩离子凝固器内镜下治疗的探讨. *中华消化内镜杂志* 2002;19:221-223
- Farin G, Grund KE. Technology of argon plasma coagulation with particular regard to endoscopic applications. *Endosc Surg Allied Technol* 1994;2:71-77
- Byrne JP, Armstrong GR, Attwood SE. Restoration of the normal squamous lining in Barrett's Esophagus by argon beam plasma coagulation. *Am J Gastroenterol* 1998;93:1810-1815
- 徐富星.内镜诊治消化道息肉的进展. *中华消化内镜杂志* 1999;16:133-134
- Van Laethem JL, Jagodzinski R, Peny MO, Gremer M, Deviere J. Argon plasma coagulation in the treatment of Barrett's high-grade dysplasia and in situ adenocarcinoma. *Endoscopy* 2001;33:257-261

## 肝硬化门脉系统食管侧支血流动力学与血浆内皮素的关系

肖际东,李瑞珍,周平,朱文晖

肖际东,李瑞珍,周平,朱文晖,中南大学湘雅三医院超声科  
湖南省长沙市 410013  
湖南省自然科学基金项目, No. 02JJY3024  
项目负责人:周平, 410013, 湖南省长沙市桐梓坡路 361 号, 中南大学湘雅三医院超声科, jidongxiao1975@hotmail.com  
电话: 0731-8618402 传真: 0731-8836032  
收稿日期: 2003-08-23 接受日期: 2003-09-24

### 摘要

目的:探讨内皮素与门静脉系统食管侧支等血流动力学变化的关系。

方法:采用放免法对24例肝硬化患者外周血浆内皮素含量进行检测,应用内镜超声观测肝硬化患者食管曲张静脉内径,分析曲张静脉内径与内皮素的相关性;应用无创食管曲张静脉测压仪测量肝硬化患者曲张静脉压力,分析曲张静脉压力与内皮素的相关性。

结果:肝硬化患者内皮素水平与曲张静脉内径( $r=0.558$ ,  $P<0.05$ )、压力成正相关( $r=0.648$ ,  $P<0.05$ )。

结论: 内皮素通过影响门脉及食管侧支的压力, 在肝硬化门脉高压及食管静脉曲张的发生发展中起重要作用。

肖际东, 李瑞珍, 周平, 朱文晖. 肝硬化门脉系统食管侧支血流动力学与血浆内皮素的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(2):483-485

http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/483.asp

## 0 引言

肝硬化门脉高压时存在严重的门脉系统血流动力学紊乱, 其原因可能与体内某些血管活性物质有关<sup>[1-12]</sup>. 其中以内皮素备受人们关注<sup>[1-12]</sup>. 我们测定肝硬化患者外周血浆内皮素的水平, 并采用内镜超声及无创测压仪等先进设备, 研究肝硬化患者食管侧支血流动力学各项指标的变化与血浆内皮素水平的关系如下。

## 1 材料和方法

1.1 材料 ACUSON128XP/10 彩色多普勒超声仪, 探头频率 2.5-7.5 MHz, 为扇扫电子相控阵变频探头, 取样容积 1-10 mm, 内镜超声 Olympus PV240 型. 我院门脉高压中心研制的食管曲张静脉测压仪. SN-695B 型智能放免 r 检测仪, LD5 -2A 离心机, 电热恒温水浴箱. -70 °C 低温冰箱. 肝硬化来自 2002-05/11 住院患者, 均为住院乙型肝炎后肝硬化及酒精性肝硬化并发食管静脉曲张患者, 共 24 例, 其中男 18 例, 女 6 例, 年龄 31-68 岁。

1.2 方法 清晨空腹抽静脉血 2 mL, 注入含 100 g/L EDTA 二钠 30 uL 和抑肽酶 40 uL 的试管中混匀, 4 °C 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血浆 -70 °C 保存标准待测. 试剂盒由北京东亚免疫技术研究所提供, 采用非平衡竞争法测定血浆中 ET 的含量, I-ET 与标准或样品同时竞争地与内皮素抗体结合, 根据样品管中放射性含量直接从标准曲线上查出相应的内皮素含量. 应用内镜超声观测食管黏膜下静脉的内径, 选择管径最大的一根予以记录, 并按 Nobuhiko 标准分级; 应用无创测压仪贴壁测量曲张静脉的压力. 压力测量 3 次, 取平均值。

统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件包, 所有数据以均数 ± 标准差表示, 两组数据间相关性应用直线相关性分析。

## 2 结果

肝硬化患者内皮素与曲张静脉内径具有正相关( $r=0.558$ ,  $P<0.05$ ). 曲张静脉压力与内皮素水平具有正相关( $r=0.648$ ,  $P<0.05$ ).

## 3 讨论

门静脉压的升高是食管曲张静脉等门静脉侧支形成及发展的起始, 也是最重要的因素. 内皮素可通过增加肝内及侧支血管阻力, 同时参与门脉高动力循环使门脉压升高, 参与曲张静脉的发生发展. 其次, 高动力循环使通过胃食管曲张静脉从门静脉分流入体循环的血流

量增加, 这也是静脉曲张和不断扩张的重要因素. 内皮素等多种血管活性物质可引起水钠潴留, 引起血容量增加, 促进食管侧支的形成. 侧支血管的阻力是曲张静脉压的重要决定因素, 也是曲张静脉扩张和破裂的因素. Chan et al<sup>[13]</sup>应用内皮素 -1, 发现可直接对侧支血管有收缩作用, 从而增加侧支血管阻力. Ohtam et al<sup>[14]</sup>发现, 门脉高压食管黏膜下静脉与对照组比较, 内皮素 -1 蛋白, ETAR、ETBRmRNA 显著增多, 门脉高压引起内皮素 -1 在食管黏膜下静脉过度表达. 这些基础研究说明在肝硬化动物模型中, 内皮素 -1 可调节门脉侧支血管阻力, 从而调节食管曲张静脉压. 我们证实了在肝硬化食管静脉曲张的患者中, 内皮素与曲张静脉压有相关性; 这与动物模型的研究一致. 因此, 在肝硬化患者中, 内皮素可能作用于曲张静脉等侧支血管, 引起侧支阻力增加, 从而使曲张静脉压增加. 食管曲张静脉压力测定近年受到日益重视, 被认为是预测食管曲张静脉破裂出血的最主要指标. 曲张静脉压力的大小及突然变化的幅度是决定曲张静脉是否破裂的重要因素. 前瞻性研究表明, 当食管曲张静脉压力大于 2.03 kPa, 出血可能性为 78%<sup>[15]</sup>. 内皮素是调节曲张静脉压的重要活性物质, 内皮素水平的调控, 对曲张静脉压增高导致的曲张静脉破裂出血治疗有重要意义. 临床发现应用内皮素拮抗剂及相关药物治疗曲张静脉破裂出血有效, 本研究为此提供理论依据。

## 4 参考文献

- 1 姚冬梅, 姚希贤, 杨川杰, 冯志杰, 房红梅, 高军萍. 肝硬化不同病期 ET-1, NO 对离体肝脏血流动力学的调节作用. 世界华人消化杂志 2003;11:726-729
- 2 Liu F, Li JX, Li CM, Leng XS. Plasma endothelin in patients with endotoxemia and dynamic comparison between vasoconstrictor and vasodilator in cirrhotic patients. *World J Gastroenterol* 2001;7:126-127
- 3 Vaughan RB, Angus PW, Chin-Dusting JP. Evidence for altered vascular responses to exogenous endothelin-1 in patients with advanced cirrhosis with restoration of the normal vasoconstrictor response following successful liver transplantation. *Gut* 2003;52:1505-1510
- 4 Fiorucci S, Antonelli E, Morelli A. Nitric oxide and portal hypertension: a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic acid that selectively releases nitric oxide in the liver. *Dig Liver Dis* 2003;35(Suppl 2):S61-69
- 5 Yao D, Yao X, Yang C, Feng Z, Fang H, Gao J. Effects of ET-1 on isolated perfused rat liver and vascular rings at two stages of cirrhosis. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:1565-1568
- 6 Yang L, Liu X, Fu H, Qiang O, Huang M. TGF beta 1 and ET-1 expression in the peripheral blood of patients with cirrhosis. *Huaxi Yike Daxue Xuebao* 2001;32:202-203
- 7 Yokomori H, Oda M, Yasogawa Y, Nishi Y, Ishii H. Signal detection of endothelin receptor subtypes in human cirrhotic liver by a new in situ hybridization method. *Med Electron Microsc* 2000;33:207-216
- 8 Zhan Q, Guo J, Tang J. Alternation of the level of plasma calcitonin gene related peptide and endothelin-1 in liver cirrhosis. *Zhonghua Neike Zazhi* 1999;38:91-93
- 9 Hasegawa T, Kimura T, Sasaki T, Okada A. Plasma endothelin-1 level as a marker reflecting the severity of portal hypertension in biliary atresia. *J Pediatr Surg* 2001;36:1609-1612
- 10 Kojima H, Sakurai S, Kuriyama S, Yoshiji H, Imazu H,

- Uemura M, Nakatani Y, Yamao J, Fukui H. Endothelin-1 plays a major role in portal hypertension of biliary cirrhotic rats through endothelin receptor subtype B together with subtype A in vivo. *J Hepatol* 2001;34:805-811
- 11 张喆颖, 任锡玲, 姚希贤. 内皮素与一氧化氮在肝硬化血流动力学紊乱中的作用. *华人消化杂志* 1998;6:588-590
- 12 张弛, 刘建军, 王吉耀. 选择性内皮素受体拮抗剂对肝硬化门脉高压症大鼠血流动力学的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8:1339-1344
- 13 Chan CC, Wang SS, Lee FY, Chang FY, Lin HC, Chu CJ, Chen CT, Huang HC, Lee SD. Endothelin-1 induces vasoconstriction on portal-systemic collaterals of portal hypertensive rats. *Hepatology* 2001;33:816-820
- 14 Ohta M, Pai R, Kawanaka H, Ma T, Sugimachi K, Sarfeh II, Tarnawski AS. Expression of endothelin-1, and endothelin A and B receptors in portal hypertensive esophagus of rats. *J Physiol Pharmacol* 2000;51:57-67
- 15 Kravetz D, Bildozola M, Argonz J, Romero G, Korula J, Munoz A, Suarez A, Terg R. Patients with ascites have higher variceal pressure and wall tension than patients without ascites. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1770-1775

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

• 临床经验 •

## 大黄与促肝细胞生长素联合治疗重型肝炎

黄以群, 林珍辉, 纪树梅, 王喻, 王崇国

黄以群, 林珍辉, 纪树梅, 王喻, 王崇国, 中国人民解放军第一八零医院肝病研究中心 福建省泉州市 362000

项目负责人: 黄以群, 362000, 福建省泉州市, 中国人民解放军第一八零医院肝病研究中心. 180hyq@sina.com

电话: 0595-2668811 传真: 0595-2777800

收稿日期: 2003-06-17 接受日期: 2003-07-24

### 摘要

目的: 探讨大黄和促肝细胞生长素(PHGF)联合治疗重型肝炎的疗效机制。

方法: 35例患者随机分成两组, 在其他综合治疗的基础上, 治疗组18例, 采用大黄联合PHGF治疗, 对照组17例, 采用门冬氨酸钾镁治疗, 疗程各6 wk. 疗程中定期观察两组治疗前后肝功能、血氨、血浆内毒素(LPS)及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和IL-6、IL-8的变化。

结果: 治疗后4 wk, 治疗组ALT、TBIL、LPS、血氨及IL-6、IL-8和TNF- $\alpha$ 值分别为 $83.25 \pm 33.17$ 、 $103.35 \pm 75.51$ 、 $22.74 \pm 15.37$ 、 $77.23 \pm 35.64$ 、 $62.34 \pm 5.37$ 、 $188.86 \pm 16.54$ 、 $2.84 \pm 0.66$ 与对照组对比有显著性差异( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 治疗后6 wk, 治疗组ALT、TBIL、LPS、血氨及IL-6、IL-8和TNF- $\alpha$ 值分别为 $56.31 \pm 36.32$ 、 $64.34 \pm 56.28$ 、 $16.68 \pm 9.31$ 、 $51.64 \pm 34.17$ 、 $49.58 \pm 5.16$ 、 $138.83 \pm 12.67$ 、 $2.35 \pm 0.23$ 与对照组对比有显著性差异( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

结论: 大黄联合PHGF对肝坏死有明显保护作用, 其机制可能与抑制内毒素、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8等炎症物质的产生有关, 二者合用疗效更佳。

黄以群, 林珍辉, 纪树梅, 王喻, 王崇国. 大黄与促肝细胞生长素联合治疗重型肝炎. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):485-487

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/485.asp>

### 0 引言

重型肝炎中血氨、血浆内毒素(LPS)及细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8)等有害因素明显升高, 影响着重型肝炎的治疗效果及预后. 为提高治愈率及生存率, 我院于2000-08/2003-02用大黄联合促肝细胞生长素(PHGF)治疗重型肝炎18例, 观察肝功能、血氨、LPS、TNF- $\alpha$ 和IL-6、IL-8的变化, 现将结果报道如下:

### 1 材料和方法

1.1 材料 2000-08/2003-02住院乙型肝炎患者35例, 随机分成2组, 治疗组18例, 男12例, 女6例, 平均41.2岁. 按临床分型: 急性重型6例, 亚急性重型8例, 慢性重型4例. 对照组17例, 男12例, 女5例, 平均39.4岁. 按临床分型: 急性重型6例, 亚急性重型7例, 慢性重型4例. 上述两组性别、年龄、病情、病程比较无显著性差异. 所有病例均参照2000年西安制定的《病毒性肝炎防治方案》诊断标准<sup>[1]</sup>.

1.2 方法 治疗方法: 两组疗程均为6 wk. 基础治疗相同(给血浆、白蛋白、支链氨基酸、甘草酸二胺、维生素C及其他对症治疗). 治疗组(18例): 口服生大黄粉6-10 g/d, 分2-3次, 以温开水调成稀糊状口服或胃管注入胃中; PHGF(空军广州医院制备) 100-120 mg加入100 g/L葡萄糖250 mL内静滴, 1次/d. 对照组(17例): 门冬氨酸钾镁30 mL加入100 g/L葡萄糖250 mL内静滴, 1次/d. 实验检测: (1)疗程中及时观察主要症状及体征变化. (2)治疗前(0 wk)及治疗后2 wk、4 wk、6 wk取血分别常规检测谷丙转氨酶(ALT)、总胆红素(TBil)及血氨; 双抗体夹心ELISA法检测TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8; 鲎基质定量法检测血浆内毒素. (3)疗效判断: 显效: 疗程结束时, 临床症状消失或明显改善, 肝无肿大, ALT及TBil降

至正常. 有效: 疗程结束时, 临床症状好转, 肝肿大缩小, ALT及TBiL降至治疗前50%以上. 无效: 全疗程治疗后, 临床和生化指标无改善或加重. 死亡: 治疗过程中, 病情恶化死亡.

统计学处理 实验数据以 mean±SD 表示, 采用 t 检验及  $\chi^2$  检验, 所有数据均利用 SAS 软件分析.

## 2 结果

2.1 疗效 两组疗效对比有显著性差异( $P < 0.01$ ), 表明大黄联合 PHGF 治疗重型肝炎具有很好的疗效(表 1).

表 2 不同时间 2 组血清中肝功、血氨、LPS 及细胞因子的变化(mean±SD)

组别	ALT (U/L)	TBiL ( $\mu\text{mol/L}$ )	LPS ( $\mu\text{g/L}$ )	血氨 ( $\mu\text{mol/L}$ )	IL-6 ( $\mu\text{g/L}$ )	IL-8 ( $\mu\text{g/L}$ )	TNF- $\alpha$ ( $\mu\text{g/L}$ )
治疗组							
0 wk	418.85 ± 251.74	413.27 ± 115.61	63.78 ± 22.31	163.24 ± 67.23	97.23 ± 6.15	323.56 ± 24.52	4.78 ± 0.54
2 wk	284.13 ± 64.81	221.62 ± 78.36	33.24 ± 18.54	121.37 ± 32.21	74.28 ± 4.36	271.25 ± 17.84	3.68 ± 0.75
4 wk	83.25 ± 33.17 <sup>a</sup>	103.35 ± 75.51 <sup>a</sup>	22.74 ± 15.37 <sup>a</sup>	77.23 ± 35.64 <sup>b</sup>	62.34 ± 5.37 <sup>a</sup>	188.86 ± 16.54 <sup>a</sup>	2.84 ± 0.66 <sup>a</sup>
6 wk	56.31 ± 36.32 <sup>a</sup>	64.34 ± 56.28 <sup>a</sup>	16.68 ± 9.31 <sup>b</sup>	51.64 ± 34.17 <sup>b</sup>	49.58 ± 5.16 <sup>a</sup>	138.83 ± 12.67 <sup>b</sup>	2.35 ± 0.23 <sup>b</sup>
对照组							
0 wk	427.26 ± 273.65	395.37 ± 103.82	63.81 ± 25.46	166.33 ± 65.83	95.38 ± 6.84	337.35 ± 25.74	4.81 ± 0.48
2 wk	325.26 ± 138.12	244.32 ± 94.04	39.81 ± 29.58	131.45 ± 57.24	76.58 ± 5.06	284.52 ± 22.94	3.71 ± 0.68
4 wk	126.62 ± 81.52	165.83 ± 94.27	36.07 ± 21.24	116.45 ± 46.73	67.42 ± 5.81	202.28 ± 19.78	3.31 ± 0.45
6 wk	89.73 ± 57.41	113.36 ± 67.23	28.21 ± 12.36	87.14 ± 35.48	54.36 ± 5.68	151.41 ± 13.68	2.81 ± 0.63

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

值分别为 2.083、2.170、2.136、2.801、2.688、2.182、2.448 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 治疗后 6 wk, 2 组经配对 t 检验, t 值分别为 2.071、2.344、3.129、3.016、2.612、2.824、2.893 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 表 2.

2.3 副作用 大黄副作用小, 主要是腹泻、味苦, 偶见胃痛、纳差; PHGF 副作用小, 偶见局部胀痛. 均不需特殊处理, 所有患者均可耐受.

## 3 讨论

体内高活性 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 与内毒素血症有关, 内毒素是 TNF- $\alpha$  的强诱导剂, 而 TNF- $\alpha$  在体内也能诱导肝细胞合成 IL-6、IL-8 等, 这些细胞因子可引起肝内异常免疫反应, 介导肝细胞损伤、坏死<sup>[2-3]</sup>, 因此减轻内毒素血症, 可降低血清高活性 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 水平, 减轻肝细胞损伤.

重型肝炎时机体免疫功能低下, 肝脏解毒能力差, 容易出现高血氨及内毒素血症. 大黄性苦寒, 具有攻积通便、泻火凉血、活血祛瘀、利胆退黄、清泄湿热等功效, 通过大黄导泻可使肠道内病原体及各种有毒物质排出体外, 抑制肠道内毒素的吸收, 显著降低内毒素血症. 现代实验证实, 大黄能抑制体液免疫, 增强细胞免疫, 具有免疫调控、稳定机体内环境、修复肝细胞等作用. 大黄治疗重型肝炎的作用机制: (1) 阻断内毒素诱

表 1 两组疗效比较

组别	n	显效	有效	无效	死亡	有效率 %
治疗组	18	7	4	3	4	61.11
对照组	17	3	3	4	7	35.29
P 值						< 0.01

2.2 治疗后 2 组肝功能、血氨、LPS 及 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 的变化 于治疗后 4 wk, 2 组血浆中 ALT、TBiL、LPS、血氨、IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$  经配对 t 检验, t

生 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 等细胞因子<sup>[4-5]</sup>; (2) 刺激肝细胞 DNA 的合成, 稳定肝细胞膜, 促进肝细胞再生<sup>[6]</sup>; (3) 增强 Kupffer 细胞功能, 提高肝脏清除内源性及外源性内毒素的能力, 促进肝功能恢复<sup>[7]</sup>. PHGF 是从乳猪新鲜肝脏提取的多肽类活性物质, 能刺激肝细胞 DNA 的合成, 促进肝细胞再生; 提高肝脏清除内源性及外源性内毒素的能力; 可阻断诱导 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 等的过程, 降低体内 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 等细胞因子的活性, 逆转重型肝炎的病理过程<sup>[8-9]</sup>.

血氨升高是重型肝炎发生肝性脑病的重要诱因之一<sup>[10]</sup>, 经研究发现治疗组血氨下降明显高于对照组, 表明大黄联合 PHGF 可以显著降低患者体内血氨的水平, 对防治肝性脑病及减轻肝脏负担有很好的疗效. 另研究结果显示治疗组内毒素、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 下降明显高于对照组, 因内毒素、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 等有害物质减少, 从而缓解肝脏炎症凋亡及坏死, 减轻肝内胆汁淤积, 促进肝细胞再生. 表明大黄联合 PHGF 不仅能明显降低血浆中内毒素、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 的产生, 而且可明显退黄、降酶、改善肝细胞. 目前国内有关大黄或 PHGF 治疗病毒性肝炎疗效的报道较多, 但二者联合的报道甚少, 我们研究的结果提示大黄联合 PHGF 对肝坏死有明显保护作用, 其机制可能与抑制内毒素、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 等炎症物质的产

生有关,且二者合用副作用小,安全,是目前治疗重型肝炎较为理想的联合用药。

#### 4 参考文献

- 1 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,肝病学会联合修订.病毒性肝炎防治方案.中华肝病杂志 2000;8:324-329
- 2 于岩岩,斯崇文,田秀兰,何群,薛海鹏.多种细胞因子单独及协同作用对肝坏死影响的实验研究.中华医学杂志 1996;76:258-261
- 3 陈宪锐,周玉霞,玄梅香,吴多文,尹燕明,魏佑农,王连成,赵新平.病毒性肝炎患者血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-8 水平动态研究.中华传染病杂志 1999;17:115-117
- 4 陈德昌,李红江,景炳文,陈学云,杨兴易.大黄对烫伤大鼠肝脏内

- 5 细胞因子基因表达的影响.中国危重病急救医学 1999;11:587-590
- 6 观晓辉,李韶光,杨小云,曾宏.口服大黄水对肝硬化患者血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平的影响.广东医学 2001;22:907-908
- 7 展玉涛,魏红山,工志荣,黄新,徐芹芳,李定国.大黄素对大鼠四氯化碳性肝损伤保护作用的实验研究.中国中医药科技 2000;7:30-31
- 8 陈德昌,杨兴易,景炳文,李红江.大黄对烫伤后肝脏内肿瘤坏死因子基因表达的影响.中华创伤杂志 2000;16:151-153
- 9 樊万虎,岳金声,朱凤群,张树林.促肝细胞生长素对重症肝炎患者血清 IL-6、IL-8 的影响.中国急救医学 1998;18:15-17
- 10 李灼亮,谢庆,郑茉莉,王宝奎.促肝细胞生长素对重症肝炎患者血浆 TNF 的影响.中华肝病学会肝脏病杂志 1995;3:173
- 11 蒋滢,蒋菊香,徐颖,朱庚伯.氨基酸代谢与肝性脑病.氨基酸和生物资源 2002;24:53-58

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

• 临床经验 •

## 5 km 长跑对新兵胆囊排空及胃肠激素的影响

李小丽,郝悦,杨风江,邹勤,李智力,李晓春

李小丽,郝悦,杨风江,邹勤,李智力,李晓春,武警海南总队医院 海南省海口市 570203  
项目负责人:李小丽,570203,海南省海口市,武警海南总队医院特诊科.lixiaoli123456@263.net  
电话:0898-65379374  
收稿日期:2003-03-07 接受日期:2003-03-26

### 摘要

目的:观察5 km长跑对新兵胆囊排空及胃肠激素的影响。

方法:采用实时超声和放免技术检测36名新兵5 km长跑前后胆囊排空及血浆胆囊收缩素(CCK)、血浆胃动素(MTL)、血管活性肠肽(VIP)和生长抑素(SS)水平的变化。

结果:长跑后空腹及脂餐后胆囊排空指数、MTL水平均明显低于长跑前,且MTL与胆囊排空指数呈正相关( $r_{\text{空腹}}=0.78$ ,  $r_{\text{餐后}}=0.89$ ,  $P<0.01$ ),长跑前后空腹血浆CCK水平比较无显著性差异,长跑后脂餐后血浆CCK水平低于长跑前,脂餐后CCK与胆囊排空指数呈显著正相关( $r=0.86$ ,  $P<0.01$ ).长跑后VIP水平在空腹及脂餐后均明显升高.血浆SS水平长跑前后比较差异无显著性。

结论:剧烈运动使空腹及餐后胆囊排空下降,血浆促胃肠动力激素(MTL、CCK)水平下降,抑制胃肠动力激素(VIP)水平升高,SS无明显变化。

李小丽,郝悦,杨风江,邹勤,李智力,李晓春.5 km长跑对新兵胆囊排空及胃肠激素的影响.世界华人消化杂志 2004;12(2):487-488

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/487.asp>

### 0 引言

部队常因军事训练、剧烈运动而引起消化道动力学及

胃肠激素水平的变化.目前剧烈运动对胆囊排空及胃肠激素水平改变研究甚少.我们通过5 km长跑观察和研究胆囊排空及胃肠激素水平的变化,为预防新兵剧烈运动对消化功能产生的影响提供理论依据。

### 1 材料和方法

1.1 材料 受试者系武警某部队新兵连战士36例,均为男性,年龄16-18岁,平均17.4岁,入伍后首次参加5 km长跑,所有受试者近期无消化不良,并经B超、X线及有关实验室检查排除各系统器质性疾病。

1.2 方法 受试者5 km长跑前1 d,晨起空腹静脉抽血6 mL,并行实时超声检查,然后食油煎鸡蛋二枚.分别于脂餐后30 min、40 min、50 min、60 min行超声检查.并于60 min时抽血6 mL.测定胆囊排空率及胃肠激素水平.新兵长跑后第2 d空腹及脂餐后行以上同样检查.胆囊排空测定,采用仪器为美国HP1500型彩超仪,探头频率为3.5 MHz.均由1人操作,受检者取平卧位及右侧卧位,选择显示胆囊最大长径a,横径b,前后径c.计算胆囊容积(gallbladder volume, GBV)和胆囊排空指数或胆囊排空率(GBEF),胆囊排空指数或胆囊排空率(GBEF)用下列公式计算:  $GBV = \pi/6abc = 0.52abc$ ;  $GBEF = (\text{空腹胆囊容积} - \text{脂餐后某时刻胆囊容积}) / \text{空腹胆囊容积} \times 100\%$ 。

血浆胃肠激素测定:取血样加入90  $\mu\text{L}$ 质量分数为100 mg/L乙二胺四乙酸二钠和90  $\mu\text{L}$ 抑肽酶试管中混匀,-4  $^{\circ}\text{C}$ 离心.取血浆,-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存.MTL试剂盒为北京东亚免疫研究所提供,CCK试剂盒为瑞典Euro-Diagnostica公司提供,VIP、SS试剂盒均为美国

Diasorin 公司提供, 严格按说明操作.

统计学处理 所有实验数据以 mean±SD 表示, 采用 NOSA 统计软件分析处理.

## 2 结果

2.1 5 km长跑后空腹及脂餐后各时间段胆囊排空指数均低于长跑前, 差异均有显著性(表 1).

表1 5 km长跑前后空腹及餐后不同时相胆囊排空指数(n=36, mean±SD)

级别	空腹		脂餐后		
	30 min	40 min	50 min	60 min	60 min
长跑前	16.65 ± 6.0	34.9 ± 11.6	38.9 ± 9.8	47.9 ± 1.3	54.7 ± 9.1
长跑后	11.97 ± 6.0 <sup>a</sup>	21.7 ± 9.5 <sup>b</sup>	22.0 ± 7.1 <sup>b</sup>	26.8 ± 7.1 <sup>b</sup>	32.5 ± 8.1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05 vs 长跑前; <sup>b</sup>P < 0.01 vs 长跑前.

2.2 血浆胃肠激素测定结果 长跑后空腹及脂餐后血浆MTL均低于长跑前, 长跑后脂餐后 CCK 水平低于长跑前脂餐后水平, 而空腹时 CCK 在长跑前后无明显变化. VIP 空腹及脂餐后长跑后水平均高于长跑前, 有显著差异. 空腹及餐后 SS 水平长跑前后无明显差异. 相关分析表明, 空腹及脂餐后 MTL 和脂餐后 CCK 与胆囊排空呈正相关(r 分别为 0.78, 0.89, 0.92, P < 0.01). 空腹及脂餐后 VIP 与胆囊排空指数呈负相关,(r 分别为 -0.76, -0.44, P < 0.01)(表 2).

表2 5 km长跑对血浆胃肠激素水平的影响(n=36, mean±SD)

	空腹		脂餐后 60 min	
	长跑前	长跑后	长跑前	长跑后
MTL (ng/L)	209.7 ± 42.2	98.6 ± 19.3 <sup>a</sup>	218.3 ± 19.3	113.3 ± 26.1 <sup>a</sup>
CCK (ng/L)	145.6 ± 35.9	131.7 ± 22.8	248.1 ± 18.2	170.6 ± 31.5 <sup>a</sup>
VIP (ng/L)	16.5 ± 4.9	20.4 ± 1.6 <sup>a</sup>	15.3 ± 4.3	20.3 ± 4.0 <sup>a</sup>
SS (ng/L)	17.5 ± 8.0	15.6 ± 4.9	8.6 ± 4.8	9.7 ± 7.0

<sup>a</sup>P < 0.01 vs 剧烈运动前.

## 3 讨论

剧烈运动对胆囊排空可产生影响. 剧烈运动后, 使机体处于一种较强的生理性(驱体性)应激状态. 应激可使大脑皮层兴奋性增高, 刺激下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴释放多种激素, 引起血浆胃肠激素的变化. Jonsson et al<sup>[1]</sup>研究发现, 胃泌素、胆囊收缩素 CCK 和生产抑制素(SS)均为对应激刺激敏感激素. 而血浆胃动素(MTL)、胆囊收缩素(CCK)、是胆囊动力的重要激素. 消化间期MTL呈周期性释放, 可调节消化间期胆囊的活动, 促使胆囊收缩, 排空胆汁<sup>[2]</sup>. 脂餐后胆囊收缩主要与 CCK 有关. CCK 是脂餐后胆囊收缩, oddi 括约肌舒张和胆汁排空的主要生理调节因子<sup>[3]</sup>. 本实验显示剧烈运动后空腹及脂餐后胆囊排空指数明显低于长跑前, 空腹血浆 MTL 值明显低于长跑前, VIP 值明显高于长跑前, 脂餐后血浆 MTL、CCK 值明显低于长跑前, VIP 值明显高于长跑前, 剧烈运动组胆囊排空指数分别与 MTL、CCK 水平呈显著正相关, 与 VIP 水平呈负相关. 实验结果表明 SS 水平在剧烈运动前后无明显变化.

故认为 5 km 长跑, 特别对新兵是一种较高强度的驱体性应激, 所以新兵训练期间, 应科学制定训练计划, 重视饮食调节及机体卫生保健工作, 进行适当的预防性治疗, 有利于改善剧烈运动对消化功能产生的不良影响, 减少或杜绝部队的非战斗减员具有深远意义.

## 4 参考文献

- 1 Jonsson BH, Uvnas Moberg K, Theorell T, Gotthard R. Gastrin, cholecystokinin, and somatostatin in a laboratory experiment of patients with functional dyspepsia. *Psychosom Med* 1998; 60:331-337
- 2 孙晓宁, 刘晓梅, 刘均平. 功能性消化不良患者胆囊排空及激素水平的研究. *中华消化杂志* 2001;6:356-359
- 3 兰康, 董蕾. 胆道运动和胆汁酸与消化间期移行性复合运动. *世界华人消化杂志* 2001;9:1071-1073

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

• 临床经验 •

# 药物性肝病 41 例

苏淑慧, 王春平, 李迎新, 冯永毅

苏淑慧, 王春平, 李迎新, 冯永毅, 中国人民解放军解放军 302 医院北京市 100039  
项目负责人: 苏淑慧, 100039, 北京市丰台区西四环中路 100 号, 中国人民解放军 302 医院内科. guohaoyue@etang.com  
电话: 010-66933766  
收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-07-24

## 摘要

目的: 分析 41 例药物性肝病的病因和临床特点, 以加深临

床医师对该病的认识.

方法: 根据患者服药史、临床表现、肝功检查作出综合判断.

结果: 引起肝病的有关药物中, 中药类占 36.6%, 抗结核类药占 19.5%, 抗肿瘤类药占 17.1%, 抗菌素类药占 7.3%, 激素类药占 7.3%. 其他药物还包括抗甲状腺类药、解热镇痛类药和镇静催眠类药. 临床分型: 急性药物性肝病 38 例,

慢性药物性肝病3例.经停药后治疗,有92.6%的病例预后良好,有2例亚急性重症肝炎患者死亡.

结论:临床医师应重视药物性肝病的预防、诊断和治疗.

苏淑慧,王春平,李迎新,冯永毅.药物性肝病41例.世界华人消化杂志 2004; 12(2):488-490

http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/488.asp

## 0 引言

近年来,随着临床应用药物种类的迅速增多,药物性肝损害的发生率也随之增加.据统计,药物性肝损害的发生率仅次于皮黏膜损害和药物热.我们通过对我科1996-11/2003-04确诊的41例药物性肝病进行临床分析,以加深临床医师对药物性肝病病因和临床表现的认识.

## 1 材料和方法

1.1 材料 41例患者中,男29例,女12例,年龄9-78岁,平均年龄46.7岁.19岁以下1例,20-39岁12例,40-59岁13例,60岁以上14例.

### 1.2 方法

1.2.1 诊断依据 (1)给予药剂后,大多于1-4 wk内出现肝损害表现,但也可于数月后才出现肝病的表现.少数的潜伏期可更长.(2)初发症状可有发热、皮疹、瘙痒等.(3)周围血液嗜酸性粒细胞大于6%.(4)有肝内胆汁淤积或肝实质细胞损害的病理和临床特点.(5)巨嗜细胞或淋巴细胞转化实验阳性.(6)HBsAg、抗-HBc、抗HAV-IgM、抗HCV、HDV和抗HEV阴性.(7)偶然再次给药后可发生肝损害.如有(1),加上(2)-(7)中的任何2条,即可考虑为药物性肝病.本组病例均符合上述诊断标准.

1.2.2 用药后发病时间及所用药物种类 用药后出现肝损害时间为:1-2 wk发病6例,2-4 wk发病8例,4-6 wk发病14例,6-8 wk发病8例,8 wk以上发病5例(表1).

1.2.3 临床表现 症状:乏力34例,纳差32例,尿黄25例,腹胀5例,皮肤瘙痒5例,发热7例,恶心6例,肝区痛2例.体征:皮肤巩膜黄染22例,肝区叩痛9例,肝大8例,皮疹2例,腹水2例,肝掌阳性2例.

1.2.4 实验室检查及辅助检查 谷丙转氨酶(ALT)升高39例,异常范围46-1 500 U/L以上.谷草转氨酶(AST)升高38例,异常范围47-1 500 U/L以上,碱性磷酸酶(ALP)升高38例,异常范围112-1 155 U/L,γ-谷氨酰转氨酶(GGT)升高37例,异常范围83-971 U/L,总胆红素(TBil)升高35例,异常范围22.7-493 μmol/L.直接胆红素(DBil)占总胆红素比值在60%以上者29例.胆碱酯酶(CHE)下降者21例,异常范围在618-5 210 u/L.40例患者甲、乙、丙、丁、戊及庚型肝炎病原学均阴性.1例患者为乙型肝炎慢性携带者.41例患者均行腹部B超检查,显示肝回声浓密者31例,脾厚5例,肝

弥漫性损害4例,慢性肝损害3例,脂肪肝3例,腹水2例.有6例行肝穿检查,病理均证实为药物所致肝损害.

1.2.5 并发症 低钾血症11例,肝性脑病3例.肝肾综合征2例,腹水2例,腹膜炎1例,上消化道出血1例.

1.2.6 治疗及转归 经停用有关或可疑药物、卧床休息、保肝、降酶、退黄、加强支持治疗及积极治疗各种并发症等综合措施,治愈13例,好转25例,治愈好转率达92.6%.平均住院41.3 d.无效自动出院1例.2例因亚急性重型肝炎并肝肾综合征死亡.

表1 引起药物性肝损害药物名称、例数及比率

药物名称	n	比例	药物名称	n	比例
1 中药类	15	36.6%	4 抗菌素类药	3	7.3%
藏红花			先锋霉素		
青黛			头孢三嗪		
雷公藤			5 激素类药	3	7.3%
复方中药汤剂			6 抗甲状腺类药	2	4.9%
复方中成药			他巴唑		
2 抗结核类药	8	19.5%	7 解热镇痛药	2	4.9%
异烟肼			扑热息痛		
利福平			安乃近		
吡嗪酰胺			8 镇静催眠药	1	2.4%
3 抗肿瘤类药	7	17.1%	安定		
5-氟尿嘧啶					
环磷酰胺					
羟基喜树碱					
长春新碱					

## 2 结果

从表1中可以看出引起肝病的有关药物中,中药类占36.6%,抗结核类药占19.5%,抗肿瘤类药占17.1%,抗菌素类药占7.3%,激素类药占7.3%.其他药物还包括抗甲状腺类药4.9%、解热镇痛类药4.9%和镇静催眠类药2.4%.

## 3 讨论

肝脏在药物代谢中起着非常重要的作用,许多药物在肝内经过生物转化(氧化、还原、水解、结合反应)而清除.这些药物本身或其代谢产物可引起肝脏损害<sup>[1]</sup>.最近,美国医学会杂志公布的一份材料表明,药物引起的肝病或肝损伤在药物不良反应中占有重要的位置<sup>[2]</sup>.药物引起的肝脏损害通常取决于两个因素,一是药物对肝脏的损害程度,二是机体对药物的反应.因此,药物性肝病的发病可能是直接的或间接的,引起药物性肝病的药物几乎包括临床各科应用的药物<sup>[3]</sup>.我科1996-11/2003-04共收治41例被确诊的药物性肝病患者,其中有20例患者入院时误诊为病毒性肝炎、急性黄疸型肝炎,有3例误诊为肝外梗阻性黄疸,有2例误诊为

肝炎后肝硬化并发腹水。本组病例中,引起肝损害的药物以中药类、抗结核类药、抗肿瘤类药物多见,所占比例分别为:36.6%、19.5%、17.1%。分析中药所占比例高的原因与本组60岁以上老年人所占比例较高有关,老年人共14例,占病例总数的三分之一,而大多老年人发病是服治疗骨质增生、银屑病、白癜风的中药所致。成年人则以服抗结核类药、抗肿瘤类药物多见。在我国许多人片面认为中药无副作用,比西药安全,可近年报告表明,中药引起的肝损害并不少见<sup>[4]</sup>。从本组资料总结的结果来看,中药所致肝损害占36.6%,高居首位,应引起广大临床医师足够重视。

药物性肝病的临床表现和实验室检查常无特异性,易被误诊为病毒性肝炎、阻塞性黄疸等肝胆疾病。在我国人群中,HBsAg的携带率很高,这种患者一旦发生药物性肝病常常被诊为慢性乙型肝炎,而不去深究其用药史,从而使诊断误入歧途。

药物性肝病重在预防,每个患者在药物治疗期间,特别是用新药治疗时,要注意监视各种毒副作用,定期测定血象、尿液、胆红素、转氨酶和碱性磷酸酶,一旦出现肝功能异常或黄疸应立即停药。给予甘利欣、谷胱甘肽降酶、保肝治疗,茵栀黄或复方茵陈退黄,及时治疗各种并发症,大部分患者预后是很好的<sup>[5]</sup>。近年来,

用谷胱甘肽治疗药物性肝损害取得了显著疗效<sup>[6]</sup>。本组41例患者经过住院治疗,治愈好转率达92.6%,1例治疗无效,放弃治疗自动出院,2例因亚急性重型肝炎肝肾综合征死亡(死亡患者中,其中1例52岁,有乙肝病毒慢性携带病史及特发性血小板减少性紫癜病史,另1例年龄78岁,平时无慢性基础性疾病)。对死亡病例的分析提示我们:遇有基础性疾病及高龄患者,一旦出现药物性肝损害,病情发展快,易发展为重型肝炎,死亡率高。临床医师应高度警惕。做到要详细询问病史,特别是近期的服药情况,早期作出正确的诊断,不延误病情。对有药物性肝损害病史者,应避免再度给予相同或化学结构类似的药物。

#### 4 参考文献

- 1 李健,程香普,崔静,段芳龄. 36例药物性肝病的临床分析. 胃肠病学和肝病杂志 2000;9:216
- 2 姚光弼. 药物性肝病. 中华消化杂志 1999;19:339-342
- 3 陈世耀,蒋晓渠,刘天舒,王吉耀. 药物性肝病的病因和临床表现. 中华肝脏病杂志 2000;8:244
- 4 王希海,黄光照. 中草药引起中毒性肝病的病理变化. 临床肝胆病杂志 1997;13:126-129
- 5 Speeg KV, Bay MK. Prevention and treatment of drug-induced liver disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1995;24:1047-1064
- 6 翁明钢. 谷胱甘肽治疗抗结核药物性肝损害(附18例疗效观察). 中国综合临床 2001;17:576

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

• 临床经验 •

## 数字化成像结肠双对比造影检查 345 例

何发清,官泳松,王小林,郭兵文,孙 龙

何发清,王小林,郭兵文,射洪县人民医院放射科 四川省射洪县 629200  
官泳松,孙龙,四川大学华西医院放射科 四川省成都市 610041  
项目负责人:官泳松,610041,四川省成都市,四川大学华西医院放射科.  
yongsongguan@yahoo.com  
电话:028-85421008 传真:028-85421008  
收稿日期:2003-08-08 接受日期:2003-09-24

### 摘要

目的:对345例数字化成像结肠双对比造影进行分析,并用103例传统法结肠造影比较,探讨数字化成像双对比造影的应用优势。

方法:345例,男224例,女121例,年龄1月-81岁,有不同程度的腹部疼痛298例(86.4%)、腹胀137例(39.7%)、便秘75例(21.7%)、便血60例(17.4%)的患者进行数字化成像结肠双对比造影检查,最后检出阳性病例均以手术或病理证实,并回顾性与103例传统法结肠造影结果作对比。

结果:数字化成像结肠双对比造影在345例中,正常和无器质改变26例,结直肠癌48例,其中早期癌5例,溃疡性结肠炎30例,肠息肉12例,肠结核10例,结肠炎174例,总阳性检查率达92.5%,结肠癌检出率13.9%,其中早期癌占10.4%。传统法结肠造影103例中结肠癌5例(4.8%),肠息肉2例(1.9%),肠结核3例(2.9%),先天性巨结肠3例(2.9%),结肠炎41例(40%),其他8例(7.8%),总阳性检查率61.3%。早期癌检出率0%。

结论:数字化成像结肠双对比造影检查比传统法结肠造影检查的病变更检出率高,在早期病变的检出率最为明显。

何发清,官泳松,王小林,郭兵文,孙龙. 数字化成像结肠双对比造影检查 345例. 世界华人消化杂志 2004;12(2):490-491

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/490.asp>

### 0 引言

随着数字化成像技术、图像后处理技术的研究开发,

一批数字化综合X线机已应用于临床。胃肠道造影是临床广泛应用的一项常规检查技术,为探讨数字化成像结肠双对比造影的特点与优点,笔者将其与传统法结肠造影进行了分析、评价<sup>[1-2]</sup>。

## 1 材料和方法

1.1 材料 共345例病例,男224例,女121例,年龄1月-81岁,有不同程度的腹部疼痛298例(86.4%)、腹胀137例(39.7%)、便秘75例(21.7%)、便血60例(17.4%)的患者进行数字化成像结肠双对比造影,最后检出阳性病例均以手术或病理证实,并回顾性与103例传统法结肠造影结果作对比。有不同程度的腹部疼痛、腹胀、便秘、血大便等。日立TU-130XF数字胃肠机、混悬硫酸钡剂、柯尼卡Li-10A激光相机、激光胶片、自动灌肠机、改进的注气灌肠用具一套。

1.2 方法 充分准备肠道,检查前1d低纤维饮食,22:00左右服用蓖麻油40 mL,适量饮水。检查当日08:00清洗灌肠两次后,于09:30/10:30钟检查。造影剂钡浆浓度为700-1 000 g/l、250-300 ml、置入肠管后,患者取仰卧位,可适当倾斜检查床(头低10-15°),在透视下,注入钡浆,一般钡浆头到达结肠脾曲即停止,然后注气700-1 000 mL,至升结肠扩张至约5 cm即可停止注气,拔除肛管,让患者在检查床上翻滚3-4 wk,且钡剂在结肠表面形成良好涂布即可摄片。按常规方法分段分区摄取仰、俯卧位双对比像,可根据需要对病变部位进行体位暴露,在回放中根据需要进行取舍,调节窗宽、窗位,进行打印,一般12帧图像。

## 2 结果

在345例中,正常与无器质改变26例,结直肠癌48例,其中早期癌5例,溃疡性结肠炎30例,肠息肉12例,肠结核10例,憩室8例,结肠炎174例,先天性巨结肠4例,其他病变33例,总阳性检查率达92.5%,结肠癌检出率13.9%。我们在345例中作了低张双对比造影检查83例,但副作用多。注射654-2后出现口干、脸部潮红和视物模糊等。通过改进造影剂量、浓度,控制注气量及改变体位等因素使结肠充分暴露、显示从而达到低张双对比造影效果,其后262例检查均达到造影要求,无副作用。通过先注入钡剂,后注入空气,结肠内径一般在5 cm以内并且粗细均匀,气体要多少注多少,较容易掌握。利用负影(或减影)处理病变局部,更容易显示病变局部大小、范围,大大提高了诊断准确率。1997/1998用传统法(充盈、黏膜像)结肠造影共计103例,其中结肠癌5例(4.8%)、肠息肉2例(1.9%)、肠结核3例(2.9%)、先天性巨结肠3例(2.9%)、结肠炎41例(40%),其他8例(7.8%),总阳性检查率61.3%。早期癌检出率0%。而双对比造影结肠癌检出率13.9%,其中早期癌占10.4%。

## 3 讨论

由于钡剂在肠道内涂布不均,部位厚薄不一,应用传统钡餐造影时难以控制曝光量。传统钡餐造影曝光时间长,对于蠕动的消化道病变不能瞬间点片,可造成病灶遗漏或重复检查。数字化成像系统由于曝光时间短,操作方便,避免了患者过多的X线辐射,缩短了操作时间并可消除肠道运动伪影<sup>[3-6]</sup>。使用数字化摄影装置连续采集系统对其蠕动进行动态记录,给诊断提供可靠的科学依据。数字化成像结肠双对比造影提高了早期癌的诊断率<sup>[7-9]</sup>。我们一共诊断5例早期癌,并得到外科手术及结肠镜检查与病理证实。低张双对比造影检查副作用多,禁忌证范围宽。通过改进造影剂量、浓度,控制注气量及转动体位等办法自然双对比造影检查也可取得了良好的双对比效果。不采用静脉内注射低张药物654-2,避免了人为的副作用,使有心脏病、高血压、青光眼等疾病的患者均可接受该项检查。而且自然双对比检查省时、省事,且节约医疗费用,减少了患者痛苦。我们通过改进灌肠器具、注气用具,同时注入气体和钡剂改为先注入钡剂后注入气体,利于掌握注气量的多少,可达到满意的检查效果。结肠内壁上钡剂涂抹更均匀,同时避免了同时注入气体和钡剂时使结肠内径过度扩张的缺点。对于黏膜的病变与侵及黏膜的病变发现和诊断,结肠镜检查有较高价值,但双对比造影对发现黏膜下病变、器官形态结构改变,功能改变及受结肠腔外病变影响的形态改变更能做出定位、定形、定质,定性诊断,有利于选择最适宜的临床治疗方案<sup>[10]</sup>。

## 4 参考文献

- 1 陈九如. 胃肠道影像学检查的新进展. 中国医学计算机成像杂志 1999;5: 251-264
- 2 孙玉芝, 张金山, 时惠平, 姚家琪. 应用数字化成像和激光照像胃肠双对比造影的初步评价. 中华放射学杂志 1996;30:745-747
- 3 Iinuma G, Ushio K, Ishikawa T, Nawano S, Sekiguchi R, Satake M. Diagnosis of gastric cancers: comparison of conventional radiography and digital radiography with a 4 million-pixel charge-coupled device. *Radiology* 2000;214:497-502
- 4 Rubesin SE, Levine MS, Laufer I, Herlinger H. Double-contrast barium enema examination technique. *Radiology* 2000; 215:642-650
- 5 Levine MS, Rubesin SE, Laufer I, Herlinger H. Diagnosis of colorectal neoplasms at double-contrast barium enema examination. *Radiology* 2000;216:11-18
- 6 Levine MS, Rubesin SE. Diagnosis of colorectal neoplasms on double-contrast barium enemas: interpretive aspects. *Semin Roentgenol* 2000;35:357-369
- 7 Levine MS, Rubesin SE, Laufer I, Herlinger H. Barium studies. *Gastrointest Endosc* 2002;55(7 Suppl):S16-24
- 8 Levine MS, Glick SN, Rubesin SE, Laufer I. Double-contrast barium enema examination and colorectal cancer: a plea for radiologic screening. *Radiology* 2002;222:313-315
- 9 Chawla S, Levine MS, Laufer I, Gingold EL, Kelly TJ, Langlotz CP. Gastrointestinal imaging: a systems analysis comparing digital and conventional techniques. *Am J Roentgenol* 1999; 172:1279-1284
- 10 Chong A, Shah JN, Levine MS, Rubesin SE, Laufer I, Ginsberg GG, Long WB, Kochman ML. Diagnostic yield of barium enema examination after incomplete colonoscopy. *Radiology* 2002;223:620-624

# 胃十二指肠隐匿性穿孔的诊断与治疗 4 例

詹世林, 吴良平, 蒲淼水

詹世林, 吴良平, 蒲淼水, 广州军区广州总医院 广东省广州市 510010  
项目负责人: 詹世林, 510010, 广东省广州市, 广州军区广州总医院普通外科. shilinZhan@163.net  
电话: 020-61653381  
收稿日期: 2003-08-08 接受日期: 2003-10-07

## 摘要

目的: 提出胃十二指肠隐匿性穿孔的概念. 提高对胃十二指肠隐匿性穿孔的诊断与治疗水平.

方法: 回顾性分析4例胃十二指肠隐匿性穿孔患者的临床病理特征、处理方法及随访结果.

结果: 胃十二指肠隐匿性穿孔多发于老年人. 症状介于急性穿孔与慢性胃痛之间, 主要表现为右上腹或上腹部疼痛(4/4)、呕吐(3/4)、固定的压痛点(4/4)、上腹部包块(3/4). 易误诊为肝胆疾病(4/4), 均在剖腹探查术中确诊. 2例为胃十二指肠球部溃疡穿孔, 1例为肝癌肝动脉栓塞化疗后异位(胃)栓塞并发症, 1例为胆管癌内置管尖压迫致十二指肠穿孔. 1例行穿孔修补, 2例行胃大部切除胃空肠吻合, 1例行腹腔引流. 术后所有隐匿性穿孔症状均消失, 2例随访3-6 mo 健在, 1例术后6 mo 死于肝癌, 1例术后1 mo 死于胆管癌及十二指肠瘘.

结论: 提高对胃十二指肠隐匿性穿孔的认识, 是减少其误诊误治的关键.

詹世林, 吴良平, 蒲淼水. 胃十二指肠隐匿性穿孔的诊断与治疗 4 例. 世界华人消化杂志 2004;12(2):492-494

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/492.asp>

## 0 引言

胃十二指肠溃疡急性穿孔由于其临床症状与体征明显、典型(即显性穿孔)而容易诊断<sup>[1-3, 16]</sup>, 相对显性穿孔而言, 对一些症状(隐匿)不典型或临床呈现慢性或亚急性过程以及一些并非由消化性溃疡引起的胃十二指肠穿孔我们称之为胃十二指肠隐匿性穿孔. 隐匿性穿孔极易误诊、误治. 为了提高对胃十二指肠隐匿性穿孔的认识, 减少其误诊误治, 我们对近年来遇到的 4 例胃十二指肠隐匿性穿孔患者进行总结、分析.

## 1 临床资料

1.1 一般资料 2000-01/2003-05, 我院普通外科收治的 4 例胃十二指肠隐匿性穿孔患者, 男 1 例, 女 3 例. 年龄 46-75 岁, 平均 64.5 岁. 2 例为十二指肠球部溃疡穿孔, 1 例为肝动脉栓塞并发异位胃栓塞致胃穿孔, 1 例为胆道内支架管致十二指肠穿孔.

1.2 临床与病理特征 右上腹或上腹部疼痛(4/4)及呕吐(3/4)、腹胀(3/4)、返酸嗝气(2/4)、低热(2/4)是其主要症状. 发病 9-15 d 就诊. 右上腹或上腹部固定的压痛点(4/4)及包块(3/4)是其主要体征. 胃镜检查可见大片溃疡、疑似肿瘤, 但病检不能发现肿瘤细胞, 仅发现慢性炎症或坏死组织(2/2). 手术探查无实质性包块, 可见穿孔处炎性包块、脓苔、周围组织水肿、粘连. 详见表 1.

1.3 诊断 4 例患者均以误诊疾病(胆囊结石、胆囊癌复发、肝癌胃侵犯、胆管癌致肠梗阻)住院及手术. 在剖腹探查中确诊.

1.4 治疗方法 均以误诊疾病行手术治疗. 1 例行胆囊切除、粘连松解、十二指肠溃疡穿孔修补, 术后内科治疗十二指肠溃疡. 2 例行胃大部切除、胃空肠吻合, 其中 1 例附加肝动脉置管, 术后行肝动脉栓塞化疗治疗肝癌. 1 例行腹腔脓肿引流、胃造瘘、空肠造瘘术. 详见表 1.

1.5 结果 术后 4 例隐匿性穿孔患者症状均消失, 1 例术后 3 mo 复查胃镜溃疡基本愈合. 1 例术后 6 mo 死于肝癌; 1 例术后 1 mo 死于十二指肠瘘; 2 例术后随访 3-6 mo 健在.

## 2 讨论

相对于胃十二指肠急性穿孔的典型(显性)临床表现而言, 隐匿性穿孔是指临床表现不典型、过程隐匿的胃十二指肠穿孔. 急性胃十二指肠穿孔由于其剧烈的腹痛及典型的腹膜炎体征而容易诊断. 隐匿性穿孔则由于其临床表现不典型而容易误诊. 胃十二指肠隐匿性穿孔的机制由于病因不同而不同, 例 1、例 2 是单纯的消化性溃疡穿孔, 推测穿孔呈慢性或亚急性过程, 周围组织的粘连包裹(及手术后粘连)起到局限和保护作用. 例 3 是肝癌肝动脉栓塞化疗后异位栓塞并发症胃壁坏死穿孔, 在其坏死过程中周围组织的炎症反应、粘连起到保护和局限作用. 例 4 是胆管癌胆总管内置管后, 内置管下端过长、压迫致十二指肠坏死、穿孔, 胆汁、肠液从后腹膜间隙渗出形成局限性或包裹性积液、积脓.

胃十二指肠隐匿性穿孔的临床及病理特点: (1)本组病例多发生于老年人. 除 1 例患者 46 岁外, 其他 3 例均在 65 岁以上. 可能与老年人机体反应差有关<sup>[1, 4-5]</sup>. (2)症状介于急性穿孔与慢性胃痛之间, 呈亚急性或慢性穿孔特点. 病程多在 1 wk 以上, 常由于病情逐渐加重就诊. 主要表现为右上腹或上腹部的疼痛. 疼痛呈持续性, 饮食后明显加重, 并出现呕吐症状. 呕吐症状比幽门梗阻患者轻. 可伴低热或不发热. 发热与局部炎症有关, 形

表1 4例隐匿性穿孔患者的临床表现、检查及手术情况

序号	症状与体征	检查	探查及手术情况
1	右上腹部疼痛、低热伴饭后腹胀、疼痛逐渐加重、呕吐10 d。体温37℃，腹平软，右上腹轻压痛，无反跳痛，肠鸣音正常。	HB107g/L, WBC10.22 × 10 <sup>9</sup> /L. B超:胆囊结石, 慢性胆囊炎	胃小弯、十二指肠球部与前胆囊壁相对光滑。分离粘连后见腹壁、大网膜、横结肠粘连, 十二指肠球部前壁有一0.5 × 0.5 cm大小穿孔, 周围组织水肿及脓苔。行胆囊切除、粘连松解、十二指肠球部溃疡穿孔修补
2	胆囊癌术后3 mo上腹疼痛伴腹胀、呕吐、返酸、症状逐渐加重15 d。腹平软, 右上腹轻压痛, 似可扪及边不清包块, 无反跳痛, 肠鸣音正常。	Hb131g/L, WBC11.87 × 10 <sup>9</sup> /L. CEA正常。胃镜:胃窦黏膜凹凸不平、组织僵硬、表面溃烂, 活检为慢性炎症。 CT:胆总管扩张, 胃窦区黏膜增厚伴腔内充盈缺损, 符合胃癌表现	上腹广泛粘连, 胃幽门、十二指肠球部下壁与大网膜、横结肠粘连成团块状。分离粘连后见十二指肠球部下后壁溃疡约4 × 3 cm, 向胰头部浆膜穿透, 深达胰腺实质0.5cm, 并附脓苔及坏死组织, 周围组织充血水肿明显。行胃大部切除, 胃空肠吻合, 十二指肠溃疡旷置。
3	肝癌肝动脉栓塞术后2 mo, 上腹痛伴呕吐、暖气、返酸9 d。腹平软, 右上腹轻压痛, 右上腹可扪及质中、边不清包块。	HB125g/L, WBC14 × 10 <sup>9</sup> /L. 胃镜:胃窦部小弯侧大片溃疡样改变, 活检为慢性溃疡, 不排除恶性肿瘤可能。	胃小弯与肝左叶后方及大、小网膜紧密粘连成团, 胃小弯巨大溃疡穿孔。肝癌位于肝右叶, 行胃大部切除、胃空肠吻合、肝动脉置管术。
4	胆总管癌行胆道内支架引流后3 mo, 腹痛、腹胀、低热9 d, 肛门停止排气排便4 d。体温37.5℃, 腹隆如鼓, 右上腹轻压痛, 无反跳痛, 肠鸣音弱	Hb97g/L, WBC17.0 × 10 <sup>9</sup> /L. 腹平片:大小肠广泛胀气、升结肠可见多个液气平面, 考虑肠梗阻	右上腹部粘连, 文氏孔及右肝下包裹性积液约400 ml。十二指肠降部溃烂, 大网膜、横结肠粘连成团。行腹腔引流、空肠造瘘、胃造瘘术。

成脓肿及积液者发热明显。可有肠梗阻症状, 与后腹膜间隙炎症、积液、积脓及肠粘连有关。常有固定的压痛点及包块感。压痛点即穿孔与病变的部位。包块是穿孔处大网膜及周围组织包裹、炎症改变的结果。腹膜炎体征不明显, 可能与穿孔小, 空腹、慢性或亚急性穿孔以及与老年人应激反应迟钝有关。(3)常伴其他疾病而漏诊, 其症状常与肝胆疾病类似, 易误诊为肝胆系疾病。本组4例均误诊或漏诊。(4)CT可表现为局部管壁增厚、不规则, 周围脂肪层模糊、腹膜增厚<sup>[6]</sup>以及上腹部偏右的成团性边不清包块, 无游离气体及造影剂外漏等急性穿孔典型影像学表现<sup>[7-8]</sup>。(5)胃镜可发现溃疡, 但由于溃疡往往较大, 穿孔处粘连, 常易误诊为肿瘤, 但活检不能发现肿瘤细胞。(6)术中探查常为穿孔周围的广泛粘连、炎性包块及周围组织器官的感染改变。穿孔处由于穿孔时间的长短不一呈现不同改变。本组患者发病9-15 d, 穿孔处仍有脓苔及水肿改变, 粘连亦能顺利分开。

胃十二指肠隐匿性穿孔临床极易误诊。误诊的原因:除患者不具备典型的胃肠穿孔急腹症表现外, 例1患者症状与胆囊炎、胆囊结石相似, 溃疡病史与胆囊结石

病史并存, 一直把溃疡病史当成胆囊结石的症状。住院后亦未能全面检查。例2患者溃疡病史不明显, 虽然胃镜检查有溃疡表现, 但胆囊癌手术的病史及CT检查的右上腹成团状包块使其误诊为胆囊癌复发侵犯胃。例3为肝癌患者, 胃镜检查为非典型的消化性溃疡改变, 大片坏死组织未考虑胃血管栓塞并发症。例4为胆管内置管引流的一种少见并发症, 更多的考虑为胆管肿瘤的晚期表现。

对上腹、右上腹疑似肝胆疾病或伴有明确肝胆疾病者, 应考虑胃十二指肠隐匿性穿孔的可能, 不能满足于胆囊结石或已知疾病的诊断。胃镜或十二指肠镜检查虽有助于诊断, 但穿孔处更多地呈现为急慢性炎症、坏死和粘连而难以确诊。B超、CT更多地表现出穿孔后腹腔局部的继发性改变<sup>[7-12]</sup>。

虽然患者穿孔已被大网膜等周围组织黏附达到了修补的目的, 但穿孔处的“修补”往往形成炎性包块或继发性改变如胃、肠粘连、积液、积脓等, 且患者仍有较明显的症状需要处理。对消化性溃疡所致隐匿性穿孔患者, 单纯内科保守治疗可能可以改善部分症状<sup>[1,13-14]</sup>, 但难以解决穿孔所致腹腔继发改变引起的症状, 需要外

科手术处理,对诊断困难者剖腹探查更具意义.至于穿孔修补还是胃大部切除,则应根据具体情况决定手术.本组1例行十二指肠球部溃疡穿孔修补者年龄较大(75岁),附加有胆囊切除,一般情况较差,不宜行胃大部切除.2例行胃大部切除手术者1例为46岁十二指肠球部溃疡穿孔且有幽门梗阻表现,1例则为胃小弯的大片坏死穿孔,无法修补.1例胆管癌晚期十二指肠穿孔并脓肿形成已无法修补和切除了,只宜行脓肿引流手术.

胃十二指肠隐匿性穿孔虽然少见,但极易误诊<sup>[15-16]</sup>,需要我们提高对其认识,以减少误诊误治.

### 3 参考文献

- 薛春利. 胃十二指肠溃疡急性穿孔的非手术治疗. 腹部外科 1998; 11:210-211
- 邵天松, 文纯, 张凯至, 马儒德, 孙建辉, 骆兵. 胃十二指肠溃疡急性穿孔 119 例诊治体会. 腹部外科 1998;11:204-205
- 庞曰亮, 张瑞义, 王有峰. 溃疡病穿孔 282 例诊治分析. 滨州医学院学报 1999;22:247-248
- 方喜, 陈进新, 温思齐, 李进展. 老年人消化性溃疡穿孔手术治疗 165 例. 河北医药 2001;23:658-659
- 陈彪. 56 例老年人消化性溃疡穿孔的临床特点及诊治体会. 华夏医学 2001;14:858-859
- 杨岷, 王翔, 金朝林, 艾道蕴. 胃十二指肠溃疡穿孔的 CT 表现. 现代医用影像学 1998;7:257-260
- Fultz PJ, Skucas J, Weiss SL. CT in upper gastrointestinal tract perforation secondary to peptic ulcer diseases. *Gastrointest Radiol* 1992;17:5-8
- Catalano O. Computed tomography in the study of gastrointestinal perforation. *Radiol Med Torino* 1996;91:247-252
- Chen CH, Yang CC, Yeh YH. Role of upright chest radiography and ultrasonography in demonstrating free air of perforated peptic ulcer. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1082-1084
- Fujii Y, Asato M, Taniguchi N, Shigeta K, Omoto K, Itoh K, Suzukawa M. Sonographic diagnosis and successful nonoperative management of sealed perforated duodenal ulcer. *J Clin Ultrasound* 2003;31:55-58
- Jacobs JM, Hill MC, Steinberg WM. Peptic ulcer disease: CT evaluation. *Radiology* 1991;178:745-748
- Ranschaent E, Rigauts H. Confined gastric perforation: ultrasound and computed tomographic diagnosis. *Abdom Imag* 1993;18:318-319
- Raafat NA, Lee MJ, Dawson SL, Mueller PR. Case report: combined conservative and percutaneous management of a perforated duodenal ulcer. *Clin Radiol* 1993;47:426-428
- 胡海秋. 超 12 h 的溃疡病穿孔 91 例分析. 华夏医学 1999;12:165-166
- 刘荣惠, 张亚, 郑兴华. 胃镜诊断十二指肠球部隐匿性穿孔 2 例. 云南医药 2000;21:366
- 詹世林, 宋新明, 陈建雄. 大手术后十二指肠球部溃疡穿孔及出血的诊断与治疗. 中华胃肠外科杂志 2002;5:136

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

• 临床经验 •

## 胃癌及癌前病变中胃黏膜上皮细胞增生及凋亡相关基因蛋白表达

孟 华, 刘丽娜, 吕 申

孟华, 刘丽娜, 大连医科大学附属第一医院消化科 辽宁省大连市 116011  
吕申, 大连医科大学病理教研室 辽宁省大连市 116027  
项目负责人: 孟华, 116011, 辽宁省大连市中山路 222 号, 大连医科大学附属第一医院消化科. lystudent@sohu.com  
电话: 0411-3635963-2173 传真: 0411-2682686  
收稿日期: 2003-10-09 接受日期: 2003-11-19

### 摘要

目的: 探讨胃癌演变过程中胃上皮细胞动力学变化.

方法: 应用免疫组化 SP 法对各种病变胃上皮细胞增生相关蛋白(PCNA、P53)和凋亡相关蛋白(Fas、Bcl-2、Bax)的表达进行检测.

结果: PCNA、P53 表达随病变进展逐渐增加, 慢性浅表性胃炎(CSG)组明显低于肠化生(IM)、不典型增生(Dys)、胃癌(GC)组 (PCNA 53.3% vs 75.6%、93.3%、86.4%, P53 3.3% vs 24.4%、36.7%、81.8%). Fas、Bax 表达随病变进展逐渐减少, Dys、GC 组明显低于 CSG 组 (Fas 30%、27.3% vs 60%, Bax 43.3%、40.9% vs 70%,  $P < 0.05$ ). Bcl-2 表达随病变进展而逐渐增加, Dys (63.3%)、GC (72.7%)

组明显高于 CSG (20%)、IM (32.2%)组( $P < 0.01$ ).

结论: 对不同胃黏膜上皮细胞增生相关蛋白(PCNA、P53)及凋亡相关蛋白(Fas、Bcl-2、Bax)检测表明, 在胃癌演变过程中存在着胃上皮细胞增生和凋亡的失衡, 即增生过快凋亡受抑. PCNA、P53、Fas、Bcl-2、Bax 通过在不同病变阶段被激活或抑制而在胃癌及癌前病变形成过程中起作用.

孟华, 刘丽娜, 吕申. 胃癌及癌前病变中胃黏膜上皮细胞增生及凋亡相关基因蛋白表达. 世界华人消化杂志 2004;12(2):494-496  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/494.asp>

### 0 引言

胃癌是我国常见恶性肿瘤之一, 其发病机制迄今未明. 本实验通过免疫组化 SP 法对浅表性胃炎(chronic superficial gastritis, CSG)、肠化生(intestinal metaplasia, IM)、不典型增生(dysplasia, Dys)和胃癌(gastric carcinoma, GC)胃上皮细胞 PCNA、P53、Fas、Bcl-2、Bax 蛋白表达进行检测, 观察胃黏膜病变过程中细胞动力学的变化及其与癌变的关系.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2001-04/2002-10因上消化道症状来我院经胃镜检查诊断并经病理组织学检查证实为 CSG、IM、Dys、GC 的患者, 共 172 例。各组总例数、年龄及性别构成见表 1。PCNA 单抗、突变型 P53 单抗、Fas 多抗、Bcl-2、Bax 单抗、SP 试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司。

表 1 各组患者年龄、性别构成

组别	n	平均年龄(岁)	年龄范围(岁)	男女比例(M/F)
CSG	30	50.6 ± 5.05	21-79	17/13
IM	90	58.49 ± 2.48	50-85	59/31
Dys	30	54.62 ± 5.03	25-86	23/7
GC	22	62.14 ± 5.08	30-83	12/10

1.2 方法 PCNA、P53、Fas、Bcl-2、Bax 的免疫组化染色方法采用 SP 法, 具体实验步骤按照试剂盒说明书进行。PCNA、P53 阳性反应为细胞核棕黄色颗粒, Fas、Bax、Bcl-2 阳性反应为黄到棕黄色颗粒, Fas

表 2 Fas、Bcl-2、Bax、PCNA、P53 在胃黏膜病变过程中的表达

组织学类型	n	Fas	Bcl-2	Bax	PCNA	P53
		阳性 n (%)	阳性 n (%)	阳性 n (%)	阳性 n (%)	阳性 n (%)
CSG	30	18 (60.0%)	6 (20.0%)	21 (70.0%)	16 (53.3%)	1 (3.3%)
IM	90	52 (57.8%) <sup>b</sup>	29 (32.2%)	45 (50.0%)	68 (75.6%) <sup>a</sup>	22 (24.4%) <sup>a</sup>
Dys	30	9 (30.0%) <sup>ab</sup>	19 (63.3%) <sup>ab</sup>	13 (43.3%) <sup>a</sup>	28 (93.3%) <sup>ab</sup>	11 (36.7%) <sup>ab</sup>
GC	22	6 (27.3%) <sup>ab</sup>	16 (72.7%) <sup>ab</sup>	9 (40.9%) <sup>a</sup>	19 (86.4%) <sup>a</sup>	18 (81.8%) <sup>abc</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05 vs CSG 组; <sup>b</sup>P < 0.05 vs IM 组; <sup>c</sup>P < 0.05 vs Dys 组。

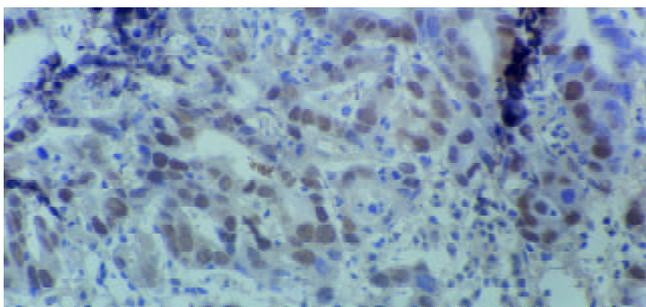


图 1 胃癌胃上皮细胞 PCNA 表达。

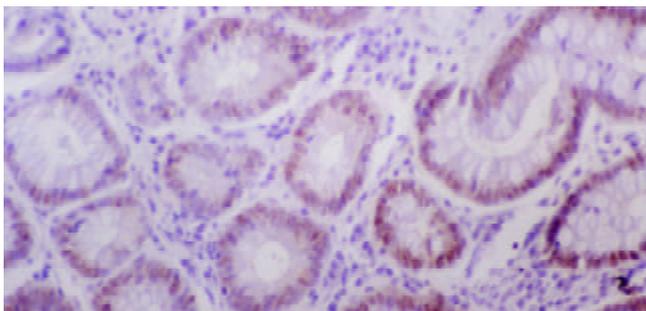


图 2 IM 胃上皮细胞 P53 表达。

定位于胞膜, Bax、Bcl-2 定位于胞质。阳性细胞数量大于或等于 50% 为阳性表达。

统计学处理 采用  $\chi^2$  检验, 以 P < 0.05 为有统计学意义。

## 2 结果

2.1 PCNA 表达从 CSG 到 IM 逐渐增加, Dys 时达高峰, CSG 组明显低于 IM、Dys、GC 组(P < 0.05、P < 0.01、P < 0.05), Dys 组明显高于 IM 组(P < 0.05)但与 GC 组无差异。

2.2 P53 表达从 CSG、IM 到 Dys 逐渐增加, GC 时达高峰, CSG 组明显低于 IM 组及 Dys 组(P < 0.01), GC 组明显高于 IM 组及 Dys 组(P < 0.01)。

2.3 Fas 基因蛋白的表达随病变进展而递减, CSG、IM 组明显高于 Dys 及 GC 组(P < 0.05)。

2.4 Bcl-2 基因蛋白的表达随病变进展而递增, CSG、IM 组明显低于 Dys 及 GC 组(P < 0.01)。

2.5 Bax 基因蛋白的表达随病变进展逐渐降低, CSG 组明显高于 Dys 及 GC 组(P < 0.01) (表 2)。

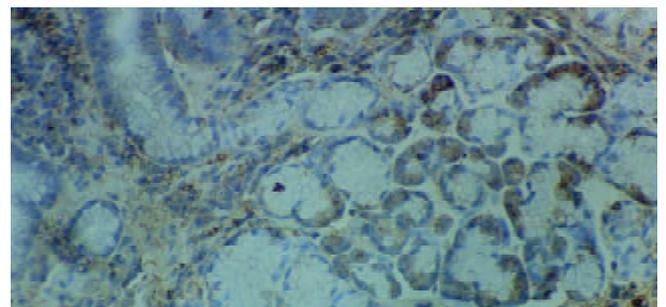


图 3 CSG 胃上皮细胞 BCL-2 表达。

## 3 讨论

胃黏膜上皮细胞增生和凋亡的动态平衡维持着胃黏膜的正常结构, 二者之间失衡的病理状态是胃癌形成的早期分子生物学改变<sup>[1-2]</sup>。

PCNA 是一种  $M_r$  为 36 kD 的核蛋白, 是反映细胞增生活性的最好生物学指标之一<sup>[3]</sup>。本实验结果表明 PCNA 表达由 CSG 至 IM 逐渐增加, 到 Dys 时达高峰, 与 GC 无差别, 提示从 CSG、IM、Dys 向 GC 演变过程中胃黏膜上皮细胞的增生程度逐渐增加, 与以往结果相符<sup>[4-5]</sup>。

P53 基因分为野生型和突变型, 野生型 P53 基因具有抑制细胞生长的功能, 而突变型 P53 则会刺激和促进细胞的生长<sup>[6]</sup>. 野生型 P53 蛋白半衰期短, 突变型 P53 蛋白半衰期延长, 并能稳定在较高水平上, 故用免疫组化方法检测到的 P53 蛋白代表了突变型 P53 蛋白的表达<sup>[7]</sup>. 既往有研究表明, P53 基因的突变和过表达不仅存在于胃癌各临床分期, 且可发生于癌变前各阶段<sup>[8]</sup>. 但也有研究显示, P53 基因变异主要发生在胃癌晚期阶段<sup>[9]</sup>. 本实验显示从 CSG、IM 到 Dys, P53 蛋白表达逐渐增强, GC 时达高峰; CSG 组 P53 表达明显低于 IM 及 Dys 组, 而 GC 时 P53 表达明显高于 IM 和 Dys 组. 提示 P53 蛋白过度表达不但与胃癌发生有关, 而且与癌前病变的发生亦有关, P53 基因变异的出现有促进细胞恶性转化的作用, 与文献<sup>[10]</sup>报道相符.

Fas 是一种跨膜表面蛋白, 其与抗 Fas 抗体或 Fas 配体结合后可以诱导 Fas 阳性细胞凋亡<sup>[11-12]</sup>. 本文发现, Dys 及 GC 组织中 Fas 蛋白阳性表达率较 CSG 及 IM 组明显下降( $P < 0.05$ ), 表明在胃黏膜癌前病变及胃癌发生的早期阶段即存在着 Fas 基因的变化. Fas 蛋白在 Dys、GC 组织中表达减弱, 使 Fas-Fas 配体启动的凋亡减弱, 使本应凋亡的细胞逃逸, 为细胞癌变创造了条件. Bcl-2 家族基因包括 Bcl-2、Bax 和 BH<sub>3</sub> 3 个亚族. Bcl-2 是一种抑制凋亡基因, Bax 与 Bcl-2 在体内的表达呈部分互补形式, Bax 通过抑制 Bcl-2 的功能从而促进凋亡. Bcl-2 与 Bax 的比值, 将影响细胞凋亡<sup>[13]</sup>. 本实验发现, 随着病变进展, Bcl-2 蛋白的表达逐渐增强, 而 Bax 蛋白的表达逐渐降低, 二者在 Dys 组和 GC 组的表达与 CSG 组的表达有明显差异( $P < 0.05$ ), 说明癌前病变的发生可能与细胞凋亡受抑制有关. 国内刘海峰 et al<sup>[14-15]</sup>通过对胃癌及癌旁组织中 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的研究, 认为在胃黏膜细胞恶性转化过程中可能存在细胞凋亡受抑制, 而 Bax 蛋白表达减少及 Bcl-2 蛋白表达异常增加可能是细胞凋亡受抑制的机制之一, 进一步说明胃癌发生与细胞凋亡异常有关.

对不同胃黏膜上皮细胞增生相关蛋白(P53、PCNA)和凋亡相关蛋白(Fas、Bcl-2、Bax)的检测表明在胃癌演变过程中存在着胃上皮细胞增生和凋亡的失衡, 即增生加快, 凋亡受抑制. PCNA、P53、Fas、Bcl-2、Bax 通过在胃黏膜病变不同阶段被激活或被抑制而在胃癌及癌前病变成过程中起作用. 他们可能相互协调起作用, 也可能分别起作用来共同调节细胞的增生和凋

亡<sup>[16-17]</sup>, 深入研究他们在肿瘤发生过程中的表达情况及作用是十分必要的.

#### 4 参考文献

- Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821-1828
- Melen-Mucha G, Niewiadomska H. Frequency of proliferation, apoptosis, and their ratio during rat colon carcinogenesis and their characteristic pattern in the dimethylhydrazine-induced colon adenoma and carcinoma. *Cancer Invest* 2002;20:700-712
- Maeda K, Chung YS, Onoda N, Kato Y, Nitta A, Arimoto Y, Yamada N, Kondo Y, Sowa M. Proliferating cell nuclear antigen labeling index of preoperative biopsy specimens in gastric carcinoma with special reference to prognosis. *Cancer* 1994;73:528-533
- Koide N, Nishio A, Hiraguri M, Shimada K, Shimozawa N, Hanazaki K, Kajikawa S, Adachi W, Amano J. Cell proliferation, apoptosis and angiogenesis in gastric cancer and its hepatic metastases. *Hepatogastroenterology* 2002;49:869-873
- 吴华星, 赵玉兰, 潘林娜, 武春龙, 冯占军. 内镜下胃癌活标本 PCNA 的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:92-93
- Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, Welsh D. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the P53 tumor-suppressor gene in the tumorigenesis. *Br J Cancer* 1994;69:409-416
- Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Elyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 1988;8:531-539
- 费素娟, 陈玉林, 林志发, 陈淑敏, 刘于珍. 胃癌及癌前病变 Fas, P21, P53 的表达意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:465-466
- Xu AG, Li SG, Liu JH, Gan AH. Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, P53 and C-myc in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:403-406
- Shiao YH, Rugge M, Correa P, Lehmann HP, Scheer WD. P53 alteration in gastric precancerous lesions. *Am J Pathol* 1994;144:511-517
- Houghton J, Korah RM, Condon MR, Kim KH. Apoptosis in *Helicobacter pylori*-associated gastric and duodenal ulcer diseases is mediated via the Fas antigen pathway. *Dig Dis Sci* 1999;44:465-478
- Jones NL, Day AS, Jennings HA, Sherman PM. *Helicobacter pylori* induces gastric epithelial cell apoptosis in association with increased Fas receptor expression. *Infect Immun* 1999;67:4237-4242
- Reed JC, Tsujimoto Y, Alpers JD, Croce CM, Nowell PC. Regulation of bcl-2 proto-oncogene expression during normal human lymphocyte proliferation. *Science* 1987;236:1295-1299
- 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 柳凤轩. 胃癌及癌旁组织中 Bax 蛋白表达及其与细胞凋亡的关系. *中华消化杂志* 1998;18:325-327
- 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 门荣甫. 胃癌及癌旁组织中 Bcl-2 蛋白表达及其与细胞凋亡的关系. *胃肠病学和肝病学杂志* 1998;7:26-28
- 王波, 杨志宏, 殷新光, 阮水良. P53 蛋白、PCNA 在胃癌中表达及其生物学行为关系的研究. *癌症* 2003;17:274-276
- Strasser A, Harris AW, Huang DC, Krammer PH, Cory S. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J* 1995;14:6136-6147

# 胃十二指肠疾病与幽门螺杆菌感染的相关性分析

周惠萌, 范欣敏

周惠萌, 范欣敏, 浙江省新华医院 浙江省杭州市 310005  
 项目负责人: 周惠萌, 310005, 浙江省杭州市潮王路318号, 浙江省新华医院.  
 电话: 0571-88077914-1414 传真: 0571-88064725  
 收稿日期: 2003-07-31 接受日期: 2003-06-31

## 摘要

目的: 探讨幽门螺杆菌(H pylori)感染的各种相关因素与胃十二指肠疾病的相关性.

方法: 胃镜检查7054例, 检测胃液pH值, 取胃黏膜做尿素酶试验及涂片(革兰染色), 显微镜找H pylori, 病理检查, 根据临床症状、胃镜诊断、病理诊断、年龄、性别、病程、胃液pH值等共设定了24个相关因素, 将数据资料输入计算机, 以SPSS软件包作统计学分析.

结果: 男性H pylori阳性率高于女性; 60岁以上老人比青壮年低; 消化性溃疡、活动性胃炎、胃癌、肠上皮化生与H pylori感染有相关性; 多元回归分析显示: 方程复相关系数 $R^2=0.13$ , H pylori感染只是引起胃、十二指肠疾病多种因素中的一个相关因素.

结论: H pylori感染是引起胃、十二指肠疾病的因素之一.

周惠萌, 范欣敏. 胃十二指肠疾病与幽门螺杆菌感染的相关性分析. 世界华人消化杂志 2004;12(2):497-498

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/497.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(H pylori)感染与胃和十二指肠疾病的关系已得到世界公认<sup>[1-12]</sup>. 本院胃镜室自1988年以来, 在胃镜检查时进行H pylori检测7054例.

## 1 材料和方法

1.1 材料 因上腹部疼痛、饱胀、反酸、呕血、黑便等而接受胃镜检查7054例, 男4378例, 占62.1%; 女2676例, 占37.9%, 男:女=1.64:1. 年龄10-90岁, 平均42.5岁.

1.2 方法 在胃镜检查时, 同时检测胃液pH值(从活检孔中插入冲洗管抽取胃液用pH精密试纸测试), 并于胃窦大弯取黏膜, 做尿素酶试验及涂片革兰染色, 显微镜检找H pylori, 二项检查均阳性者, 即诊断为H pylori阳性, 并取黏膜送病理检查. 根据临床症状、胃镜诊断、病理诊断、年龄、性别、病程、胃液pH值等, 共设定了24个相关因素, 将数据输入计算机. 以SPSS软件包作统计学分析.

## 2 结果

男性H pylori阳性率高于女性<sup>[13]</sup>, 54.7% vs 48.9%,  $P<0.01$ . 60岁以上的老年人H pylori阳性率比青壮年低, 39.4% vs 54.7%,  $P<0.01$ . 31-40岁组59.6%与61-70岁组42.0%及大于70岁组31.9%相比 $\chi^2=67.98$ , 71.33 ( $P<0.01$ ). 胃镜诊断十二指肠溃疡组H pylori阳性率最高, 食管静脉曲张组最低(表1). 病理诊断活动性胃炎最高, 其次为异型增生, 胃黏膜慢性炎最低(表2).

表1 胃镜诊断不同消化道疾病的H pylori阳性率

胃镜诊断	n	阳性率%
食管炎	213	47.9
食管癌	26	38.5
食管静脉曲张	41	17.1
浅表性胃炎	2 671	41.1
萎缩性胃炎	1 041	56.3
胃溃疡	465	68.8
胃癌	151	53.0
胃息肉	79	43.0
残胃炎	122	32.0
十二指肠球炎	735	51.2
十二指肠溃疡	1 488	70.2
吻合口溃疡	22	22.7
合计	7 054	52.5

表2 病理诊断不同消化道疾病的H pylori阳性率

病理诊断	n	阳性率%
胃黏膜慢性炎	2 171	25.0
慢性炎活动性	1 532	83.4
萎缩性胃炎	1 041	56.3
胃癌	151	53.0
胃息肉	79	43.0
肠上皮化生	1 871	59.6
异型增生	127	59.8
囊状扩张	82	50.0
合计	7 054	52.5

为探索年龄、性别、临床诊断、病理诊断和临床症状各种因素与H pylori的意义, 以H pylori(赋值阳性=1, 阴性=0)为应变量Y, 以上各因素年龄(实值), 性别(赋值男=1, 女=0)、临床诊断、病理诊断和临床症状(赋值阳性=1, 阴性=0)为自变量X, 作多元回

归分析(表3). 进入方程的因素有12项, 表明H pylori感染与活动性胃炎关系最密切, 其后依次为十二指肠溃疡、胃溃疡、肠上皮化生、萎缩性胃炎, 与文献报道相符. 方程复相关系数 $R=0.35$ ,  $R^2=0.13$ .

表3 多元逐步回归分析结果参数

自变量	进入方程次序	t值	P值
活动性胃炎	1	22.237	0.0000
十二指肠溃疡	2	13.069	0.0000
年龄	3	-7.156	0.0000
病程	4	5.815	0.0000
胃溃疡	5	5.714	0.0000
肠上皮化生	6	4.593	0.0000
萎缩性胃炎	7	3.203	0.0014
胃液pH值	8	2.977	0.0029
食管静脉曲张	9	-2.837	0.0046
出血	10	-2.609	0.0091
残胃炎	11	-2.563	0.0104
反酸	12	2.187	0.0288

### 3 讨论

本组H pylori阳性率高于平均值者, 从低到高分别为: 胃癌、萎缩性胃炎、胃十二指肠溃疡, 阳性率为52.98-70.23%, 与文献报道相符. 阳性率低于平均值者为食管静脉曲张、吻合口溃疡、残胃炎、食管炎、胃息肉及食管炎. 表明H pylori感染与胃、十二指肠炎症、消化性溃疡及胃癌有相关性, 而食管静脉曲张的原发病变为肝脏, 所以相关性最小, 残胃炎、吻合口溃疡的感染率低可能与手术后胃的解剖形态、生理功能的改变、胆汁反流等不利于H pylori生存有关. 活动性炎症阳性率最高, 达83.36%, 证实了H pylori感染可引起组织学上的变化, 异型增生及肠上皮化生者H pylori阳性率分别为59.84%和56.92%, 因异型增生和肠上皮化生均属癌前期病变, 蒙古沙土鼠可经口感染H pylori, 感染26 wk出现严重的活动性慢性胃炎、溃疡和肠化, 在62 wk时, 37%的沙土鼠发生胃腺癌, 并发现腺癌与肠化生密切相关<sup>[14-15]</sup>, 认为H pylori感染与胃癌有相关性.

多元回归分析显示活动性胃炎、十二指肠溃疡、胃溃疡、肠上皮化生、萎缩性胃炎、病程、胃液pH

值、反酸与H pylori感染有相关性. 方程复相关系数为 $R^2=0.13$ , 说明H pylori感染与上述因素的关系只占13%, 另外还有很多因素不在此方程内, 因H pylori感染的表现形式不一与H pylori菌株不同, 产生毒力因子不同, 而且H pylori感染只是引起胃、十二指肠疾病多种因素中的一个相关因素.

### 4 参考文献

- 1 范学工, 彭小宁. 螺杆菌属及其相关性疾病. 世界华人消化杂志 2001;9:979-983
- 2 白杨, 黄文, 林焕健, 王继德, 陈烨, 张兆山, 周殿元, 张亚历. 表达幽门螺杆菌热休克蛋白60克隆的构建. 世界华人消化杂志 2003;11:547-550
- 3 姜政, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙. 幽门螺杆菌疫苗的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:1451-1456
- 4 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 王国安, 滕小春. 根除幽门螺杆菌对胃癌前病变组织中bax蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:22-24
- 5 白杨, 黄文, 王继德, 张兆山, 周殿元, 张亚历. 幽门螺杆菌黏附素基因babA<sub>2</sub>的克隆、序列测定及其生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2003;11:1470-1472
- 6 Qiao W, Hu JL, Xiao B, Wu KC, Peng DR, Atherton JC, Xue H. cagA and vacA genotype of *Helicobacter pylori* associated with gastric diseases in Xi'an area. *World J Gastroenterol* 2003;9:1762-1766
- 7 Mao YF, Yan J, Li LW, Li SP. Construction of hpaA gene from a clinical isolate of *Helicobacter pylori* and identification of fusion protein. *World J Gastroenterol* 2003;9:1529-1536
- 8 Lai YC, Wang TH, Huang SH, Yang SS, Wu CH, Chen TK, Lee CL. Density of *Helicobacter pylori* may affect the efficacy of eradication therapy and ulcer healing in patients with active duodenal ulcer. *World J Gastroenterol* 2003;9:1537-1540
- 9 Han FC, Ng HC, Ho B. Stability of randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting in genotyping clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2003;9:2021-2024
- 10 Han FC, Gong M, Ng HC, Ho B. Identification of *H pylori* strain specific DNA sequences between two clinical isolates from NUD and gastric ulcer by SSH. *World J Gastroenterol* 2003;9:1747-1751
- 11 Wu TC, Chen LK, Hwang SJ. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in school-aged Chinese in Taipei city and relationship between ABO blood groups. *World J Gastroenterol* 2003;9:1752-1755
- 12 Jiang Z, Huang AL, Tao XH, Wang PL. Construction and characterization of bivalent vaccine candidate expressing HspA and M<sub>1</sub> 18000 OMP from *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2003;9:1756-1761
- 13 王凯娟, 王润田. 中国幽门螺杆菌感染流行病学 Meta 分析. 中华流行病学杂志 2003;24:443-446
- 14 张建中. 幽门螺杆菌与胃癌相关研究. 中华流行病学杂志 2003;24:437-438
- 15 郑青, 陈晓宇, 施尧, 萧树东. 幽门螺杆菌长期感染蒙古沙土鼠建立胃癌模型的研究. 中华消化杂志 2003;23:92-95

# 原发性胆汁性肝硬化 37 例临床分析

董正芳, 程留芳

董正芳, 程留芳, 中国人民解放军总医院消化内科 北京市 100853  
项目负责人: 程留芳, 100853, 北京市复兴路 28 号, 中国人民解放军总医院  
消化内科. dzfmqp@yahoo.com.cn  
电话: 010-68245044  
收稿日期: 2003-10-09 接受日期: 2003-11-13

## 摘要

目的: 研究原发性胆汁性肝硬化(PBC)患者的临床及病理学特征, 以提高对该病的认识。

方法: 对37例原发性胆汁性肝硬化患者临床及其中16例肝穿病理资料进行回顾性分析。

结果: 原发性胆汁性肝硬化患者中女 29 例, 男 8 例; 确诊时平均年龄  $52.16 \pm 12.75$  岁; 常见的首发症状是瘙痒 7 例 (18.92%), 乏力 6 例 (16.22%), 黄疸 4 例 (10.81%); 常见症状为黄疸 (56.76%)、纳差 (40.54%)、瘙痒 (37.84%);  $\gamma$ -谷氨酰胺转氨酶 ( $\gamma$ -GT)、碱性磷酸酶 (ALP)、总胆汁酸 (TBA)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、总胆红素 (TB)、直接胆红素 (DB) 等生化指标升高 2 倍以上; 78.38% 患者免疫球蛋白 M (IgM) 水平升高, 97.30% 患者抗线粒体抗体 (AMA) 和 (或)  $M_2$  亚型 (AMA- $M_2$ ) 阳性, 1 例患者 AMA 及 AMA- $M_2$  阴性但病理证实为 PBC, 83.78% 患者抗核抗体 (ANA) 阳性。16 例肝穿病理结果为 I 期 2 例, II 期 5 例, III 期 5 例, IV 期 4 例。

结论: 原发性胆汁性肝硬化中年女性多见, 肝穿病理学检查对诊断有重要作用, 临床医师要加强对本病的认识, 综合临床表现、生化检验、免疫学及病理改变进行诊断。

董正芳, 程留芳. 原发性胆汁性肝硬化 37 例临床分析. 世界华人消化杂志 2004;12(2):499-501

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/499.asp>

## 0 引言

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis PBC)是一种慢性进行性肝内胆汁淤积性疾病。估计世界范围年发病率为 5.8-15/百万, 且有增多趋势。以往本病在我国较少见, 但近年来逐渐增多。现对本院近 8 a 诊断的 37 例 PBC 患者的临床资料及 16 例肝穿病理资料进行分析, 以加深对该病的认识。

## 1 材料和方法

1.1 材料 1995-07/2003-01 就诊于我院的 PBC 患者 37 例, 诊断符合 2000 年美国肝病学会(AASLD)PBC 指导建议<sup>[1]</sup>。

1.2 方法 检查指标: 患者的性别、年龄、症状、体征、发病或初诊至确诊的时间间隔, 实验室指标包括 ALT、AST、总胆红素(TB)、直接胆红素(DB)、碱性磷酸酶(ALP)、 $\gamma$ -谷氨酰转氨酶( $\gamma$ -GT)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶原时间活动度(PA)、总胆汁酸(TBA)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、白细胞(WBC)、血红蛋白(Hb)、胆固醇(CH)、甘油三酯(TG)等, 免疫学指标包括 AMA 及 AMA- $M_2$  亚型、ANA、IgA、IgG、IgM 等, 及肝穿组织病理学结果。

## 2 结果

2.1 一般结果 1995-07/2003-01 我院共收治原发性胆汁性肝硬化患者 37 例, 男 8 例 (21.62%), 女 29 例 (78.38%)。确诊时年龄 26-80 岁, 平均年龄  $52.16 \pm 12.75$  岁。从出现症状到明确 PBC 诊断的间隔时间为 0.3-678 mo, 平均  $45.44 \pm 112.13$  mo。确诊时无症状者 8 例 (21.62%)。合并干燥综合征 5 例、系统性硬化症 3 例、类风湿关节炎 2 例; 首发症状中前三位分别是瘙痒 7 例 (18.92%), 乏力 6 例 (16.22%), 黄疸 4 例 (10.81%); 临床症状前 3 位分别是黄疸 22 例 (56.76%), 纳差 15 例 (40.54%), 瘙痒 14 例 (37.84%) 等。体征前 3 位分别为脾大 28 例 (75.68%), 贫血 25 例 (67.57%), 黄疸 22 例 (59.46%)。实验室检查指标升高 2 倍以上者:  $\gamma$ -GT 30 例、ALP 22 例、TBA 25 例、AST 21 例、ALT 19 例、TB 16 例、DB 21 例; 19 例 (51.35%) 患者 TG 升高, 29 例患者 (78.38%) IgM 水平升高; 36 例患者 (97.30%) AMA 和 (或) 其  $M_2$  亚型阳性, 1 例患者 AMA 及 AMA- $M_2$  阴性但病理证实为 PBC; 31 例患者 (83.78%) ANA 阳性, 4 例患者抗着丝点抗体阳性, 1 例患者抗胃壁细胞抗体阳性, 1 例患者抗平滑肌抗体阳性, 1 例患者抗板层素抗体阳性; 1 例患者母亲患有结缔组织病。

2.2 实验室检查结果 见表 1。

2.3 病理结果 分析 16 例患者的肝穿病理检查结果: I 期 2 例、II 期 5 例、III 期 5 例、IV 期 4 例, 由于许多患者同时存在相邻各期的病理变化特点, 上述分期以主要病理特点为准。病理分期参照 Scheuer 氏的四期分类法<sup>[2]</sup>。

2.4 随访 除 1 例失访外, 我们对所有患者进行了随访, 平均随访时间  $29.53 \pm 20.21$  mo, 期间有 9 例死亡, 生存期 4-60 mo, 平均  $31.44 \pm 21.82$  mo; 死亡主要原因肝功能衰竭 4 例, 上消化道出血 2 例, 多器官功能衰竭 1 例 (2 次肝移植术后), 继发乙型肝炎病毒感染 1 例 (肝移植术后)。

表1 37例原发性胆汁性肝硬化患者的实验室检查结果

检查指标	实测值范围	平均值	正常值范围	升高倍数
$\gamma$ -GT (IU/L)	24.6-1150.8	392.09 ± 330.21	0-50	7.84
DB ( $\mu$ mol/L)	2.7-280.2	43.25 ± 57.48	0-8.6	5.03
TBA ( $\mu$ mol/L)	7.4-205.7	47.55 ± 47.52	0-10	4.76
TB ( $\mu$ mol/L)	10-417.8	78.38 ± 97.35	0-21	3.73
ALP (IU/L)	57.8-1266.5	395.56 ± 260.44	0-130	3.04
AST (IU/L)	19.9-439.1	108.76 ± 83.39	0-40	2.72
ALT (IU/L)	10.6-379.1	94.99 ± 74.24	0-40	2.37
IgM (mg/dL)	99.9-1650	518.65 ± 326.44	63-277	1.87
CH (mmol/L)	1.97-16.96	6.12 ± 3.12	3.1-5.7	1.07
TP (g/L)	46.6-89.3	70.11 ± 8.26	55-80	正常
TG (mmol/L)	0.25-4.5	1.45 ± 0.86	0.4-1.7	正常
WBC ( $\times 10^9/L$ )	1.4-10.34	4.21 ± 1.95	4-10	正常
PLT ( $\times 10^9/L$ )	48-243	120.76 ± 62.28	100-300	正常
PT(s)	10.1-19.5	12.22 ± 1.97	12-16	正常
PA	0.265-1	0.82 ± 0.16	0.6-1.2	正常
IgA (mg/dL)	128-811	315.10 ± 173.85	69-382	正常
IgG (mg/dL)	187-3270	1601.62 ± 599.36	713-1685	正常
ALB (g/L)	24.5-40.9	32.98 ± 4.23	35-50	降低
Hb (g/L)	66-145	105.16 ± 17.19	120-160	降低

### 3 讨论

PBC是一种慢性进展性疾病,早期诊断存在一定困难.本组患者从起病到明确PBC诊断的间隔时间平均为 $45.44 \pm 112.13$  mo,最长达678 mo.一是由于PBC无症状期较长,患者未能及时就诊;再者由于以往对PBC的认识不够,一部分患者肝硬化的原因不明,在出现肝硬化并发症如食管胃静脉曲张破裂出血就诊时仍未做出PBC诊断.因而认识PBC与其他类型肝硬化的异同,对于早期诊断PBC具有重要的意义.

本研究发现PBC患者 $\gamma$ -GT、TB、DB、TBA、ALP升高明显,其平均升高幅度分别为7、5、4、3、3倍以上.尽管胆红素的平均水平明显高于正常(4倍以上),但40%以上患者无明显黄疸,主要是由于PBC是一种慢性进行性肝内胆汁淤积性疾病,肝内胆汁淤积是肝细胞和胆管细胞对胆汁摄取、转运和排泄功能障碍,以致胆汁成分(如胆汁酸、胆红素、胆固醇)在血液中滞留,因而PBC患者早期即可有血清ALP、GGT及胆固醇水平的明显升高,而黄疸很轻或无黄疸<sup>[3]</sup>,导致生化检查结果与临床症状的不一致.本研究还发现多数PBC患者的WBC、PLT及PT正常.上述特点是PBC患者区别于其他类型的肝硬化如乙型肝炎肝硬化患者的特征性表现,有助于PBC的临床诊断和鉴别诊断.

本组有18.92%的患者合并有干燥综合征,ANA的阳性率为83.78%,以混合型为主,抗着丝点抗体阳性率为10.81%,提示PBC可能与其他多种自身免疫性疾病同时存在,有共同的免疫病理学基础.AMA是诊断PBC

最重要的免疫学指标,阳性率95%以上(本组97.30%),可在PBC患者的临床、生物化学和肝组织病理异常前出现.但是AMA-M<sub>2</sub>阳性也可出现在其他许多疾病.因此要结合临床及生物化学指标和病理特点,并排除肝外胆道系统的因素进行诊断<sup>[4]</sup>.

本组16例患者的肝穿大多具有PBC特征性病理改变(13例),如胆管细胞损伤、胆管增生、淋巴细胞浸润、局灶肝细胞坏死、胆汁淤积、肉芽肿形成等.有文献报告组织学损伤的程度与典型症状的程度和生化指标的异常具有一致性<sup>[5]</sup>,但在我们的研究中未能发现此相关性.因而肝穿活检对于诊断PBC,明确肝脏损伤程度具有重要意义.

PBC的治疗目前以对症治疗为主,只有肝移植可以治愈此病<sup>[6-8]</sup>.许多研究表明,药物治疗方面应用熊去氧胆酸UCDA(每天13-15 mg/kg)可以有效地改善生化指标,延缓肝病的进展<sup>[9-11]</sup>,而且应早期应用<sup>[12-13]</sup>.2002年国际Cochrane肝胆组织Glued et al<sup>[14]</sup>对16篇随机临床试验资料的1422例病例应用UCDA治疗PBC分析,结果显示口服UCDA,每天8-15 mg/kg,连续3 mo以上,能改善患者的瘙痒、乏力、自身免疫状况、生活质量、肝组织学病变及门静脉高压情况;也能减少腹水、黄疸和ALP、GGT水平.本组21例患者应用此药,血清ALP及胆红素均有所下降,乏力及皮肤瘙痒有所改善.但亦有认为已发表的随机对照试验并不能证明UCDA治疗PBC的效果<sup>[15]</sup>.其他药物如糖皮质激素或免疫抑制剂疗效有限<sup>[16]</sup>.

### 4 参考文献

- 1 Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American association for the study of liver diseases practice guideline. *Hepatology* 2000;31:1005-1013
- 2 叶维法,钟振义. 临床肝胆病学. 第2版. 天津:天津科学技术出版社,1998:814-816
- 3 Zhang F, Jia J, Wang B, Qian L, Yin S, Wang Y, Cui Y, You H, Ma H, Wang H, Zhang C. Clinical characteristics of primary biliary cirrhosis: a report of 45 cases. *Zhonghua Neike Zazhi* 2002;41:163-167
- 4 Chen G, Li L, Gao J, Li F, Li B. Primary biliary cirrhosis: an analysis of 153 cases. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:1625-1628
- 5 Poupin R, Chazouilleres O, Balkau B, Poupon RE. Clinical and biochemical expression of the histopathological lesions of primary biliary cirrhosis. UCDC-PBC group. *J Hepatol* 1999;30:408-412
- 6 Nishio A, Bass NM, Luketic VA, Coppel RL, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis: from induction to destruction. *Semin Gastrointest Dis* 2001;12:89-102
- 7 Scholmerich J. Treatment of cholestasis. *Rev Gastroenterol Peru* 1999;19:221-229
- 8 MacQuillan GC, Neuberger J. Liver transplantation for primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2003;7:941-956
- 9 Poupon RE, Lindor KD, Pares A, Chazouilleres O, Poupon R, Heathcote EJ. Combined analysis of the effect of treatment with ursodeoxycholic acid on histologic progression in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2003;39:12-16
- 10 Yao D, Xie W, Wang L. Clinical analysis of 22 patients with primary biliary cirrhosis. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2002;10:344-345
- 11 Marschall HU, Broome U, Einarsson C, Alvelius G, Thomas

- HG, Matern S. Ursodeoxycholic acid: metabolism and therapeutic effects in primary biliary cirrhosis. *J Lipid Res* 2001;42:735-742
- 12 Nakashima T, Yoh T, Sumida Y, Kakisaka Y, Mitsuyoshi H. Differences in the efficacy of ursodeoxycholic acid and bile acid metabolism between viral liver diseases and primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:541-547
- 13 Hempfling W, Grunhage F, Dilger K, Reichel C, Beuers U, Sauerbruch T. Pharmacokinetics and pharmacodynamic action of budesonide in early- and late-stage primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2003;38:196-202
- 14 Glud C, Christensen E. Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2002;CD000551
- 15 Goulis J, Leandro G, Burroughs AK. Randomised controlled trials of ursodeoxycholic-acid therapy for primary biliary cirrhosis: a meta-analysis. *Lancet* 1999;354:1053-1060
- 16 Suzuki A, Van de Water J, Gershwin ME, Jorgensen R, Angulo P, Lindor K. Oral tolerance and pyruvate dehydrogenase in patients with primary biliary cirrhosis. *Dev Immunol* 2002;9:55-61

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

• 临床经验 •

## 射频消融联合局部热化疗治疗特殊部位肝脏恶性肿瘤

田伏洲, 陈涛, 蔡忠红, 陈琪

田伏洲, 陈涛, 蔡忠红, 陈琪, 中国人民解放军成都军区总医院全军普通外科中心 四川省成都市 610083  
项目负责人: 田伏洲, 610083, 四川省成都市, 中国人民解放军成都军区总医院全军普通外科中心.  
电话: 028-86570351  
收稿日期: 2003-08-23 接受日期: 2003-12-06

### 摘要

目的: 研究B超引导射频消融(radiofrequency ablation, RFA)联合局部热化疗治疗特殊部位肝脏肿瘤的安全性及疗效。

方法: 采用B超引导射频消融联合局部热化疗治疗49例肝脏肿瘤患者, 其中原发性肝癌38例, 转移性肝脏肿瘤11例。治疗后随访血清学及影像学改变综合判断疗效。

结果: 术后1 mo患者AFP由 $573 \pm 51$  ng/mL降至 $91 \pm 27$  ng/mL ( $P < 0.01$ ), 术后2 mo肿瘤直径由 $8.3 \pm 1.1$  cm缩小至 $3.9 \pm 0.8$  cm ( $P < 0.05$ ); 术后随访1 a患者生存率93.9%。

结论: B超引导射频消融联合局部热化疗对于特殊部位的肝脏肿瘤是一种安全有效的微创治疗方法。

田伏洲, 陈涛, 蔡忠红, 陈琪. 射频消融联合局部热化疗治疗特殊部位肝脏恶性肿瘤. *世界华人消化杂志* 2004;12(2):501-503  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/501.asp>

### 0 引言

肝脏肿瘤是我国十分常见的恶性肿瘤, 也是肿瘤患者常见的致死原因, 其发病率有不断上升趋势。射频消融(radiofrequency ablation, RFA)代替手术切除治疗在我国推广已有4 a, 临床实践证明本疗法具有创伤小、痛苦轻, 易于反复多次治疗, 疗效不亚于手术切除等优点。我院自1999-10以来, 共用本法治疗各类肝脏肿瘤患者181例。在治疗过程中曾遇到部分患者肿瘤位置特殊, 直接进行射频治疗易损伤胆管或重要血管。对于此

种情况, 我们采用联合局部热化疗的方法治疗了49例肝脏肿瘤患者, 疗效较好, 现报告如下:

### 1 材料和方法

1.1 材料 1999-10/2002-1, 采用B超引导经皮射频消融治疗肝脏肿瘤181例, 共879个病灶。其中49例83个病灶因肿瘤位置特殊治疗困难并有潜在危险, 因而采取了射频消融联合局部热化疗方法进行治疗。其中男39例, 女10例, 平均47.1岁(21-72岁)。肝细胞性肝癌38例(77.6%), 转移性肝脏肿瘤11例(22.4%), 其中7例来源于结、直肠, 2例为胆管癌肝内转移, 2例为平滑肌肉瘤肝内转移。38例肝细胞癌中, AFP > 400 ng/mL者26例(68.4%); 10例为切除术后复发; 27例伴有肝硬化, 肝脏功能Child A级11例, Child B级29例, Child C级9例, 合并黄疸、腹水者12例; 合并肺转移2例。49例患者均有AFP和/或病理诊断。共治疗肿瘤结节83个, 患者于接受治疗前行CT检查确定肿瘤结节的位置, 测量其三维直径, 肿瘤结节直径2.1-21.3 cm, 平均 $8.3 \pm 1.1$  cm。治疗后定期随访进行血清学检测及CT检查。适应症及禁忌证: 适应症: 因肿瘤位置特殊而不适于进行手术切除及单纯射频治疗危险较大者。这些特殊位置包括: (1)左肝和/或右肝巨大肿瘤, 其内缘紧贴肝门胆管及门静脉, 共17例19个病灶; (2)肝中叶IV、V段肿瘤, 其下缘紧贴左右肝管分叉处并有胆管受压表现, 共9例21个病灶; (3)肿瘤位于两支主要肝静脉之间紧贴静脉壁, 共10例19个病灶; (4)肿瘤位于第二肝门处紧贴腔静脉, 射频针易损伤腔静脉, 共8例16个病灶; (5)I段即尾状叶肿瘤, 肿瘤前方靠近门静脉, 后方靠近腔静脉, 共4例4个病灶; (6)肿瘤一侧靠近胆囊壁, 单纯射频治疗易导致胆囊穿孔, 共1例4个病灶。禁忌证: 重度黄疸、腹水者; 严重肝肾功能损害者; 巨大肝癌或弥漫性肝癌者;

门静脉主干癌栓形成者.射频消融治疗系统组成:采用美国Radio Therapeutics公司生产的RF2000射频消融治疗系统,500 kHz单极向射频发生器,功率0-100 W连续可调.15GLeVeen针式电极,15 cm长,含10个展开呈弧形伞状的小电极,可在B超或CT引导下穿刺进入肿瘤后展开,展开最大直径3.5 cm,消融范围呈球状,消融最大直径5 cm.HitachiUB450 B超仪,5 MHz线阵探头引导穿刺.

1.2 方法 治疗前先以B超定位,选取最佳穿刺点,局麻后以22G穿刺针在B超引导下定位穿刺至肿瘤底部与周围重要结构交界处边缘缓慢推注化疗药物阿霉素20 mg及丝裂霉素8-20 mg.注药过程中调整穿刺针位置及方向,以尽量使肿瘤外围生发层有化疗药物均匀浸润.注药完毕后将穿刺点皮肤作一1 cm小切口,避免RFA治疗过程中皮肤灼伤.以B超引导,将LeVeen针式电极定位穿刺至肿瘤并展开后开始RFA治疗.对直径小于3.5 cm的肿瘤,可将电极置入肿瘤中心部位一次完成治疗;对于较大的肿瘤,右肝占位以肋间隙为分层标志,左肝以一定的层间距,均从边缘起,将肿瘤分层“切割”治疗.层内用放射状穿刺或多点穿刺,由深部起治疗,渐向浅部退针,每一治疗点间距、针道间距及层间距不超过3 cm,以保证覆盖全部治疗区域无遗漏.如此反复进行至拟治疗区域全部消融.治疗时RF起始能量为30 W,每隔2 min上调10 W,最高至90 W,其治疗中心温度可达90-110 °C,作用范围直径约4-5 cm.持续治疗后组织发生凝固性坏死,阻抗升高,功率则自动降低.阻抗升至最高后功率降至最低,说明组织已彻底固化消融.在治疗过程中采用B超实时监测治疗区域组织变化,凝固坏死后的组织由于水分气化产生大量微气泡,在超声上表现为极强回声,后方可伴有声影,以B超极强回声团作为治疗区域的范围估计指征.

统计学处理 t 检验,数据以 mean±SD 表示.

## 2 结果

治疗后患者症状均有不同程度缓解,表现为肝区疼痛减轻或消失(38例,77.6%);患者纳差、乏力等症状缓解,精神状态好转,体重增加(32例,65.3%).

射频消融治疗的结果是治疗区域发生凝固性坏死,肿瘤体积缩小较为缓慢,须定期随访做CT/MRI检查及血清学检测,结合临床判断疗效.(1)AFP变化:在AFP升高的26例患者中,17例转阴(65.4%),7例AFP明显降低,<400 ng/mL(26.9%),2例AFP无明显降低(7.7%).AFP均值由术前的 $573 \pm 51$  ng/mL降至术后1 mo的 $91 \pm 27$  ng/mL( $t=8.19$ ,  $P<0.01$ ). (2)影像学变化: B超主要应用于治疗时定向引导,由于治疗过程中组织气化产生气泡,B超实时监测可见治疗区产生一极强回声团,但在治疗结束后15 min-24 h,由于气体吸收,这种强回声可完全消失,故超声不能用于判断疗效.术后7 d,CT增强造影可见治疗区为边缘清晰锐利的低

密度区,瘤灶内无强化,与周围正常肝脏组织分界明显,增强扫描的延迟图像可以区分固化坏死及残留肿瘤组织.2 wk后CT可见治疗区中心少量液化,肿瘤体积缓慢缩小.至术后2 mo,肿瘤平均直径由术前的 $8.3 \pm 1.1$  cm缩小至 $3.9 \pm 0.8$  cm( $t=3.38$ ,  $P<0.05$ ).本组无手术死亡,随访1 a患者生存率93.9%,术后1 a内死亡3例,均为晚期肝癌伴门静脉癌栓、广泛肺转移,术后1 a内死于多器官功能衰竭.随访过程中3例患者CT发现局部残留肿瘤组织生长,予再次RFA治疗彻底消融.

治疗过程中患者有不同程度治疗区胀痛感觉,少数患者有肩背部放射痛,以治疗区靠近肝脏包膜及肝门区者痛感较为明显,多数患者耐受良好,少数疼痛明显无法耐受者,改为硬膜外麻醉下进行.治疗后5例患者出现转氨酶升高,7例患者出现轻度黄疸,2例患者出现少量腹水,均为一过性,保守治疗后缓解.1例患者出现术后胆漏,经置管引流3 wk后治愈.

## 3 讨论

临床所见肝脏肿瘤多为晚期,或由于肿瘤的位置、侵犯重要脏器及血管以及患者肝脏储备功能无法耐受手术等原因,而无法进行手术切除.因此近年来射频技术在肿瘤的临床治疗上得到了广泛应用.目前临床常用射频容性加热方法,其作用原理既有生物组织中离子传导电流产生焦耳热的因素,也有生物组织在高频电场中因介电损耗而产生热的作用<sup>[1]</sup>.以往采用的单电极射频治疗由于射频的穿透能力差,组织温度随距电极的距离增加而迅速降低,因而治疗范围非常有限<sup>[2]</sup>.因此LeVeen针式电极采用了多电极设置,电极的形状制成弧形伞状以适应肿瘤的大体形状.当LeVeen针式电极到达靶点展开后,10枚小电极各自产生一个球形治疗区域,并相互叠加产生一个直径约5 cm的较大的治疗区域,从而有效地扩大了治疗范围.

在影响RFA疗效的因素中,肿瘤的位置是至关重要的.本组49例的共同特点是肿瘤与肝内外重要的解剖结构如大的胆管、门静脉、肝静脉主干、下腔静脉及胆囊等紧密相贴,造成RFA进退两难的局面:对于靠近大血管的肿瘤组织,由于热量随快速流动的血液迅速散失,因而难以持续达到有效的治疗温度,也影响疗效<sup>[3]</sup>;若射频针头太靠近危险区域,则容易穿透血管;对于靠近胆囊、胆管或肝门部的肿瘤,治疗时产生的高温也容易对胆道系统造成损伤;若射频针头过于远离危险区域,可以保证治疗安全,但却容易造成治疗不彻底导致术后复发.这就造成了RFA治疗进退两难的局面.对此类患者,在RFA治疗前局部注射化疗药物,一方面可以利用注射入肿瘤组织内的液体作为递质将热量向远处传递以扩大治疗范围,这与有些研究者利用注射生理盐水作为导热递质避免组织炭化扩大治疗范围的原理是一样的<sup>[4-5]</sup>.另一方面,由于加热后细胞膜流动性及通透性的变化,肿瘤细胞对化疗药物的摄取增加,可

延长药物在肿瘤组织内的滞留时间,并增加肿瘤对化疗药物的敏感性,可以有效增强化疗药物对肿瘤外围增生活跃的生发层细胞的细胞毒作用,从而达到改善疗效的作用,同时可以减少化疗药物的用量,减轻其毒副作用<sup>[6]</sup>。此外,丝裂霉素可以阻止热耐受现象的发生,而阿霉素能够使大量细胞停滞于对热最敏感的S期<sup>[7]</sup>,从而发挥了对热疗的增效作用。本组患者治疗后肿瘤直径明显缩小,AFP显著降低,并发症较少,近期疗效较为满意。本组3例复发患者肿瘤都位于右后叶上段,靠近膈顶,部分肿瘤组织为肺气所掩盖而成为B超的盲区,在B超引导下难以准确充分完成治疗,因而造成术后残瘤生长。其后对此类患者,我们采用CT引导下治疗,有效解决了B超盲区的问题,疗效满意。RFA治疗的并发症据文献报道有出血、胸腔积液、膈肌损伤、肠瘘等<sup>[8]</sup>,本组患者仅少数发生一过性转氨酶升高、轻度黄疸、少量腹水,经保守治疗后缓解,仅1例发生术后胆漏,经置管引流后治愈。因此我们认为,在有经验的B超医师配合下进行RFA联合局部热化疗是安全有效的。

射频消融联合局部热化疗对患者损伤小,疗效确切,患者更易耐受,适应证广,是一种近期疗效较好的安全有效的肝癌微创治疗方法,特别对于特殊位置的

肝脏肿瘤更有其优越性,其远期疗效正在观察之中。

#### 4 参考文献

- 1 万柏坤,林世寅. 射频加温方法. 林世寅,李瑞英主编. 现代肿瘤热疗学. 第1版. 北京:学苑出版社,1997:120-121
- 2 McGahan JP, Browning PD, Brock JM, Tesluk H. Hepatic ablation using radiofrequency electrocautery. *Invest Radiol* 1990; 25:267-270
- 3 Jiao LR, Hansen PD, Havlik R, Mitry RR, Pignatelli M, Habib N. Clinical short term results of radiofrequency ablation in primary and secondary liver tumors. *Am J Surg* 1999;177: 303-306
- 4 Miao Y, Ni Y, Mulier S, Wang K, Hoey MF, Mulier P, Penninckx F, Yu J, De Scheerder I, Baert AL, Marchal G. Ex vivo experiment on radio-frequency liver ablation with saline infusion through a screw-tip cannulated electrode. *J Surg Res* 1997;71:19-24
- 5 Livraghi T, Goldberg SN, Monti F, Bizzini A, Lazzaroni S, Meloni F, Pellicano S, Solbiati L, Gazelle GS. Saline-enhanced radiofrequency tissue ablation in the treatment of liver metastases. *Radiology* 1997;202:205-210
- 6 Huang SK, Stuauffer PR, Hong K, Guo JW, Phillips TL, Huang A, Papahadjopoul os D. Liposomes and hyperthermia in mice: increased tumor uptake and therapeutic efficacy of doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Cancer Res* 1994;54: 2186-2191
- 7 Valdagni R. International consensus meeting on hyperthermia: final report. *Int J Hyperthermia* 1990;6:839-877
- 8 Curley SA, Izzo F, Delrio P, Ellis LM, Granchi J, Vallone P, Fiore F, Pignata S, Daniele B, Cremona F. Radiofrequency ablation of unresectable primary and metastatic hepatic malignancies: results in 123 patients. *Ann Surg* 1999;230:1-8

## 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎 7a 1 例

冯莉娟,张桂英,陈凤英,晏仲舒

冯莉娟,张桂英,陈凤英,中南大学湘雅医院消化科 湖南省长沙市 410008  
晏仲舒,中南大学湘雅医院普外科 湖南省长沙市 410008  
项目负责人:冯莉娟,410008,湖南省长沙市,中南大学湘雅医院消化科.  
电话:0731-4327106  
收稿日期:2003-08-07 接受日期:2003-12-06

冯莉娟,张桂英,陈凤英,晏仲舒. 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎 7a 1 例. 世界华人消化杂志 2004;12(2):503-504  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/503.asp>

### 摘要

目的:报告1例卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7a病例,分析误诊原因,以引起临床医生注意。

方法:全面回顾该患者临床、化验、及检查的病历资料,诊疗过程、术中情况和手术后病理诊断。

结果:临床资料、术中情况和手术后病理证实该患者为卵巢巨大巧克力囊肿。

结论:遇到原因不明的女性血性腹水患者,即使无痛经史,排除其他原因所致腹水,不能忽视卵巢巧克力囊肿的诊断。

### 1 病例报告

患者,女,32岁。1996年体检发现少量腹水,1998年体检发现大量腹水,略腹胀,先后就诊于6家大医院,均诊断为“结核性腹膜炎”,先后联合规则抗痨治疗4疗程,每疗程9mo,腹水未完全消退。腹水由草黄色转为淡红,最后为咖啡色。既往14岁因“肠梗阻”手术治疗。月经正常,无痛经。查体:一般情况可,浅淋巴结不大。心肺正常,腹部略膨隆,无静脉曲张,腹部柔软,移动性浊音阳性,其余无异常。三大常规、血沉、血CA<sub>125</sub>、腹水CEA正常,结核抗体阴性,PPD皮试(++),腹水常规呈棕褐色,红细胞为主的渗出液。腹水CA<sub>125</sub>>1178u/mL,腹水病理检查多次未见癌细胞。全消化道钡餐和结肠镜

检查未见异常. 妇科B超: 右侧卵巢探及不满意, 腹部见大量液性暗区, 上方至肋缘, 两边至双侧腋前线, 下至子宫后上方. 液性暗区上部分离, 在脐下迎合呈“U”形, 有包膜, 将肠管推向其外. 放腹水2000 mL后做腹部B超: 腹膜无增厚, 腹腔淋巴结不大, 腹盆腔探及巨大囊性暗区, 左侧到达脾肾隐窝, 右侧到达肝肾隐窝. 行剖腹探查, 手术中见肿块位于下腹部及盆腔, 囊肿与双侧卵巢、输卵管、回肠末端粘连紧密. 术后诊断: 卵巢巧克力囊肿. 术后病理诊断: 见纤维囊壁, 囊上有明显出血, 纤维增生, 有少数含铁血黄素沉着, 见可疑子宫内膜腺体, 符合巧克力囊肿.

## 2 讨论

CA<sub>125</sub>是一种来源于体腔上皮细胞的表面抗原, 主要存在于子宫内膜、宫颈上皮、输卵管、胸膜、腹膜及心包膜细胞上. 卵巢肿瘤、子宫内膜异位症、盆腔炎、结核性腹膜炎、肝硬化等疾病均可使体液中CA<sub>125</sub>升高<sup>[1]</sup>. 此患者巧克力囊肿巨大, 体积远远超过一般巧克力囊

肿, 且无痛经, 是造成临床误诊的主要原因. 一般卵巢巨大囊肿与腹水的鉴别是卵巢巨大囊肿位于下腹正中, 腹部形态为尖腹, 叩诊中间为浊音, 两边为鼓音, 无移动性浊音. 而该患者卵巢巨大囊肿呈“U”形, 移动性浊音阳性, 囊液颜色从草黄色变为淡红, 最后变为棕褐色也是本病例的特殊之处. 该患者误诊为结核性腹膜炎7a之久, 主要是囊肿巨大且与腹腔粘连紧密, 将囊肿液误诊为腹水, 将囊肿误认为整个腹腔而多次误诊. 但透过现象看本质, 患者反复多次正规抗痨治疗无效, 且病程7a腹部无揉面感, 腹膜不增厚, 腹腔淋巴结无肿大, 且患者虽大量腹水却无结核中毒症状, 血沉不快, 均不支持结核性腹膜炎的诊断. 今后若遇到原因不明的女性血性腹水患者, 即使无痛经史, 排除引起腹水的其他情况, 也应考虑到卵巢巧克力囊肿的可能.

## 3 参考文献

- 1 李华军, 沈铿, 朗景和, 吴鸣, 黄惠芳, 潘凌亚. 卵巢良性肿块伴腹水和血清CA<sub>125</sub>升高的临床分析 - 附三例报告. 中华妇产科杂志 2003;38:147-149

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

• 答读者问 •

## 如何订购《世界华人消化杂志》?

### 1 如何订购2004年《世界华人消化杂志》?

答:《世界华人消化杂志》由北京报刊发行局公开发售, 邮发代号82-262. 订购2004年《世界华人消化杂志》, 请在邮局办理订阅事宜.

### 2 2004年《世界华人消化杂志》的订阅价格是多少?

答:《世界华人消化杂志》2004年为月刊, 单价24.00元/期, 全年12期, 共计288.00元(含邮资).

### 3 错过邮局征订时间, 如何补订《世界华人消化杂志》?

如错过邮局征订时间, 您可直接向编辑部联系办理邮购、补订手续.

### 4 购买历年《世界华人消化杂志》应该如何办理?

答:《世界华人消化杂志》1993年创刊至2002年, 存有少量的精装合订本. 如您需订购, 请参阅下表, 选择您所需要的《世界华人消化杂志》合订本.

### 5 如何办理汇款手续?

答: 请按以下详细地址办理邮局汇款:

邮政编码: 100023

收款人地址: 北京市2345信箱

收款人姓名: 世界胃肠病学杂志社发行部

电话: 010-85381892

附:《世界华人消化杂志》订单

订刊目录	期数	单价	订数	合计金额
《新消化病学杂志》1993年合订本	1-4期	120.00元/套		
《新消化病学杂志》1994年合订本	1-4期	120.00元/套		
《新消化病学杂志》1995年合订本	1-4期	120.00元/套		
《新消化病学杂志》1996年合订本	1-12期	340.00元/套		
《新消化病学杂志》1997年合订本	1-12期	350.00元/套		
《华人消化杂志》1998合订本	1-12期	350.00元/套		
《世界华人消化杂志》1999年合订本	1-12期	350.00元/套		
《世界华人消化杂志》2000年合订本	1-12期	350.00元/套		
《世界华人消化杂志》2001年合订本	1-12期	350.00元/套		
《世界华人消化杂志》2002年合订本	1-12期	350.00元/套		
《世界华人消化杂志》2003年合订本	1-12期	350.00元/套		
《华人消化杂志》1998年特刊号	特刊6号	34.00元		
《世界华人消化杂志》2004年(月刊)	1-12期	288.00元/期		

### 6 订刊时我还需注意什么?

答: 特别要提醒的是, 请将您所需订购年份的期刊及数量在汇款单附言栏写清楚, 并将您的邮政编码、收件人地址、收件人姓名工整、清晰书写清楚, 以便我部及时正确的邮寄给您.



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**  
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,  
CA 94588, USA  
Fax: +1-925-223-8242  
Telephone: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

